



**HAL**  
open science

# Impact de l'insaturation membranaire sur la voie d'internalisation du récepteur dopaminergique de type 2

Rim Baccouch

## ► To cite this version:

Rim Baccouch. Impact de l'insaturation membranaire sur la voie d'internalisation du récepteur dopaminergique de type 2. Chimie thérapeutique. Université de Bordeaux, 2022. Français. NNT : 2022BORD0054 . tel-03763513

**HAL Id: tel-03763513**

**<https://theses.hal.science/tel-03763513v1>**

Submitted on 29 Aug 2022

**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  
POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR DE  
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

SPÉCIALITÉ : Chimie et technologie pour le vivant

Par :

**Rim BACCOUCH**

**Impact de l'insaturation membranaire sur la voie  
d'internalisation du récepteur dopaminergique de type 2**

**Sous la direction de : Isabel ALVES et Pierre TRIFILIEFF**

Soutenue le 11 Mars 2022 :

**Membres du jury :**

Mme. Pascale Crépieux	Directrice de Recherche, CNRS, Tours	Rapportrice
M. Emmanuel Margeat	Directeur de Recherche, CNRS, Montpellier	Rapporteur
Mme. Isabelle Mus-Veteau	Directrice de recherche, CNRS, Nice	Examinatrice
M. Sébastien Mongrand	Directeur de Recherche, CNRS, Bordeaux	Examinateur
Mme. Alves Isabel	Directrice de Recherche, CNRS, Bordeaux	Directrice de thèse
M. Pierre Trifilieff	Directeur de Recherche, INRAE, Bordeaux	Directeur de thèse
M. David Perrais	Directeur de Recherche, CNRS, Bordeaux	Membre invité
M. Thierry Durroux	Directeur de Recherche, CNRS, Montpellier	Membre invité

## Résumé :

Le récepteur dopaminergique de type D2 (RD2) est un récepteur couplé à une protéine G (RCPG) majoritairement exprimé au niveau du système nerveux central où il est largement impliqué dans le contrôle de plusieurs fonctions cérébrales, dont la motivation, la cognition et la motricité fine. Des dérégulations des voies de signalisation médiées par le RD2 semblent être impliquées dans le développement de plusieurs pathologies psychiatriques telles que la dépression, les troubles bipolaires ou la schizophrénie. Bien que très différents, ces troubles ont notamment en commun une altération du métabolisme lipidique entraînant une diminution significative des taux en acides gras polyinsaturés (AGPI). Malgré le fait que plusieurs études cliniques ont rapporté le potentiel thérapeutique d'une supplémentation en AGPI pour la réduction voire la prévention de certains symptômes psychiatriques, le rôle des AGPI dans l'altération de la transmission dopaminergique et dans la genèse de certaines maladies psychiatriques demeure inconnu. Ainsi, l'hypothèse émise par notre équipe est que la composition en AGPI des membranes neuronales exprimant le RD2 pourrait influencer sur les mécanismes de neurotransmission via une action directe sur la pharmacologie, la signalisation intracellulaire ainsi que l'internalisation de ce récepteur. Dans ce contexte, l'objectif de ce projet de thèse était d'évaluer l'impact des AGPI membranaires sur la voie d'internalisation du RD2. Ceci a été étudié par une approche *in cellulo* basée sur l'utilisation d'un système cellulaire, enrichi en AGPI d'intérêt, exprimant le RD2 humain ainsi que toutes les protéines nécessaires pour mimer sa voie d'internalisation. La réalisation d'analyses lipidomiques nous a permis, dans un premier temps, de nous assurer de l'augmentation de la teneur en AGPI dans les membranes totales des cellules enrichies. Ensuite, l'imagerie Raman a permis d'identifier la distribution cellulaire des acides gras d'intérêt. L'utilisation de cette approche cellulaire ainsi que des techniques complémentaires, la microscopie confocale et le transfert d'énergie en temps résolu, a révélé une corrélation entre le taux d'insaturation membranaire et la voie d'internalisation du RD2. D'une manière intéressante, cette corrélation n'était pas observable pour un autre RCPG de la même classe, le récepteur  $\beta$ 2-adrénergique, ou en modulant le taux des acides gras saturés (AGS) membranaires. Dans un dernier temps, la microscopie TIRF a été utilisée pour élucider l'impact de l'enrichissement membranaire en AGPI sur le trafic membranaire du RD2 ainsi que sur le recrutement membranaire d'une protéine cytosolique, la  $\beta$ -arrestine, indispensable pour l'initiation de l'internalisation du RD2.

Cette étude a mis en évidence une altération significative au niveau du recrutement de cette protéine cytosolique. Ainsi, cette observation suggère l'existence d'un lien causal entre le taux d'insaturation membranaire, le recrutement de la  $\beta$ -arrestine et l'internalisation du RD2. Nos données sont très prometteuses pour l'identification du rôle des AGPI dans la genèse des maladies psychiatriques.

**Mots clés** : RCPG, RD2, désordres psychiatriques, AGPI, AGS



## Abstract:

The dopamine receptor type 2 (D2R) is a G protein-coupled receptor (GPCR) specifically expressed in the central nervous system where it is largely involved in the control of several brain functions, including motivation, cognition or motor activity. Deregulations of the signaling pathways mediated by this receptor seem to be involved in the development of several psychiatric disorders such as depression, bipolar disorders, or schizophrenia. Despite their diversity, these disorders are accompanied by imbalances in lipid metabolism leading to a significant decrease in polyunsaturated fatty acid (PUFAs) levels. Although several clinical studies have reported the therapeutic potential of PUFAs supplementation for the reduction or prevention of certain psychiatric symptoms, the role of PUFAs in the alteration of dopaminergic transmission and the genesis of certain psychiatric diseases remains unknown. Thus, the hypothesis of this work is that PUFAs content in neuronal membranes expressing the D2R could influence the mechanisms of neurotransmission via a direct action on the pharmacology, the intracellular signaling, and the internalization of this receptor. In this context, the objective of this project was to evaluate the impact of membrane PUFAs on D2R internalization pathway. To unravel this, the receptor as well as all the proteins necessary to allow its internalization pathway have been expressed in mammalian cell system whose membrane PUFA composition has been enriched in a controlled manner. Lipidomic analysis confirmed the increase of PUFA content in total membranes of enriched cells. Then, Raman micro-spectroscopy was applied to determine the cellular distribution of exogenous fatty acid.

Complementary techniques, confocal microscopy and time-resolved energy transfer, revealed a correlation between the membrane unsaturation level and D2R internalization efficacy. Interestingly, this correlation was not observed for another GPCR, the  $\beta$ 2-adrenergic receptor, or by modulating the level of membrane saturated fatty acids (SFAs). Finally, TIRF microscopy was used to elucidate the impact of membrane lipid polyunsaturation on D2R membrane trafficking and  $\beta$ -arrestin recruitment, crucial for the initiation of D2R internalization. This study revealed a significant alteration in  $\beta$ -arrestin recruitment suggesting a causal link between membrane PUFAs level,  $\beta$ -arrestin recruitment, and D2R internalization. Thus, our data hold great promise for identifying the role of PUFAs in the genesis of psychiatric diseases.

**Keywords:** GPCRs, D2R, psychiatric disorders, PUFA, SFA

## Valorisation des travaux de thèse

### Article et Revue :

- **Rim Baccouch**, Silvia Sposini, Véronique De Smedt-Peyrusse, Joyce Heuinck, Thierry Durroux, Pierre Trifilieff, David Perrais, Isabel Alves, **The impact of membrane lipid poly-unsaturation on dopamine D2 receptor internalization**, **en cours de préparation**
- **Rim Baccouch**, Estelle Rascoll, Isabel Alves, **The role of the lipid environment in the activity of G protein coupled receptor**, **Biophysical Chemistry Journal**
- Marie-Lise Jobin, Véronique De Smedt-Peyrusse\*, Fabien Ducrocq, Asma Oummadi, **Rim Baccouch**, Maria Hauge Pedersen, Brian Medel-Lacruz, Sébastien Mongrand5, Jana Selent, Tarson Tolentino-Cortez, Gabriel Barreda-Gómez, Stéphane Grégoire, Elodie Masson, Thierry Durroux, Jonathan A. Javitch, Ramon Guixà-González, Isabel D. Alves, Pierre Trifilieff, **Impact of membrane lipid poly-unsaturation on dopamine D2 receptor ligand binding and signaling**, **soumis dans Molecular Psychiatry**
- Pierre Calmet , Christophe Cullin , Sandra Cortès , Maylou Vang , Nada Caudy , **Rim Baccouch** , Jean Dessolin, Nada Taib Maamar , Sophie Lecomte , Bruno Tillier , Isabel D Alves, **Cholesterol impacts chemokine CCR5 receptor ligand-binding activity**, **FEBS JOURNAL**

### Congrès et journée scientifique

#### ➤ Posters :

- **Rim Baccouch**, Véronique De Smedt-Peyrusse, Joyce Heuinck, Thierry Durroux, Pierre Trifilieff, Isabel Alves, **The impact of membrane lipid poly-unsaturation on dopamine D2 receptor signaling pathway**, **Symposium des jeunes chercheurs en Novembre 2018 : prix de la meilleure présentation par affiche**

- **Rim Baccouch**, Véronique De Smedt-Peyrusse, Joyce Heuinck, Thierry Durroux, Pierre Trifilieff, Isabel Alves, **The impact of membrane lipid poly-unsaturation on dopamine D2 receptor internalization**, **Congrès Club Exocytosis-Endocytosis et le groupe d'étude des membranes (GEM) en Avril 2019**
  - **Rim Baccouch**, Silvia Sposini, Véronique De Smedt-Peyrusse, Joyce Heuinck, Thierry Durroux, Pierre Trifilieff, David Perrais, Isabel Alves, **The impact of membrane lipid poly-unsaturation on dopamine D2 receptor internalization**, **Congrès ERNEST-GPCR en Octobre 2019**
- Présentations orales :
- **Rim Baccouch**, Silvia Sposini, Véronique De Smedt-Peyrusse, Joyce Heuinck, Thierry Durroux, Pierre Trifilieff, David Perrais, Isabel Alves, **The impact of membrane lipid poly-unsaturation on dopamine D2 receptor internalization**, **Congrès GEM-SFB en Septembre 2021 : prix de la meilleure présentation orale**
  - **Rim Baccouch**, Silvia Sposini, Véronique De Smedt-Peyrusse, Joyce Heuinck, Thierry Durroux, Pierre Trifilieff, David Perrais, Isabel Alves, **The impact of membrane lipid poly-unsaturation on dopamine D2 receptor internalization**, **journée scientifique du CBMN en Septembre 2021**

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury de thèse de m'avoir fait l'honneur d'évaluer ce travail, mes remerciements s'adressent au **Dr Pascale Crépieux** et au **Dr Emmanuel Margeat** pour leur rôle de rapporteur ainsi qu'aux **Dr Isabelle Mus-Veteau** et **Dr Sébastien Mongrand** d'avoir accepté d'assurer le rôle d'examineur.

Je remercie également la directrice de mon laboratoire d'accueil, le **Dr Sophie Lecomte**, de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Je souhaite évidemment remercier tout particulièrement mes directeurs de thèse le **Dr. Isabel Alves** et le **Dr. Pierre Trifilieff**. Je me sens très privilégiée d'avoir pu poursuivre mes études doctorales à vos côtés.

**Isabel**, ta passion pour la recherche et ta soif de partage font de toi une directrice exceptionnelle. Merci infiniment pour ta disponibilité quotidienne ! Merci pour ton soutien, pour toutes les discussions que nous avons eues, scientifiques et autres. Ce fut un réel plaisir de travailler avec toi toujours dans la joie et la bonne humeur.

**Pierre**, j'ai énormément appris de nos rencontres et de nos discussions pendant lesquelles tu m'as transmis les connaissances mais aussi les outils de la pensée qui m'ont permis de me construire scientifiquement, merci pour ton enthousiasme et ta disponibilité. Ton exigence et ta rigueur accompagnées de ta bonne humeur resteront un exemple pour moi.

**Isabel** et **Pierre**, je vous remercie énormément pour votre réactivité et vos retours très encourageants pendant la rédaction !

Je n'oublie pas de remercier **Véronique De Smedt Peyrusse** qui fut la première à me faire découvrir et m'initier à la culture cellulaire. Merci pour ton aide et tes conseils judicieux.

Je remercie particulièrement **mes chers parents** pour leur soutien continu depuis mon départ de la Tunisie, merci pour votre confiance et pour l'amour que vous me portez. Sans vous, ce mémoire n'aurait jamais vu le jour. J'espère que vous êtes fiers de votre petite fille.

Un grand merci à mon mari, **Ahmed**, avec qui j'ai la chance de partager ma vie. Merci pour ton amour merci d'être toujours là dans les moments heureux, comme dans les moments difficiles. Sans ta présence à mes côtés, je n'aurais certainement pas réussi à tenir le cap ces dernières années. Merci de toujours savoir comment me motiver et me redonner confiance quand j'en ai besoin.

Merci aussi pour toutes les fins de journée passées dans la voiture devant le labo pendant que j'essaie de finir les dernières lignes d'un paragraphe ou de nourrir mes cellules ... **Cette thèse, c'est aussi la tienne...**

Je profite par le biais de ce manuscrit pour exprimer mes vifs remerciements à ma belle-mère et ma deuxième maman **Hela** pour ses encouragements et son soutien inestimable. Je n'oublierai jamais ta fameuse phrase : je crois en toi tu vas y arriver !

Mes sincères remerciements s'adressent à nos collaborateurs **Thierry Durroux** et **Joyce Heuinck** de l'institut de Génomique Fonctionnelle à Montpellier qui m'ont accueillie parmi eux pendant trois semaines et m'ont permis de me familiariser avec certaines techniques disponibles dans leur laboratoire. Je remercie bien évidemment **David Perrais** et **Silvia Sposini** de l'institut interdisciplinaire de neurosciences qui m'ont formé et accueilli à plusieurs reprises dans leur laboratoire. Merci pour les longues discussions qui ont contribué à l'élaboration de ce modeste travail. Merci pour avoir eu la gentillesse de m'introduire au monde de la microscopie de fluorescence.

Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe pour leur gentillesse, leurs remarques intéressantes et leur bonne humeur. C'est grâce à ces personnes que ma thèse s'est révélée être aussi instructive et agréable. Je remercie plus particulièrement **Estelle Rascoll** pour ses qualités humaines et ses conseils, tu es une personne formidable. Merci à **Sandrine Villette** d'avoir accepté de m'aider pour mener à bien les derniers projets de mon doctorat, merci pour ta patience pendant les derniers mois. Merci à **Cécile** et **Michael** de m'avoir permis de rédiger ma thèse dans les meilleures conditions.

Je remercie également tous les thésards et les stagiaires, présents et passés, pour leur accueil, leur aide et leur soutien : **Rita, Mehdi, Marion, Emilie** et surtout **Alysson** qui m'a bien soutenue pendant les dernières semaines de ma thèse.

Enfin, j'adresse mes plus sincères remerciements à mon frère et deuxième Papa **Karim** et ma belle-sœur **Émilie** qui m'ont soutenu et encouragé dans toutes les étapes que j'ai parcourues depuis mon installation en France. Je vous suis particulièrement reconnaissante pour tout le support.

Merci aussi à tous les membres de ma famille : **Rzouga, Aicha, Faiza, Zohra, Mouna, Noujoud, Issra, Dalila** et **Dhia** pour leur amour et tous les beaux moments partagés à chaque retour en Tunisie.

## Listes des abréviations

**3D** : trois dimensionnelle

**aa** : acide aminé

**AA** : Acide Arachidonique

**AB** : Acide Béhénique

**AC** : Adénylate Cyclase

**ADN** : Acide Désoxyribonucléique

**AGPI** : Acides Gras Polyinsaturés

**AO** : Acide Oléique

**AG** : acide gras

**AGS** : Acide Gras Saturé

**AMP** : Adénosine

**AMPC** : Adénosine Mono-Phosphate cyclique

**Anova** : analyse de variance

**ARN** : acide ribonucléique

**ATP** : Adénosine Tri-Phosphate

**BE** : boucle extracellulaire

**BI** : boucle intracellulaire

**BRET** : Bioluminescence resonance energy transfer

**BSA** : Sérum d'Albumine Bovine

**BV-2** : cellules microgliales murines

**CBMN** : chimie et biologie des membranes et des nano-objets

**CCP** : Clathrin Coated Pits

**CCV** : Clathrin Coated Vesicles

**CG-SM** : chromatographie gazeuse-spectroscopie de masse

**CHO** : cellules ovariennes de Hamster

**CL** : chromatographie en phase liquide

**CLASP** : CLathrin-coat Associated Sorting Protein

**CME** : Clathrin Mediated Endocytosis

**CXCR7** : Récepteur de chimiokine C-X-C de type 7

**DAG** : diacylglycérol

**DERET** : Diffusion-Enhanced Resonance energy transfer

**DHA** : acide docosahexaénoïque

**DHA-A** : DHA-Alcyne

**DMEM** : Dulbecco's Modified Eagle Medium

**DPA** : acide docosapentaénoïque

**EC<sub>50</sub>** : la concentration d'efficacité médiane

**Emax** : effet maximal

**ERK1/2** : Extracellular signal-regulated kinases

**EPA** : acide eicosapentaénoïque

**GDP** : Guanosine Di-Phosphate

**GRK** : G protein Receptor Kinase

**GTP** : Guanosine Tri-Phosphate

**HDL** : High Density Lipoprotein

**HEK-293** : cellules embryonnaires rénales humaines

**IINS** : Interdisciplinary Institute for Neuroscience

**IP3** : inositol triphosphate

**Ld** : phase liquide désordonnée

**LGR** : leucine rich repeats containing

**Lo** : phase liquide ordonnée

**MAPK** : Mitogen-activated protein kinases

**PBS** : Phosphate-Buffered Saline

**PC** : phosphatidylcholine

**PDE** : phosphodiesterase

**PE** : phosphatidyléthanolamine

**PG** : polarisation généralisée

**PI** : phosphatidylinositol

**PIP2** : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate,

**PIP3** : Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate

**PKA** : Protéine Kinase A

**PKC** : Protéine Kinase C

**PL** : phospholipides

**PLA<sub>2</sub>** : phospholipase A2

**PS** : phosphatidylsérine

**PWR** : Plasmon Waveguide Resonance

**QPL** : quinpirole

**RA<sub>2A</sub>** : récepteur A2 de l'adénosine

**RCPG** : récepteur couplé au protéine G

**RD2** : récepteur dopaminergique D2 humain

**RGS** : Regulator of G-protein signaling

**Rβ1A** : récepteur β1 adrénergique

**Rβ2A** : récepteur β2 adrénergique

**SVF** : Sérum de Veau Fœtal

**TfR1** : récepteur de la transferrine 1

**TM**: transmembranaire

**VLGR** : Very Large G-protein coupled Receptor

**ω3** : Oméga 3

**ω6** : Oméga 6

**TIRF** : total internal reflection fluorescence microscopy

**NMR** : Résonance Magnétique Nucléaire

# Table des matières

Chapitre I : Introduction bibliographique .....	1
Résumé : .....	2
<b>1. Les récepteurs couplés aux protéines G : .....</b>	<b>2</b>
<b>1.1. Généralités : .....</b>	<b>3</b>
i. La structure des RCPG : .....	4
ii. La classification des RCPG : .....	5
<b>1.2. Transduction du signal par les protéines G .....</b>	<b>7</b>
i. Les différentes protéines G .....	8
ii. Les différents effecteurs des protéines G : .....	9
<b>1.3. Transduction du signal indépendante des protéines G : via les <math>\beta</math>-arrestines .....</b>	<b>10</b>
i. La classification et la structure des arrestines : .....	11
ii. Base structurale de l'interaction des $\beta$ -arrestines avec les RCPG .....	13
iii. Rôles des $\beta$ -arrestines dans la signalisation des RCPG : .....	14
<b>1.4. La modulation de l'activation des RCPG : .....</b>	<b>16</b>
i. Les agonistes conventionnels : .....	16
ii. Les antagonistes : .....	17
iii. Les agonistes biaisés : .....	18
<b>1.5. La désensibilisation des RCPG : .....</b>	<b>20</b>
i. La phosphorylation des RCPG : .....	21
ii. Les mécanismes d'internalisation des RCPG : .....	24
iii. Trafic intracellulaire des RCPG : devenir des récepteurs internalisés .....	31
<b>1.6. Les récepteurs dopaminergiques : .....</b>	<b>33</b>
i. Généralités sur le système dopaminergique : .....	33
ii. Les différentes classes de récepteurs dopaminergiques : .....	35
iii. Le récepteur dopaminergique de type 2 : .....	36
<b>2. La membrane plasmique : .....</b>	<b>41</b>
<b>2.1. Généralités sur les AGPI : .....</b>	<b>43</b>
i. Nomenclature et classification : .....	43
ii. Biosynthèse et sources alimentaires : .....	45
iii. Insertion des AGPI au niveau des PL : .....	47
iv. Impact des AGPI sur les propriétés de la membrane : .....	48
<b>2.2. Les AGPI dans le cerveau : .....</b>	<b>53</b>
i. Composition du cerveau en AGPI : .....	53
ii. Déficience en AGPI et pathologies psychiatriques : .....	54
iii. L'intérêt thérapeutique des AGPI .....	56



3.	Impact des AGPI sur l'activité et la signalisation des RCPG :	57
4.	Objectif de thèse :	63
Chapitre II : Matériels et méthodes		0
Résumé :		0
1.	Matériels :	1
1.1.	Lignée cellulaire :	1
1.2.	Les bactéries :	1
1.3.	Les milieux de culture :	1
1.4.	Les tampons :	2
1.5.	Les plasmides :	2
1.6.	Les ligands :	3
1.7.	Les anticorps primaires et secondaires :	4
1.8.	Les acides gras :	4
1.9.	Les oligonucléotides :	5
1.10.	Autres réactifs utilisés :	5
2.	Méthodes :	6
2.1.	Passage cellulaire :	6
2.2.	Comptage cellulaire	6
2.3.	Transfection cellulaire	6
2.4.	Enrichissement cellulaire en acides gras :	7
2.5.	Test de cytotoxicité cellulaire :	8
2.6.	Clonage du plasmide pSEP-RD2 :	8
i.	Mutagenèse dirigée :	8
ii.	Transformation bactérienne par choc thermique :	9
iii.	Purification de l'ADN plasmique :	10
iv.	Quantification de l'acide nucléique :	10
v.	Validation d'un clone positif :	11
vi.	Digestion des plasmides :	11
vii.	Ligation et insertion de la séquence SEP	11
viii.	Validation de l'insertion par séquençage :	12
2.7.	La microscopie de fluorescence :	12
i.	Généralités	12
ii.	Les techniques de transfert d'énergie par résonance :	13
iii.	La microscopie confocale	21
iv.	La microscopie de fluorescence par réflexion totale interne (TIRF) :	28
2.8.	Spectroscopie de fluorescence :	32

2.9. La micro-spectroscopie Raman :	36
Chapitre III : Enrichissement membranaire en AG	106
Résumé :	107
1. Analyse lipidomique :	109
1.1. Analyse de la composition en AG des lipides totaux :	109
1.2. Analyse de la teneur en PL :	112
2. Localisation des AG d'intérêt par la spectroscopie de diffusion Raman :	114
2.1. Localisation des AGPI :	114
2.2. Incorporation de l'AGS :	117
3. Etude de la fluidité membranaire par la spectroscopie de fluorescence :	119
Conclusions et perspectives :	123
Chapitre IV : Impact des AGPI sur la voie d'internalisation du RD2	126
Résumé :	127
1. Etude de l'internalisation du RD2 par la technique d'HTRF	129
1.1. Optimisation du système cellulaire :	129
1.2. Validation de la technique HTRF	133
1.3. Impact de l'enrichissement lipidique membranaire en AGPI sur :	136
i. La viabilité cellulaire :	136
ii. Le taux d'expression membranaire du RD2	137
iii. L'internalisation du RD2 :	138
2. Etude de l'internalisation du RD2 par microscopie confocale :	142
2.1. Système cellulaire utilisé :	143
2.2. Impact des AGPI sur l'internalisation du RD2 :	145
3. Impact des AGPI sur l'internalisation du R $\beta$ 2A :	150
4. Impact des AGPI sur l'internalisation du RTf-1 :	153
Conclusions et perspectives :	155
Chapitre V : Impact des AGPI sur le recrutement de la $\beta$ -arrestine-2	158
Résumé :	159
1. La visualisation du recrutement membranaire de la $\beta$ -arrestine-2 par la microscopie confocale en temps réel :	161
2. La visualisation du recrutement membranaire de la $\beta$ -arrestine-2 et du trafic membranaire du RD2 par la microscopie TIRF en temps réel :	165
3. L'impact des AGPI sur le clustering du RD2 et sur le recrutement membranaire de la $\beta$ -arrestine-2	167
3.1. L'impact des AGPI membranaires sur le clustering du RD2 :	167
3.2. L'impact des AGPI membranaires sur le recrutement de la $\beta$ -arrestine-2 :	169
Conclusions et perspectives :	171

<b>Chapitre VI : conclusions et perspectives générales</b> .....	174
<b>Conclusions et perspectives générales</b> .....	174
<b>Références:</b> .....	179
<b>Annexes</b> .....	200
<b>Annexe 1</b> .....	201
<b>Annexe 2</b> .....	202
<b>Annexe 3</b> .....	251

# Chapitre I

## Introduction bibliographique

### Résumé :

En préambule de la présentation des résultats expérimentaux, ce premier chapitre est une étude bibliographique sur les différents concepts abordés dans ce mémoire. La première partie est consacrée à décrire les données actuelles relatives aux RCPG et particulièrement les mécanismes généraux de signalisation et de désensibilisation de ces récepteurs membranaires ainsi que leur pharmacologie. Cette première partie se termine par la description de la famille des récepteurs dopaminergiques tout en se focalisant sur le récepteur modèle de cette thèse, le RD2. La seconde partie est dédiée aux AGPI : leur nomenclature, biosynthèse, transport vers le cerveau, leur déficience chez les patients souffrant de pathologies psychiatriques ainsi que leur impact sur les propriétés physicochimiques des membranes qui les contiennent. Enfin, la troisième partie est un état de l'art sur l'impact des AGPI sur la voie de signalisation des RCPG.

Cette introduction bibliographique se termine par la présentation des objectifs de ce travail ainsi que l'organisation des différents chapitres qui vont suivre.

### 1. Les récepteurs couplés aux protéines G :

La capacité des organismes multicellulaires, tels que les mammifères, à réagir aux signaux provenant de leur environnement est déterminante pour le maintien de l'homéostasie, c'est-à-dire l'ensemble des paramètres physico-chimiques qui doivent rester constants pour garantir la survie et le développement de l'organisme en question. Le maintien de cet équilibre commence à l'échelle cellulaire à travers un processus de communication, finement harmonisé, entre les cellules d'un même organe et entre les cellules de différents organes. Cette communication cellulaire est définie comme l'ensemble des mécanismes permettant à une cellule de recevoir, d'intégrer et de répondre aux signaux émis par d'autres cellules ou par l'environnement extérieur. Ces différents mécanismes (réception/transduction du signal et génération d'une réponse cellulaire appropriée au signal reçu) requièrent la présence de protéines membranaires capables de capter les différents stimuli du milieu extracellulaire et de relayer l'information à l'intérieur de la cellule.

Les récepteurs transmembranaires, exprimés à la surface des cellules, constituent la plus grande famille de protéines membranaires impliquées dans la transduction du signal. Ces récepteurs, présents à l'interface entre le milieu extra- et intracellulaire, appartiennent à plusieurs classes de protéines qui diffèrent par leur mécanisme de transmission du signal et leur structure moléculaire.

## Introduction bibliographique

Nous pouvons distinguer les récepteurs de type canaux ioniques, les récepteurs associés à une activité enzymatique (tyrosine kinase, histidines kinases...) et les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Dans ce chapitre nous nous intéresserons spécifiquement aux RCPG aussi dénommés récepteurs à sept domaines transmembranaires.

### 1.1. Généralités :

La superfamille des RCPG constitue l'une des familles de gènes la plus grande et la plus étudiée du génome des mammifères [1]. En effet, le séquençage du génome humain a permis de découvrir un peu moins d'un millier de gènes codant pour cette famille de récepteurs dont environ 500 correspondent aux récepteurs gustatifs et olfactifs et 400 à des récepteurs capables de lier des ligands endogènes [2]–[5].

La découverte matérielle de ces récepteurs transmembranaires a eu lieu en 1979 par le groupe de Lefkowitz suite à la purification du récepteur  $\beta$ 2-adrénérique (R $\beta$ 2A), exprimé naturellement dans les érythrocytes de grenouille, par chromatographie d'affinité [6]. Il a fallu attendre environ 10 ans pour que la même équipe réussisse à cloner le gène de ce récepteur.

Le clonage de nombreux autres gènes a ensuite permis de renforcer l'idée de l'existence d'une superfamille de gènes codant pour les RCPG. Comme leur nom l'indique, le couplage de ces récepteurs à des protéines hétérotrimériques, aussi appelées protéines G, est partagé par l'ensemble des récepteurs de cette superfamille. Leur deuxième appellation, **récepteurs à sept segments transmembranaires**, vient du fait que les RCPG partagent tous une unité fonctionnelle commune constituée de sept domaines transmembranaires en forme d'hélices  $\alpha$  séparés par des boucles intra et extra-cellulaires. Néanmoins, les RCPG possèdent également des domaines fonctionnels variés notamment au niveau de leur extrémité extracellulaire (extrémité N-terminale) et intracellulaire (extrémité C-terminale).

Ces récepteurs se retrouvent dans tous types de tissus et sont impliqués dans la plupart des processus physiologiques et physiopathologiques (épilepsie, dépression, allergies...) ce qui en fait une cible de choix pour environ 30 % des médicaments commercialisés [2], [7], [8]. Etant donné que ces médicaments ne ciblent qu'une quarantaine des RCPG, de nombreux travaux de recherche sont consacrés à la conception et la synthèse de ligands à visée thérapeutique. Dans le même contexte, l'existence de nombreux récepteurs pour lesquels des ligands physiologiques n'ont pas été à ce jour identifiés, appelés récepteurs orphelins, est prometteuse pour la recherche d'autres candidats médicaments ciblant ces récepteurs.

### i. La structure des RCPG :

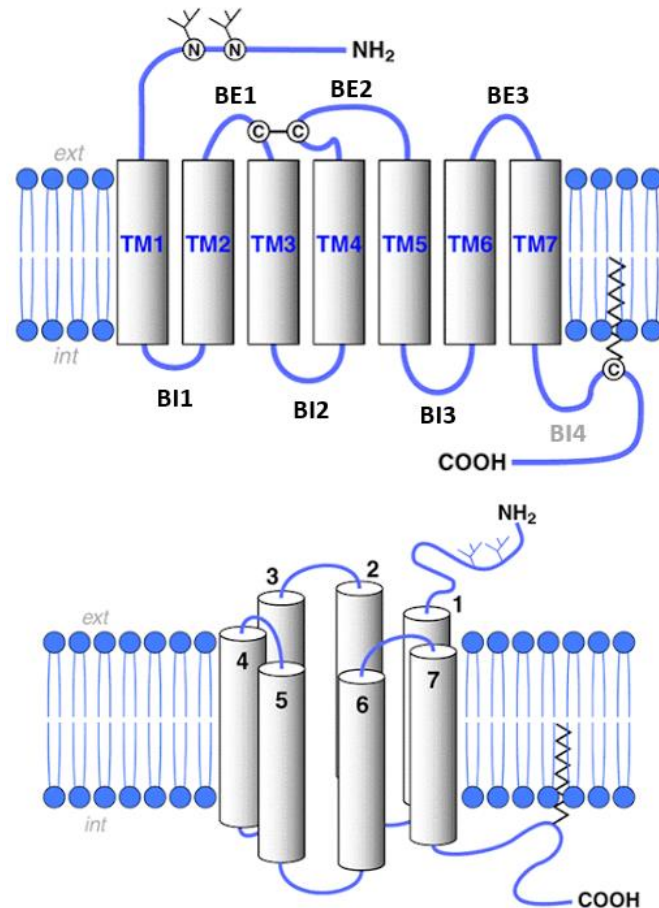
Jusqu'en Octobre 2007, la rhodopsine bovine était le seul RCPG dont la structure tridimensionnelle (3D) était résolue. La détermination de cette structure a commencé, en 1993, par les travaux de Shertler et Henderson qui ont identifié la première structure bidimensionnelle de la rhodopsine, par la microscopie électronique, avec une résolution supérieure à 9 Å [9]. Un véritable saut en avant a été réalisé en 2000 par le groupe de Palczewski avec la résolution en 3D d'un cristal de la rhodopsine bovine avec une forte résolution d'environ 2,8 Å [10]. Ensuite, il a fallu attendre 2007 pour que Kobilka et Stevens réussissent à obtenir le cristal du premier RCPG non visuel, le R $\beta$ 2A, avec une résolution d'environ 3,4 Å [11]. A l'heure actuelle, un nombre important de structures cristallographiques a été obtenu dont celle du récepteur  $\beta$ 1-adrénergique [12], celle du récepteur A2 de l'adénosine (RA<sub>2</sub>A) [13] et celles des récepteurs dopaminergiques de type 2 et 3 [14], [15].

Plusieurs avancées technologiques ont permis l'explosion du nombre de publications sur la structure cristallographique des RCPG : **1)** la possibilité de produire les RCPG en grande quantité dans un système hétérologue (cellules d'insectes, levure, bactéries...); **2)** la possibilité de réduire la flexibilité structurale des RCPG par l'introduction de mutations permettant d'augmenter la thermo-sensibilité. La réduction de la flexibilité de la troisième boucle intracellulaire (la plus flexible) est possible par l'utilisation des anticorps ou en la remplaçant par une protéine bien structurée comme le lysozyme T4 [15]; **3)** la possibilité de solubiliser ces protéines transmembranaires avec des détergents spécifiques.

Comme évoqué précédemment, la comparaison des structures cristallographiques des RCPG révèle une topologie membranaire commune à tous les récepteurs de cette superfamille : sept segments hydrophobes, bien conservés, composés chacun d'environ 25 à 35 acides aminés (aa) organisés en un tonnelet tridimensionnel. Ces segments transmembranaires sont reliés entre eux par trois boucles intracellulaires (BI), cytoplasmiques, et trois boucles extracellulaires (BE). Les BE 1 et 2, de la majorité des RCPG, présentent toutes les deux une cystéine permettant la formation de pont disulfure. Les extrémités N-terminale et C-terminale se situent respectivement du côté extracellulaire et intracellulaire. L'extrémité C-terminale possède un site possible de palmitoylation situé à la sortie du 7<sup>ème</sup> segment transmembranaire. Ce site de modification post-traductionnel permet l'ancrage lipidique de l'extrémité C-terminale dans la membrane et la création d'une 4<sup>ème</sup> boucle intracellulaire (**Figure 1**).

## Introduction bibliographique

Quant à l'extrémité N-terminale, celle-ci constitue la région la plus variable et peut être composée de 7 aa, dans le cas du RA<sub>2</sub>A de l'adénosine, comme de 5900 aa, dans le cas du Very Large G-protein coupled Receptor (VLGR). Ces variations de taille notables des extrémités N- et C-terminale ainsi que des boucles constituent un des critères permettant de différencier plusieurs familles de RCPG.



**Figure 1** : Structure schématique générale des récepteurs couplés aux protéines G. Les 7 segments antiparallèles hydrophobes (TM1-7) sont reliés par 3 boucles intracellulaires (BI1-2-3) et 3 boucles extracellulaires (BE1-2-3). Une 4<sup>ème</sup> boucle intracellulaire est créée suite à un ancrage lipidique dans la membrane plasmique au niveau de l'extrémité C-terminale.

### ii. La classification des RCPG :

Plusieurs systèmes de classification des RCPG ont été proposés. La classification la plus répandue est celle établie par Kolakowski en 1994 [16]. Celle-ci se base sur l'identité de séquences et sépare les RCPG, des invertébrés et des vertébrés, en six classes de A à F. Parmi ces six classes, seules les trois premières (A, B, C) sont présentes chez les humains (**figure 2**).



## Introduction bibliographique

- La classe A : « Rhodopsin-Like »

C'est la classe la plus représentée et la plus caractérisée, elle comporte le plus grand nombre de récepteurs dont son archétype, la rhodopsine. La moitié des récepteurs de cette famille sont des récepteurs sensoriels impliqués dans la reconnaissance de stimuli olfactifs, gustatifs ou lumineux [17].

Cette classe est divisée en trois sous-groupes qui diffèrent par la taille et l'emplacement du site de liaison du ligand. La sous classe **A.a** comprend les récepteurs de petites molécules comme le rétinol. Le site de liaison des récepteurs de cette sous classe est situé au sein du tonnelet central et est constitué par une cavité formée par les domaines transmembranaires. La sous-classe **A.b** comprend les récepteurs des neuropeptides. Le site de liaison de ces récepteurs implique l'extrémité N-terminale ainsi que les boucles extracellulaires. La sous-classe **A.c** ou « LGR » (leucine rich repeats containing) comprend les récepteurs d'hormones glycoprotéiques (Thyréostimuline-TSH, Hormone folliculo-stimulante-FSH ou Hormone lutéinisant-LH). Cette sous classe se distingue par une grande extrémité N-terminale qui sert de site de liaison.

L'homologie globale entre les récepteurs de classe A est limitée à une vingtaine d'acides aminés hautement conservés. Parmi ces acides aminés, l'aspartate du TM2 et deux cystéines qui forment un pont disulfure entre les deux premières boucles extracellulaires permettant le maintien de la structure tertiaire [18]. Le motif E/DRY (glutamate/aspartate-arginine-tyrosine), situé à l'extrémité cytoplasmique du TM3 (au début de la BI2), et le motif NPXXY (asparagine-proline-X-X-tyrosine), positionné au niveau du TM7, sont également très conservés [19]. Ces deux motifs conservés sont très importants pour l'activation des RCPG de cette classe [19], [20].

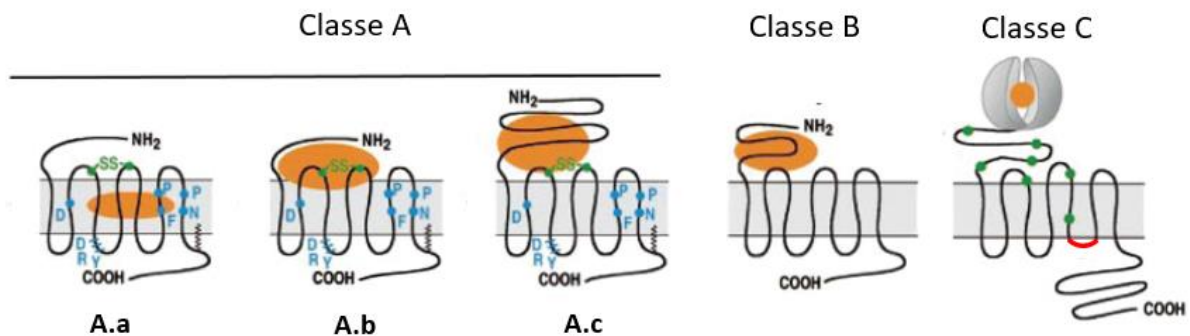
- La classe B : « Secretin-Like »

Cette deuxième classe est caractérisée par un grand domaine N-terminal (100-500 aa) riche en cystéines conservées et engagées dans des ponts disulfures. Cette famille regroupe des récepteurs structurellement proches du récepteur à la sécrétine capables de lier des peptides relativement grands tels que les hormones et les neuropeptides par l'intermédiaire d'un site de liaison constitué de l'extrémité N-terminale et des BE [21].

## Introduction bibliographique

- La classe C : « Metabotrope-glutamate/phéromone »

Cette classe est composée des récepteurs métabotropes des neurotransmetteurs qui sont caractérisés par une extrémité N-terminale extrêmement longue (500-600 aa). Cette extrémité se structure en deux lobes distincts séparés par une cavité formant le site de fixation de ligand. L'autre particularité de la classe C réside dans la taille de la BI3 qui est très courte par rapport aux deux autres classes [22].

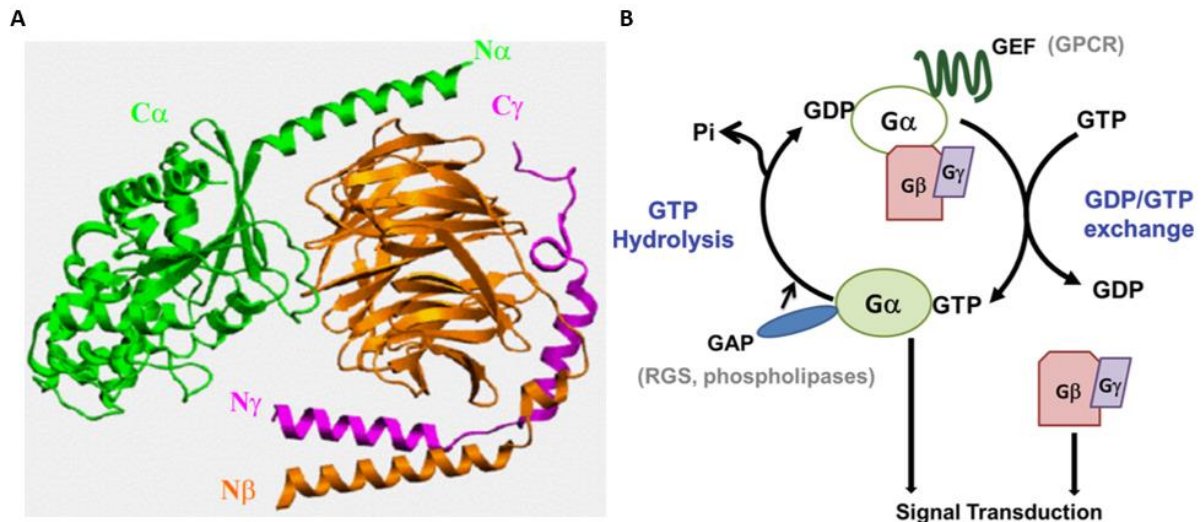


**Figure2** : Représentation schématique de la structure générale des trois principales classes de RCPG (A, B, C). Le site de liaison du ligand, représenté en orange, est différemment positionné selon les récepteurs considérés, adaptée de [2].

### 1.2. Transduction du signal par les protéines G

A part la similarité structurale entre les différents RCPG, l'autre caractéristique de cette superfamille est le fait que les récepteurs déclenchent une cascade de signalisation médiée par les protéines G hétérotrimériques avec lesquelles ils interagissent. A l'état inactif, ces protéines intracellulaires, localisées préférentiellement au niveau de la membrane plasmique, forment un assemblage composé d'une sous-unité  $G\alpha$  et d'un complexe  $\beta\gamma$  indissociable (**figure 3A**).

Une fois activé par son ligand, le récepteur subit un agencement tridimensionnel (changement de conformation) exhibant une affinité supérieure pour une protéine G hétérotrimérique particulière. Ceci est accompagné par un changement conformationnel au niveau de l'hétérotrimère et l'échange du GDP de la sous-unité  $G\alpha$  par du GTP. En effet, le récepteur activé agit comme une protéine GEF (Guanine Exchange Factor) et catalyse la réaction d'échange du GDP par du GTP au niveau de la protéine G (**figure 3B**). Suite à cet échange, l'hétérotrimère activé se dissocie en une sous unité  $\alpha$  ( $G\alpha$ ) et un dimère  $\beta\gamma$  ( $G\beta\gamma$ ) et initie la transduction du signal intracellulaire induite par le récepteur [23].



**Figure 3 :** Structure 3D du complexe hétérotrimérique  $G\alpha$ -GDP/ $G\beta$ / $G\gamma$ 1 et son cycle d'activation. **A.** La sous-unité  $\alpha$  est représentée en vert et les sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  en orange et magenta respectivement, **code PDB 1GOT**. **B.** Représentation du cycle d'activation d'une protéine G : en présence de ligand le RCPG catalyse la réaction d'échange du GDP en GTP ce qui favorise l'activation de la protéine G et sa dissociation en  $G\alpha$ -GTP et  $G\beta\gamma$ . L'hydrolyse du GTP favorise le retour à l'état basal et la formation du complexe  $G\alpha$ -GDP/ $G\beta$ / $G\gamma$ 1, adaptée de [24].

#### i. Les différentes protéines G

Le clonage par homologie a permis l'identification de 35 gènes codant les différentes sous-unités des protéines G (16 codant les  $\alpha$ , 5 les  $\beta$  et 14 les  $\gamma$ ) [25].

Malgré leur haute diversité, les différents sous-unités  $\alpha$  présentent toutes une activité GTPase. Ces dernières se subdivisent en quatre sous-groupes qui diffèrent par leur action sur leurs effecteurs : 4 sous-types  $\alpha_s$  stimulatrices de l'adénylate cyclase (AC), 5 sous-types  $\alpha_{i/o}$  inhibitrices de l'AC, 5 sous-types  $\alpha_{q/11}$  activant la phospholipase C (PLC) et 2 sous-types  $\alpha_{i2/i3}$  impliquées dans la régulation du cytosquelette (**figure 4**). Hormis la diversité des sous-unités elles-mêmes, le degré de diversité augmente par l'assemblage croisé de ces trois sous-unités. Néanmoins, il a été montré que toutes les combinaisons aléatoires possibles (environ 960 hétérotrimères) ne sont pas efficaces en terme de transduction du signal *in vivo* [23], [26].

Diverses techniques telles que la mutagénèse dirigée et le BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer) ont permis d'étudier la spécificité de couplage des protéines G aux RCPG. Ces études ont révélé qu'un seul RCPG est capable d'interagir avec plusieurs protéines G qui n'appartiennent pas à la même famille [27]. C'est le cas du récepteur de la CRH (corticotrophin-releasing hormone), capable d'interagir avec 5 protéines G différentes [28].

D'après les études disponibles à ce jour, pour la plupart des RCPG, les deuxième et troisième boucles intracellulaires ainsi que la partie C-terminale sont les déterminants moléculaires impliqués dans l'interaction et l'activation des protéines G [29]–[31]. Quant aux protéines G, ce sont les cinq derniers aa de l'extrémité C-terminale de la sous-unité  $\alpha$  qui modulent la spécificité d'interaction avec le récepteur.

### ii. Les différents effecteurs des protéines G :

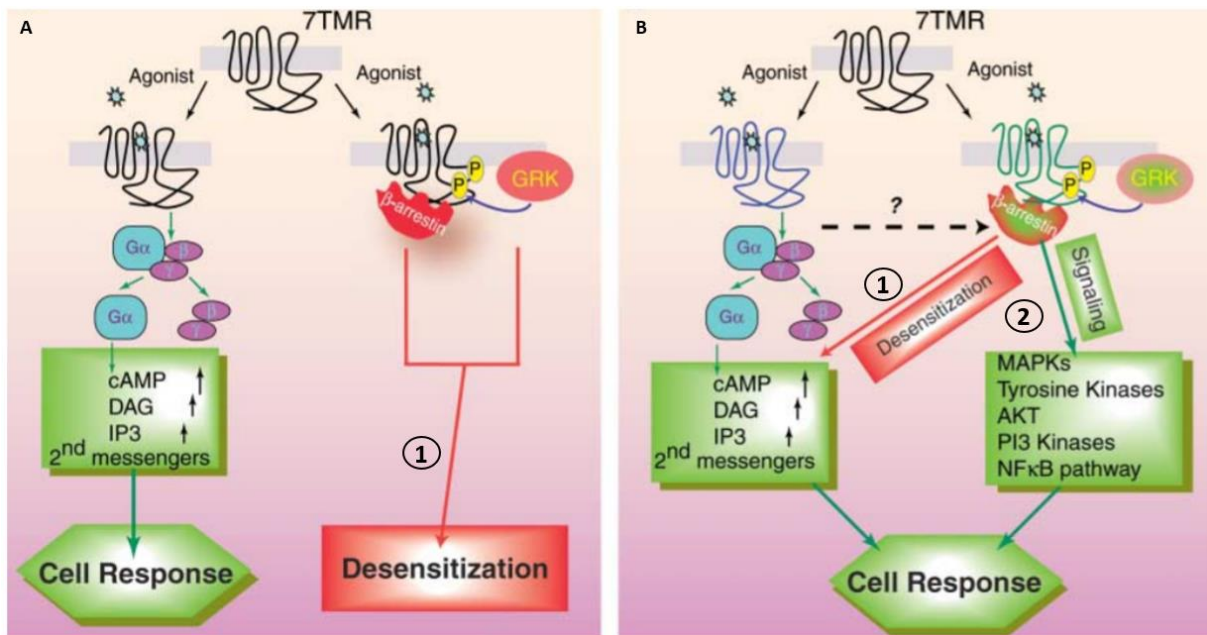
- Les effecteurs de la sous unité  $G\alpha$  :

Longtemps considérées comme les seules sous-unités actives des protéines G, les sous-unités  $G\alpha$  sont, à l'issue de leur activation par le récepteur, capables d'activer divers effecteurs intracellulaires dont les plus connus sont les AC et les PLC. L'activation de l'AC et de la PLC est à l'origine de la production de petites molécules appelées seconds messagers : l'inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>) et le diacylglycérol (DAG), produits par la PLC, ou l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) issue de la conversion de l'ATP par l'AC. Ces seconds messagers vont se propager dans le milieu intracellulaire pour stimuler à leur tour de nouveaux effecteurs [32], [33]. Les canaux calciques et la protéine kinase C (PKC) sont les principaux effecteurs des IP<sub>3</sub> et du DAG tandis que la protéine kinase A (PKA) est la cible principale de l'AMPc. D'autres types de phospholipases telles que les phospholipases D et A<sub>2</sub> peuvent également être activées par ces sous-unités.

- Les effecteurs du dimère  $G\beta\gamma$  :

Longtemps considéré comme un simple point d'ancrage à la membrane pour la sous-unité  $G\alpha$ , le dimère  $G\beta\gamma$  est aussi capable d'activer une multitude d'effecteurs. Depuis la première évidence expérimentale d'un rôle actif du  $G\beta\gamma$  en termes de signalisation chez les mammifères, ce dimère s'est vu impliqué dans le contrôle de l'activité de plusieurs effecteurs protéiques des RCPG. En effet, Logothetis *et al* [34] sont les premiers à avoir découvert l'implication du  $G\beta\gamma$  dans l'activation du canal potassique muscarinique.





**Figure 5 :** Transduction du signal indépendante des protéines G. **A.** Paradigme classique de la signalisation dépendante des protéines G. **B.** Nouveau paradigme : les  $\beta$ -arrestines désensibilisent le signal des RCPG dépendants des protéines G et agissent elles aussi comme des transducteurs du signal [36].

#### i. La classification et la structure des arrestines :

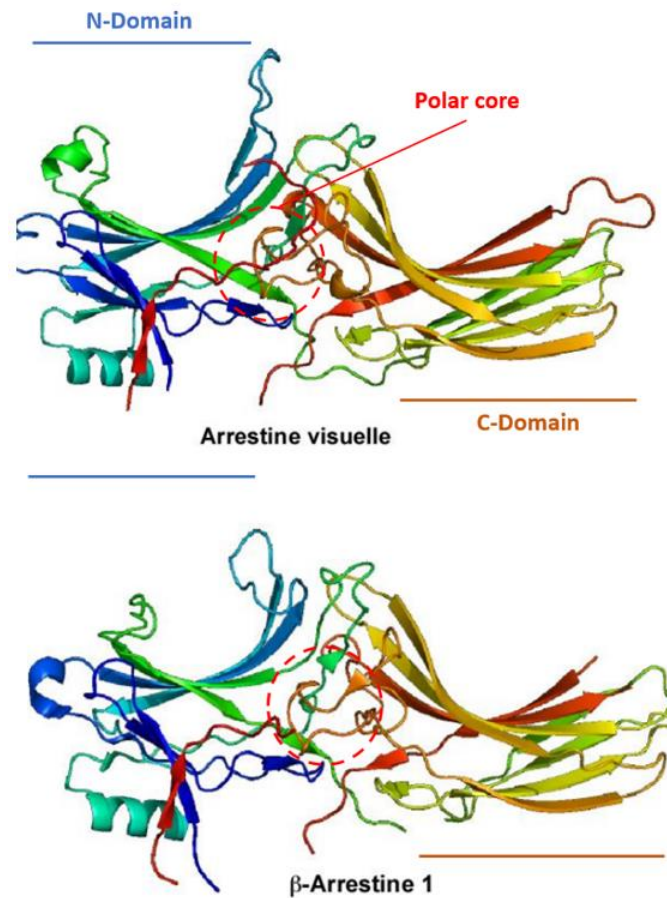
L'arrestine visuelle (arrestine 1 ou arr1) a initialement été découverte en 1985 à travers son implication dans la désensibilisation de la rhodopsine activée par la lumière [38]. A l'heure actuelle, la famille des arrestines comporte quatre membres divisés en deux groupes en fonction de leur homologie de séquence ainsi que de leur distribution tissulaire. Le premier groupe comporte l'arr1 et l'arrestine 4 aussi appelées arrestines visuelles [39]. Quant au deuxième groupe, celui-ci comporte deux arrestines très homologues : la  $\beta$ -arrestine-1 et la  $\beta$ -arrestine-2 respectivement appelées les arrestine 2 et arrestine 3 [40], [41]. Le nom de la  $\beta$ -arrestine-1 vient de son rôle dans l'inactivation du R $\beta$ 2A. Le nom de la deuxième  $\beta$ -arrestine vient de sa capacité à désensibiliser le R $\beta$ 2A ainsi que de sa forte homologie avec la  $\beta$ -arrestine-1. Comme leur nom l'indique, les arrestines visuelles sont spécifiquement exprimées au niveau de la rétine mais les  $\beta$ -arrestines sont plutôt ubiquitaires [42].

La résolution de la structure de la  $\beta$ -arrestine-1 bovine [43] et des arrestines visuelles [44] a permis de montrer qu'elles possèdent des structures très proches (**figure 6**). Ces protéines de forme allongée sont composées majoritairement de feuilletts  $\beta$  antiparallèles, reliés par différentes boucles, et d'une courte hélice  $\alpha$  [45].



## Introduction bibliographique

Elles disposent de deux domaines, N et C, séparés par un important cœur polaire situé au centre de la protéine. La structure de ces protéines est caractérisée par une petite portion charnière qui permet de relier les deux domaines N et C. La forte homologie entre les  $\beta$ -arrestines 1 et 2 a permis de modéliser la structure de la  $\beta$ -arrestine-2 à partir des données cristallographiques obtenues pour la  $\beta$ -arrestine-1. Récemment, Min *et al* ont réussi à résoudre la structure 3D de la  $\beta$ -arrestine-2 associée à un phosphopeptide dérivé de l'extrémité C-terminale du récepteur de chimiokine de type 7 (CXCR7) avec une résolution de 2,3 Å [46].



**Figure 6** : La structure 3D de l'arrestine visuelle (arr1) et de la  $\beta$ -arrestine-1 présentant les domaines N et C, le cœur polaire en rouge et l'hélice  $\alpha$  en bleu cyan. [Code PDB 1CF1](#) pour l'arrestine visuelle, [2WTR](#) pour la  $\beta$ -arrestine 1.

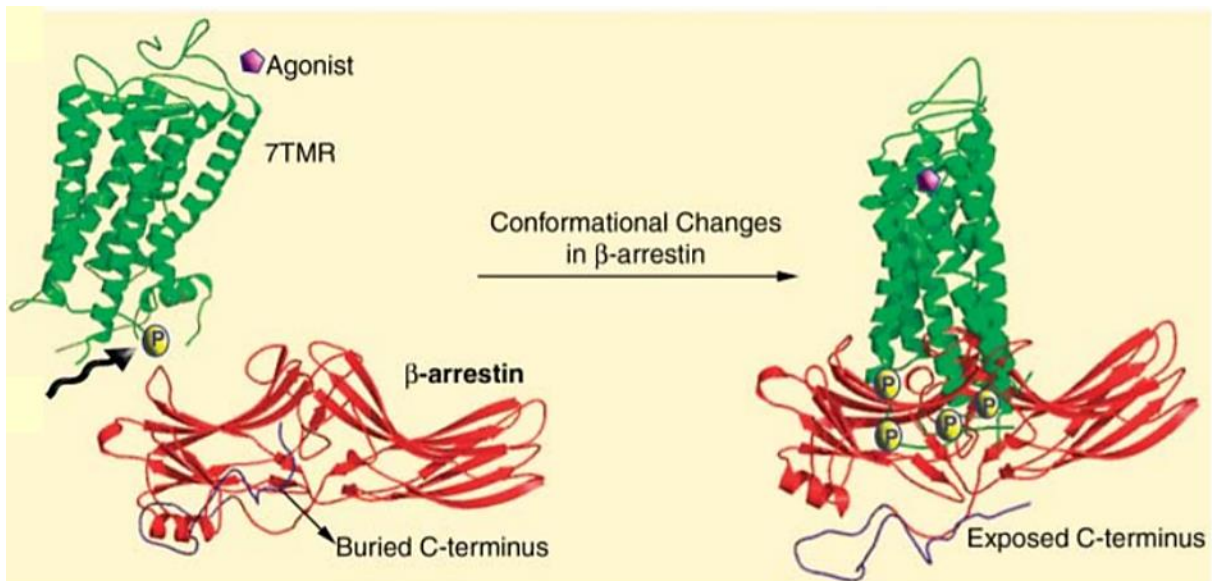
### ii. Base structurale de l'interaction des $\beta$ -arrestines avec les RCPG

La résolution de la structure des deux  $\beta$ -arrestines a permis de mieux comprendre la base structurale de leur interaction avec les RCPG. Une caractéristique importante de l'interaction des  $\beta$ -arrestines avec les RCPG est la capacité de ces protéines cytosoliques à reconnaître la conformation activée ainsi que l'état phosphorylé d'un RCPG.

Concernant la reconnaissance de l'état de phosphorylation, il a été montré que les  $\beta$ -arrestines adoptent une conformation active uniquement lorsque leur cœur polaire interagit avec un RCPG phosphorylé. Certains résidus du cœur polaire (Arg169, Lys170, Arg 393 entre autres), chargés positivement, sont très conservés entre les différentes arrestines ce qui suggère qu'ils sont essentiels pour la liaison des groupements phosphates d'un RCPG phosphorylé [47]. En outre, la modification de charge sur un seul aa du cœur polaire, l'Arg169 appelé phosphosensor, entraîne la désorganisation du cœur polaire et génère une arrestine constitutivement activée capable de lier aussi bien un RCPG phosphorylé que non phosphorylé [45]. Ceci confirme l'implication de cet aa dans la reconnaissance de l'état phosphorylé d'un RCPG. Du côté du RCPG, il est bien documenté qu'au moins trois résidus phosphorylés (sérine ou thréonine), séparés par des résidus supplémentaires non phosphorylés, sont essentiels pour une interaction de haute affinité avec l'arrestine. A ce propos, les travaux de Zhou *et al* [48] ont mis en évidence deux types de motifs de phosphorylation conservés chez la majorité des RCPG : un motif court (**PxPxxP/E/D**) et un motif long (**PxxPxxP/E/D** où **P** désigne un phospho-Ser ou un phospho-Thr et X désigne tout autre acide aminé à l'exception de la proline).

Il est admis que l'interaction d'une  $\beta$ -arrestine avec un RCPG phosphorylé est suivie par la disruption du cœur polaire et le réarrangement des différents domaines de cette protéine cytosolique. Ce changement conformationnel entraîne la libération de l'extrémité C-terminale de la  $\beta$ -arrestine ce qui démasque ses différents sites d'interaction avec les protéines impliquées dans la désensibilisation des RCPG (AP-2, clathrine) ainsi que des protéines de la signalisation (**figure 7**). Outre le cœur polaire, 3 autres parties des  $\beta$ -arrestines sont essentielles pour ce changement de conformation : l'extrémité C-terminale, le feuillet  $\beta 1$  et l'hélice  $\alpha$ . Quant aux domaines de reconnaissance du récepteur activé, il est admis que la région N-terminale est indispensable à la reconnaissance d'un RCPG donné tandis que l'extrémité C-terminale constitue un site de reconnaissance secondaire [49].





**Figure 7** : Changements conformationnels de la  $\beta$ -arrestine-2 et la libération de son extrémité C-terminale suite à son interaction avec le récepteur activé et phosphorylé [36].

### iii. Rôles des $\beta$ -arrestines dans la signalisation des RCPG :

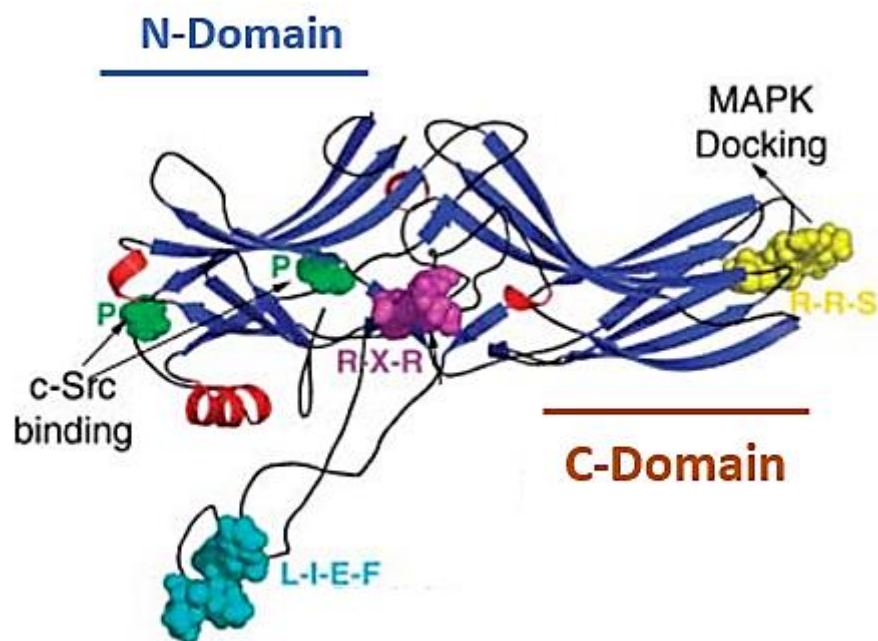
Comme indiqué précédemment, la seconde vague de signaux dépendants des  $\beta$ -arrestines entraîne un niveau de complexité supplémentaire dans la signalisation des RCPG. En plus de sa liaison à un RCPG, la  $\beta$ -arrestine se lie à une multitude de protéines, notamment des kinases, et les recrute au récepteur activé :

- Activation des kinases de la famille Src

Les protéine-tyrosine kinases de la famille Src sont impliquées dans le contrôle de la prolifération cellulaire, de l'adhésion ainsi que dans le réarrangement du cytosquelette. Ce sont des protéines cytosoliques dont l'activité est régulée via leur recrutement au niveau de la membrane plasmique. Le rôle des  $\beta$ -arrestines dans la régulation de l'activité de ces kinases a été mis en évidence suite à l'observation de la colocalisation d'une kinase Src et d'une  $\beta$ -arrestine au niveau de la membrane plasmique. L'interaction de ces protéines, Src kinase et  $\beta$ -arrestine, se fait au niveau du domaine N de la  $\beta$ -arrestine via des régions spécifiques riches en proline. En effet, la mutation d'un des motifs est suffisante pour bloquer le recrutement membranaire et l'activation de la Src [36], [37] (**figure 8**).

- Activation des kinases de la voie MAP-kinase :

La famille des MAP-Kinases (MAPK, Mitogen-activated protein kinases) est constituée de sérine et thréonine kinases impliquées dans la prolifération cellulaire. L'activation des MAPK est facilitée par des protéines d'échafaudage qui facilitent l'engagement de la cascade de phosphorylation. Les  $\beta$ -arrestines font partie de ces protéines d'échafaudage. En effet, la régulation de l'activité des kinases ERK1/2 (Extracellular signal-regulated kinases) par les  $\beta$ -arrestines est le mécanisme dépendant des  $\beta$ -arrestines le plus étudié de la voie MAPK [50]. Comme pour les kinases de la famille Src, les  $\beta$ -arrestines recrutées aux RCPG se lient aux ERK1/2 via des sites de liaison spécifiques présents au niveau du domaine C [36] (**figure 8**).



**Figure 8** : Structure 3 D de la  $\beta$ -arrestine-2 montrant les motifs impliqués dans l'interaction avec les MAP-kinases (en jaune) et les Src kinases (en vert) [36].

### 1.4. La modulation de l'activation des RCPG :

A l'état basal, en l'absence de ligand, les RCPG transitent d'une manière réversible entre différents états dits actifs et inactifs [51]. La fixation d'un ligand au récepteur stabilise préférentiellement un de ces deux états, plus précisément celui pour lequel le ligand possède plus d'affinité. Les ligands sont classés en deux groupes en fonction de leur localisation sur le site de liaison du RCPG. Selon ce critère, deux types de ligands sont discriminés :

- Les ligands orthostériques : ces ligands se lient spécifiquement au même site de liaison que les ligand(s) endogène(s).
- Les ligands allostériques : contrairement au premier type, ces molécules occupent des sites de liaisons situés en dehors du site de liaison des ligand(s) endogène(s).

La deuxième classification, la plus connue, dépend des effets biologiques générés suite à la fixation d'un ligand donné. On distingue trois groupes : les agonistes conventionnels (complets, partiels ou inverses), les agonistes biaisés et les antagonistes.

#### i. Les agonistes conventionnels :

En pharmacologie, un agoniste est un ligand qui se lie spécifiquement à un récepteur tout en induisant le réarrangement de sa conformation et le déclenchement d'un effet biologique. Les agonistes complets et partiels augmentent la proportion des récepteurs activés tandis que les agonistes inverses stabilisent le récepteur dans sa conformation inactive.

- Les agonistes complets et partiels :

Un agoniste complet est caractérisé par le déclenchement d'une réponse biologique maximale similaire à celle engendrée par l'agoniste endogène. En revanche, un agoniste partiel est défini par une réponse biologique moindre en comparaison à celle engendrée par un agoniste complet. Ce dernier est donc incapable d'induire une réponse aussi forte que l'agoniste complet même à une concentration saturante (**figure 9**). Ceci est due à sa faible affinité pour l'état actif d'un récepteur en comparaison aux agonistes complets qui possèdent une très haute affinité pour cet état.

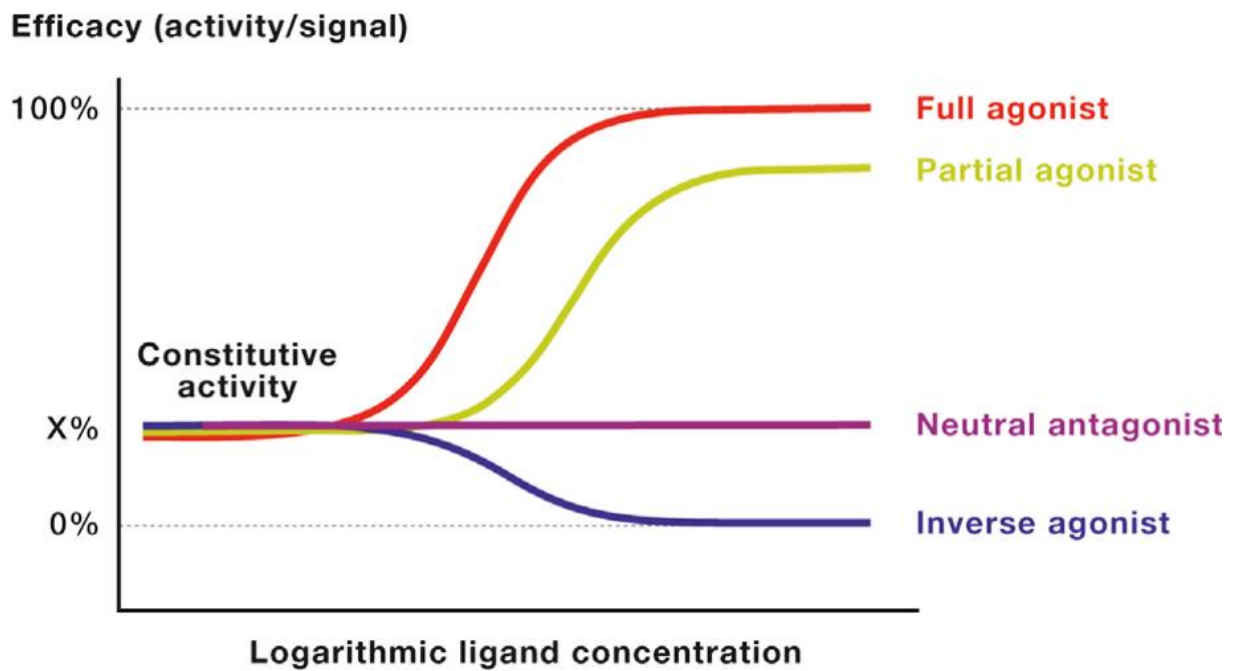
La deuxième différence vient du fait que ces deux types d'agoniste (complet et partiel) ne stabilisent pas la même conformation active du récepteur. En effet, il a été démontré par différents travaux que l'agoniste partiel stabilise une conformation active différente de celle stabilisée par un agoniste complet. A titre d'exemple, la spectroscopie de résonance plasmonique (PWR) a permis de montrer que les récepteurs  $\gamma$ -opioïdes adoptent une conformation active différente en fonction de la nature de l'agoniste utilisé : complet ou partiel [52]. Similairement, les travaux de Ghanouni *et al* ont démontré que la conformation d'un domaine du R  $\beta$ 2A, le domaine de liaison à la protéine G, est différente en fonction de la nature de l'agoniste occupant le site de liaison de ce récepteur [53].

- Les agonistes inverses :

La découverte de ces agonistes a eu lieu tardivement, avec la genèse de RCPG mutants présentant une activité basale plus importante que celle du récepteur sauvage [54]. En présence d'un agoniste inverse, les récepteurs constitutivement actifs se retrouvent à l'état inactif. Ainsi, l'action d'un agoniste inverse n'est observable qu'avec des RCPG présentant une activité basale (**figure 9**). Le rétinol de la rhodopsine est un exemple d'agoniste inverse endogène qui inhibe l'activité constitutive de la rhodopsine en stabilisant sa conformation inactive [55].

- ii. Les antagonistes :

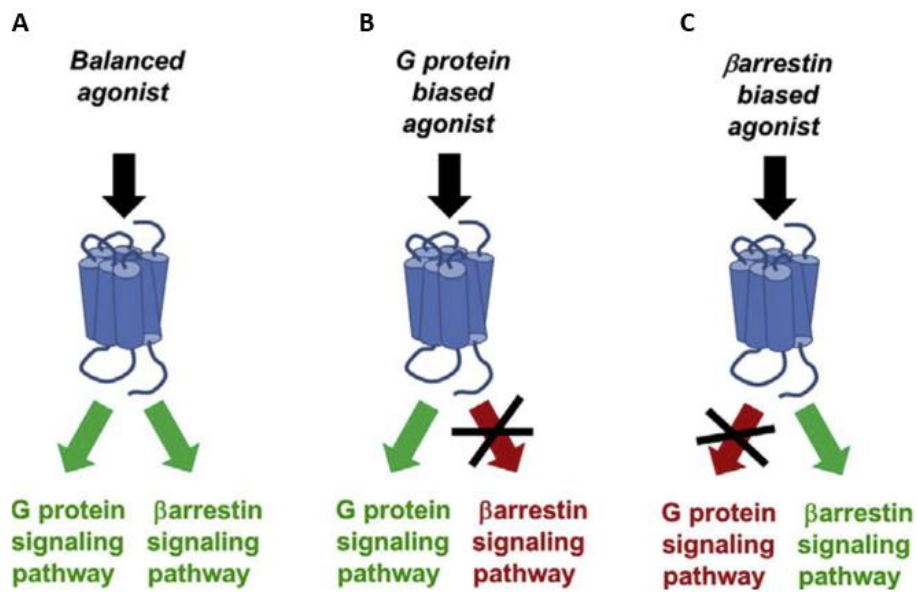
Contrairement à tous les autres types de ligand, un antagoniste présente une affinité similaire pour les états inactifs et actifs d'un récepteur. Son effet consiste à réduire, par compétition, la liaison des autres ligands ce qui atténue l'effet biologique induit par ces derniers. En l'absence d'autres ligands, l'antagoniste est dit neutre car il occupe le site actif sans moduler l'activité des effecteurs du récepteur (**figure 9**).



**Figure 9** : Graphique représentant les différentes réponses biologiques générées par les différents types de ligands (agoniste, antagoniste et agoniste inverse) lors d'une expérience dose réponse, adaptée de [56].

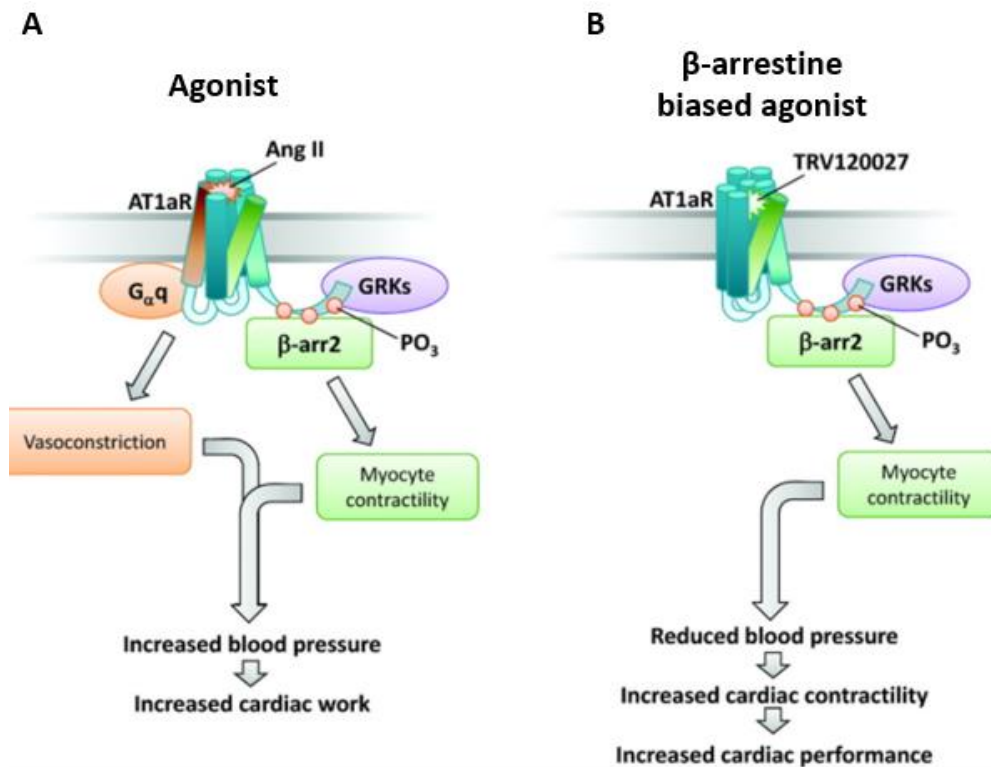
### iii. Les agonistes biaisés :

Traditionnellement, il était admis qu'un même complexe agoniste-récepteur est capable d'activer toutes les voies de signalisation avec la même efficacité intrinsèque. Cependant diverses études sont venues contester ce paradigme classique en révélant que certains agonistes, dits biaisés, peuvent activer les effecteurs d'un RCPG avec une efficacité intrinsèque très différente. Ce nouveau concept, dit de « sélectivité fonctionnelle » ou d'« agonisme biaisé » signifie que la fixation d'un agoniste donné biaise le récepteur en faveur de l'activation d'une voie de signalisation particulière [57]. Par exemple, un ligand biaisé envers les protéines G peut activer spécifiquement des voies dépendantes d'une protéine G sans activer les voies dépendantes des  $\beta$ -arrestines et vice-versa (**figure 10**). Pour les RCPG capables d'activer plusieurs protéines G, il existe des agonistes biaisés capable d'activer spécifiquement les voies de signalisation dépendante d'une seule protéine G.



**Figure 10** : Représentation schématique des effets signalétiques d'un agoniste classique, d'un agoniste biaisé pour la protéine G et d'un agoniste biaisé pour la  $\beta$ -arrestine. **A.** L'agoniste non biaisé active indifféremment les voies dépendantes des protéines G et des  $\beta$ -arrestines. **B.C.** L'agoniste biaisé active majoritairement les voies dépendantes des protéines G (**A**) ou les voies dépendantes des  $\beta$ -arrestines (**C**) [58].

Depuis la découverte du fort potentiel thérapeutique des agonistes biaisés pour les  $\beta$ -arrestines, un nombre important de ces agonistes a été identifié. A titre d'exemple, les agonistes biaisés du récepteur angiotensine II AT1a ont été le sujet de plusieurs études cardiovasculaires. En effet, il a été montré que la stimulation de la signalisation dépendante des  $\beta$ -arrestines, et indépendante des protéines G, par les agonistes biaisés favorise la croissance ainsi que la prolifération des myocytes tout en réduisant les effets néfastes causés par les médicaments conventionnels [59] (**figure 11**).



**Figure 11** : Signalisation biaisée du récepteur angiotensine II AT1a. Contrairement à l'agoniste (**A**) qui active les effecteurs de la voie de la protéine Gq ainsi que les effecteurs de la β-arrestine, l'agoniste biaisé favorise la voie de la β-arrestine (**B**) [59].

### 1.5. La désensibilisation des RCPG :

L'activité d'un RCPG repose sur un équilibre entre les mécanismes d'activation de ses voies de signalisation et ceux qui aboutissent à l'arrêt de la réponse biologique permettant ainsi de contrôler finement la durée de la stimulation cellulaire induite par un récepteur. En effet, pour la plupart des RCPG, l'étape de stimulation par un ligand est suivie par une étape de désensibilisation. Ce processus comprend plusieurs composantes :

- 1) Le découplage de la protéine G du récepteur
- 2) L'endocytose du récepteur qui consiste à internaliser des portions de la membrane plasmique contenant le récepteur découplé de la protéine G vers des compartiments intracellulaires appelés endosomes. Cette étape permet de diminuer la proportion de RCPG exprimés à la surface de la cellule et capables d'émettre un signal.



## Introduction bibliographique

La voie majeure d'internalisation des RCPG est la voie dépendante de la clathrine (clathrin mediated endocytosis, CME) caractérisée par la formation d'invaginations au niveau de la membrane plasmique nommées puits recouverts de clathrine (clathrin coated pits, CCP). D'autres RCPG empruntent une voie d'endocytose indépendante de la clathrine, la voie des cavéoles.

3) La diminution du nombre total de récepteurs exprimés par la cellule suite à la dégradation des récepteurs internalisés au niveau du compartiment lysosomal. Il est important de noter qu'une partie des récepteurs internalisés peut être recyclée au niveau de la membrane plasmique.

Il est important de préciser qu'à l'état inactif, en absence de ligand, la plupart des RCPG subissent une internalisation dite constitutive dont le taux est relativement faible comparativement à l'internalisation induite par un ligand [60]. Les travaux menés à ce jour suggèrent que ce mécanisme est indispensable au contrôle de la distribution membranaire des récepteurs et pour la création d'une réserve de récepteurs disponibles pour remplacer les récepteurs désensibilisés [61].

### i. La phosphorylation des RCPG :

Le déclenchement du processus de désensibilisation dépendante du ligand requiert la phosphorylation des résidus thréonines et sérines situées au niveau des boucles intracellulaires ou de l'extrémité C-terminale des RCPG. Cette phosphorylation, démarrant quelques secondes après l'activation d'un RCPG, diminue son affinité à sa protéine G spécifique et favorise le recrutement de la  $\beta$ -arrestine qui provoque le découplage par gêne stérique du complexe RCPG/protéine G et initie l'internalisation le récepteur découplé [40].

Plusieurs types de kinases peuvent être impliquées dans l'étape de phosphorylation d'un RCPG activé. Les protéines kinases les mieux caractérisées sont les kinases associées aux RCPG, les GRK [62]. La phosphorylation de ces récepteurs membranaires peut aussi avoir lieu via des kinases dépendantes des seconds messagers : PKA et PKC [63].

- Les GRK :

La première kinase indépendante des seconds messagers identifiée a été longtemps nommée la  $\beta$ -Adrenergic Receptor Kinase ( $\beta$ ARK) car elle est impliquée dans la phosphorylation du récepteur R $\beta$ 2A activé [64]. La découverte d'autres kinases indépendantes des seconds messagers a été à l'origine de la découverte de la famille des GRK [62], [65].

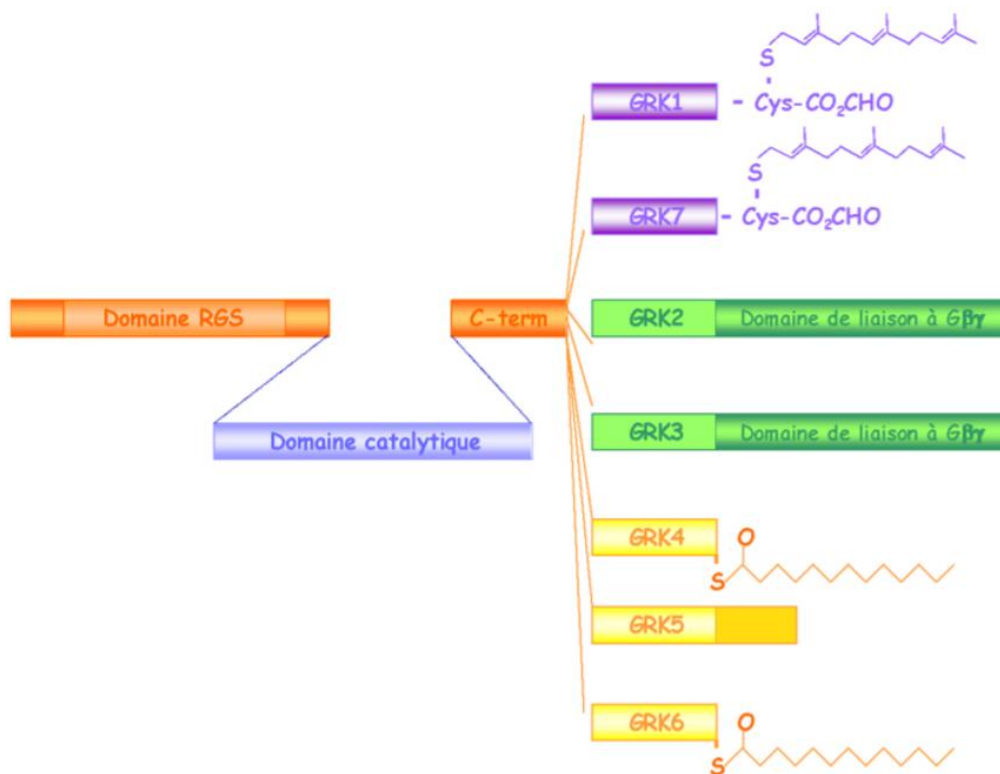


## Introduction bibliographique

Cette famille comprend sept différentes kinases, ayant de fortes similitudes de séquence, et classées en quatre groupes en fonction de leur spécificité pour certains RCPG et de leur localisation tissulaire. On distingue ainsi les GRK-1 et GRK-7, respectivement les GRK de la rhodopsine et du récepteur « cône-opsin », les GRK-2, GRK-3, GRK-5 et GRK-6 exprimés de manière ubiquitaire et la GRK-4 exprimée au niveau du cerveau et des reins. Etant ubiquitaires, les GRK-2, GRK-3, GRK-5 et GRK-6 sont responsables de la phosphorylation de la majorité des RCPG.

Comme indiqué précédemment, ces kinases phosphorylent les sérines et thréonines localisées dans les domaines intracellulaires des RCPG, plus précisément au niveau de la 3<sup>ème</sup> boucle intracellulaire ou de l'extrémité C-terminale. En effet, la mutation de toutes les sérines/thréonines, de l'extrémité C-terminale du récepteur R $\beta$ 2A et de la 3<sup>ème</sup> boucle intracellulaire du récepteur muscarinique M2, en alanine bloque la phosphorylation de ces récepteurs par les GRK [66], [67]. Similairement, le blocage des sites de phosphorylation du récepteur dopaminergique D2 (RD2), situés au niveau de sa 3<sup>ème</sup> boucle intracellulaire, par des anticorps spécifiques, abolit complètement la phosphorylation du récepteur médiée par les GRK-2/3 [68].

Toutes les GRK arborent une structure comprenant un domaine catalytique central et un domaine homologue au RGS (Regulator of G-protein signaling) situé au niveau de l'extrémité N-terminale. Les différentes kinases se distinguent essentiellement par leur domaine C-terminal ce qui va définir leurs propriétés d'association à la membrane plasmique (**figure 12**). Les GRK-2 et GRK-3 ont en commun un domaine C-terminal liant la sous-unité G $\beta\gamma$ . Cette liaison favorise la translocation de ces deux kinases à la membrane plasmique à proximité des récepteurs activés [69]. Les autres kinases, n'ayant pas ce domaine d'interaction à la G $\beta\gamma$ , adhèrent à la membrane plasmique par l'intermédiaire de leurs acides aminés basiques ou par des groupements lipidiques (acylation ou farnésylation) présents sur leur extrémité C-terminale. De ce fait, ces kinases sont présentes d'une manière constitutive au niveau de la membrane plasmique mais elles ne sont actives que lorsque le récepteur est en conformation active [65].



**Figure 12** : Représentation schématique des différentes kinases de la famille GRK (GRK-1/GRK-7). Les kinases de cette famille diffèrent par leur domaine C-terminal : les GRK-1 et GRK-7 sont farnésylées, les GRK-2 et GRK-3 présentent un domaine de liaison à la Gβγ, la GRK-5 présente une séquence riche en résidus basiques lui conférant une affinité pour les phospholipides membranaires, les GRK-4 et GRK-6 sont palmitoylées au niveau des résidus cystéine [70].

- Les protéines kinases PKA et PKC :

Activées toutes les deux par les seconds messagers issus de la signalisation dépendante des RCPG, l'AMPc pour la PKA, le calcium et le DAG pour la PKC, ces kinases sont aussi impliquées dans la phosphorylation des RCPG [63]. A titre d'exemple, le Rβ2A présente une séquence de reconnaissance consensus spécifique pour chacune des kinases (R/K-R/x-x-S/T dans le cas de PKA, S/T-x-K/R dans le cas de PKC) [71].

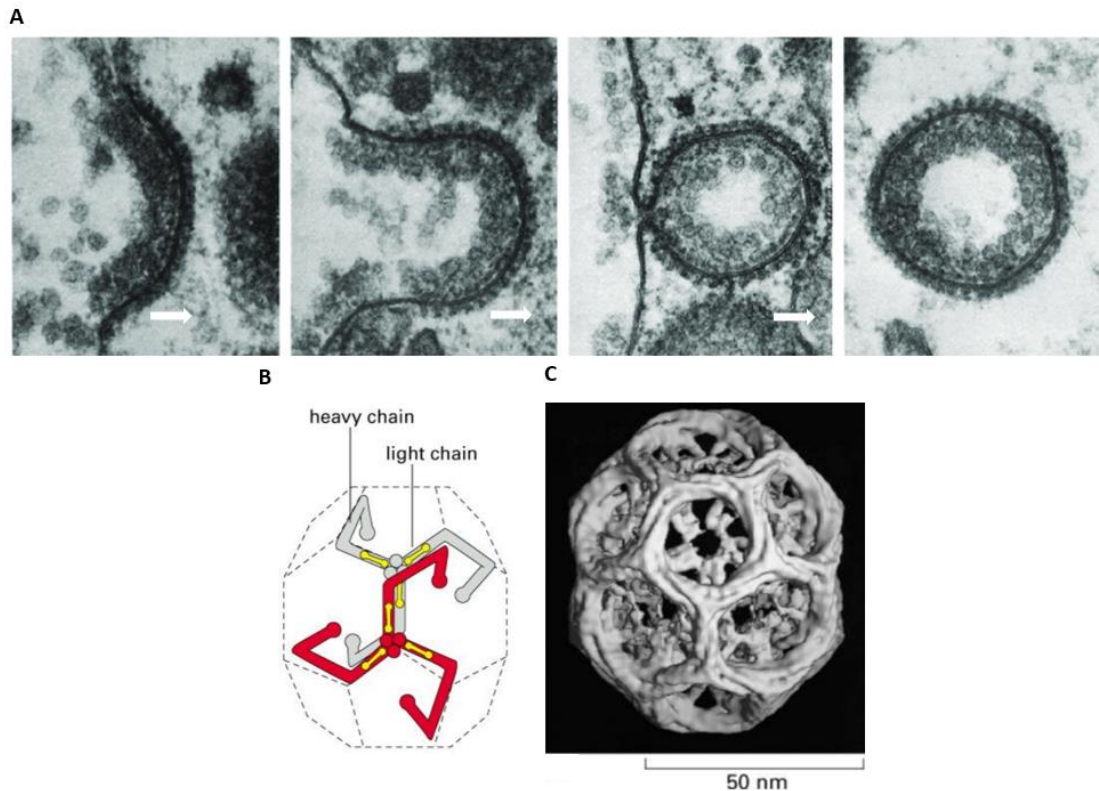
Il est important de noter que les kinases dépendantes (PKA, PKC) et indépendantes des seconds messagers (GRK) sont capables de phosphoryler le même récepteur. Dans le cas du Rβ2A, il a été rapporté que la PKA est recrutée en présence de faibles concentrations d'isoprotérénol (agoniste du Rβ2A) alors que la GRK nécessite de bien plus fortes concentrations [72]. Suite à ces travaux, il a été admis que la fonction de ces deux types de kinases dépend de la concentration d'agoniste.

### ii. Les mécanismes d'internalisation des RCPG :

Plusieurs mécanismes d'endocytose s'offrent aux RCPG, on distingue l'endocytose dépendante de la clathrine et de la  $\beta$ -arrestine, l'endocytose indépendante des deux protéines et l'endocytose dépendante uniquement de la clathrine. Il est à noter que l'endocytose dépendante de la clathrine et de la  $\beta$ -arrestine est le modèle canonique d'internalisation des RCPG.

- L'endocytose  $\beta$ -arrestine et clathrine-dépendante :

C'est la voie d'internalisation la plus caractérisée et la mieux comprise à l'heure actuelle. Elle est empruntée par un grand nombre de récepteurs membranaires y compris les RCPG. Dans cette voie d'internalisation, la vésicule d'endocytose (Clathrin Coated Vesicles, CCV) est formée suite à la polymérisation de la clathrine qui constitue un manteau protéique au niveau de la membrane plasmique parfaitement observable en microscopie électronique, (**figure 13A**). La clathrine est composée de trois chaînes lourdes et trois chaînes légères assemblées en une structure à trois branches nommée triskèle. Ces triskèles peuvent s'auto-assembler pour former une cage rigide autour de la vésicule d'endocytose (**Figure 13B, C**) [73].

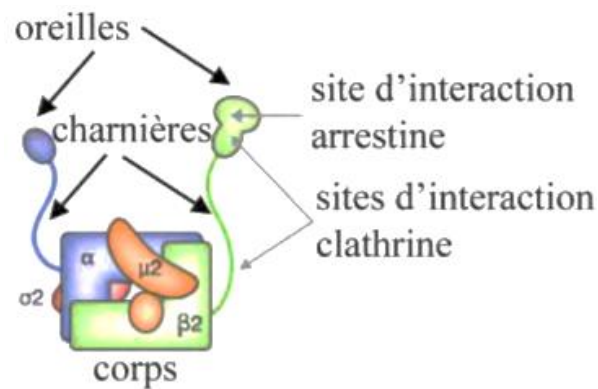


**Figure 13** : Formation d'une vésicule recouverte de clathrine et structure du manteau de clathrine. **A.** Les étapes de formation d'une vésicule, d'environ 150 nm, recouverte de clathrine observée au microscope électronique à transmission. Le manteau de clathrine est visible en noir sur la membrane invaginée ainsi que sur la vésicule néoformée. Les flèches blanches représentent le sens d'invagination de la vésicule d'endocytose. **B.** Représentation schématique de deux triskélions : chaînes lourdes en gris ou rouge et chaînes légères en jaune. **C.** Cage de clathrine vue en microscopie électronique sur laquelle on peut distinguer les triskèles assemblés. Images adaptées de [74] et [75].

L'endocytose des vésicules recouvertes de clathrine nécessite l'action de plusieurs dizaines de protéines et peut être décomposée en deux principales étapes. La première étape est caractérisée par la reconnaissance des motifs spécifiques présents sur le cargo à internaliser (RCPG) par des protéines adaptatrices dites CLASP (CLathrin-coat Associated Sorting Protein). Parmi ces protéines adaptatrices, le complexe hétéro-tétramérique AP-2 (AP, Adaptor ou Assembly Protein) composé de deux grosses sous-unités, appelées adaptines  $\alpha$  et  $\beta_2$ , et de deux petites sous unités  $\mu_2$  et  $\sigma_2$  [76]. Ce complexe est crucial car il fait la liaison entre la clathrine et la membrane plasmique.

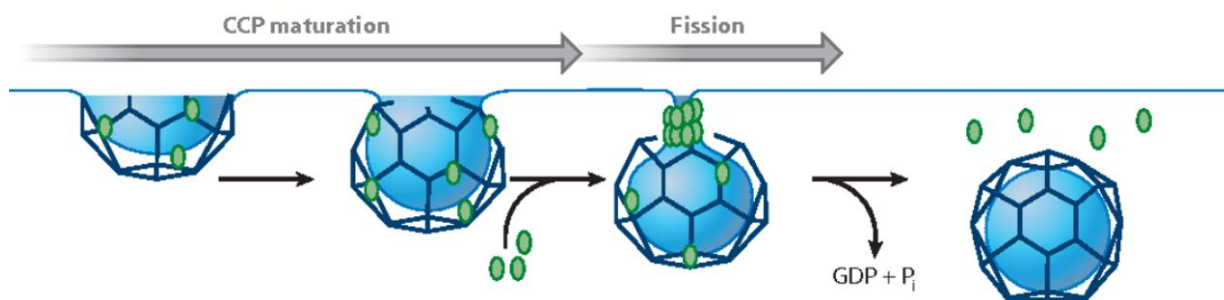
## Introduction bibliographique

Il est aussi capable de lier d'autres protéines adaptatrices comme les  $\beta$ -arrestines et les protéines d'échafaudage (protéines à domaine BAR), qui aident à la déformation de la membrane et participent à différentes étapes de la maturation et de fission des CCP [77] (**figure 14**).



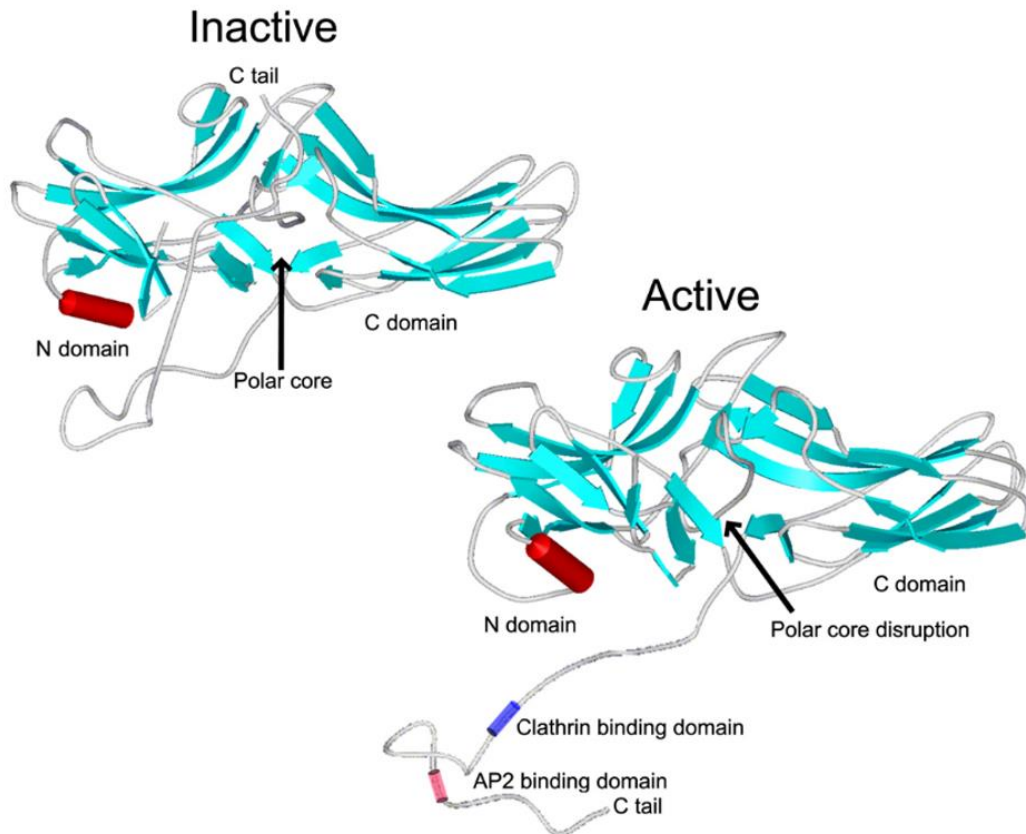
**Figure 14** : Représentation schématique de la structure du complexe AP-2 montrant les sites de liaison à l'arrestine et à la clathrine au niveau de la sous unité  $\beta 2$ -adaptine [78].

Ainsi, toutes ces interactions entraînent la concentration des RCPG au niveau des CCP qui s'invaginent vers le milieu intracellulaire jusqu'à la formation de la vésicule d'endocytose. La séparation de la vésicule, chargée de récepteurs internalisés, se fait par une GTPase, la dynamine, qui polymérise sous forme d'hélice entraînant ainsi la fusion des lipides au niveau du cou de la vésicule et la libération de la vésicule d'endocytose dans le milieu intracellulaire (**Figure 15**) [79]. Une fois libérées dans le cytosol, les vésicules endocytiques sont déshabillées puis dirigées vers des organites spécialisés nommés endosomes (**voir paragraphe 1.5. iii**).



**Figure 15** : La fission de la vésicule d'endocytose par la dynamine. Après la maturation de la vésicule et en présence de GTP, la dynamine (en vert) polymérise au niveau du cou de la vésicule et induit sa fission. L'hydrolyse du GTP en GDP entraîne la dépolymérisation de la dynamine [80].

Comme évoqué à plusieurs reprises, l'interaction du récepteur phosphorylé avec la  $\beta$ -arrestine induit la libération de sa queue C-terminale contenant les motifs de liaison pour le complexe AP-2 et clathrine (**figure 16**) [36], [81].



**Figure 16** : Modèle d'activation de la  $\beta$ -arrestine-2. Changements conformationnels de la  $\beta$ -arrestine-2 et la libération de son extrémité C-terminale exposant à la fois les domaines de liaison à la clathrine et à AP2 [81].

En effet, la résolution de la structure cristallographique de la  $\beta$ -arrestine-1 en complexe avec la clathrine a permis de révéler une interaction de haute affinité entre une séquence consensus située sur l'extrémité C-terminale des  $\beta$ -arrestines et un bandeau de résidus hydrophobes et basiques de l'extrémité N-terminale de la chaîne lourde de la clathrine [82]. Ces interactions ont été confirmées par des études de mutagenèse dirigée montrant que la mutation des résidus formant la séquence consensus de la  $\beta$ -arrestine-1 bloque son interaction avec la clathrine et altère le mécanisme d'internalisation [83]–[85].

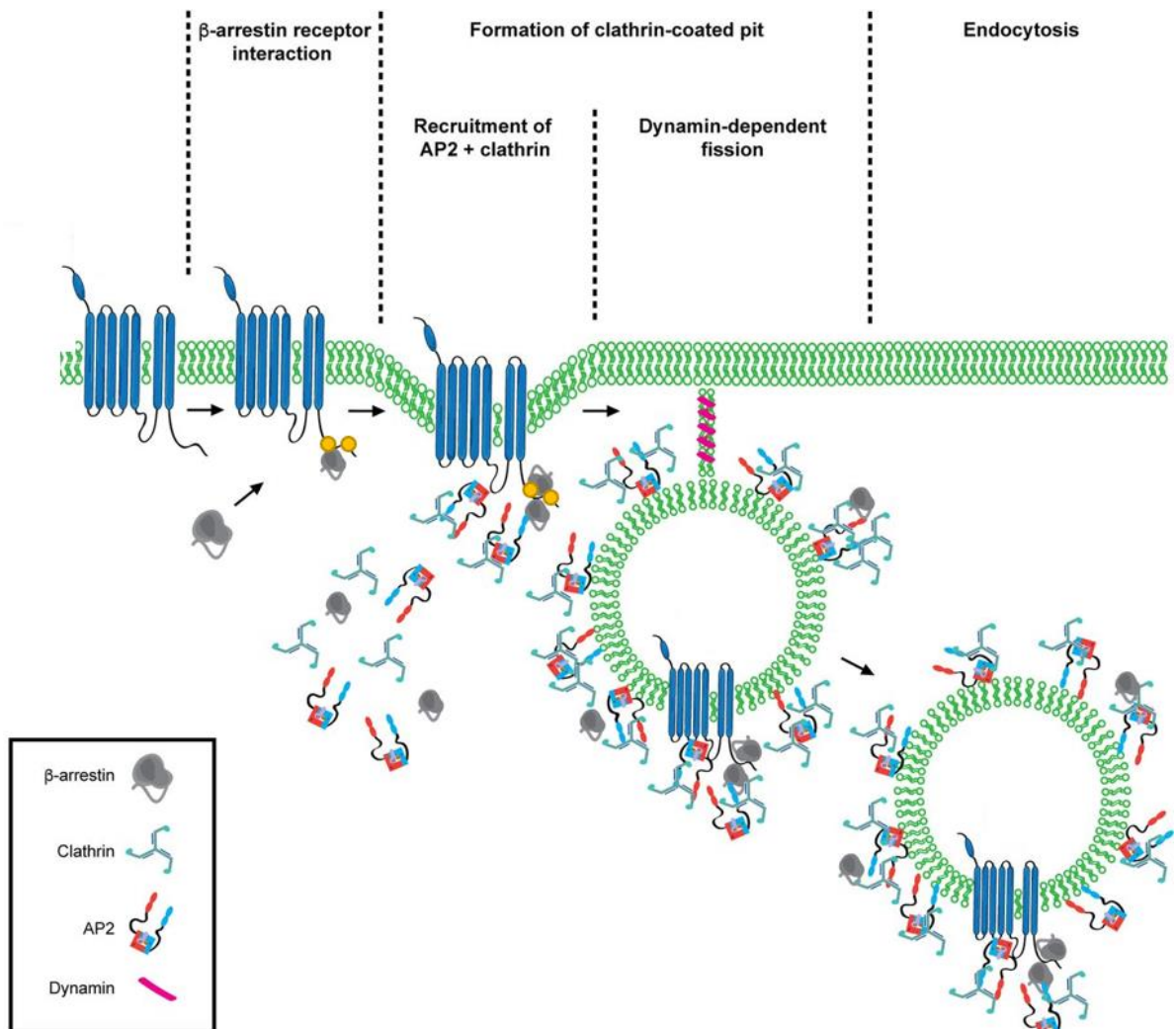
En ce qui concerne l'interaction avec AP2, deux arginines (R394 et R396), de l'extrémité C-terminale des  $\beta$ -arrestines, responsables de l'interaction avec la sous-unité  $\beta$ 2-adaptine du complexe AP-2 ont été identifiées par des expériences de mutagenèse dirigée.



## Introduction bibliographique

Dans ce contexte, il a été montré que la mutation de ces arginines bloque le recrutement du récepteur R $\beta$ 2A vers les CCP sans altérer la formation du complexe  $\beta$ -arrestine-2/ R $\beta$ 2A [83].

En résumé, d'après plusieurs travaux, l'ensemble des interactions spécifiques entre les  $\beta$ -arrestines et les composants majeurs de l'endocytose dépendante de la clathrine (clathrine et AP-2) font des  $\beta$ -arrestines des adaptateurs endocytiques indispensables pour la liaison de certains récepteurs avec la machinerie d'endocytose (**figure 17**).



**Figure 17** : Modèle conventionnel de l'endocytose  $\beta$ -arrestine et clathrine dépendante. L'association de la  $\beta$ -arrestine au RCPG phosphorylé favorise le recrutement des différentes protéines du manteau (AP-2 et clathrine) qui s'organisent pour former un CCP. Le CCP s'invagine vers le milieu intracellulaire jusqu'à la libération de la CCV après l'action de la dynamine, adoptée de [86].

- L'endocytose  $\beta$ -arrestine indépendante et clathrine-dépendante :

Les premières évidences suggérant ce type d'internalisation ont été obtenues à l'aide de mutants négatifs d'arrestine qui n'empêchent pas l'internalisation de divers RCPG [87]–[90]. Ces observations ont été confirmées grâce à l'expression de plusieurs RCPG dans des fibroblastes embryonnaires (MEF) issus de souris KO pour les deux  $\beta$ -arrestines [91]. Ces travaux ont permis de démontrer que l'internalisation du récepteur US28 d'une chimiokine virale est complètement indépendante des  $\beta$ -arrestines. Au contraire, ces études ont confirmé que l'internalisation du R $\beta$ 2A et du récepteur aux chimiokines, CCR5, nécessite l'expression des  $\beta$ -arrestines. Beaucoup d'autres RCPG font partie de cette catégorie notamment le récepteur de la sérotonine de type 2A (5-HT<sub>2A</sub>) [92] et le récepteur de la sécrétine (SR) [93].

Pour certains de ces RCPG, le complexe AP-2 est capable d'interagir directement, avec les récepteurs pour les recruter au niveau des CCP. En effet, la sous-unité  $\mu$ 2 d'AP-2 est capable de se lier au motif tyrosine d'endocytose YXX $\phi$  (ou Y est une tyrosine,  $\phi$  un aa hydrophobe et X n'importe quel aa) présent au niveau de l'extrémité C-terminale de quelques RCPG [94].

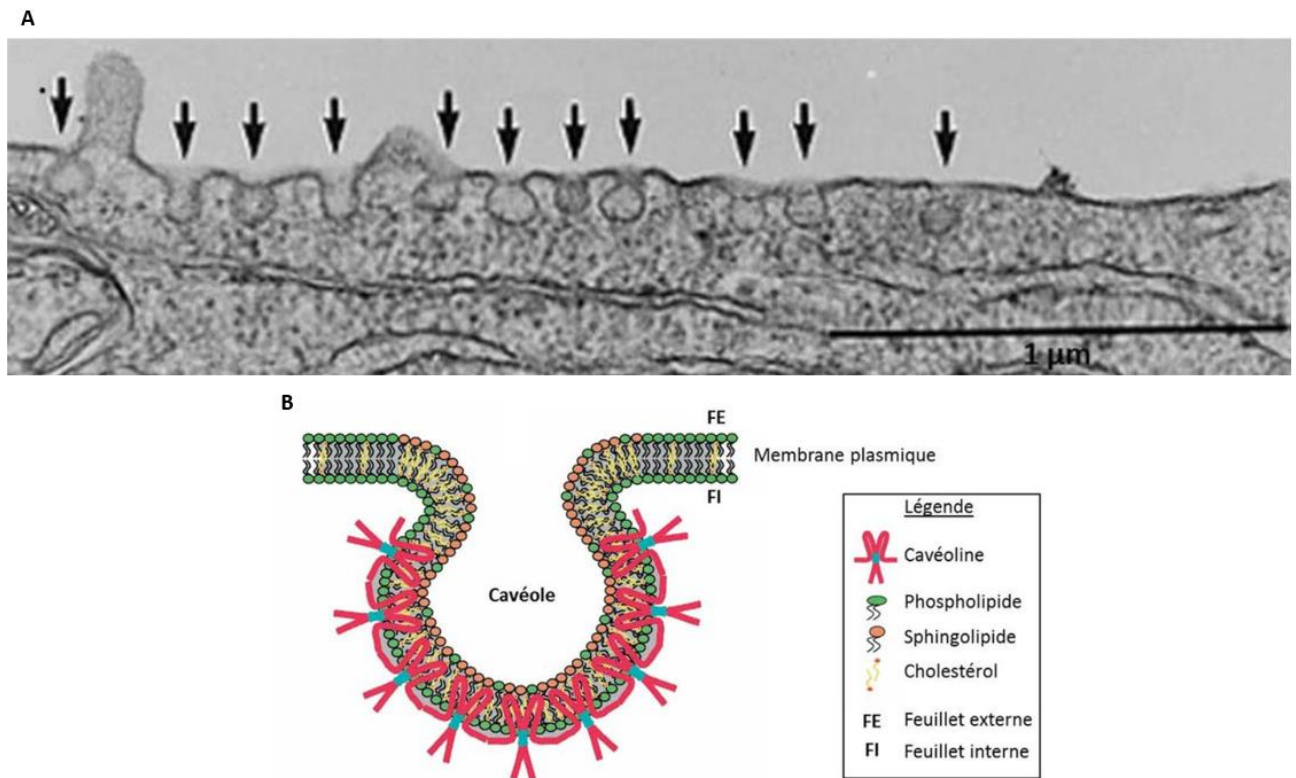
- L'endocytose  $\beta$ -arrestine et clathrine indépendante :

Comme nous l'avons déjà mentionné, l'internalisation des RCPG peut se faire par des voies indépendantes de la clathrine : l'endocytose dépendante des cavéoles [95], [96]. Ce sont des invaginations qui se forment à partir des radeaux lipidiques (rafts) de la membrane plasmique (**figure 18**). La formation de ces invaginations, très enrichies en glycosphingolipides et en cholestérol, est due à la l'oligomérisation de trois protéines, les cavéolines 1/2/3. Similairement à l'endocytose dépendante de la clathrine, la fission des cavéoles est un phénomène dépendant de la dynamine.

Plusieurs RCPG ont été associés aux cavéoles et plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer la localisation de ces récepteurs au niveau de ces structures membranaires. Cette localisation peut être due à :

- 1) L'interaction des RCPG avec le cholestérol qui est très enrichi dans les cavéoles
- 2) L'interaction entre les RCPG et les cavéolines. En effet, des motifs de liaison à la cavéoline-1 ont été identifiés chez tous les RCPG associés aux cavéoles ce qui suggère que cette protéine est impliquée dans l'adressage des RCPG au niveau des cavéoles [95].





**Figure 18** : Structure et composition des cavéoles. **A.** Images de microscopie électronique montrant la formation de cavéoles (indiquées par les flèches noires) à la surface d'une cellule endothéliale [97]. **B.** Les cavéoles sont formées à partir de microdomaines membranaires riches en cholestérol et sphingolipides (radeaux lipidiques) [98].

Dans ce contexte, il est important de préciser que les mécanismes de désensibilisation utilisés par le même RCPG peuvent varier ce qui entraîne un haut degré de complexité du système de désensibilisation des RCPG. A titre d'exemple, il a été montré que l'internalisation du récepteur à l'endothéline de type A peut être clathrine et  $\beta$ -arrestine dépendante mais aussi cavéoles dépendante [99], [100]. Similairement, le R $\beta$ 2A emprunte l'endocytose dépendante de la clathrine en présence de son agoniste alors qu'il utilise les cavéoles pour l'internalisation constitutive [101]. Un autre niveau de complexité se rajoute avec la possibilité pour chaque ligand d'un même RCPG d'entraîner un profil de désensibilisation qui lui est spécifique. C'est le cas pour les agonistes du récepteur  $\mu$ -opioïde (l'étorphine et la morphine). En effet, il a été montré qu'en présence de l'étorphine, le récepteur s'internalise via une endocytose  $\beta$ -arrestine dépendante. A l'inverse, la morphine est à l'origine d'une internalisation indépendante de la  $\beta$ -arrestine [102]. A l'heure actuelle, de nouvelles données bibliographiques sont nécessaires pour savoir si ce nouveau concept, de désensibilisation sélective, est généralisable à d'autres RCPG.

### iii. Trafic intracellulaire des RCPG : devenir des récepteurs internalisés

Quel que soit le mécanisme d'internalisation emprunté, les vésicules endocytiques chargées de RCPG internalisés sont immédiatement acheminées vers des organites vésiculaires, nommés endosomes précoces, avec lesquels elles fusionnent pour libérer leur contenu. Ces structures sont caractérisées par un contenu acide (pH d'environ 6,5) permettant la dissociation des complexes ligand/récepteur. Ces endosomes représentent le point de tri entre :

- 1) Les récepteurs destinés au recyclage vers la membrane plasmique où ils seront à nouveau disponibles pour d'autres cycles d'activation, **c'est le phénomène de resensibilisation** [103].
- 2) Les récepteurs destinés à la dégradation au niveau des lysosomes, spécialisés dans la dégradation protéique, ce qui entraîne la diminution de leur quantité dans la cellule, **c'est la régulation négative à long terme** [103].

En effet, le tri repose sur la structure tubulo-sphérique des endosomes précoces formés de régions tubulaires où se rassemblent les RCPG destinés au recyclage ainsi que de sphères (vésicules) contenant les RCPG qui seront adressés au compartiment lysosomal. Les mécanismes cellulaires gouvernant l'adressage d'un RCPG vers les voies de dégradation ou de recyclage sont encore peu connus. Néanmoins, trois complexes ont été identifiés :

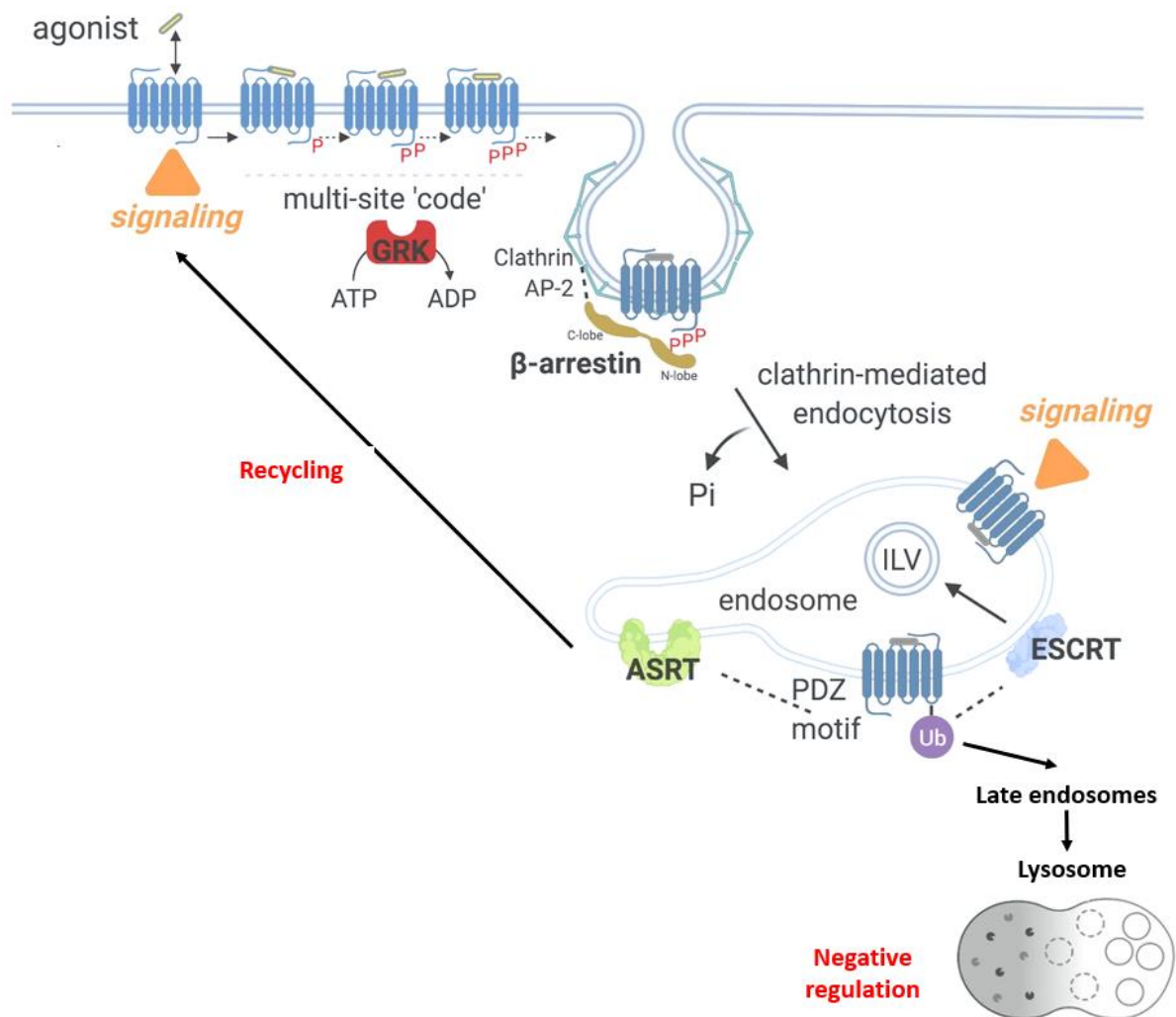
- Les complexes impliqués dans l'adressage des RCPG vers les voies de dégradation :

Deux complexes protéiques sont associés aux voies de dégradation : ESCRT (endosome sorting complex required for transport) et GASP (GPCR-associated sorting proteins) [104], [105]. Le premier complexe requiert l'ubiquitination des RCPG internalisés. En effet, les composants de ce complexe reconnaissent spécifiquement les récepteurs ubiquitinés pour les diriger vers des structures multi-vésiculaires, les endosomes tardifs. Par la suite, ces endosomes fusionnent avec les lysosomes permettant de dégrader les récepteurs en question (**figure 19**). Même si l'ubiquitination est le signal majeur pour la dégradation des RCPG, il a été démontré que certains RCPG sont dirigés vers les lysosomes sans être ubiquitinés. C'est le cas du récepteur d'opioïde murin dont la forme non ubiquitinable a été retrouvée dans les lysosomes [106]. En effet, il a été rapporté que la dégradation de ce récepteur fait intervenir la protéine GASP qui interagit avec le récepteur non ubiquitiné pour l'adresser au compartiment lysosomal.

## Introduction bibliographique

- Le complexe impliqué dans l'adressage des RCPG vers les voies de recyclage :

Il est admis que le recyclage des RCPG est médié par le complexe ASRT (actin/sorting nexin/27-retromer tubule) [107], [108]. En effet, les récepteurs destinés au recyclage interagissent avec les trois composants de ce complexe via un motif de recyclage, dit PDZ, présent au niveau des domaines intracellulaires des RCPG (**figure 19**). Dans ce contexte, des études menées sur les récepteurs adrénergiques, R $\beta$ 1A et R $\beta$ 2A, ont démontré que la mutation de leurs domaines de recyclage ou la baisse de l'expression de l'un des composants du complexe ASRT inhibe le recyclage de ces deux récepteurs [109].



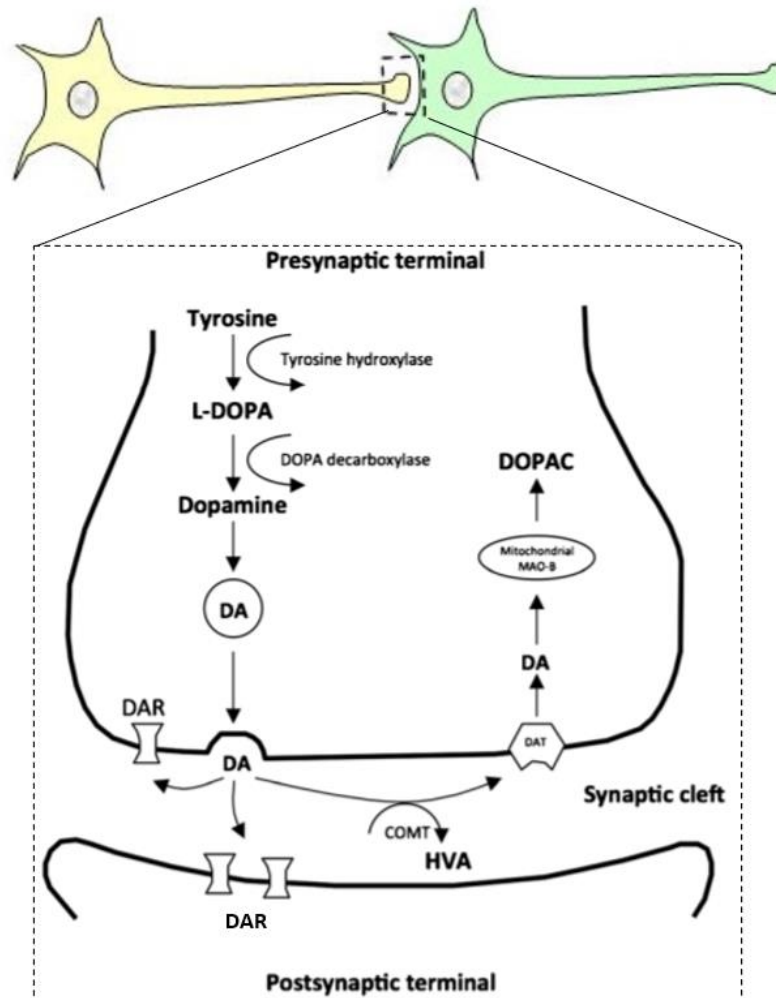
**Figure 19** : Devenir des RCPG internalisés via l'endocytose clathrine et  $\beta$ -arrestine dépendante, modifié de [108].

### 1.6. Les récepteurs dopaminergiques :

#### i. Généralités sur le système dopaminergique :

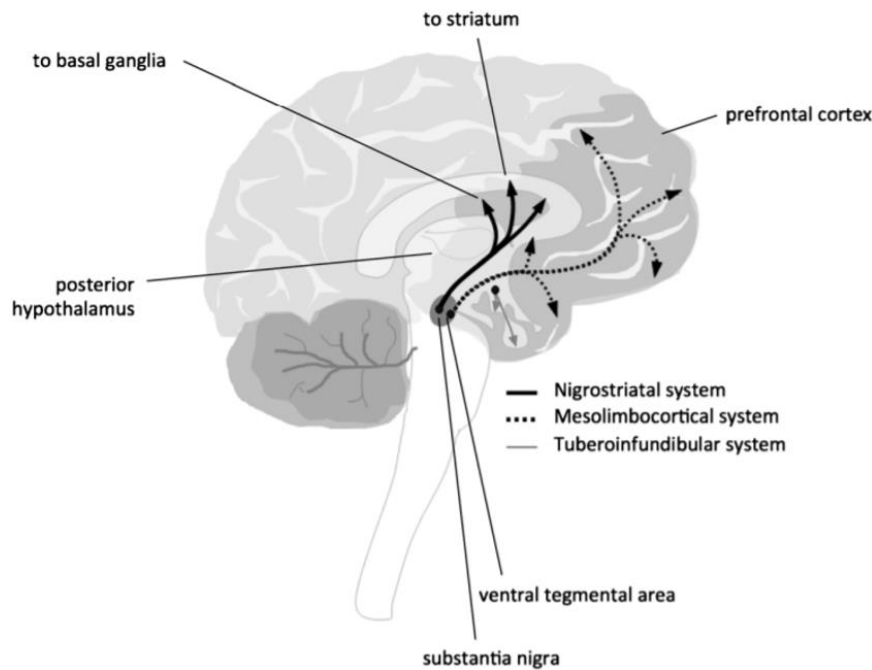
Longtemps considéré comme un simple précurseur métabolique, la dopamine a été identifiée en 1957 comme un neurotransmetteur à part entière [110]. Bien qu'elle soit minoritaire dans le cerveau, par rapport aux autres neurotransmetteurs, la dopamine joue un rôle critique dans le fonctionnement du système nerveux central (SNC), notamment dans les processus d'apprentissage, de récompense et de motivation [111].

Étant donné qu'elle ne traverse pas la barrière hématoencéphalique (BHE), la dopamine est synthétisée au niveau du système nerveux central à partir de la L-tyrosine. Dans un premier temps, cet aa essentiel se transforme en (L)-3,4 dihydroxyphénylalanine (L-DOPA) par la Tyrosine Hydroxylase (TH). La L-Dopa est ensuite décarboxylée en dopamine par la dopa-décarboxylase (DDC). Une fois synthétisée, la dopamine est stockée dans les vésicules synaptiques permettant le maintien d'une concentration élevée en dopamine dans les terminaisons nerveuses. Suite à l'arrivée d'un potentiel d'action au niveau d'une terminaison nerveuse, la dopamine est relâchée dans la fente synaptique pour agir sur des RCPG de classe A, les récepteurs dopaminergiques, situés principalement sur l'élément postsynaptique. Elle se lie également aux autorécepteurs dopaminergiques présents sur l'élément pré-synaptique pour réguler la libération de la dopamine dans la fente synaptique : on parle de rétrocontrôle négatif. Au niveau de la fente synaptique, la dopamine libre peut être re-stockée dans les vésicules synaptiques jusqu'à l'arrivée d'un autre potentiel d'action ou alors catabolisée en acide dihydroxyphénylacétique (DOPAC) par des oxydases avant d'être libérée dans l'espace extracellulaire (**Figure 20**) [112], [113].



**Figure 20** : Transmission dopaminergique entre deux neurones et voie de synthèse de la dopamine, adapté de [113] .

Comme évoqué précédemment, la dopamine est impliquée dans la régulation de plusieurs circuits dont trois sont particulièrement importants et prennent naissance dans la partie haute du tronc cérébral, le mésencéphale. On distingue ainsi la voie mésolimbique, nigrostriée et mésocorticale (**figure 21**). La voie mésolimbique est le faisceau dopaminergique associé au circuit de la récompense, cette voie est impliquée dans la mémoire et la modulation des performances d'un comportement donné (la motivation). Ainsi, la dysfonction de cette voie est associée à des troubles comme l'hyperactivité, les symptômes dépressifs et les déficits d'attention. La voie mésocorticale intervient principalement dans la régulation des fonctions cognitives. La voie nigrostriée, quant à elle, joue un rôle important dans le contrôle des fonctions motrices [113], [114].



**Figure 21 :** Présentation schématique des principales voies dopaminergiques (mésolimbique, nigrostriée et mésocorticale) [113].

### ii. Les différentes classes de récepteurs dopaminergiques :

Les récepteurs dopaminergiques ont été mis en évidence, pour la première fois en 1972, par des études biochimiques montrant que la dopamine stimulait l'activité de l'AC au niveau du SNC [115]. Quelques années plus tard, il a été découvert que la dopamine se liait sur deux populations de récepteurs : une qui active l'AC et une autre qui l'inhibe. Ainsi, les cinq récepteurs dopaminergiques : RD1, RD2, RD3, RD4 et RD5 sont regroupés en deux familles selon la taille de leur BI3, la taille de leur extrémité C-terminale ainsi que leur action (excitatrice ou inhibitrice) sur l'activité de l'AC. On distingue ainsi les récepteurs D1-like (RD1 et RD5) et les récepteurs D2-like (RD2, RD3, RD4) (**tableau 1**).

Les récepteurs D1-like, à l'inverse des récepteurs D2-like, se caractérisent par une longue extrémité C-terminale et une petite BI3. Les RD1 et RD5, partageant ~80% d'homologie de séquence, s'associent à la protéines  $G_s$  pour activer l'AC alors que les récepteurs de la deuxième famille s'associent à la  $G_{i/o}$  [116]. Les récepteurs dopaminergiques sont exprimés dans un nombre important de régions du SNC mais le RD1 et le RD2 sont les plus abondants [116].

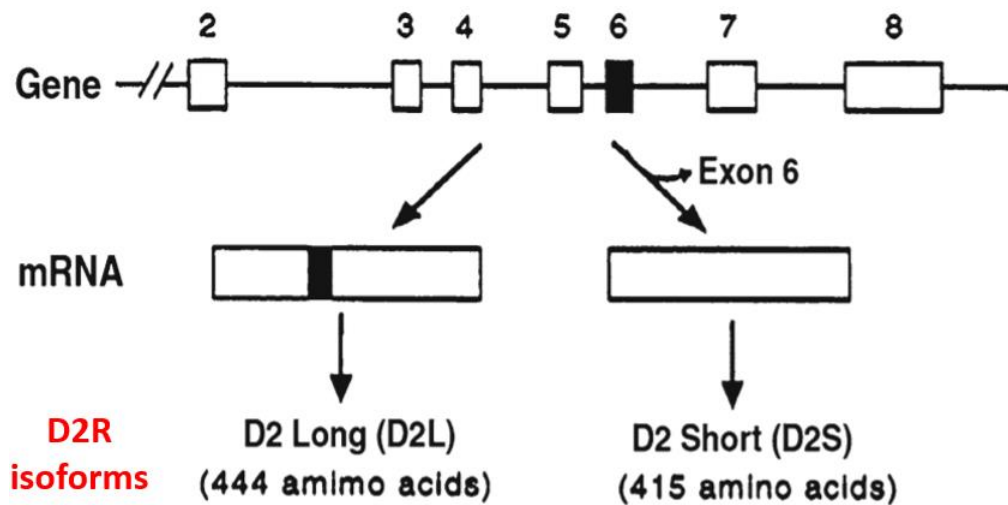


**Tableau 1** : Les voies de transduction et la localisation des différents types de récepteurs dopaminergiques

Famille	D1-like	D2-like
Transduction	Gs Stimulation de l'adénylate cyclase	Gi Inhibition de l'adénylate cyclase
Localisation synaptique	Post-synaptiques	Post-synaptiques Pré-synaptiques Corps cellulaires dopaminergiques

iii. Le récepteur dopaminergique de type 2 :

La transcription du gène du RD2 génère deux isoformes, le D2L (Long) et le D2S (Short), produites par épissage alternatif du même transcrit. Ainsi, l'isoforme longue (D2L, 444 aa) diffère de l'isoforme courte (D2S, 415 aa) par la présence d'un domaine de 29 aa au niveau de la BI3 [117] (**figure 22**). Etant donné que cette boucle intracellulaire est impliquée dans l'interaction avec la protéine Gi-βγ, il est admis que ces deux isoformes présentent une affinité différente pour cette protéine. Dans ce contexte, plusieurs études ont montré que le D2L et le D2S n'ont pas la même capacité à inhiber l'AC [118], [119].



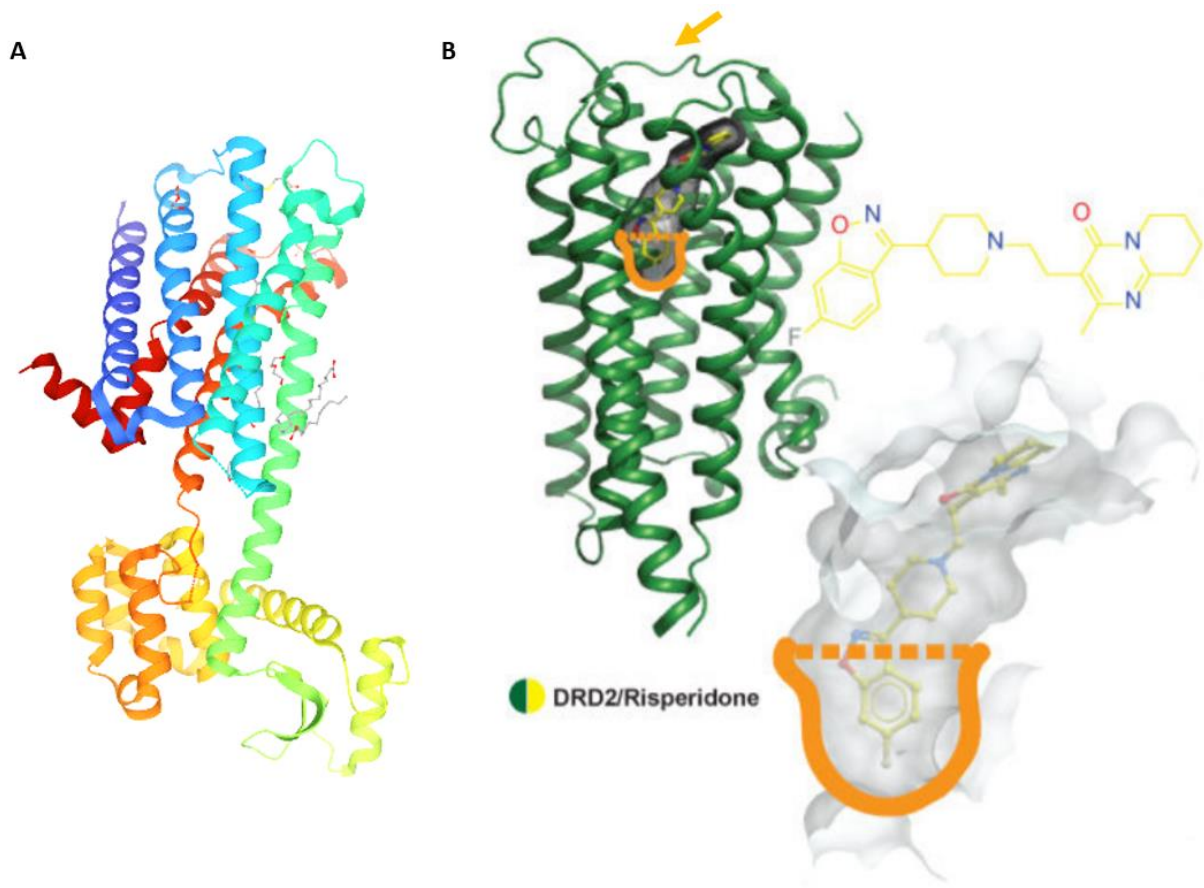
**Figure 22** : Structure du gène du récepteur RD2 humain. Deux transcrits sont générés par épissage alternatif de l'exon 6 d'où l'existence de deux isoformes du RD2, adapté de [117].

La genèse de souris transgéniques n'exprimant qu'une seule isoforme (D2S ou D2L) a permis d'évaluer le rôle fonctionnel pour chacune des isoformes du RD2. Ces études ont permis de démontrer un rôle préférentiel du D2L dans les réponses postsynaptiques telles que la régulation de l'activité motrice. Fait intéressant, chez les souris n'exprimant pas le D2S les fonctions présynaptiques reliées à la régulation de la libération de la dopamine sont inhibées.

Ceci suggère que l'isoforme D2S est préférentiellement exprimée au niveau des neurones présynaptiques où elle joue le rôle d'autorécepteur [120]. Toutefois, ces deux isoformes entraînent une cascade de signalisation assez similaire [121].

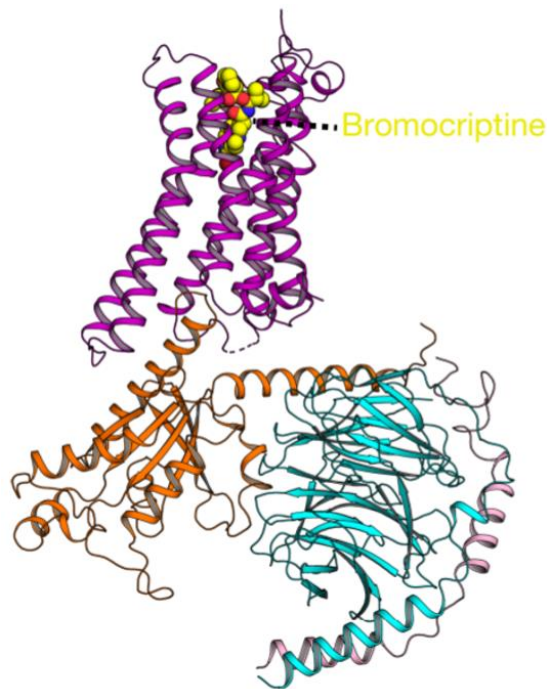
Bien que l'ADNc du RD2 a été isolé depuis 1989 [122], sa structure 3D n'a été publiée qu'en 2018 par Wang *et al* (**figure 23A**) [15]. Pour faciliter le processus de cristallisation, le récepteur (D2L) a été cristallisé en présence de son agoniste inverse, la rispéridone, et démunie de sa BIC3 très longue et très mobile. En effet, cette boucle a été substituée par le lysozyme T4 permettant de réduire la flexibilité du récepteur. D'après ces travaux, le RD2 possède un site de liaison assez particulier, qui le différencie des autres RCPG de classe A, qui s'étend de la cavité extérieure jusqu'au cœur du récepteur. Ce site étendu (extended binding pocket, en anglais) est établi par la jonction de trois hélices (TM 3-5-6) (**figure 23B**). Plus récemment, d'autres structures 3D du RD2 à l'état inactif, lié à deux différents antagonistes (l'halopéridol et la spipéronone), ont été résolues [123], [124]. La comparaison des différentes structures inactives, par Im *et al* [123], a montré une différence considérable entre la structure du RD2 déterminée en présence de la spipéronone et celles obtenues en présence d'halopéridol ou de la rispéridone. D'une manière intéressante, la spipéronone induit une conformation très différente de la BE2, impliquée dans le site de liaison, comparativement aux autres ligands. Ainsi, ces travaux démontrent que le RD2 est capable d'adopter plus qu'une conformation inactive.





**Figure 23** : Structure 3D du RD2 et la représentation de son site de liaison étendu. **A.** Structure 3D du RD2 lié au lysozyme T4 (`PDB 6CM4`). **B.** Représentation schématique du RD2 complexé à la rispéridone : le site de liaison s'étend de la cavité extérieure, indiquée par la flèche orange, jusqu'au cœur du récepteur indiqué par la zone en orange [15]. Etant lié à un agoniste inverse, le RD2 est donc dans un état inactif.

Comme évoqué précédemment, étant un récepteur D2-like, l'activation du RD2 par un agoniste est à l'origine d'un agencement tridimensionnel favorisant la formation du complexe RD2/G $\alpha$ i- $\beta$  $\gamma$ . Très récemment, Yin *et al* [125] ont utilisé la cryo-microscopie électronique pour déterminer la structure 3D de ce complexe reconstitué dans une bicouche lipidique (**figure 24**). La formation du complexe RD2/G $\alpha$ i- $\beta$  $\gamma$  a été induite par la fixation d'un agoniste complet du RD2, la bromocriptine. Ainsi, contrairement à la structure déterminée par Wang *et al*, ces travaux ont permis d'identifier la structure 3D du RD2 à l'état actif.



**Figure 24 :** Structure 3D du complexe RD2/G $\alpha$ i- $\beta$  $\gamma$ . Le RD2 apparaît en magenta, la sous unité G $\alpha$ i apparaît en orange et la sous unité G $\beta$  $\gamma$  apparaît en bleu et rose. Le RD2 est complexé à son agoniste complet qui apparaît en rouge et jaune ([code PDB 6VMS](#)) [125].

Dans un deuxième temps, les auteurs ont réalisé des études de modélisation moléculaire pour identifier les changements conformationnels du récepteur entre la forme inactive, liée à l'agoniste inverse, et la forme active liée à l'agoniste complet. D'après ces travaux la fixation d'un agoniste complet entraîne :

- Le réarrangement de l'extrémité extracellulaire qui s'accommode pour accueillir l'agoniste
- Un changement conformationnel au niveau de la BE2
- Un changement conformationnel au niveau des domaines transmembranaires (TM 5-6-7) ce qui crée un site intracellulaire de liaison à la G $\alpha$ i- $\beta$  $\gamma$ .

## Introduction bibliographique

Dans des conditions physiologiques optimales, la formation de ce complexe (RD2/G $\alpha$ i- $\beta$  $\gamma$ ) est suivie par la diminution du taux d'AMPc suite à l'inhibition de l'AC par la sous unité G $\alpha$ i. Comme d'autres récepteurs dopaminergiques, le RD2 peut moduler l'activité des canaux ioniques via la sous unité G $\beta$  $\gamma$  qui inhibe les canaux calciques dépendants du voltage. Elle peut aussi agir sur les courants potassiques de type G protein coupled inwardly rectifying potassium channel (GIRK) afin d'augmenter ces courants, ce qui engendre une hyperpolarisation membranaire [126]. Comme la majorité des RCPG, la dissociation du complexe (RD2/G $\alpha$ i- $\beta$  $\gamma$ ) ainsi que l'initiation du processus d'internalisation dépendent de la phosphorylation du RD2 par la GRK [127]. Le mécanisme d'internalisation de ce récepteur, endocytose clathrine dépendante, a été identifié suite à la purification des vésicules recouvertes de clathrine, à partir de striatum de bœuf, contenant le RD2 [128]. L'implication de la  $\beta$ -arrestine-2 dans l'internalisation de ce même récepteur a été révélée, à plusieurs reprises, par l'expression d'un dominant négatif de cette protéine cytosolique. A titre d'exemple, Skinbjerg *et al* [129] ont montré que l'internalisation du RD2 est complètement bloquée chez des souris n'exprimant pas la  $\beta$ -arrestine-2.

L'intérêt d'étudier le RD2 provient de l'existence d'un lien causal entre la fonctionnalité de ce récepteur et de nombreuses pathologies psychiatriques comme la schizophrénie, la dépression ou les troubles bipolaires. Dans le cas de la schizophrénie, il a été déjà montré par des expériences de binding (liaison récepteur/ligand) que les antipsychotiques utilisés pour diminuer les symptômes de cette pathologie se lient majoritairement au RD2 [130]. Dans le même contexte, d'autres travaux ont montré que le RD2 est l'une des cibles majoritaires du système dopaminergique pour traiter les troubles de la motivation [131], [132]. Fait intéressant, le taux d'expression du RD2 dans le SNC semble être mis en jeu dans le développement de la schizophrénie et l'amotivation. En effet, la délétion génétique de ce récepteur entraîne une réduction de la volonté à fournir un effort [133], au contraire la surexpression du RD2 l'augmente [134].

Malgré la diversité des symptômes causés par ces pathologies psychiatriques, il a été rapporté que ces désordres ont en commun une altération du métabolisme lipidique au niveau du cerveau de certains acides gras polyinsaturés (AGPI), en particulier les AGPI de type  $\omega$ 3, entraînant une réduction significative des taux des AGPI cérébraux [135]. Ces observations sont à l'origine des hypothèses proposant que ces réductions pourraient influencer sur la transmission dopaminergique dépendante du RD2 via une action directe sur la pharmacologie et la signalisation intracellulaire de ce récepteur.

### 2. La membrane plasmique :

La membrane plasmique, une barrière naturelle délimitant l'intérieur et l'extérieur de la cellule, est le principal point de rencontre des AGPI membranaires et des RCPG. Cette dernière est composée d'une grande variété de lipides assemblés en bicouche, de protéines membranaires et de glucides qui sont attachés à certains lipides et protéines. Les membranes eucaryotes sont essentiellement composées de trois types de lipides : les phospholipides (PL), les sphingolipides et le cholestérol qui s'associent pour former les domaines rafts [136].

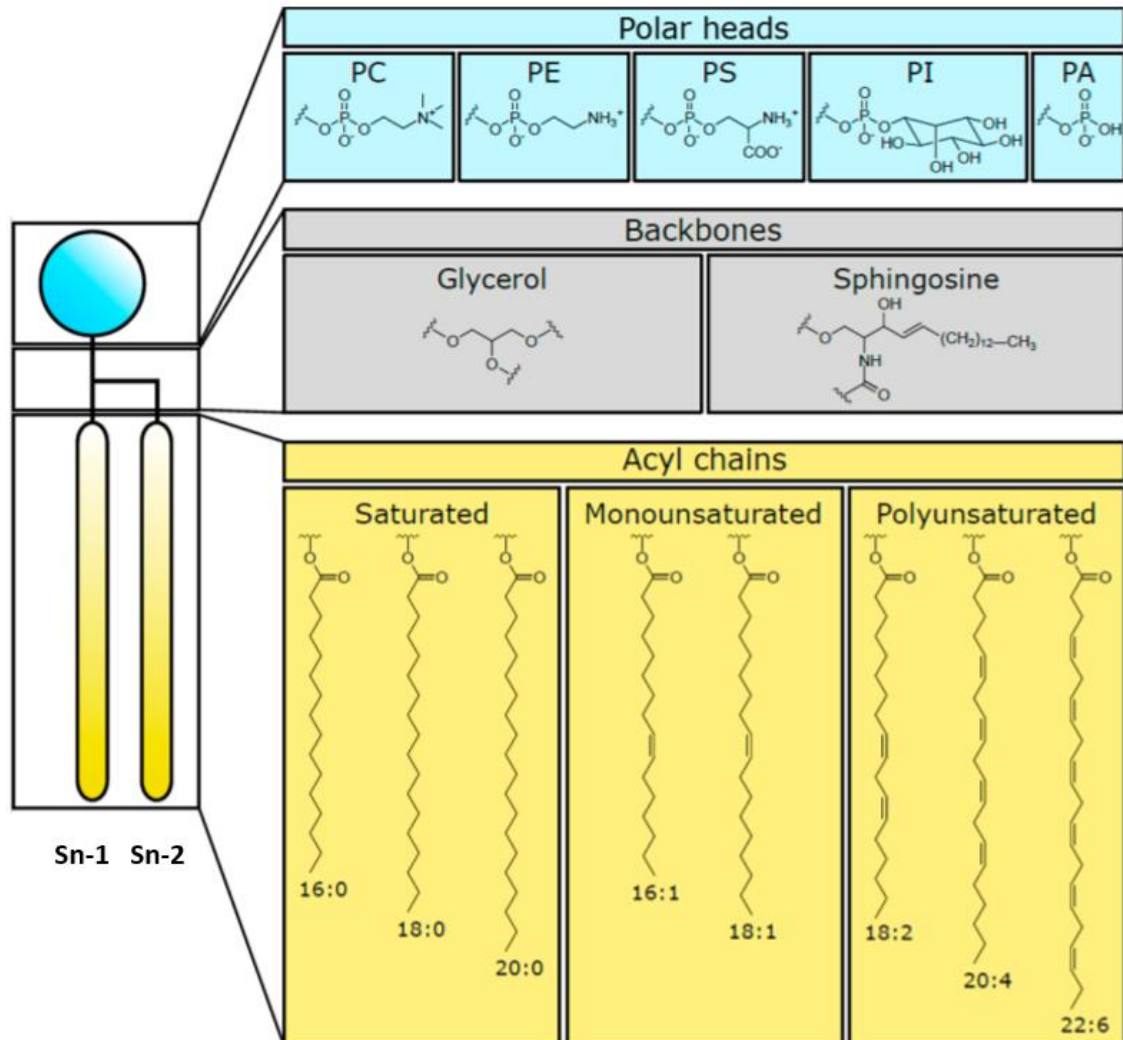
Les PL, composants majoritaires de la membrane plasmique, sont des molécules amphiphiles composées d'une tête polaire qui définit la nature du PL et de deux chaînes carbonées hydrophobes, appelées acides gras (AG), estérifiés en position 1 et en position 2 (sn-1, sn-2). Les têtes polaires des PL sont directement en contact avec les milieux intra et extra-cellulaire tandis que les chaînes carbonées s'associent entre elles pour se regrouper au milieu de la bicouche [137], [138]. La grande variété des têtes polaires (composés plus ou moins encombrants, chargés ou neutres) est à l'origine d'une forte diversité des PL membranaires. Les PL les plus abondants dans les membranes des cellules eucaryotes sont la phosphatidyléthanolamine (PE), le phosphatidylinositol (PI), l'acide phosphatidique (AP), la phosphatidylcholine (PC) et la phosphatidylsérine (PS) (**figure 25**).

On distingue trois familles de PL qui diffèrent par la nature de la liaison reliant deux carbones entre eux (**figure 25**) :

- Les PL saturés : les chaînes carbonées des AG ne contiennent aucune double liaison (C=C, insaturation)
- Les PL monoinsaturés : les chaînes des AG contiennent une seule insaturation
- Les PL polyinsaturés : les chaînes des AG contiennent plus de deux insaturations.

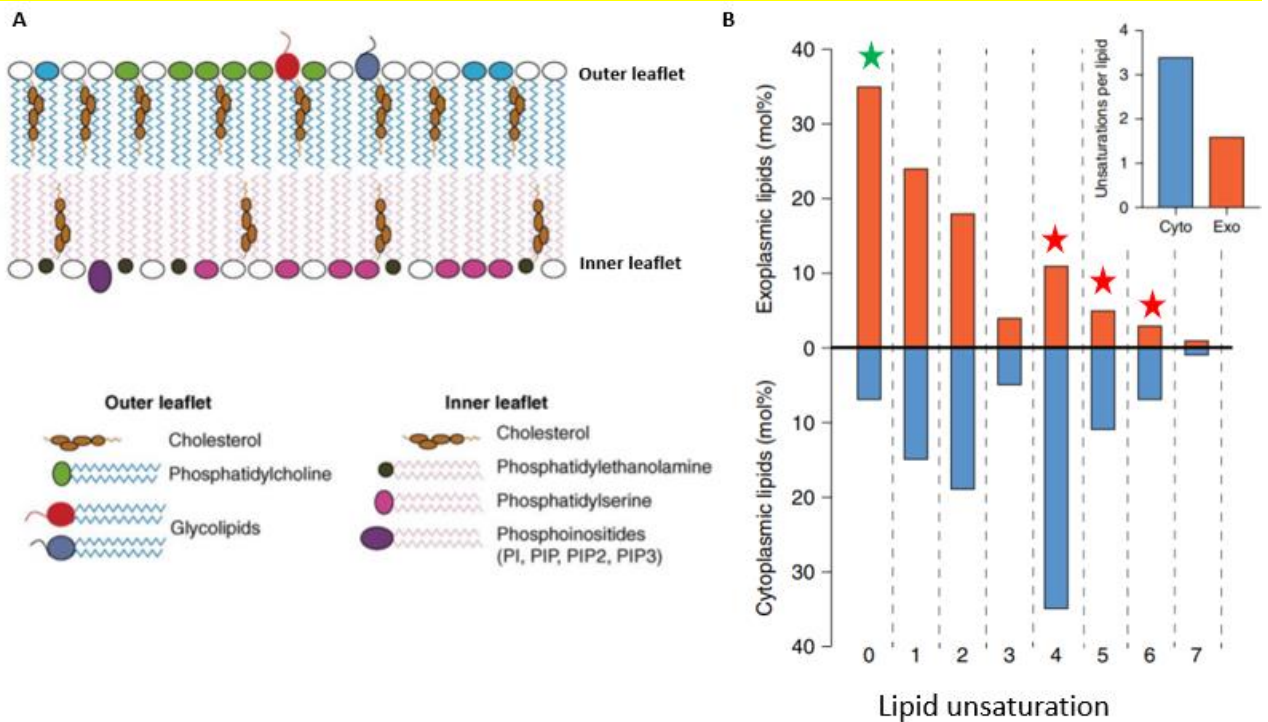
Fait intéressant, plusieurs travaux ont montré que la composition lipidique des deux feuilletts de la membrane plasmique n'est pas similaire, on parle ici d'asymétrie membranaire [139], [140]. En effet, le PI, la PE et la PS sont localisés exclusivement sur le feuillet interne de la membrane alors que les glycolipides et la PC sont concentrés seulement du côté extracellulaire (**figure 26A**). Cette asymétrie de la composition lipidique semble être accompagnée par une asymétrie des chaînes aliphatiques. En effet, des études de lipidomique poussées menées par le groupe de Levental ont révélé un fort taux de PL polyinsaturés dans le feuillet cytosolique des érythrocytes [141]. A l'inverse, le feuillet externe contient beaucoup de PL saturés (**figure 26B**).

Similairement, pour une vésicule synaptique la polyinsaturation concerne principalement les PL du feuillet interne (PS et PE) ce qui suggère la présence de beaucoup plus de chaînes insaturées dans le feuillet interne comparant au feuillet externe [142].



**Figure 25 :** Représentation schématique illustrant la structure des PL et les possibilités combinatoires à l'origine de leur diversité. **PC**, phosphatidylcholine ; **PE**, phosphatidyléthanolamine ; **PS**, phosphatidylsérine ; **PI**, phosphatidylinositol ; **PA**, acide phosphatidique. Cette liste représente les PL les plus abondants dans les membranes eucaryotes, adapté de [137].





**Figure 26** : Asymétrie des lipides de la membrane plasmique. **A.** Distribution asymétrique des PL membranaires : le PI, PE et PS sont retrouvés sur le feuillet interne alors que les glycolipides et la PC sont retrouvés sur le feuillet externe, adapté de [139]. **B.** Asymétrie de la répartition des chaînes polyinsaturées dans les feuillets des érythrocytes. Les PL polyinsaturés ayant de 4 à 6 insaturations, indiqués par les étoiles rouges, sont plus abondants dans le feuillet interne en revanche de nombreux PL du feuillet externe sont saturés (étoile verte), adapté de [141].

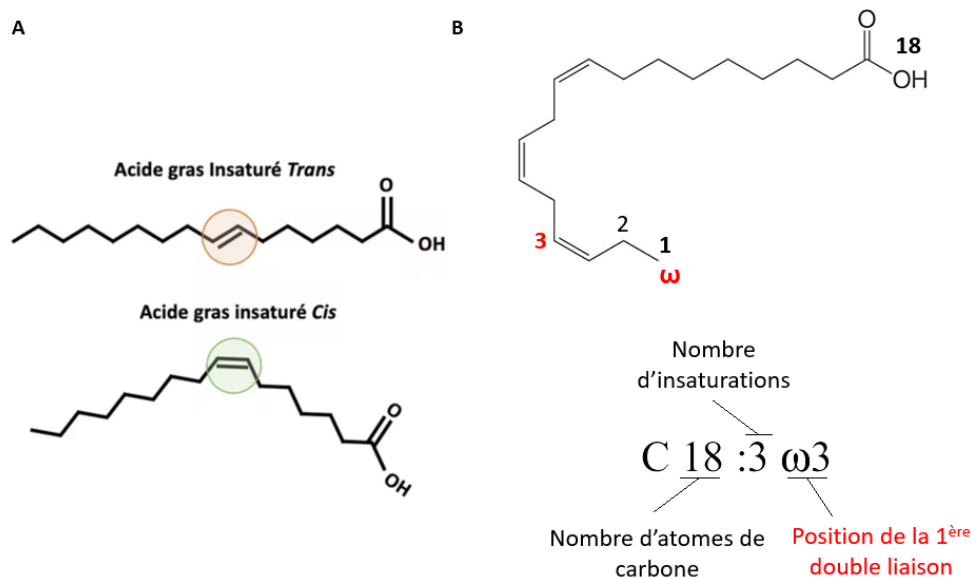
## 2.1. Généralités sur les AGPI :

### i. Nomenclature et classification :

Comme cité précédemment, les AG sont des molécules possédant une chaîne hydrocarbonée plus ou moins longue, une fonction carboxylique et un groupement méthyl. Les AG sont classés en fonction du nombre d'atomes de carbone constituant la chaîne carbonée : AG courts (< 8 atomes de carbone), AG moyens (entre 8 et 12 atomes de carbone), AG longs (entre 14 et 18 atomes de carbone) ou AG très longs (à partir de 20 atomes de carbone). Les AG peuvent être saturés (AGS), en l'absence d'insaturation, monoinsaturés (AGMI) ou polyinsaturés (AGPI) selon le nombre d'insaturations présentes sur la chaîne carbonée. Ainsi ces derniers se distinguent par : **1)** La longueur de la chaîne carbonée, **2)** Le nombre d'insaturation, **3)** la position ainsi que la structure spatiale des insaturations : *cis* (lorsque les hydrogènes portés par deux atomes de carbone liés par une double liaison (-HC=CH-) sont situés du même côté du plan) ou *trans* (lorsque les H sont situés de part et d'autre de ce même plan) (**figure 27A**).

## Introduction bibliographique

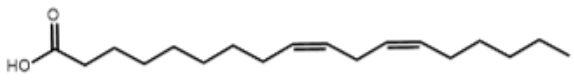
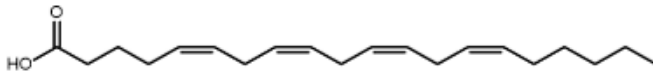
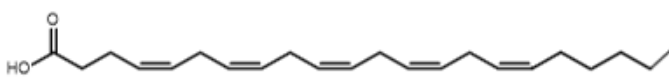
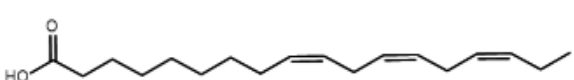
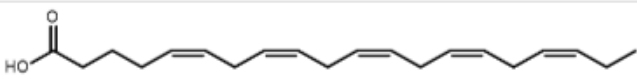

Ces différents paramètres sont pris en compte dans la nomenclature des AG ( $C_x: y \omega_z$ ) où  $C_x$  indique le nombre d'atomes de carbone,  $y$  indique le nombre d'insaturations et  $\omega_z$  indique la position de la première insaturation à partir du méthyl terminal (**figure 27B**).



**Figure 27** : Structure spatiale des doubles liaisons C=C (**A**) et la nomenclature d'un AGPI : l'acide linoléique de type  $\omega_3$  (**B**).

Selon cette nomenclature, il existe des AGMI de la famille  $\omega_9$  et  $\omega_7$  ainsi que les AGPI de type  $\omega_6$  et  $\omega_3$  ayant plus de deux insaturations qui apparaissent tous les 3 carbones. Ces AG dérivent, respectivement, de l'acide oléique (AO, 18 :1  $\omega_9$ ), de l'acide palmitoléique (AP, 16 :1  $\omega_7$ ), de l'acide linoléique (AL, 18 :2  $\omega_6$ ) et de l'acide  $\alpha$ -linoléique (ALA, 18 :3  $\omega_3$ ). Parmi les principaux AGPI de type  $\omega_3$ , on trouve l'acide eicosapentaénoïque (EPA, 20 :5  $\omega_3$ ) et l'acide docosahexaénoïque (DHA, 22 :6  $\omega_3$ ). L'acide arachidonique (AA, 20 :4  $\omega_6$ ) et l'acide docosapentaénoïque (DPA, 22 :5  $\omega_6$ ) sont les principaux AGPI de type  $\omega_6$  (**tableau 2**).

**Tableau 2** : Les principaux AGPI et leurs précurseurs

Shorthands	Structure	Common name
C18:2, $\omega$ 6		Linoleic acid
C20:4, $\omega$ 6		Arachidonic acid
C22:5, $\omega$ 6		Docosapentaenoic acid
C18:3, $\omega$ 3		$\alpha$ -Linolenic acid
C20:5, $\omega$ 3		Eicosapentaenoic acid
C22:6, $\omega$ 3		Docosahexaenoic acid

## ii. Biosynthèse et sources alimentaires :

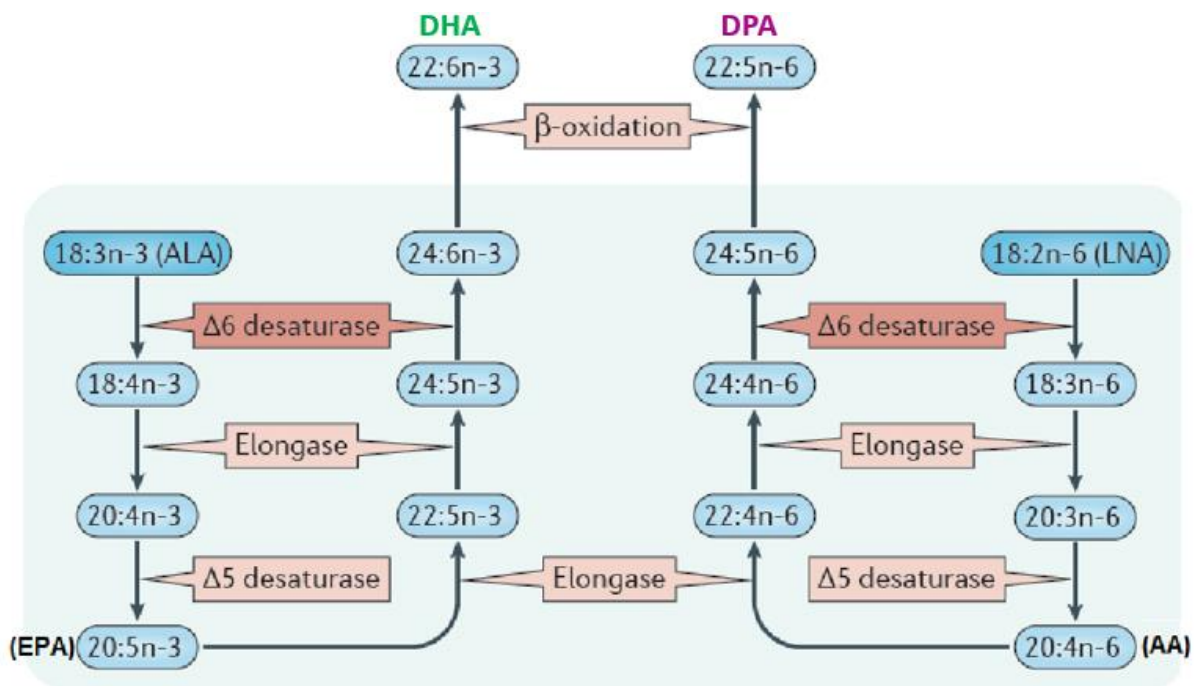
Contrairement aux végétaux et certains invertébrés, les mammifères ne possèdent pas les désaturases permettant d'éliminer deux atomes d'hydrogène entre deux carbones adjacents pour introduire une double liaison en position  $\omega$ 3 et  $\omega$ 6. Par conséquent, la synthèse des AGPI,  $\omega$ 3 et  $\omega$ 6, à longues chaînes se fait à partir de leurs précurseurs respectifs, ALA et AL, dits essentiels du fait qu'ils ne peuvent pas être synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation. Une fois ingérés, ces précurseurs subissent une série de réactions d'élongation (addition de deux atomes de carbones) et de désaturation permettant de synthétiser des AG ayant une plus longue chaîne carbonée et un plus grand nombre d'insaturations : l'AA pour la famille  $\omega$ 6 et l'EPA pour la famille  $\omega$ 3.

La conversion de l'ALA et l'AL en AA et EPA est catalysée par les désaturases  $\Delta$ 6 et  $\Delta$ 5 et une élongase. Il est important de préciser que ces AGPI ne sont pas inter-convertibles, mais rentrent en compétition puisque les mêmes élongases et désaturases sont utilisées par leurs voies métaboliques. En cas de déficience en DHA ou en DPA, les voies de biosynthèses peuvent se poursuivre jusqu'à la formation de ces derniers. Contrairement à celle du DHA, la synthèse du DPA nécessite une  $\beta$ -oxydation permettant d'éliminer deux atomes de carbone [143] (**figure 28**).



## Introduction bibliographique

Les AGPI,  $\omega$ 3 et  $\omega$ 6, à longues chaînes sont majoritairement synthétisés dans le foie sur-exprimant les désaturases  $\Delta$ 6 et  $\Delta$ 5 ainsi que les élongases. Il est important de préciser que le cerveau est capable de synthétiser de très faibles proportions d'AGPI en comparaison avec le foie [144].



**Figure 28** : Synthèse *de novo* des AGPI à longues chaînes à partir de leurs précurseurs, ( $n = \omega$ ) correspond à la position de la première double liaison par rapport au groupement méthyle, adaptée de [143].

Les AGPI essentiels, ALA et AL, se trouvent principalement dans les aliments d'origine végétale. En effet, l'AL est très abondant dans les graines et la plupart des plantes comme le soja et le tournesol, tandis que l'ALA se retrouve dans les huiles végétales comme les huiles de noix, de lin et de pépins de raisins. Il est également possible d'avoir un apport direct en AGPI à longue chaîne à partir des poissons (sardine, thon et saumon) et des fruits de mer qui ont une alimentation très riche en microalgues [145].

L'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANES) conseille de limiter les apports en AGPI *trans*, principalement issus de procédés industriels comme l'hydrogénation des huiles végétales, car ces derniers sont associés à une augmentation du risque cardiovasculaire.

Selon la dernière réactualisation de l'ANES, l'apport nutritionnel en AL a été fixé à 4% de l'apport énergétique contre 1% pour l'ALA avec un rapport  $\omega$ 6/ $\omega$ 3 conseillé inférieur à 5.

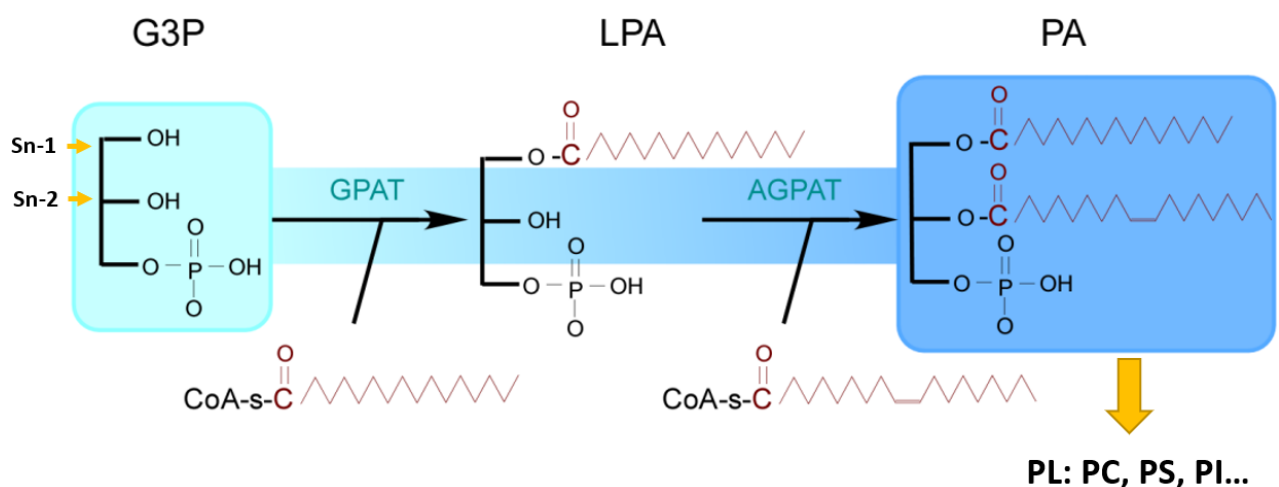
## Introduction bibliographique

Maintenant que nous avons expliqué l'origine et les différentes voies de synthèse des AGPI, voyons comment ces derniers s'insèrent au niveau des PL.

### iii. Insertion des AGPI au niveau des PL :

L'incorporation des AGPI au sein des PL se fait au cours de la synthèse *de novo* de ces derniers. En effet, la première étape de synthèse des PL consiste à convertir le glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P) en acide lysophosphatidique (LPA) par la G3P acyltransférase (GPAT) qui insère un AG activé sous forme d'AG-CoA en position sn-1. La deuxième étape est catalysée par la sn-acyl-G3P acyltransférase (AGPAT), ou LPAAT pour LPA acyltransférase, permettant l'estérification d'un deuxième AG-CoA en position sn-2 pour former l'acide phosphatidique (AP) : substrat nécessaire à la synthèse des différents PL membranaires [146] (**figure 29**).

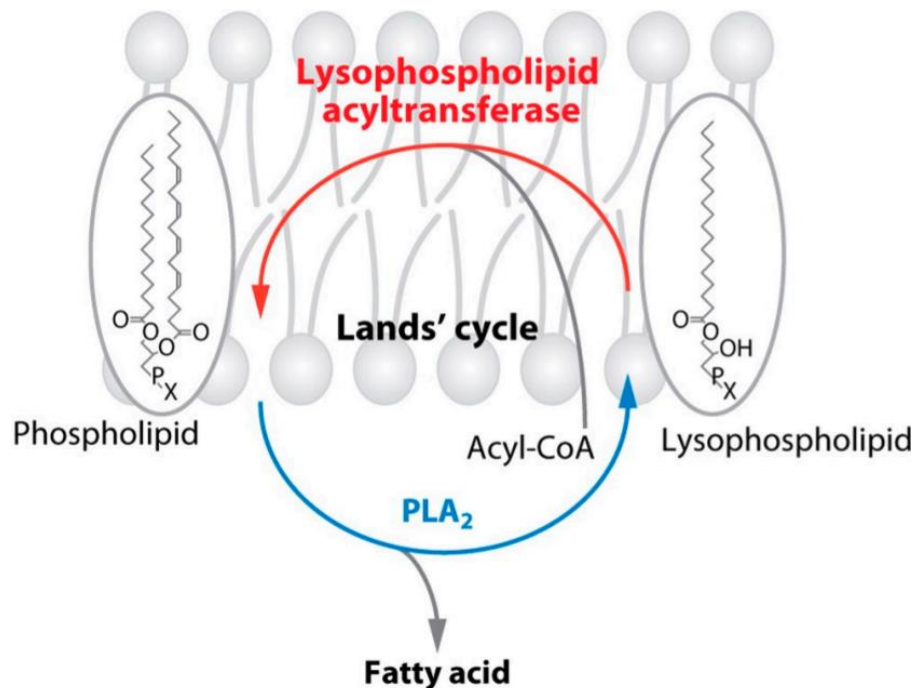
Chez les mammifères, il est bien admis que les GPAT ont une haute affinité pour les AG saturés et monoinsaturés tels que l'acide palmitique (16 :0) et l'acide oléique (18 :1). Dans le même contexte, l'AGPAT de type 3 (AGPAT3) a une meilleure affinité pour les AGPI à longues chaînes notamment l'AA et le DHA [147]. Par conséquent, les PL ont communément un AGS en position sn-1 et un AGPI en sn-2 [148].



**Figure 29** : Représentation simplifiée de la voie de synthèse des PL à partir du G3P montrant les étapes d'estérification des deux chaînes d'AG (activés sous forme d'acyl-CoA) en position sn-1 et sn-2.

Il est important de préciser que les AGPI estérifiant les PL peuvent être remodelés par des phospholipases et des lysophospholipides transférases (LPLAT). En effet, la phospholipase A2 (PLA<sub>2</sub>) hydrolyse des phospholipides membranaires en position sn-2 entraînant la libération d'AG qui sont des AGPI dans la plupart des cas. Cette hydrolyse génère donc un lysophospholipide qui se transforme de nouveau en un PL suite à l'action d'une LPLAT.

Cette succession de réactions (hydrolyse par la PLA<sub>2</sub> + estérification par la LPLAT) constitue un cycle de remodelage membranaire très conservé chez les eucaryotes appelé cycle de Lands [149] (**figure 30**).



**Figure 30** : Représentation schématique du cycle de Lands [150].

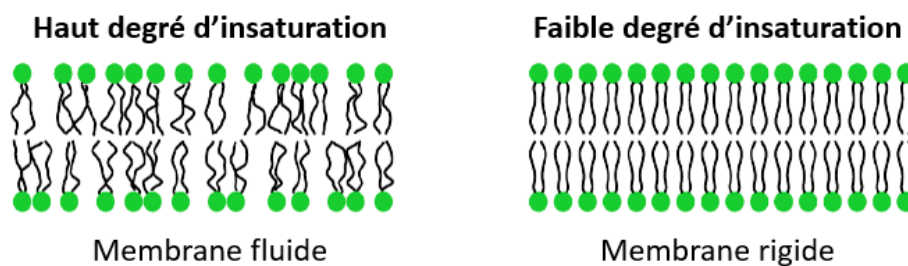
#### iv. Impact des AGPI sur les propriétés de la membrane :

Comme nous l'avons détaillé dans une revue annexe (**Baccouch *et al*, annexe 1**), le niveau d'insaturation d'une membrane plasmique lui confère des propriétés physicochimiques très spécifiques (diminution de l'épaisseur et de la perméabilité, une meilleure déformation et fluidité membranaire, etc...) essentielles pour assurer de nombreuses fonctions telles que la division et la défense cellulaire, les processus d'endocytose et exocytose ainsi que la transmission de signal. Dans cette partie, nous nous focaliserons principalement sur l'impact des AG insaturés sur la fluidité et la déformation membranaire.

La fluidité membranaire est définie par la mobilité des lipides qui la composent. Cette propriété est assurée par une diffusion latérale ( $1\mu\text{m}^2/\text{s}$ ) ainsi que par des mouvements de rotation et de balancier des lipides au sein d'un même feuillet. Plus rarement, les lipides membranaires peuvent passer d'un feuillet à l'autre grâce à une diffusion transversale appelée « flip-flop ». Ces différents mouvements lipidiques dépendent de plusieurs facteurs notamment la nature des chaînes des AG insérées dans les PL membranaires.

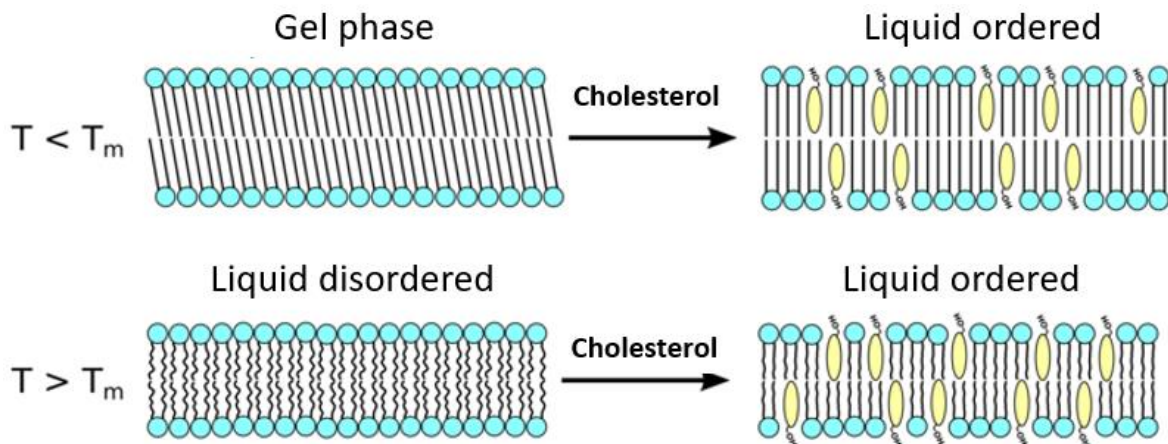
## Introduction bibliographique

En effet, au-dessus d'une certaine température dite température de transition de phase ( $T_m$ ), les lipides membranaires passent d'un état gel à un état liquide. Les membranes biologiques peuvent adopter deux états liquides : un état ordonné ( $L_o$ ) et un état désordonné ( $L_d$ ). Dans ce contexte, il a été montré par des techniques physico-chimiques variées que le degré d'insaturation des chaînes carbonées diminue cette température ce qui favorise la transition de phase [151]. Ainsi, contrairement aux PL saturés, les PL polyinsaturés se retrouvent dans un état liquide désordonné. Cet état est dû à la structure de la double liaison qui crée un coude rendant plus difficile l'alignement des chaînes carbonées. Ceci entraîne la formation d'espaces de liberté à l'origine d'une meilleure fluidification des membranes (**figure 31**).



**Figure 31** : Représentation schématique de l'organisation des lipides membranaires en fonction du degré d'insaturation des PL.

Outre le taux d'insaturation, il a été montré que la température de transition de phase augmente en fonction de la longueur de la chaîne carbonée. De ce fait, les PL ayant des longues chaînes carbonées se retrouvent dans un état gel et donc rigide. Dans ce sujet, il est important de mentionner le rôle complexe du cholestérol dans l'organisation membranaire. En effet, lorsque la membrane est en phase liquide désordonnée le cholestérol s'insère tout en réduisant l'espacement entre les chaînes insaturées ce qui entraîne la diminution de la fluidification membranaire et son passage à l'état liquide ordonné. En revanche, dans le cas d'une bicouche en phase gel, constituée majoritairement d'AGS, le cholestérol induit un écartement entre les chaînes ordonnées ce qui favorise l'état liquide ordonné (**figure 32**) [152].



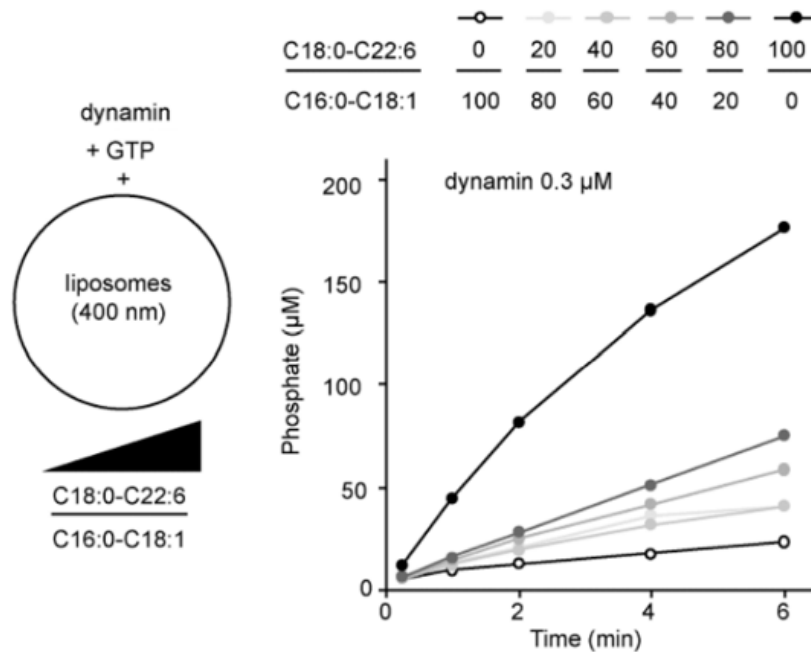
**Figure 32** : Représentation schématique des changements de phase induits par le cholestérol

Dans ce même contexte, des travaux récents suggèrent que les AGPI, estérifiés dans les PL, maintiennent l'intégrité et la stabilité des radeaux lipidiques (rafts) qualifiés de plateformes de signalisation des RCPG [153]. Beaucoup expliquent le rôle structurel des chaînes insaturées par leur faible affinité pour le composant majeur des radeaux lipidiques, le cholestérol [154], [155]. D'après certains travaux, les PL insaturés se retrouvent en dehors des rafts et forment un environnement plus fluide autour de ces derniers favorisant leur mobilité au sein de la membrane [156]. Des études biophysiques et biochimiques récentes ont évalué l'impact du DHA sur la formation de ces domaines lipidiques. D'après ces études, les chaînes du DHA, très désordonnées, perturbent l'ordre et la composition moléculaire des radeaux lipidiques ce qui peut être à l'origine de la dissociation des protéines, notamment les RCPG, qui y sont insérées [157]–[159].

Le rôle des AG insaturés dans le maintien de la fluidité membranaire a poussé beaucoup de chercheurs, notamment le groupe d'Antonny, à évaluer l'impact du taux d'insaturation membranaire sur la déformation ainsi que la scission des vésicules d'endocytose. Dans ce contexte, les travaux de Pinot *et al* [160] ont évalué l'activité GTPase de la dynamine en présence de liposomes formés par des concentrations de PL polyinsaturés plus au moins importante. Pour cela, deux différents PL ont été utilisés : le PL polyinsaturé C18 :0-C22 :6 (ayant 0 insaturation en sn-1 et 6 insaturations en sn-2) et le PL monoinsaturé C16 :0-C18 :1 (ayant 0 insaturation en sn-1 et 1 seule insaturation en sn-2).

## Introduction bibliographique

Cette étude a montré que la vitesse d'hydrolyse du GTP par la dynamine est beaucoup plus rapide (environ 7 fois) pour les liposomes polyinsaturés comparés aux monoinsaturés. Ces travaux suggèrent que les PL polyinsaturés facilitent la déformation et la scission de la membrane plasmique lors du processus d'endocytose (**figure 33**).



**Figure 33 :** Evaluation de l'impact des PL polyinsaturés sur l'activité GTPase de la dynamine. Les liposomes ont été formés par différents ratio de PL mono et polyinsaturés et mis en contact avec 0,3  $\mu\text{M}$  de dynamine et 1  $\mu\text{M}$  de GTP. La cinétique d'hydrolyse du GTP a été suivie pendant 6 min, extrait de [160].

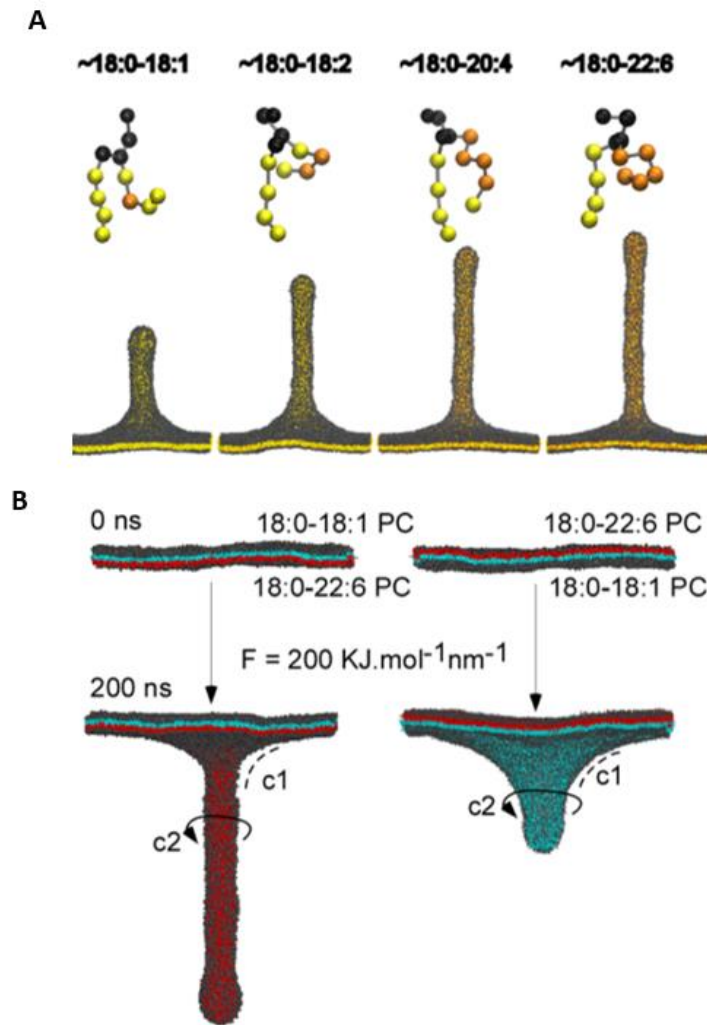
Dans le même contexte, des études de modélisation moléculaire ont été entreprises par le même groupe pour évaluer l'impact du niveau d'insaturation des PL sur la déformabilité membranaire. Ceci a été réalisé en modélisant la formation d'un tube à partir d'une bicouche symétrique formée par des PL comportant de 1 à 6 insaturations [161]. Fait intéressant, la longueur du tube formé est proportionnelle au degré d'insaturation des PL utilisés pour la formation de la membrane plane. Ces études ont donc montré que la déformabilité d'une membrane dépend du niveau d'insaturation des chaînes aliphatiques qui la forment (**figure 34A**). Pour aller plus loin, le même groupe a réalisé les mêmes expériences en utilisant cette fois-ci des bicouches représentant une asymétrie au niveau des chaînes insaturées (**figure 34B**). La modélisation de la formation d'un tube à partir de ces bicouches a montré que la présence des PL insaturés dans le feuillet externe à la déformation (feuillet cytosolique dans le cas de l'endocytose) favorise la déformabilité membranaire.



## Introduction bibliographique

En revanche, leur présence dans le feuillet interne à la déformation (feuillet extracellulaire dans le cas d'endocytose) ne stimule pas l'allongement du tube [162].

Ces résultats suggèrent que les PL polyinsaturés du feuillet cytoplasmique contribuent à la déformation de la membrane lors du processus d'endocytose, en particulier dans les terminaisons nerveuses où ils sont le plus abondants.



**Figure 34** : Simulation de la déformation membranaire des bicouches symétriques (A) et asymétriques (B) suite à l'application d'une force de 200 KJ/mol/nm. A. Les membranes symétriques sont formés avec des PL qui diffèrent par le niveau d'insaturation des chaînes en sn-2 (18:1/ 18:2/20:4/22:6), extrait de [161]. B. Images illustrant la déformation de deux types de membranes asymétriques (a, b) avant et après 200 ns de simulation. Pour la première membrane asymétrique (a), le feuillet interne est formé d'un PL poly-insaturé (18:0-22:6) alors que le feuillet externe est formé d'un PL monoinsaturé (18:0-18:1). La deuxième membrane (b) est constitué par les mêmes PL qu'en (a) qui sont repartis inversement dans les feuillets, adapté de [162].

### 2.2. Les AGPI dans le cerveau :

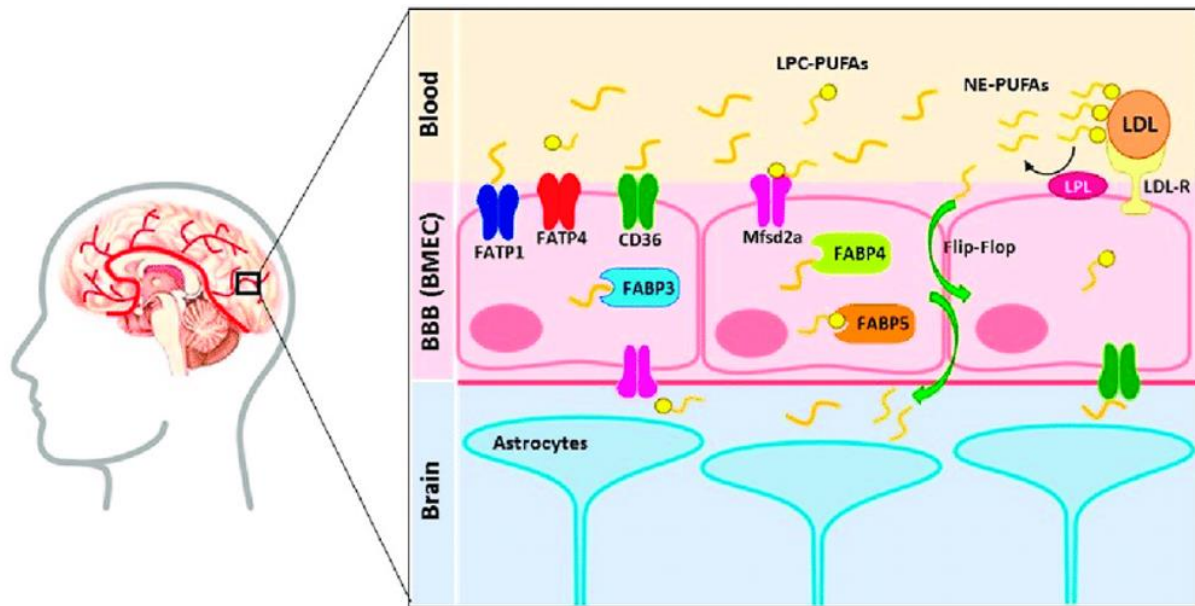
#### i. Composition du cerveau en AGPI :

Après le tissu adipeux, le cerveau est l'organe le plus riche en lipides qui constituent 50 à 60 % de son poids sec. Les PL représentent plus que 50 % des lipides totaux dont les principales espèces sont la PC (42 à 44% des PL totaux), la PS (11 à 13% des PL totaux) et le PI (2 à 3% des PL totaux) [163].

Fait intéressant, l'analyse *post-mortem* de la composition en AG du cortex humain a permis de montrer que le cerveau humain est très riche en AGPI de type  $\omega 3$  et  $\omega 6$  qui représentent environ 31% des AG totaux (AGT). Parmi ces AGPI, le DHA et l'AA sont largement représentés avec, respectivement, 10 % et 14 % des AGT du cortex cérébral. En revanche, l'EPA et le DPA sont présents en très faible quantité (environ 1 % des AGT de cette même structure) [164], [165]. Différents travaux ont été menés pour identifier les PL dans lesquels s'incorporent les AGPI les plus abondants. Ces études ont démontré que le DHA est majoritairement incorporé en position sn-2 des PE et PS alors que l'AA est majoritairement inséré en position sn-2 des PC et PI [143], [164].

Etant donné que la synthèse *in situ* des AGPI à partir de leurs précurseurs n'est pas suffisante pour couvrir les besoins de cerveau, les AGPI accumulés dans le cerveau sont principalement issus de la circulation sanguine [143]. En effet, une fois synthétisés dans le foie, les AGPI sont transportés vers le cerveau sous forme estérifiée via des lipoprotéines circulantes, notamment les VLDL (Very Low Density Lipoprotein) et les LDL (Low Density Lipoprotein), ou sous forme libre via l'albumine. Une fois arrivés au niveau des cellules endothéliales, une lipoprotéine lipase intervient pour libérer les AGPI stockés dans les lipoprotéines. L'incorporation des AG libres (AGL) dans le cerveau nécessite leur passage à travers une bicouche lipidique séparant le sang et le fluide cérébral : la membrane hématoencéphalique (BHE). Deux modes de transport émergent de la littérature, le premier mode, dit actif, nécessite la liaison des AGL à des protéines de transport membranaires telles que les FATP (Fatty Acid Transport Protein), la translocase FAT/CD36 (Fatty Acid Translocase CD36), la FABP (Fatty Acid Binding Protein) ou le transporteur MFSD2A [166], [167]. Le deuxième mode de transport repose sur la diffusion passive des AGPI à travers la BHE par un mécanisme de flip-flop caractérisée par une vitesse d'incorporation très importante comparativement au mode actif [168] (**figure 35**).

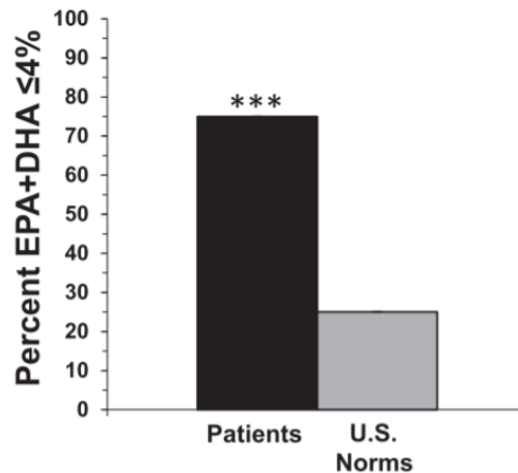




**Figure 35** : Mécanismes de transport des AGPI via la BHE. LDL-R : récepteur des LDL, NE-PUFAs : AGPI libres, adapté de [169].

ii. Déficience en AGPI et pathologies psychiatriques :

Au cours des dernières années, plusieurs travaux ont rapporté l'importance des AGPI dans le maintien structural et fonctionnel du SNC [135]. Dans ce contexte, comme évoqué précédemment, un nombre important de travaux menés chez l'homme suggèrent l'existence d'une corrélation entre la déficience en AGPI cérébraux, notamment les AGPI de type  $\omega 3$  : DHA (22 :6) et l'EPA (20 :5), et de nombreuses pathologies psychiatriques comme la schizophrénie et la dépression. Ces déficiences ont été mises en évidence par des études corrélatives basées sur l'évaluation du taux des AGPI- $\omega 3$  dans le plasma et les érythrocytes des patients atteints de désordres psychiatriques (**figure 36**). Ces études ont permis de révéler des diminutions importantes de la teneur en AGPI- $\omega 3$  suggérant une plus faible teneur de ces derniers dans le cerveau de ces patients [135], [170], [171].



**Figure 36** : Proportion de patients psychiatriques ( $\approx 75\%$  pour  $n = 131$ ) et d'individus sains ( $\approx 25\%$  pour  $n = 27426$ ) ayant un index d'AGPI- $\omega 3$  sanguins (EPA et DHA) inférieur à 4 % de la composition d'AGT [135].

Dans ce même contexte, d'autres chercheurs ont réalisé des analyses *post-mortem*, chez des patients souffrant de troubles psychiatriques, permettant d'évaluer les taux des AGPI- $\omega 3$  cérébraux. Similairement aux précédentes études, ces analyses ont identifié de plus faibles taux d'AGPI comparativement à ceux mesurés chez les personnes saines [172]–[174]. En effet, dans le cas de la schizophrénie, les faibles taux d'AGPI- $\omega 3$  sont positivement corrélés à l'apparition de symptômes négatifs, caractérisés notamment par une diminution de la motivation [175]. De façon similaire, Freeman and Rapaport ont corrélé les formes sévères de la dépression à un faible taux d'AGPI- $\omega 3$  [176]. De plus, d'autres travaux ont associé des taux sanguins élevés de ces mêmes AG à une réduction de l'apparition de troubles comportementaux et cognitifs chez l'homme, renforçant l'hypothèse d'une implication directe de ce type d'AGPI dans la pathophysiologie de ces maladies [177], [178]. Ces mêmes troubles ont été observés, chez des rongeurs, suite à l'induction d'une déficience en AGPI- $\omega 3$  via l'administration d'un régime dépourvu en AGPI- $\omega 3$  et leur précurseur, ALA. En effet, Fedorova et Salem [179] ont démontré qu'un régime alimentaire déficient en DHA entraîne des troubles de comportement (hyperactivité et agressivité) chez la souris. Il est à noter que l'induction de la déficience en DHA s'accompagne d'une incorporation compensatrice de son analogue de type  $\omega 6$ , le DPA. Malgré le fait que ces deux AGPI possèdent une structure très similaire, qui ne diffère que par la présence d'une insaturation supplémentaire située en  $\omega 3$  pour le DHA, il a été montré que le DPA- $\omega 6$  ne permettait pas de réduire les troubles cognitifs issus d'une déficience en DHA- $\omega 3$  [180].

Bien que l'ensemble de ces données se rejoignent sur le fait que les différentes pathologies psychiatriques sont associées à la réduction des AGPI- $\omega$ 3 sanguins et/ou cérébraux, l'implication de ces AG dans l'étiologie de ces désordres reste mal définie.

Plus récemment Ducrocq *et al* [181] ont établi un lien causal entre la déficience nutritionnelle en AGPI- $\omega$ 3, l'apparition des troubles de la motivation associés à plusieurs désordres psychiatriques ainsi que l'altération de la transmission dopaminergique. Ce lien a été démontré par l'utilisation de souris transgéniques (*fat-1*) capables de synthétiser des AGPI- $\omega$ 3 à partir des AGPI- $\omega$ 6. D'une manière intéressante, la restauration du taux des AGPI- $\omega$ 3, par la *fat-1*, sélectivement dans une population neuronale exprimant les récepteurs dopaminergiques RD2 permet de restaurer la transmission dopaminergique et le déficit motivationnel. Ces travaux ont montré, pour la première fois, que la restauration de la teneur en AGPI- $\omega$ 3 dans des neurones exprimant le RD2 permettait de prévenir l'apparition des troubles de la motivation causés par la déficience en AGPI. Ainsi, ces données renforcent l'hypothèse d'une sensibilité de la transmission dopaminergique, dépendante du RD2, à la manipulation des taux d'AGPI- $\omega$ 3.

### iii. L'intérêt thérapeutique des AGPI

La corrélation positive entre les pathologies psychiatriques et la déficience en AGPI- $\omega$ 3 a poussé beaucoup de chercheurs à investiguer l'impact d'une supplémentation nutritionnelle en AGPI- $\omega$ 3 sur les symptômes causés par ces désordres. Dans le cas de la schizophrénie, beaucoup de travaux suggèrent que cette supplémentation, avant l'apparition des symptômes, pourrait diminuer la transition vers la pathologie chez les patients à haut risque de développer cette maladie [182], [183]. Ces données ont été confirmées par une méta-analyse récente suggérant que les AGPI- $\omega$ 3 pourraient être efficaces dans le traitement des symptômes schizophréniques chez les patients aux stades précoces. En revanche, cette étude a montré que ces AG ne présentent aucune efficacité chez les patients atteints de schizophrénie chronique [184]. L'intérêt thérapeutique d'une supplémentation nutritionnelle en AGPI- $\omega$ 3 dans le cas de la dépression a également intéressé les chercheurs. En effet, un nombre croissant de travaux a rapporté une atténuation des symptômes dépressifs en réponse à un régime alimentaire riche en AGPI- $\omega$ 3 [185], [186].

Fait intéressant, la grande majorité de ces effets bénéfiques a été observée chez les patients recevant un traitement pharmacologique, ce qui suggère que la supplémentation en AGPI pourrait améliorer leur efficacité thérapeutique très limitée. A titre d'exemple, Jazayeri *et al* ont évalué l'effet thérapeutique d'un antidépresseur (la fluoxétine) seule et en combinaison avec l'EPA- $\omega$ 3 chez des patients atteints de dépression majeure [187]. Cette étude a révélé que le co-traitement entraîne un effet bénéfique beaucoup plus important que celui de l'antidépresseur seul. Similairement, il a été rapporté que le potentiel thérapeutique d'un autre antidépresseur, le citalopram, est considérablement amélioré suite à la supplémentation nutritionnelle en AGPI- $\omega$ 3 [188].

En conclusion, toutes ces données soulignent l'effet bénéfique de la supplémentation nutritionnelle et appuient l'implication directe de la déficience en AGPI- $\omega$ 3 dans le développement des désordres psychiatriques.

### 3. Impact des AGPI sur l'activité et la signalisation des RCPG :

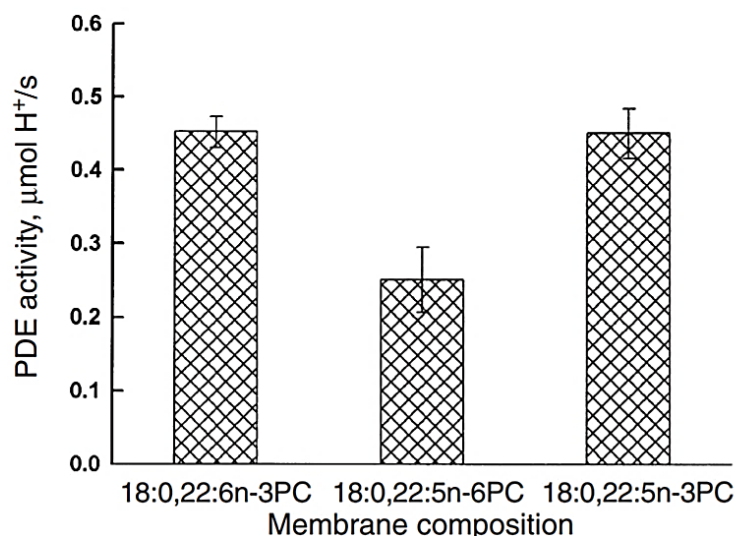
Du fait de leur structure, sept domaines transmembranaires hydrophobes complètement insérés dans la bicouche lipidique, les RCPG sont directement en contact avec les lipides membranaires qui jouent un rôle important dans le maintien de leur intégrité fonctionnelle et structurale. A ce propos, différentes données ont mis en évidence l'implication de la nature de tête polaire et du degré d'insaturation des PL membranaires ainsi que de la teneur en cholestérol dans la modulation de l'activité de certains RCPG (**annexe 1**). Comme détaillé dans cette annexe, les travaux publiés à ce jour proposent que les lipides puissent exercer leur action d'une manière directe par leur interaction avec ces protéines membranaires, au niveau des sites de liaison spécifiques, ou d'une manière indirecte par leur implication dans la modulation des propriétés physicochimiques de la membrane où sont insérés ces récepteurs. Etant donné que ce projet de thèse est axé sur la composition lipidique membranaire en AGPI, nous avons décidé de nous focaliser, pour la suite de cette partie, sur l'influence des AGPI sur l'activation et la signalisation des RCPG.

Jusqu'à récemment, le rôle des AGPI membranaires a été limité au maintien des propriétés physicochimiques. Toutefois, un nombre croissant de données, expérimentales et computationnelles, suggèrent que ces derniers sont des modulateurs clefs de l'activité et de la signalisation des RCPG. Dans ce contexte, différents groupes ont montré que le DHA joue un rôle crucial dans les premières étapes de signalisation de la rhodopsine [189]–[193].

En effet, Mitchell *et al* [189] ont évalué l'impact de la composition lipidique en DHA sur l'équilibre de la rhodopsine entre sa forme inactive métarhodopsine I (MI) et sa forme active métarhodopsine II (MII) et sur le couplage de la forme active avec la protéine G, communément appelée transducine. Pour cela, la rhodopsine et sa protéine G spécifique ( $G\alpha\text{-}\beta/\gamma$ ) ont été reconstituées dans des vésicules formées par un PL monoinsaturé, PC (C18 :0-C18 :1) ou par un PL polyinsaturé, PC (C22 :6  $\omega$ 3, C22 :6  $\omega$ 3).

La détermination de la constante d'équilibre entre les deux formes (MI et MII) par des mesures d'absorbance en fonction de la composition lipidique des liposomes a permis de montrer que la présence de la rhodopsine dans un environnement riche en chaînes insaturées favorisait la formation de la forme active. Cette même étude a révélé que le taux du complexe MII/  $G\alpha\text{-}\beta/\gamma$  formé augmente en présence du DHA ce qui suggère que cet AGPI- $\omega$ 3 peut agir comme modulateur allostérique de la transduction de signal médiée par ce récepteur. En accord avec ces observations, d'autres travaux ont rapporté la dominance de la forme active (MII) de la rhodopsine lorsqu'elle est insérée dans des bicouches contenant du DHA [193], [194].

Pour aller plus loin le groupe de Mitchell a étudié l'activité de la phosphodiesterase, effecteur de la voie de signalisation médiée par la rhodopsine, reconstitué avec la rhodopsine et la  $G\alpha\text{-}\beta/\gamma$  dans des bicouches de PL qui diffèrent par la nature de la chaîne d'AG en sn-2 : PC (C18 :0-C22 :6  $\omega$ 3), PC (C18 :0-C22 :5  $\omega$ 6) ou PC (C18 :0-C22 :5  $\omega$ 3). Ces travaux ont montré que cette enzyme est beaucoup plus efficace en présence des AGPI- $\omega$ 3 en comparaison avec les AGPI- $\omega$ 6. De ce fait, cette étude a permis de confirmer le fait que les AGPI-  $\omega$ 3, le DHA en particulier, régulent la voie de signalisation de ce récepteur [190] (**figure 37**).

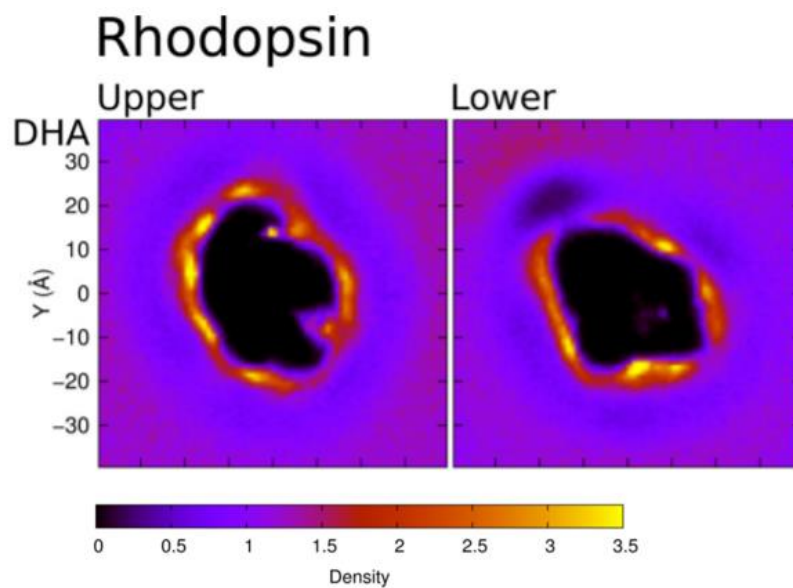


**Figure 37** : Impact de la composition lipidique membranaire sur l'activité de l'effecteur de la rhodopsine : la phosphodiesterase (PDE) [190].

## Introduction bibliographique

Des travaux similaires ont comparé la signalisation de la rhodopsine exprimée dans les membranes du segment externe de rétines isolées de rats ayant un régime alimentaire normal ou déficient en DHA. Fait intéressant, ces travaux ont rapporté une faible cinétique de signalisation de la rhodopsine, exprimée dans les membranes déficientes, ce qui suggère encore une fois que cet AGPI- $\omega$ 3 est indispensable pour le maintien d'une activité optimale de ce récepteur [195], [196].

Afin d'explorer davantage les mécanismes d'action des AGPI, une multitude d'études de modélisation moléculaire a été réalisée pour suivre la dynamique d'interaction entre la rhodopsine et le DHA. D'une manière intéressante, ces travaux ont démontré que les chaînes polyinsaturées du DHA possèdent des sites spécifiques de liaison avec ce RCPG [197], [198]. Plus précisément, les travaux de Horn *et al* [198] suggèrent que le DHA interagit spécifiquement avec la rhodopsine tout en formant une "couronne" autour de ce récepteur transmembranaire (**figure 38**).



**Figure 38** : Carte de densité du DHA montrant sa distribution dans les deux feuillets membranaires. La rhodopsine est représentée en noir. Upper : feuillet extracellulaire, Lower : feuillet cytoplasmique. Adaptée de [198].

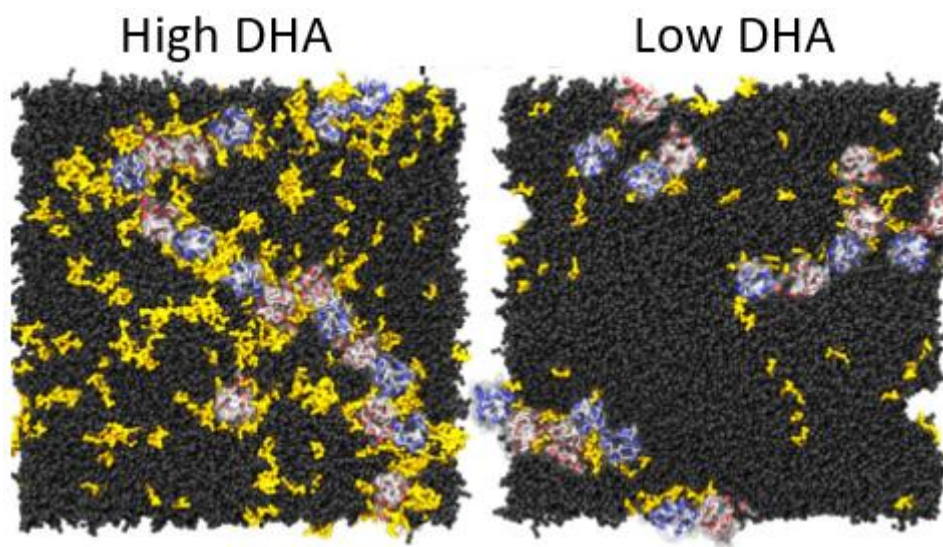
Ces observations ont été expérimentalement appuyées par des études de résonance magnétique nucléaire (RMN) menées par le groupe de Soubias suggérant que les PL polyinsaturés (ayant une chaîne de DHA en sn-2), et pas les PL monoinsaturés, interagissent avec la rhodopsine via des sites bien définis [199].



## Introduction bibliographique

De même, des études *in vivo* ont démontré que le récepteur des cannabinoïdes (RCB1), un autre RCPG de classe A, se découple de sa protéine G spécifique ( $G_{i/o}$ ) lorsqu'il est exprimé dans des neurones déplétés en DHA [200]. Ce découplage, altérant la fonctionnalité du RCB1, supporte l'hypothèse que les AGPI- $\omega 3$  à longue chaîne, en particulier le DHA, sont indispensables pour une activité normale du système endocannabinoïde [201].

La dimérisation et l'oligomérisation des RCPG semblent aussi être impactées par la composition lipidique en AGPI. A cet égard, Guixà-González *et al* [202] ont étudié l'effet du DHA membranaire sur la stabilité de l'état oligomérique de deux RCPG de classe A, le RA<sub>2</sub>A et le RD2. Fait intéressant, ces travaux computationnels ont démontré que l'oligomérisation des deux RCPG est clairement accrue (~20%) dans les membranes à forte teneur en DHA par rapport à celles ayant une faible teneur en ce dernier (**figure 39**). Cette observation a été expliquée par le fait que la présence des récepteurs dans des domaines enrichis en DHA augmente la diffusion latérale de ces derniers ce qui favorise leurs interactions. Cette même étude a permis de mettre en évidence des interactions spécifiques entre les deux RCPG et les chaînes de DHA.



**Figure 39** : Impact des chaînes de DHA sur l'oligomérisation des RCPG (le RA<sub>2</sub>A et le RD2). Les PL (C18 :0-C22 :6) sont représentés en jaune et les autres lipides sont représentés en noir. Les hélices transmembranaires des deux RCPG apparaissent en rouge (RA<sub>2</sub>A) et en bleu (RD2). Figure adaptée de [202].

Très récemment, Mizumura *et al* [203] ont évalué l'impact de deux AGPI, le DHA- $\omega 3$  et l'AA- $\omega 6$ , sur la transduction du signal médiée par le RA<sub>2</sub>A. Pour ce faire, le récepteur et sa protéine G spécifique ont été reconstitués dans des nanodisques (High Density Lipoprotein, HDL) ne contenant pas d'AGPI ou dans des nanodisques contenant un des deux AGPI.



D'une manière intéressante, le suivi de l'activation de la protéine G par le RA<sub>2</sub>A dans les différents environnements lipidiques a permis de montrer que les chaînes de DHA- $\omega$ 3, et non pas les chaînes d'AA- $\omega$ 6, favorisent l'activation de la protéine G. Ces résultats ont été confortés par des études de RMN montrant qu'en présence de DHA le RA<sub>2</sub>A adopte une conformation très favorable à son interaction avec la protéine G.

Pour ce qui est du RD2, à notre connaissance, aucune étude de l'effet des AGPI sur la voie de signalisation de ce récepteur n'a été publiée. A ce propos, des études expérimentales en cours de publication (**annexe 3**) par notre équipe ont évalué l'impact de deux AGPI, le DHA- $\omega$ 3 et le DPA- $\omega$ 6, sur l'affinité du RD2 à ses ligands (agoniste complet : dopamine et quinpirole, antagoniste : spipérone, agoniste partiel : aripiprazole) ainsi que sur les voies de signalisation  $\beta$ -arrestine et protéine G dépendantes. Ces données montrent que l'affinité du RD2 pour ses différents ligands augmente d'une manière significative lorsqu'il est exprimé dans des cellules enrichies en DHA. En revanche, l'affinité du récepteur exprimé dans des cellules enrichies en DPA est plus élevée pour le quinpirole, et la spipérone, mais inchangée pour les deux autres ligands.

Malgré ces changements d'affinité, l'enrichissement cellulaire en AGPI n'a pas d'effet sur la diminution du taux d'AMPc cellulaire en réponse aux agonistes (dopamine, quinpirole et aripiprazole). Dans le même contexte, ces travaux ont montré que le recrutement de la protéine G au RD2 exprimé dans des noyaux accumbens (une région du cerveau exprimant notre récepteur d'intérêt) extraits d'animaux contrôles ou déficients en AGPI- $\omega$ 3 n'était pas différent. Ainsi, ces travaux suggèrent que les deux types d'AGPI n'affectent pas les voies de signalisation dépendantes de la protéine G. En ce qui concerne la voie de signalisation  $\beta$ -arrestine dépendante, il a été montré que l'efficacité des agonistes, complet et partiel, à induire le recrutement de la  $\beta$ -arrestine à la membrane plasmique est plus élevée en présence des deux AGPI. En conclusion, ces études suggèrent que les AGPI, et surtout le DHA, peuvent agir comme des modulateurs allostériques de la signalisation médiée par ce récepteur, notamment en modulant son affinité pour ses ligands et en favorisant la voie de signalisation dépendante de la  $\beta$ -arrestine. Ainsi, toutes ces données appuient l'hypothèse proposant que les taux d'AGPI membranaires pourraient influencer sur la pharmacologie et la signalisation intracellulaire de ce récepteur.

## Introduction bibliographique

En résumé, toutes les études évoquées dans cette partie indiquent que le rôle des AGPI membranaires, et du DHA en particulier, est loin de n'être que structurel mais aussi fonctionnel en régulant la fonctionnalité de certains RCPG. Néanmoins, il est important de noter que toutes les études bibliographiques disponibles à ce jour s'intéressent uniquement à l'impact des AGPI sur l'affinité ou sur les premières voies de signalisation des RCPG. Mais **qu'en-est-il de l'impact de la composition membranaire en AGPI sur la voie d'internalisation des RCPG à l'origine d'une diminution du nombre de récepteurs émettant un signal à la surface de la membrane ?**

### 4. Objectif de thèse :

Comme évoqué précédemment, il ressort de la dernière partie de cette étude bibliographique que l'impact des AGPI sur l'étape d'internalisation des RCPG en général, et du RD2 en particulier, est encore inconnu. Le principal objectif de ces travaux a donc été d'explorer l'influence de deux types d'AGPI, un AGPI- $\omega$ 3 et un AGPI- $\omega$ 6, sur la voie d'internalisation de notre récepteur d'intérêt, le RD2, exprimé d'une manière transitoire dans les cellules embryonnaires de rein humain immortalisées (HEK-293). Afin de tester si les effets obtenus sont spécifiques du RD2 ou généralisables à d'autres récepteurs membranaires, nous avons également étudié l'impact de ces AG sur : **1)** l'internalisation du R $\beta$ 2A afin d'évaluer l'impact du taux d'insaturation sur un autre RCPG de classe A ; **2)** l'internalisation du récepteur à transferrine (RTf) qui est un prototype du mécanisme d'endocytose clathrine dépendante utilisé pour la majorité des RCPG de classe A dont le RD2 et le R $\beta$ 2A. Etant difficile de dépléter les AGPI membranaires pour mimer les plus faibles taux d'AGPI rapportés chez les patients psychiatriques, nous avons choisi d'enrichir ces cellules avec les AGPI d'intérêt afin de mimer un environnement lipidique enrichi en AGPI de type  $\omega$ 3 ou  $\omega$ 6. Pour rendre nos observations plus concluantes, nous avons également exploré l'impact d'un environnement enrichi en AGS. Ceci a permis d'associer l'impact de l'enrichissement membranaire en AGPI à une augmentation du taux d'insaturation membranaire et non pas à une augmentation du taux des AG à longue chaîne.

La partie résultat de ce mémoire de thèse s'articule en trois différentes parties :

Dans un premier temps, nous avons vérifié la validité de l'approche d'enrichissement cellulaire choisie afin de s'assurer que les récepteurs membranaires étudiés dans cette thèse sont exprimés dans un environnement lipidique membranaire enrichi par rapport à l'environnement natif. Pour cela, nous avons combiné des études quantitatives, basées sur des analyses lipidomiques par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (CG-SM) ainsi que la chromatographie en phase liquide (CL), et des études qualitatives par la spectro-microscopie Raman. Ces différentes techniques ont permis de quantifier le taux des AG (AGPI et AGS), dans les cellules enrichies comparées à des cellules contrôles, et d'élucider la distribution cellulaire des AG d'intérêt. Dans cette même partie, la spectroscopie de fluorescence a été utilisée afin d'évaluer l'impact de l'enrichissement cellulaire sur la fluidité membranaire des cellules HEK-293. Les résultats de cette partie sont présentés dans **le chapitre 3**.

## Introduction bibliographique

La validation de l'approche d'étude choisie nous a permis d'étudier, dans un second temps, l'impact d'un environnement lipidique enrichi en AGPI ou en AGS sur l'internalisation des différents récepteurs transmembranaires : le RD2 et le R $\beta$ 2A exprimés d'une manière transitoire et le RTf exprimé d'une manière endogène dans notre modèle cellulaire. Ceci a été réalisé par deux techniques complémentaires : une approche de transfert d'énergie en temps résolu et la microscopie confocale. Les résultats de cette partie sont présentés dans **le chapitre 4**.

Enfin, l'objectif de la dernière partie a été d'apporter des éléments de réponse sur l'origine de l'effet spécifique des AGPI, détaillé dans **le chapitre 4**, sur la voie d'internalisation de notre récepteur d'intérêt. Pour cela la microscopie de fluorescence par réflexion totale interne (TIRF) a permis d'apporter des informations quant à l'impact des deux AGPI sur une étape cruciale pour l'internalisation du RD2 : le recrutement membranaire de la  $\beta$ -arrestine. Les résultats de cette dernière partie sont présentés dans **le chapitre 5**.

Les principes et les modes opératoires des différentes techniques utilisées dans ce projet sont présentés dans **le chapitre 2**.

# Chapitre II

## Matériels & Méthodes

### Résumé :

Ce chapitre s'organise autour de la présentation des matériels et des méthodes utilisés dans le cadre de ces travaux de thèse. La partie méthode décrit les différentes techniques expérimentales employées comme la spectroscopie et la microscopie de fluorescence. Les protocoles expérimentaux suivis ainsi que les approches d'analyse des données sont aussi détaillés pour garantir une bonne compréhension des résultats présentés dans les chapitres précédents. Les avantages et les inconvénients des techniques employées sont aussi présentés pour justifier leur choix dans ce projet.

### 1. Matériels :

#### 1.1. Lignée cellulaire :

Une seule lignée cellulaire a été utilisée pour l'ensemble des expériences de cette thèse : les cellules embryonnaires rénales humaines immortalisées (HEK-293). Cette lignée sauvage a été fournie par le laboratoire NutriNeuro.

#### 1.2. Les bactéries :

Les cellules *E.coli* compétentes : Top 10 et DH5 $\alpha$  ont été employées pour l'amplification des plasmides d'intérêts, elles proviennent de ThermoFisher Scientific.

#### 1.3. Les milieux de culture :

Le milieu complet DMEM glutamax a été utilisé pour la culture de la lignée HEK-293. Le milieu Fluobrite DMEM (ThermoFisher) et le milieu réduit OptiMEM (ThermoFisher) ont été utilisés, respectivement, pour l'imagerie des cellules vivantes et pour la transfection transitoire des cellules. Le milieu LB (Luria Bertani) ainsi que le milieu enrichi SOC ont été utilisés pour la culture bactérienne. La composition de ces milieux est détaillée dans **le tableau** ci-dessous :

**Tableau 1** : La composition des milieux de culture utilisés

Milieu	Composition pour 1L, pH 7,0
DMEM glutamax complet	DMEM glutamax (ThermoFisher), 10 % de SVF (sérum de veau fœtal), 1 % pénicilline streptomycine
LB liquide	10 g de Tryptone, 5 g d'extrait de levure et 5 g de NaCl
LB solide	10 g de Tryptone, 5 g d'extrait de levure et 5 g de NaCl, 15 g d'agar
Milieu SOC	2% de tryptone, 0,5 % d'extraits de levure, 8,5 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl <sub>2</sub> et 20 mM de glucose

## Matériels et Méthodes

### 1.4. Les tampons :

Tampon phosphate 10 mM, pH 7,4

Tampon Glycine: 100 mM NaCl, 50 mM glycine, pH 3

Tampon de lyse cellulaire: 50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 5 % de glycérol et 1mM de PMSF (fluorure de phénylméthylsulfonyle, inhibiteur de protéase) ajouté extemporanément, pH 7,4.

Tampon TENS : 1M Tris pH 8 (1 %), 20 % SDS (2,5 %), 10 N NaOH (1 %), H<sub>2</sub>O

### 1.5. Les plasmides :

Différents plasmides ont été utilisés pour la transfection transitoire et l'expression des protéines d'intérêt (le RD2, le R $\beta$ 2A, la  $\beta$ -arrestine-2, la kinase GRK-2) dans les cellules HEK-293, **tableau 2**.

Trois différents plasmides ont été utilisés pour l'expression du RD2, la différence entre ces trois plasmides réside dans l'étiquette fusionnée à l'extrémité N-terminale du récepteur, les différentes étiquettes sont décrites dans **le tableau 3**.

**Tableau 2** : Les plasmides utilisés pour la transfection transitoire des cellules HEK-293

Plasmides utilisés	Source
SNAP-RD2	Cisbio Bioassays
FLAG- RD2	Jonathan Javitch, du Centre de Psychiatrie de l'Université de Columbia (EUA)
SEP- RD2	Développé pendant cette thèse
PRK, $\beta$ arrestine-2, GRK-2	Thierry Durroux de l'institut de Génomique Fonctionnelle, Montpellier
$\beta$ -arrestine-2-mCherry, R $\beta$ 2A-FLAG	David Perrais de l'institut interdisciplinaire de neurosciences

**Tableau 3** : Les différentes étiquettes fusionnées à l'extrémité N-terminale du RD2.

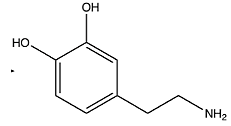
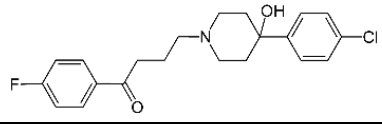
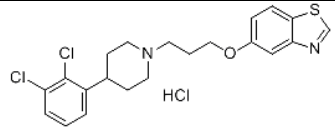
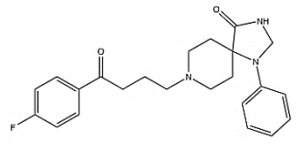
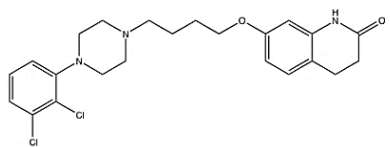
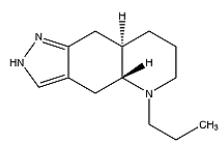
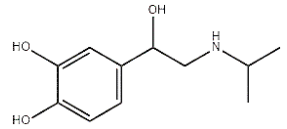
Etiquette	Poids théorique (Da)	Nombre d'acides aminés	Séquence d'acide aminé (N-terminal → C-terminal)
<b>SNAP</b>	19440	182	GPGSDKDCMKRTTLDSPGLKLELSGCEQGLHEIFLGKGTSAADAVEVPAPAA VLGGPEPLMQATAWLNAYFHQPEAIEEFPVPALHHPVFQQESFTRQVLWKL KVVKFGEVISYSHLAALAGNPAATAAVKTALSGNPVPIIPCHRVVQGDLDVG GYEGGLAVKEWLLAHEGHRLGKR
<b>FLAG</b>	1012	8	DYKDDDDK
<b>SEP</b>	26900	238	MSKGEELFTG VVPILVELDG DVNGHKFSVS GEGEGDATYG KLTCLKICTT GK LPVPWPTL VTTFSYGVQC FSRYPDHMKQ HDEFFKSAMPE GYVQERTIFF KD DGNYKTRA EVKEGDTLV NRIELKGIDF KEDGNILGHK LEYNYNDHQV YIMA DKQKNG IKVNFKIRHN IEDGSVQLAD HYQQNTPIGD GPVLLPDNHY LFTTS TLSKD PNEKRDHMLV LEFVTAAGIT HGMDELYK



1.6. Les ligands :

Les ligands du RD2 (dopamine, quinpirole, halopéridol, aripiprazole, UNC994) et celui du R $\beta$ 2A (Isoprotérénol) proviennent de Sigma Aldrich, **tableau 4**.

**Tableau 4** : Les différents ligands utilisés au cours de cette thèse ainsi que leur structure chimique

<b>Ligand naturel</b>	Agoniste	Dopamine	
<b>Ligands synthétiques</b>	Antagoniste	Halopéridol	
	Agoniste partiel	UNC9994	
	Antagoniste	Spipérone	
	Agoniste partiel	Aripiprazole	
	Agoniste	Quinpirole	
	Agoniste	Isoprotérénol	

### 1.7. Les anticorps primaires et secondaires :

Deux anticorps sont utilisés pour l'immunomarquage des deux récepteurs (RD2, Rβ2A) :

**Tableau 5** : les différents anticorps utilisés ainsi que leur réactivité.

Anticorps	Espèce hôte	Réactivité	Dilution	Référence
Anticorps primaire anti-FLAG M1	Souris	Etiquette FLAG	1 :1000	F3040, Thermo Fisher scientific
Anticorps secondaire fusionné à l'Alexa 555	Chèvre	Souris	1 :500	A32727, Thermo Fisher scientific

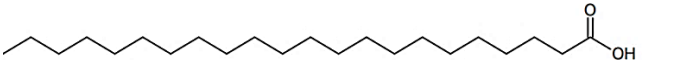
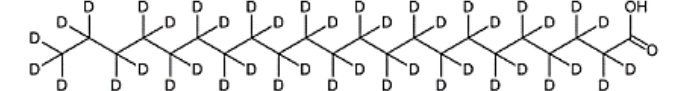
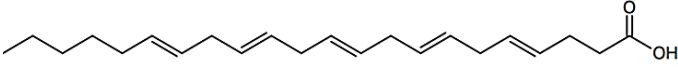
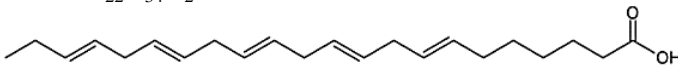
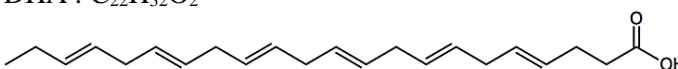
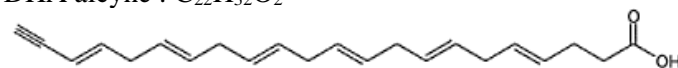
### 1.8. Les acides gras :

Les acides gras suivants proviennent de Sigma Aldrich :

- **Acide gras saturé (AGS)** : l'acide béhénique (AB)
- **Acide gras polyinsaturés (AGPI)** : l'acide docosapentaénoïque (DPA), l'acide docosahexaénoïque (DHA).

L'acide béhénique deutéré (AB-D43) et le DHA-alcyne proviennent de Cayman chemical.

**Tableau 6** : Les différents acides gras utilisés au cours de cette thèse ainsi que leur nature et classification

Acides gras	Formule chimique et structure	Nature
	AB : C <sub>22</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub> 	AGS C22 :0
	AB-D43 : C <sub>22</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub> -D43 	AGS C22 :0
	DPA : C <sub>22</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub> 	AGPI de type ω6 : C22 :5
	DPA : C <sub>22</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub> 	AGPI de type ω3 : C22 :5
	DHA : C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> 	AGPI de type ω3 : C22 :6
	DHA alcyne : C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> 	AGPI de type ω3 : C22 :6

1.9. Les oligonucléotides :

**Tableau 7** : Amorces utilisées pour l'ajout des sites de restriction Agel

Dénomination	Séquence 5' → 3'	Taille pb	Température d'hybridation °C
<b>OPH32</b>	TGTTCCGCCGACTACAAG <b>ACCGGT</b> GATGACGCCATGGATCC	40	80.5
<b>OPH33</b>	GGATCCATGGCGTCATC <b>ACCGGT</b> TCTTGTAGTCGGCGAACA	40	80.5

1.10. Autres réactifs utilisés :

**Tableau 8** : Les différents produits utilisés ainsi que leur référence

Produits	Référence
Tag-lite® buffer	LABMED, Cisbio bioassays
PFA 4% (w/v)	AA47392, Thermofisher Scientific
Trypsine EDTA (0,25%)	25200056, Thermofisher Scientific
Résazurine	R7017, Sigma Aldrich
Lumi-4-terbium	SSNPTBX, Cisbio bioassays
Laurdan	850582P, Avanti lipids
Fluorescéine	F1300, Thermofisher Scientific
Bleu de Trypan	T102282, Thermofisher Scientific
Transferrin-Alexa Fluor® 568	T23365, Thermofisher Scientific
Lipofectamine 2000	11668019, Thermofisher Scientific
Billes fluorescents, 0,2 µm	T7280, Invitrogen
Huile à immersion	16245, Cargille
Poly-L-lysine	P4707, Sigma-Aldrich
PfuTurbo DNA Polymerase	600250, Agilent
DpnI	ER1701, Thermofisher Scientific
Agel	ER1461, Thermofisher Scientific
Ligase T4	M0202S, New England Biolabs
Tampon Fast Digestion 10x	11946389, Thermofisher Scientific

### 2. Méthodes :

#### 2.1. Passage cellulaire :

Pour maintenir leur fonction, les cellules issues de lignée sont repiquées ou « passées » lorsqu'elles atteignent 90 à 100% de confluence. C'est à dire qu'elles sont détachées et transférées (avec une densité cellulaire inférieure à celle de la confluence) dans une nouvelle flasque en présence de milieu de culture frais. Les cellules adhérentes sont préalablement lavées avec du tampon PBS pour éliminer le sérum de veau fœtal (SVF) puis sont détachées sous l'action enzymatique de la trypsine clivant les protéines membranaires d'adhésion. L'action de la trypsine est inhibée par ajout de 5 ml de milieu de culture contenant du SVF.

#### 2.2. Comptage cellulaire

Dans le but d'avoir une évaluation qualitative et surtout quantitative des cellules en culture, un comptage cellulaire de routine a été réalisé en utilisant le bleu de Trypan. C'est un colorant anionique capable de traverser la membrane cellulaire des cellules mortes par diffusion passive et ne colore ainsi que ces dernières. Pour cela, 10 µl de bleu de Trypan sont rajoutés à 10 µl de cellules, le compteur automatique (NanoEnTek, 734-2675) est ensuite utilisé pour quantifier les cellules vivantes et déterminer le pourcentage de viabilité cellulaire.

#### 2.3. Transfection cellulaire

Pour les expériences de transfert d'énergie en temps résolu (HTRF), la transfection transitoire des cellules HEK-293 est réalisée dans des plaques 96 puits (Greiner bio-one) traitées antérieurement avec 100 µL de poly-L-lysine (0,01 %,) pour faciliter l'adhésion cellulaire. La quantité de plasmide utilisée pour la transfection est de l'ordre de 200 ng par puit comme récapitulé dans le **tableau 9**. Cette quantité est diluée dans 25 µl de milieu sérique réduit (Gibco™ Opti-MEM™). Comme agent de transfection, 0.5 µl de lipofectamine 2000 est dilué dans 24.5 µl de milieu Opti-MEM. Ensuite, cette solution contenant de la lipofectamine est rajoutée à la solution plasmique et le mélange est incubé pendant 15 min à température ambiante. Puis, 50 µl du dernier mélange (plasmides + lipofectamine) sont rajoutés par puit auxquels 100 µL de cellules sont ajoutées avec une densité de l'ordre de 300 000 cellules/mL. Enfin, la plaque est incubée pendant 24h à 37 °C, avec 5 % de CO<sub>2</sub>.

## Matériels et Méthodes

Pour les expériences d'imagerie cellulaire (en confocale, TIRF), la transfection cellulaire est réalisée dans des plaques 6 puits en utilisant le même protocole décrit précédemment, pour une plaque 96 puits, tout en ajustant la quantité d'ADN et de lipofectamine en fonction de la surface de culture cellulaire, **tableau 9**.

Le principe de transfection cellulaire par la lipofectamine 2000 est expliqué dans **l'annexe 1**.

**Tableau 9** : La quantité de lipofectamine ainsi que des différents plasmides utilisés pour la transfection transitoire des cellules HEK-293

	Quantité d'ADN pour une plaque 96 puits	Quantité d'ADN pour une plaque 6 puits
SNAP-RD2 ou SEP-RD2	5 ng	150 ng
GRK-2	5 ng	150 ng
$\beta$ -arrestine-2 ou $\beta$ -arrestine-2-mCherry	5 ng	150 ng
PRK-5 (plasmide vide)	185 ng	-
Quantité de Lipofectamine-2000	0,5 $\mu$ L	5 $\mu$ L

### 2.4. Enrichissement cellulaire en acides gras :

Pour enrichir les membranes cellulaires en AG (AB, DHA, DPA), les cellules HEK-293 sont cultivées jusqu'à 80 % de confluence dans le milieu de culture précisé précédemment. Puis, elles sont incubées pendant 24 h dans un milieu de culture contenant 30  $\mu$ M d'AG d'intérêt préparé dans de l'éthanol à partir des solutions mères d'AG à 30 mM. D'autres cellules sont incubées en présence de 0.1% d'éthanol seul en absence d'AG, correspondant aux cellules contrôles. En ce qui concerne les cellules HEK-293, exprimant transitoirement le récepteur (RD2 ou le R $\beta$ 2A) et les deux protéines auxiliaires ( $\beta$ -arrestine-2 et GRK-2), leur traitement par 30  $\mu$ M d'AG et 0.1 % d'éthanol est réalisé 24h après l'étape de transfection.

Pour s'assurer de l'enrichissement des membranes cellulaires en AG, un dosage lipidique est réalisé par la technique de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) [181]. Ainsi, le pourcentage d'enrichissement des cellules traitées par l'AG d'intérêt est calculé par rapport aux cellules contrôles. Cette analyse a été réalisée par **Elodie Masson** (INRA, CSGA, Dijon).

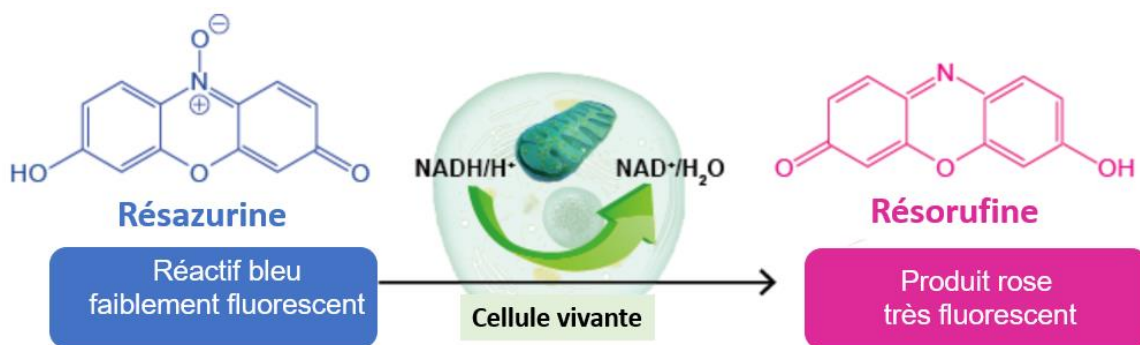
Dans un deuxième temps, la micro-spectroscopie Raman a permis de s'assurer de l'enrichissement des membranes plasmiques, exprimant le récepteur d'intérêt, par les AG d'intérêt (voir le paragraphe 2.9. [La Micro-spectroscopie Raman](#)). L'analyse de l'imagerie Raman a été réalisée par **Sandrine Villette** (IR, CNRS, CBMN, Pessac).

### 2.5. Test de cytotoxicité cellulaire :

Pour évaluer l'impact du traitement des cellules avec 30  $\mu\text{M}$  d'AG, la mortalité cellulaire est mesurée en utilisant le test à la résazurine [204]. En effet, les cellules vivantes sont capables de réduire ce composé de couleur bleue en résorufine de couleur rose fluorescent. Etant donné que les cellules mortes sont incapables de réduire la résazurine, en raison d'une perte d'activité métabolique, le signal de fluorescence généré est directement proportionnel à la quantité de cellules vivantes. **La figure 1** illustre la réaction de réduction de la résazurine dans les cellules vivantes.

#### Protocole expérimental :

Pour se faire, le milieu d'enrichissement cellulaire en AG est remplacé par 100  $\mu\text{l}$  de milieu neuf contenant 10 % de résazurine. Les cellules sont ensuite incubées pendant 2 h à 37°C. Au terme de l'incubation, une mesure de fluorescence à 590 nm est réalisée.



**Figure 1** : Réduction de la résazurine en résorufine par la NADH déshydrogénase dans les cellules vivantes en présence de NADH.

### 2.6. Clonage du plasmide pSEP-RD2 :

#### i. Mutagenèse dirigée :

Le plasmide pFLAG-RD2, décrit précédemment par Tang *et al* [205], et le plasmide pSEP-LHR, décrit auparavant par Sposini *et al* [206], sont utilisés afin de créer le plasmide pSEP-RD2. Le plasmide d'expression obtenu permet l'expression du RD2 disposant d'une étiquette SEP (Superecliptic pHluorin) sur son extrémité N-terminal. Etant donné que la séquence de l'étiquette SEP présente dans le plasmide est entourée du site de restriction Agel, l'insertion de la séquence de cette étiquette dans le plasmide pFLAG-RD2 a nécessité l'ajout de ce site de restriction.

## Matériels et Méthodes

Pour cela, le pFLAG-RD2 est modifié par mutagenèse dirigée pour introduire le site de restriction (AgeI) à l'aide du kit : QuickChange Site Directed Mutagenesis (Agilent Technologies) qui est également utilisé pour la conception des amorces OPH32 et OPH33 (illustrées dans le **tableau 7**).

Brièvement, un mélange est réalisé à partir des éléments suivants : 5 µl de tampon de réaction 10 X, 10 ng du plasmide FLAG-RD2, 125 ng d'amorce directe OPH32, 125 ng d'amorce inverse OPH33, 1 µl de dNTP et de l'eau ultra-pure jusqu'à atteindre un volume final de 50 µl. Enfin, 1 µl d'ADN polymérase (PfuTurbo, 2,5 U/µl) est rajouté au mélange et la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est lancée en utilisant les paramètres décrits dans le **tableau** ci-dessous :

**Tableau 10** : les 3 étapes thermiques suivies pour la PCR

Étapes	Nombre de cycles	Température	Durée
1-Dénaturation	1	95°C	30 secondes
2- Hybridation	18	55°C	1 minute
3- Elongation		68°C	7 minutes (1 min/kb)

A la fin de la PCR, le mélange est placé dans la glace pour atteindre une température d'environ 37°C. Après refroidissement, le produit de la PCR est digéré suite à l'ajout de 1 µl de l'enzyme DpnI (10 U/µl) pendant 2h à 37°C pour éliminer le plasmide de départ (non muté : FLAG-RD2) et ne garder que le plasmide amplifié (muté : AgeI-RD2) car cette enzyme clive l'ADN seulement s'il est méthylé.

### ii. Transformation bactérienne par choc thermique :

En conditions stériles, 20 µL de bactéries DH5α préalablement décongelés dans la glace sont ajoutés à 2 µL de produit de la digestion dans un microtube de 1,5 mL et l'ensemble est incubé pendant 30 min dans la glace. Ensuite, les bactéries sont exposées à un choc thermique en les plaçant 45 s à 42°C, ce qui induit la formation de pores favorisant l'entrée de l'ADN plasmique. Le microtube est de nouveau transféré dans la glace pendant 2 min avant l'ajout de 250 µL de milieu SOC. Avant étalement sur boîtes de Petri, le mélange est incubé à 37°C pendant 1 h sous agitation à 220 rpm. L'étalement du mélange est effectué à l'aide de billes de verre stériles sur boîtes LB-agar complémentées en Ampicilline (Amp) nécessaire pour la sélection des bactéries transformées. Les boîtes de Petri sont ensuite incubées 24 heures à 37°C.



Ce même protocole est suivi pour l'amplification des plasmides utilisés au cours de cette thèse en utilisant les bactéries « One Shot™ TOP10 Chemically Competent *E. coli* »

### iii. Purification de l'ADN plasmique :

Après 24 h d'incubation, un nombre suffisant de colonies présentes sur boîtes de Petri est prélevé avec la pointe d'un cône stérile. Celui-ci est éjecté dans un tube conique de 15 mL contenant 4 mL de milieu LB + Amp puis placé sous agitation à 37°C pendant 8 heures. L'ensemble des tubes où un développement bactérien s'est produit est analysé par la technique de mini-préparation en utilisant le kit "Macherey-Nagel™".

Pour cela, 1,5 mL de suspension bactérienne est déposée dans une micro-colonne à filtre et le volume de suspension restant qui servira de préculture pour le repiquage des clones positifs est placé à 4°C. Le microtube est d'abord centrifugé pendant 10 min à 4000 g et le surnageant est retiré. Le culot est repris dans 300 µL de tampon TENS puis re-suspendu par retournement durant 5 min avant l'ajout de 100 µL d'acétate de sodium (3 M, pH 5,2). Une nouvelle centrifugation est réalisée dans les mêmes conditions et le surnageant est transféré dans un nouveau tube. La précipitation du plasmide d'intérêt est réalisée par l'ajout de 50 µl d'éthanol absolu. Le culot d'ADN, récupéré par centrifugation, est lavé délicatement avec de l'éthanol 70% et centrifugé une nouvelle fois. L'éthanol 70 % est prélevé délicatement par aspiration à l'aide d'une pompe à vide afin d'obtenir un culot asséché qui est repris dans 30 µL d'H<sub>2</sub>O stérile.

### iv. Quantification de l'acide nucléique :

La quantification des échantillons d'acides nucléiques se fait principalement par la mesure d'absorbance à une longueur d'onde de 260 nm. Cette longueur d'onde est choisie car les bases puriques et pyrimidiques absorbent fortement dans l'UV. Pour chaque mesure, un spectre est tracé entre les longueurs d'onde 250 et 290 nm. Concernant la pureté de l'échantillon, elle est évaluée par le rapport des valeurs d'absorbance à 260 et 280 nm.

En effet, une valeur de ce rapport comprise entre 1,8 et 2,0 indique une faible contamination protéique de l'échantillon. Le spectrophotomètre (Nanodrop-1000, Thermo Scientific) est utilisé pour quantifier les différents échantillons.

### v. Validation d'un clone positif :

Pour s'assurer de l'insertion du site de l'enzyme de restriction Agel dans le plasmide pFLAG-RD2, le séquençage de différents échantillons d'ADN plasmiques extraits de différents clones par la "Midi préparation" est réalisé par l'entreprise Eurofins Scientific en utilisant l'amorce décrite dans le **tableau** ci-dessous :

**Tableau 11** : Séquence de l'amorce utilisée pour la validation des clones positifs

Dénomination	Séquence 5' → 3'	Taille en pb	Température d'hybridation
OX1	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG	21	65,7

### vi. Digestion des plasmides :

Suite au séquençage, le plasmide muté pFLAG-RD2-Agel, ayant la mutation désirée, ainsi que le pSEP-LHR sont digérés.

En effet, pour récupérer la séquence SEP le plasmide pLHR-SEP est digéré par l'enzyme de restriction Agel dans un volume total de 20 µL. Dans un microtube de 1,5 mL, sont introduits 1 µg du pLHR-SEP, 1 µL de l'enzyme de restriction Agel (10U/µL), 2 µL du tampon FastDigest 10X et de l'eau ultrapure stérile pour obtenir un volume final de 20 µl. Ensuite, le mélange est incubé pendant 1 heure à 37 °C puis la réaction est inactivée à 65 °C pendant 20 min. Un aliquot de 10 µL est déposé sur gel d'agarose afin de vérifier la bonne digestion des fragments, si tel est le cas une extraction du fragment "SEP" est réalisée. La digestion du plasmide pFLAG-RD2-Agel est réalisée comme décrit précédemment pour le pLHR-SEP.

### vii. Ligation et insertion de la séquence SEP

Suite à la digestion, la ligase T4 (10 U/µL) est utilisée pour la ligation de l'insert "SEP" dans le vecteur pFLAG-RD2-Agel. Lors de cette étape, les instructions du kit "Quick Ligation™ Kit" sont suivies. Deux proportions entre l'insert et le vecteur sont testés, l'une avec la proportion 10/1 et l'autre 2/1. Le tube est par la suite incubé à température ambiante pendant 1 heure. Le résultat de la ligation est amplifié et purifié comme décrit dans le paragraphe **(ii. Transformation bactérienne par choc thermique)**.

### viii. Validation de l'insertion par séquençage :

La validation de l'insertion de la séquence SEP dans le pFLAG-RD2 est réalisée par le séquençage de différents échantillons d'ADN et en utilisant l'amorce décrite dans le **tableau** ci-dessous :

**Tableau 12** : Séquence de l'amorce utilisée pour la validation du clonage

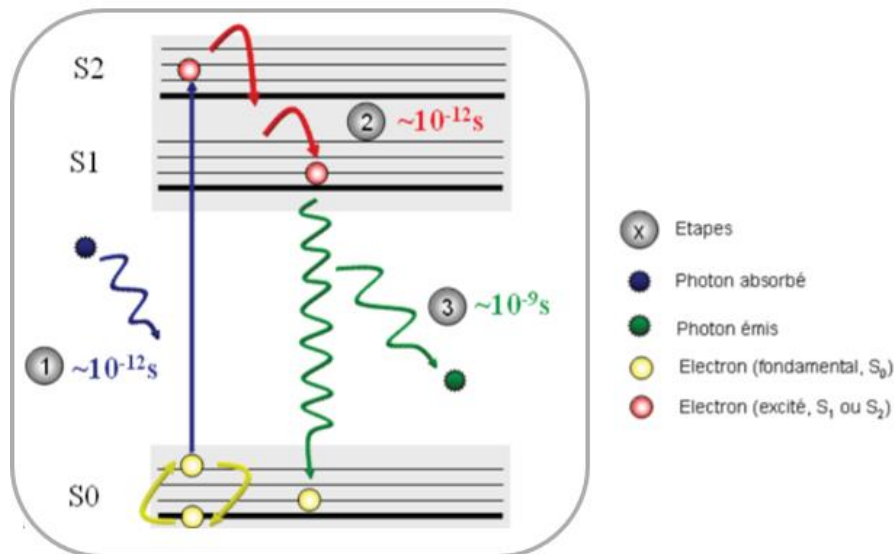
Dénomination	Séquence 5' → 3'	Taille en pb	Température d'hybridation
OX2	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG	21	65,7

### 2.7. La microscopie de fluorescence :

#### i. Généralités

De nos jours, la microscopie de fluorescence est un outil précieux largement utilisé pour l'étude du vivant. Elle permet de visualiser la fluorescence émise par des composés naturellement fluorescents ou rendus fluorescents pour faciliter leur observation. La fluorescence est un processus en plusieurs étapes qui correspond à l'émission d'un photon par un fluorophore suite à son excitation par une source extérieure (laser par exemple). En effet, lorsqu'un fluorophore absorbe un photon d'énergie  $hV_{ex}$ , ce dernier passe de son état électronique fondamental ( $S_0$ ) à un état électronique excité dit singulet ( $S_n$ ) [207].

Suite à son excitation, le fluorophore se désexcite et retourne à son état fondamental en émettant un photon : **c'est le phénomène d'émission de fluorescence**. Perrin et Jablonski ont proposé le diagramme d'énergie ci-dessous (**figure 2**) pour expliquer ce phénomène. Lors de la désexcitation, le fluorophore perd d'abord de l'énergie par conversion interne pour se retrouver à l'état excité  $S_1$ . Ensuite, il subit une transition électronique pour retourner à l'état fondamental  $S_0$ . Cette dernière transition libère de l'énergie à une longueur d'onde plus élevée que la longueur d'onde d'excitation ( $\lambda_{émission} > \lambda_{excitation}$ ).



**Figure 2** : Diagramme de Perrin et Jablonski représentant les différents états énergétiques d'une molécule excitée.

## ii. Les techniques de transfert d'énergie par résonance :

Les technologies basées sur le transfert d'énergie de type Forster tels que le FRET (Forster Resonance Energy Transfer) et le BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer) sont de plus en plus employées pour étudier les interactions des protéines dans leur environnement natif aussi bien intracellulaire qu'extracellulaire. En plus des interactions protéiques, ces approches sont suffisamment sensibles pour mesurer les changements conformationnels intervenant au sein d'une protéine [208]. Dans le domaine des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), ces techniques ont permis de mieux comprendre les mécanismes d'activation de cette large famille de récepteurs ainsi que les multiples voies de signalisation dépendantes de la protéine G [209], [210]. L'existence des récepteurs membranaires homo et hétérodimériques a été aussi découverte grâce à ces méthodes [211].

### Le FRET :

D'après la théorie de Förster, le FRET est défini comme un transfert d'énergie non radiatif résultant d'une interaction dipôle – dipôle entre deux molécules (le donneur et l'accepteur d'énergie) [212]. Pour que le transfert d'énergie se produise entre ce couple, une compatibilité énergétique entre ces deux molécules est nécessaire. En effet, le spectre d'émission du donneur doit recouvrir partiellement le spectre d'absorption de l'accepteur d'énergie.

## Matériels et Méthodes

Ceci est défini par une intégrale appelée l'intégrale de recouvrement définie par l'équation suivante :

$$J(\lambda) = \frac{\int F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int F_D(\lambda) \lambda^4(\lambda)} \quad (1)$$

Avec :

$F_D(\lambda)$  est l'intensité de la fluorescence émise par le donneur à une longueur d'onde donnée  $\varepsilon_A(\lambda)$  est le coefficient d'extinction molaire de l'accepteur. Le facteur J reflète donc la capacité d'une paire de fluorophores à émettre et absorber de l'énergie à une même longueur d'onde.

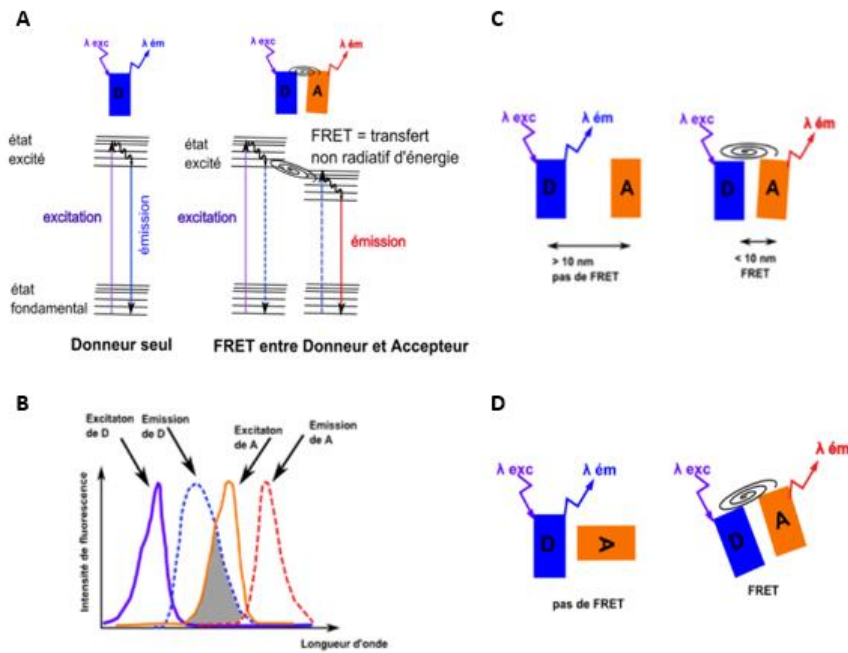
En plus du recouvrement des spectres, ce phénomène physique dépend aussi de l'orientation des deux molécules, ainsi que de la distance qui les sépare. Cette distance est généralement comprise entre 1 et 10 nm.

Lorsque cette dernière dépasse 10 nm, l'efficacité du transfert d'énergie diminue significativement. Cette distance est calculée par l'équation mathématique suivante :

$$R_0 = (J \times 10^{-3} \times K^2 \times n^{-4} \times Q_D)^{1/6} \times 9730 \quad (2)$$

où J est l'intégrale de recouvrement, n l'indice de réfraction du milieu ( $n^{-4}$  est généralement compris entre 1/3 et 1/5),  $Q_D$  le rendement quantique du donneur en absence d'accepteur et  $K^2$  le facteur d'orientation qui est fonction de l'orientation relative des dipôles du donneur et de l'accepteur, la valeur de  $K^2$  utilisée est théoriquement comprise entre 0 et 4.

Les différentes conditions nécessaires pour le déroulement du phénomène de transfert d'énergie sont présentées dans **la figure 3**, [213].



**Figure 3 :** Les conditions du FRET. **A.** Il est essentiel que les fluorophores donneur et accepteur d'énergie soient énergétiquement compatibles. **B.** Cette compatibilité énergétique entre le couple donneur/accepteur est définie par une intégrale de recouvrement entre le spectre d'émission du donneur et le spectre d'absorption de l'accepteur. **C.** Un FRET est possible si la distance séparant les deux fluorophores est inférieure à  $1.8 \times R_0$ . Ce rayon définit la distance pour laquelle l'efficacité de transfert d'énergie est de 50 %. **D.** L'orientation relative des dipôles du donneur et de l'accepteur est un paramètre fondamental pour la mise en place du phénomène de transfert d'énergie. Figure obtenue du site [<http://www.perrin33.com/index.html>].

Pour mettre en évidence le phénomène de transfert d'énergie, la première étape consiste à quantifier les variations de l'intensité de fluorescence du couple donneur/accepteur. Puis, le rapport des intensités de fluorescence appelé aussi ratio (fluorescence d'émission de l'accepteur/fluorescence d'émission du donneur) est calculé.

Ce mode ratiométrique permet de limiter les variations de signal issues de la fluctuation de la lumière émise (interférences optiques, variations du nombre de cellules utilisées...). L'inconvénient majeur de cette technique vient de la difficulté de s'affranchir des signaux parasites à courte durée de vie (bruit de fond). De plus, ces techniques sont caractérisées par le manque de sélectivité spectrale venant du recouvrement pouvant exister entre les spectres d'excitation et d'émission des fluorophores utilisés. Le rapport signal/bruit du FRET peut être amélioré grâce à l'utilisation de fluorophores à longue durée de vie permettant une lecture en temps résolu.

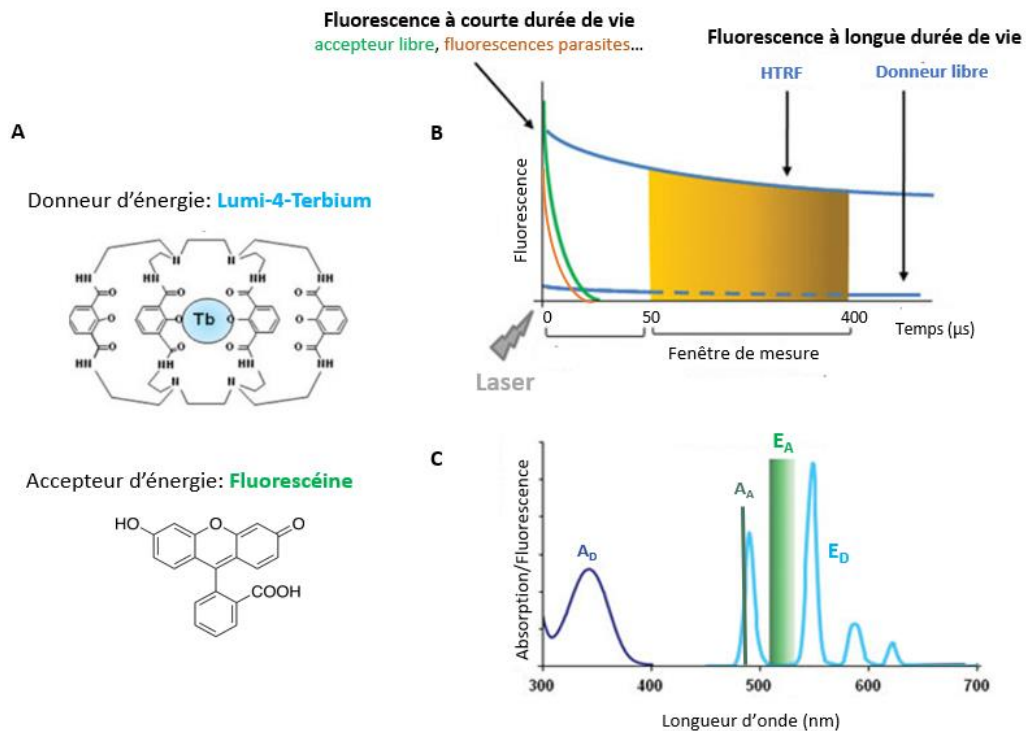
Ceci est possible depuis le développement de la technologie TR-FRET (Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer) appelée aussi HTRF (Homogenous Time-Resolved Fluorescence) qui permet de s'affranchir des signaux parasites et d'augmenter la sensibilité de ces mesures.

### La technologie HTRF : FRET en temps résolu :

L'innovation de cette technologie vient de l'utilisation de donneurs d'énergie présentant des propriétés originales de fluorescence permettant d'améliorer la résolution spectrale et temporelle du signal de transfert d'énergie. Ces donneurs d'énergie, dont la structure a été mise au point grâce aux travaux de Jean-Marie Lehn : prix Nobel de chimie en 1987, sont formés par l'association d'un chromophore (cryptate ou chélate) et d'un cation lanthanide appartenant au groupe de terres rares tel que l'euporium et le terbium.

Dans cette thèse, le FRET en temps résolu est employé pour étudier l'internalisation du RD2 dans ses différents environnements lipidiques avec un dérivé du cryptate de terbium appelé **lumi-4-terbium** comme donneur et la **fluorescéine** comme accepteur d'énergie. La principale caractéristique du donneur utilisé vient de sa durée de vie de fluorescence relativement longue (de l'ordre de quelques ms) contrairement aux autres fluorophores organiques ayant une courte durée de vie (de l'ordre de quelques ns) équivalente à celle des fluorescences parasites. Grâce à cette propriété, un délai entre l'excitation de l'échantillon et la mesure du signal émis est appliqué de manière à s'affranchir des fluorescences parasites à durée de vie courte. Cette résolution temporelle du signal permet ainsi d'améliorer le rapport entre le signal du donneur et le bruit de fond inhérent aux conditions de mesure. En plus, l'utilisation de ce type de donneur d'énergie permet une bonne séparation spectrale entre le pic d'émission de l'accepteur d'énergie et les pics d'émission du donneur d'énergie. En effet, la zone d'émission de la fluorescéine est très différente de celle du lumi-4- terbium [214]. Les caractéristiques du couple donneur/accepteur sont présentées dans **la figure 4**.





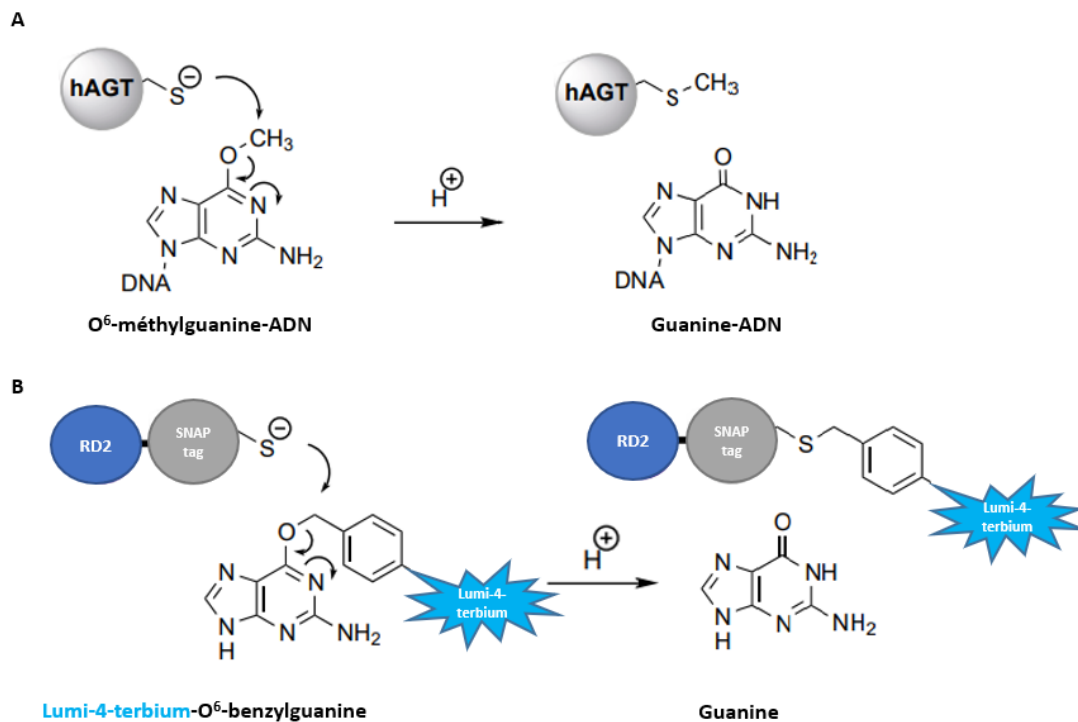
**Figure 4** : Propriétés physico-chimiques du donneur et de l'accepteur d'énergie. **A**. Structure chimique du donneur d'énergie (lumi-4-terbium) : le cryptate encage irréversiblement le cation  $Tb^{3+}$  en le protégeant des interactions environnementales. **B**. Structure chimique de l'accepteur d'énergie (fluorescéine). **C**. Sélectivité temporelle du donneur d'énergie : le phénomène du transfert d'énergie (HTRF) est caractérisé par une longue durée de vie de fluorescence. Ainsi, le signal de transfert d'énergie est mesuré en temps résolu (après un délai de 50  $\mu$ s). **D**. Sélectivité spectrale du donneur d'énergie : nette séparation entre de pic d'émission de l'accepteur ( $E_A$  à 520 nm) et les pics d'émission du donneur ( $E_D$  à 490, 548, 587, 620 nm). Figures obtenues de [214].

#### 🔧 Etude de l'internalisation du RD2 par la technique de HTRF :

L'utilisation de cette méthode nécessite la présence d'une étiquette SNAP sur l'extrémité N-terminale du RCPG d'intérêt (RD2) car le donneur d'énergie utilisé ici a la particularité de se lier d'une manière irréversible au RD2 par l'intermédiaire de cette étiquette. En effet, le SNAP-tag est un peptide de 182 acides aminés fondé sur une enzyme humaine de réparation de l'ADN, l'O6-alkylguanine-ADN-alkyltransférase (hAGT), qui reconnaît spécifiquement les groupements alkyles présents sur les guanines de l'ADN. Cette dernière catalyse la fixation covalente du groupement alkyle à une cystéine (Cys145) de son site catalytique tout en libérant le groupement guanine comme illustré dans la **figure 5A**, [215].

## Matériels et Méthodes

Pour le marquage covalent du RD2, l'idée consiste à utiliser le substrat O6-BG (O6-Benzyl Guanine) lié au lumi-4-terbium au niveau de son groupement benzyle. De ce fait, cette enzyme légèrement modifiée (SNAP) catalyse la réaction de transfert du groupement benzyle-lumi-4-terbium au niveau de son site actif permettant ainsi un marquage irréversible du récepteur par la formation du complexe **lumi-4-terbium-SNAP-RD2** (**figure 5B**).

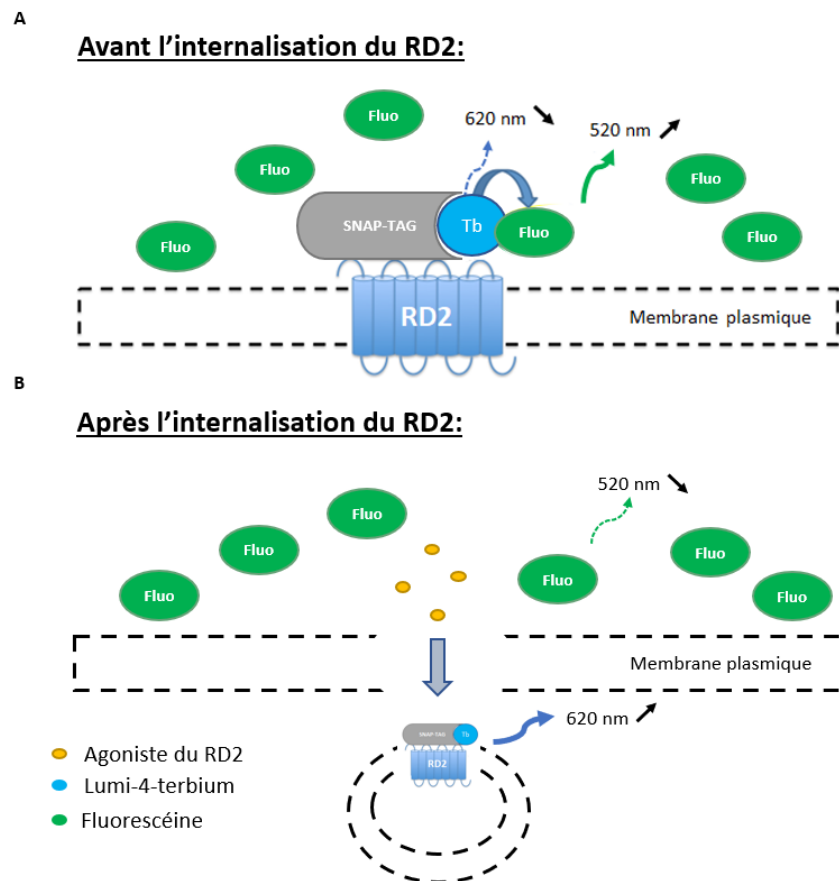


**Figure 5** : Principe du marquage covalent du RD2 par le donneur d'énergie. **A**. La O6-alkylguanine-ADN-alkyltransférase est une enzyme de réparation de l'ADN. Elle catalyse le transfert du groupe méthyle de O6-méthylguanine-ADN qui vient méthyler son résidu cystéine tout en libérant la guanine-ADN. **B**. Le SNAP tag est une variante légèrement modifiée de cette dernière enzyme qui reconnaît spécifiquement son substrat O<sup>6</sup>-benzylguanine fusionné au donneur d'énergie (lumi-4-terbium). La même réaction expliquée en **A** se produit en **B** permettant ainsi le marquage covalent du RD2, sur l'extrémité N-terminale, par l'intermédiaire de cette étiquette. Figures obtenues de [215].

Avant son internalisation, le complexe lumi-4-terbium-SNAP-RD2 se trouve au niveau de la membrane plasmique à proximité du milieu extracellulaire contenant la fluorescéine. Dans ce cas, l'excitation de ce dernier permet le transfert d'une partie de son énergie à la fluorescéine qui émet à 520 nm (**figure 6A**). En revanche, après l'activation du récepteur par son agoniste, le complexe s'internalise et quitte la membrane plasmique vers le milieu intra-cellulaire.

## Matériels et Méthodes

Etant hydrophile, la fluorescéine reste dans le milieu extracellulaire ce qui diminue la proximité spatiale et altère le phénomène de transfert d'énergie entre le couple donneur/accepteur (**figure 6B**). Ainsi, l'internalisation du récepteur est étudiée en mesurant l'augmentation de l'intensité de fluorescence du donneur (620 nm) et la diminution de celle de l'accepteur (520 nm) [216].



**Figure 6 :** Principe de l'HTRF. **A.** En absence d'agoniste, le complexe lumi-4-terbium-SNAP-RD2 reste au niveau de la membrane plasmique à proximité de la fluorescéine présente en excès dans le milieu extracellulaire. Cette proximité spatiale favorise le phénomène de transfert d'énergie en temps résolu entre le couple donneur/accepteur et résulte en un faible rapport d'émission D/A. **B.** En présence d'agoniste, seul le complexe lumi-4-terbium-SNAP-RD2 s'internalise induisant ainsi une altération du phénomène de transfert d'énergie entre le couple donneur/accepteur identifiée par l'augmentation du rapport d'émission D/A.

### Protocole expérimental :

La veille, 25 000 cellules (HEK-293) par puit (soit 100  $\mu$ L d'une suspension de 250 000 cellules/mL dans du DMEM complet) sont ensemencées dans une plaque 96 puits puis transfectées, comme décrit dans le paragraphe (2.3. [Transfection cellulaire](#)), pour coexprimer le SNAP-RD2 ainsi que les deux protéines indispensables à son internalisation : la GRK-2 et la  $\beta$ -arrestine-2.

## Matériels et Méthodes

Après 24h de transfection, la plaque est lavée deux fois par 100  $\mu$ L du tampon Tag-lite®. Ensuite, les cellules sont traitées avec 75  $\mu$ L du même tampon contenant 100 nM de Lumi-4-terbium. Ensuite, la plaque est incubée pendant 1h à 16°C pour bloquer l'internalisation constitutive du récepteur. Avant la lecture de la plaque, cette dernière est lavée 5 fois avec 100  $\mu$ L du même tampon pour éliminer l'excès de Lumi-4-terbium. Après le lavage, le taux d'expression membranaire du RD2 est estimé en mesurant le signal d'émission du Lumi-4-terbium à 620 nm suite à son excitation à 347 nm.

Ensuite, 90  $\mu$ L de fluorescéine (accepteur d'énergie) à 25  $\mu$ M sont ajoutés par puit et le gain des deux fluorochromes est fixé grâce à une première lecture de leur signal d'émission suite à l'excitation du donneur. Puis, 10  $\mu$ L d'une gamme de l'agoniste d'intérêt (dopamine ou quinpirole) préparée dans une solution de fluorescéine à 25  $\mu$ M sont rajoutés par puit et à nouveau le signal d'émission de la fluorescéine et du Lumi-4-terbium sont enregistrés suite à l'excitation du donneur pendant 75 min (4x 5min, 4x 15 min). Les intensités d'émission du couple donneur/accepteur (D/A) sont mesurées par le TECAN Infinite 500 avec le module (TR-FRET). Enfin, le rapport (R) des intensités de fluorescence émise par le couple D/A est calculé par l'équation ci-dessous pour exprimer les signaux mesurés en HTRF :

$$R = \frac{IF_D}{IF_A} \times 10000 \quad (3)$$

Avec  $IF_D$  et  $IF_A$  qui représentent, respectivement, l'intensité de fluorescence émise par le donneur d'énergie à 620 nm et l'intensité de fluorescence émise par l'accepteur d'énergie à 520 nm.

Les rapports obtenus sont normalisés, en utilisant l'équation ci-dessous, pour amener leurs valeurs sur une échelle de 0 à 100 en soustrayant le minimum et en divisant par le maximum de toutes les valeurs, le tout multiplié par 100 :

$$\text{Delta R (\%)} = \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R_{min}} \times 100 \quad (4)$$

Où R est égale à la valeur brute du ratio mesuré,  $R_{min}$  et  $R_{max}$  représentent, respectivement, la valeur minimale et maximale des ratios mesurés.

Les ratios obtenus suite à la stimulation des cellules, contrôles et enrichies en DHA ou en DPA, par une concentration constante d'agoniste sont tracés en fonction du temps (de 0 à 75 min) pour évaluer l'impact des AGPI sur l'internalisation du récepteur suivie en fonction du temps.

Des courbes doses-réponses sont tracées suite à l'exposition des cellules à une concentration croissante d'agoniste qui varie de  $10^{-14}$  à  $10^{-4}$  M. Ainsi, les valeurs d' $E_{\max}$  et d' $EC_{50}$  représentant, respectivement, l'effet maximal ou l'internalisation maximale du RD2 et la concentration en agoniste nécessaire pour induire 50% de l'internalisation maximale du récepteur sont déterminés pour chaque condition. L'analyse des résultats est réalisée en utilisant GraphPad Prism8.

### ❖ Avantages :

- ✓ Forte sélectivité temporelle et spectrale
- ✓ Marquage spécifique, irréversible et unique du récepteur d'intérêt
- ✓ Possibilité d'estimer l'expression membranaire du récepteur d'intérêt

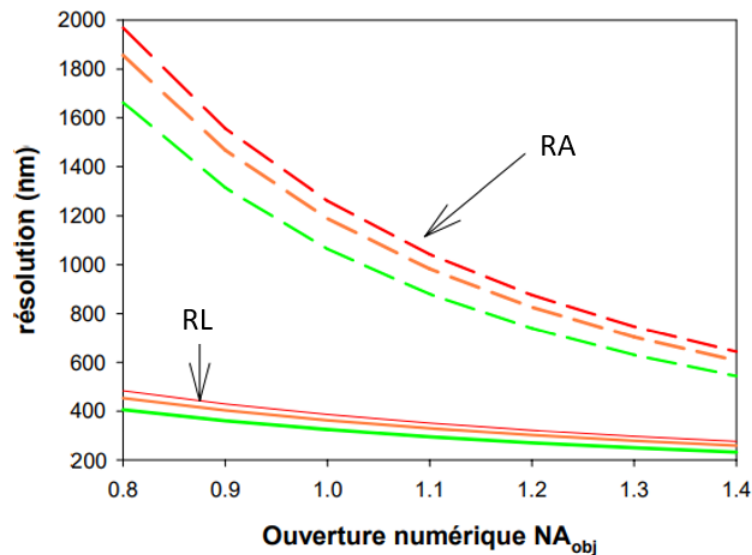
### ❖ Inconvénients :

- ✓ Adaptation nécessaire du système cellulaire : co-expression du SNAP-RD2, la GRK-2, et la  $\beta$ -arrestine-2
- ✓ Cout élevé du donneur d'énergie
- ✓ Technique non adaptée pour le marquage des protéines intracellulaires

### iii. La microscopie confocale

Le principe du microscope confocal a été décrit pour la première fois en 1957 par Marvin Minsky [217] mais il a fallu attendre les années 1980 pour l'apparition des premiers modèles commerciaux ce qui a rendu cette technique de plus en plus accessible [218].

Avant de détailler le principe de la microscopie confocale, il est important de définir **la notion de la résolution spatiale** : une notion primordiale lors de l'utilisation d'un dispositif optique confocal. La résolution d'un dispositif confocal est définie suivant le plan XY (résolution latérale, RL) et l'axe Z (résolution axiale, RA). Pour un système confocal parfait, cette dernière est limitée par l'ouverture numérique (ON) du système optique utilisé et par la longueur d'onde du laser d'excitation choisi (**figure 7**).



**Figure 7** : La variation de la résolution latérale XY (ligne) et axiale Z (pointillé) en fonction de l'ouverture numérique à différentes longueurs d'onde :  $\lambda = 532$  (vert), 584 (orange) et 633 (rouge). Figure adaptée de la thèse de Sébastien Palme 2003.

La RL est définie par la distance latérale minimale entre deux objets situés sur l'axe orthogonal x à la direction de propagation z permettant de les observer de manière distincte. Cette distance est donnée par le critère de Rayleigh :

$$RL = \frac{0,61 \lambda}{ON} \quad (5)$$

Où  $\lambda$  est la longueur d'onde d'excitation et ON est l'ouverture numérique de l'objectif. Ainsi, pour une longueur d'onde fixe, plus l'ON d'un objectif est importante meilleure sera la résolution spatiale.

En ce qui concerne la RA, elle correspond à la capacité du système confocal à distinguer deux objets proches situés sur l'axe de propagation z (en profondeur) elle dépend aussi de l'ON de l'objectif choisi et est définie par l'équation suivante :

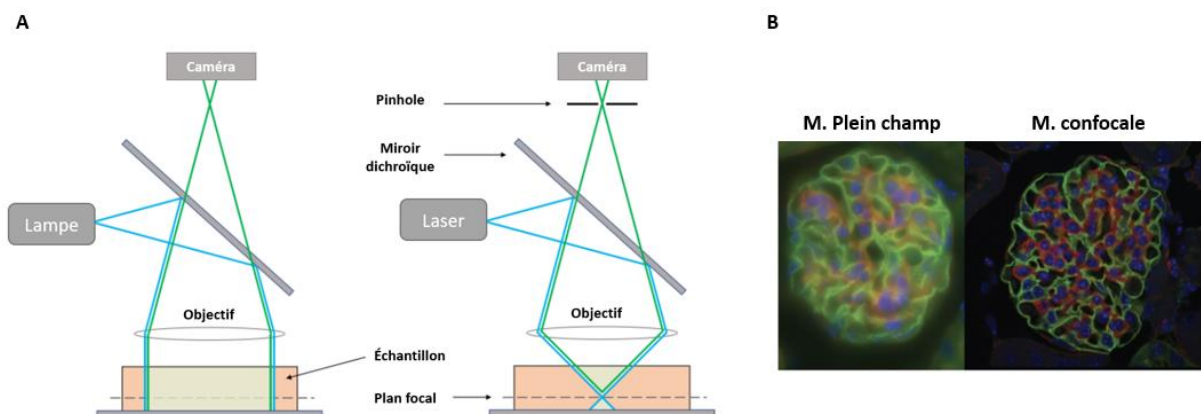
$$RA = \frac{1,4 * n * \lambda}{ON^2} \quad (6)$$

Avec n qui est l'indice de réfraction du milieu,  $\lambda$  est la longueur d'onde d'excitation et ON est l'ouverture numérique de l'objectif.

## Matériels et Méthodes

L'invention de ce microscope a permis de s'affranchir des limitations de la microscopie de fluorescence conventionnelle - dite plein champ. L'inconvénient majeur de la microscopie de fluorescence conventionnelle est sa mauvaise RA en présence d'échantillons épais (à partir de 10  $\mu\text{m}$ ) et/ou diffusants, en raison du signal parasite provenant de la fluorescence émise par les plans adjacents au plan focal. Ainsi, la microscopie à champ large n'est pas adaptée aux objets dont l'échantillon à observer n'est pas une tranche mince perpendiculaire à l'axe optique. En revanche, le microscope confocal permet de capter le signal issu d'un seul plan, le plan focal, tout en s'affranchissant des signaux parasites issus de toute l'épaisseur de l'objet imagé. Pour cela, un diaphragme dit "pinhole" est placé, devant le photodétecteur, dans le plan focal conjugué au plan focal de l'objectif, d'où l'attribut **confocal**.

Ainsi, la lumière provenant des plans adjacents est bloquée par les bords de ce diaphragme et seule la fluorescence émise par le plan focal atteint le détecteur (**figure 8A**). Grâce à ce blocage, la RL (xy) est meilleure (180-160 nm) à celle attendue pour un microscope optique conventionnel (200 nm). La RA peut atteindre 400 nm en microscopie confocale, ainsi, l'image finale est beaucoup plus nette (**figure 8B**).

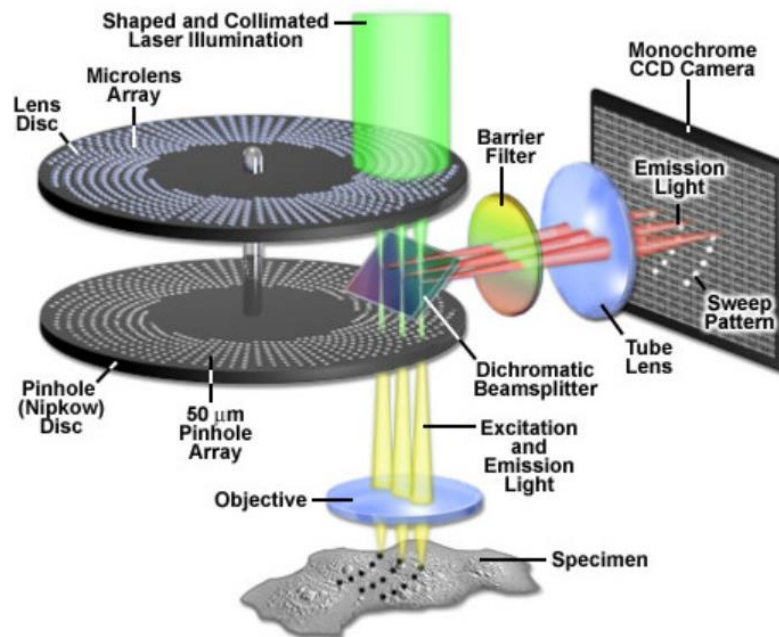


**Figure 8** : Comparaison entre le microscope à plein champ et le microscope confocal. **A.** à la différence d'un microscope plein champ, le microscope confocal dispose d'un diaphragme (pinhole) confocal situé devant le photomultiplicateur. Le pinhole arrête tout signal ne provenant pas du plan focal et permet d'améliorer la résolution spatiale comme le montre l'image **B**. Figures issues du site [[axiomoptics.com](http://axiomoptics.com)].



La mesure d'une image par microscopie confocale nécessite l'utilisation d'une illumination de type laser qui balaye point par point l'échantillon à analyser et de façon successive grâce au mécanisme de balayage (CLSM : confocal laser scanning microscope). Ce balayage est assuré à l'aide d'un système formé par deux miroirs vibrants en x et en y dites miroirs galvanométriques. Le déplacement sur l'axe z est réalisé par une sur-platine (quartz piézo-électrique) permettant l'acquisition d'une série de coupes optiques appelées séries-z. Néanmoins, la vitesse de balayage est limitée à cause de l'inertie du système mécanique en mouvement d'où la faible résolution temporelle de ce système. Cette faible vitesse de balayage rend l'utilisation du microscope confocal à balayage laser difficile pour l'étude des phénomènes dynamiques rapides tel que le phénomène d'internalisation des RCPG. Etant long, ce temps d'acquisition pourrait induire une dégradation rapide de l'échantillon par phototoxicité, ou effet thermique.

Cette résolution temporelle limitée a été améliorée grâce au remplacement du diaphragme par un disque rotatif contenant environ 20 000 trous appelé "disque de Nipkow" ou "spinning disque". Ce dernier est composé de centaines de pinholes disposés en spirales sur un disque opaque qui tourne à grande vitesse, le faisceau laser est ainsi divisé en un millier de faisceaux réduisant le temps d'acquisition et l'intensité d'excitation (**figure 9**) [219].



**Figure 9** : Principe de fonctionnement d'un microscope de type spinning disk. Le système d'illumination est un système laser qui passe à travers le premier disque composé de microlentilles qui servent à concentrer le rayon incident tout en le divisant en des centaines de faisceaux. Chaque microlentille du premier disque est alignée avec un pinhole du second disque appelé disque Nipkow. La fluorescence émise par l'échantillon passe par ce deuxième disque permettant de sélectionner la fluorescence provenant du plan focal. Image issue du site [[imagoseine.ijm.fr](http://imagoseine.ijm.fr)].

Au vu de ces avantages, nous avons utilisé la microscopie confocale en spinning disk pour étudier l'impact des AGPI sur l'internalisation de deux RCPG : le RD2 et le R $\beta$ 2A ainsi qu'un récepteur membranaire n'appartenant pas à la classe des RCPG, le récepteur à transferrine. Le recrutement membranaire de la  $\beta$ -arrestine-2 est aussi suivie par cette même technique. Toutes les expériences d'imagerie confocale sont réalisées à la plateforme d'imagerie de Bordeaux, en utilisant le microscope "vidéo spinning disk, Leica DMI6000B".

### Protocole expérimental :

- **Impact des AGPI sur l'internalisation du RD2 et du R $\beta$ 2A**

Pour l'imagerie des cellules fixées, les cellules HEK-293 exprimant transitoirement le FLAG-RD2, la GRK-2 et la  $\beta$ -arrestine-2 (ou le FLAG-R $\beta$ 2A, GRK-2 et la  $\beta$ -arrestine-2) sont ensemencées (250 000 cellules / puits) dans une plaque 12 puits, dont les fonds des puits sont couverts de lamelles en verre prétraitées à la poly-L-lysine, et enrichies en AGPI comme décrit dans le paragraphe (2.4. [Enrichissement cellulaire en AGPI](#)).

Les cellules enrichies sont d'abord incubées en présence de l'anticorps primaire (ACI, M1-FLAG) dilué dans le milieu DMEM complet pendant 10 minutes à 37° C et 5% CO<sub>2</sub>, puis traitées avec 10 µM du ligand d'intérêt (la dopamine, le quinpirole, l'aripiprazole, l'UNC993, la spipéronne et l'halopéridol pour le RD2 ou l'isopropanol pour le Rβ2A) pendant 30 minutes. Les cellules stimulées sont ensuite lavées avec du PBS (pH 7.4 contenant 0,9 mM de Ca<sup>2+</sup>) et immédiatement fixées avec du paraformaldéhyde à 4% (v/v) dilué dans du PBS + Ca<sup>2+</sup> pendant 10 min à la température ambiante (TA). Les cellules fixées sont ensuite perméabilisées pendant 10 minutes avec 0,2 % (v/v) de Triton-X et incubées en présence de l'anticorps secondaire (ACII, anti-souris Alexa Fluor-555) pendant 30 minutes à TA. Puis, les cellules sont lavées 3 fois avec du PBS pour enlever l'excès de l'ACII. Enfin, le montage entre lame et lamelle est réalisé en utilisant le Fluoromount comme milieu de montage.

En ce qui concerne l'imagerie des cellules vivantes, les cellules HEK-293, exprimant transitoirement le FLAG-RD2, la GRK-2 et la β-arrestine-2 (ou la β-arrestine-2-mCherry) sont ensemencées dans une plaque 12 puits comme décrit précédemment. Les cellules contrôles et enrichies en AGPI sont d'abord incubées en présence de l'ACI (10 min, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) préparé dans le milieu DMEM ne contenant pas le rouge de phénol. Ensuite, le milieu contenant l'ACI est remplacé par l'ACII et la plaque est incubée pendant 10 min à 37 °C et 5% CO<sub>2</sub>. Les cellules sont lavées 3 fois avec le même milieu puis placées dans une chambre tempérée, avec une température et un niveau de CO<sub>2</sub> bien contrôlés, qui permet une imagerie cellulaire optimale. La durée de l'imagerie des cellules vivantes varie de 30 à 45 min et le ligand du récepteur d'intérêt (10 µM) est rajouté après 5 min d'acquisition.

Voir le **tableau 9** pour la composition des tampons utilisés et le **tableau 5** pour les dilutions des anticorps (ACI/ACII) utilisées.

- **Impact des AGPI sur l'internalisation du récepteur à transferrine :**

La veille, les cellules HEK-293 exprimant naturellement le récepteur de la transferrine (RTf1) sont ensemencées dans une plaque 12 puits en présence des AGPI. Après 24 heures d'enrichissement, les cellules sont incubées dans du milieu DMEM incomplet et placées dans l'incubateur. Après 30 min d'incubation, les cellules sont incubées, pendant 15 min à 4°C, dans du milieu DMEM incomplet contenant 10 µg/ml de transferrine Alexa 568 (Tfn-A568).

Pour favoriser l'internalisation du complexe RTf/Tfn-A568, les cellules sont incubées pendant 5 min à 37°C puis lavées pendant 2 min avec du tampon glycine froid pour éliminer la Tfn-A568 non internalisée. Enfin, les cellules sont fixées comme expliqué ci-dessus et le système lame et lamelle est monté.

- **Imagerie cellulaire et l'analyse des résultats :**

Pour l'imagerie des cellules fixées, les images sont acquises avec un microscope confocal spinning Disk contrôlé par le logiciel d'acquisition MetaMorph avec un module d'acquisition multidimensionnelle. Ce microscope est équipé d'une caméra EMCCD Evolve, d'un objectif à immersion d'huile 63×/1,4 NA et des lasers à diode 561, 647 nm.

L'acquisition d'une série de coupes optiques appelées séries z ou "z-stack" permettant de recueillir toute l'information en z est réalisée avec une distance, séparant deux coupes, fixée à 0,5 µm. L'empilement par projection des 12 sections optiques obtenues est réalisé par le même logiciel d'acquisition, ceci permet de générer une image reconstruite en 3D servant à la quantification **1)** des endosomes produits suite à l'induction de l'internalisation des récepteurs (RD2, B2AR) par leurs agonistes ou **2)** des endosomes produits suite à l'internalisation du complexe RTf/Tfn-A568 par les cellules incubées en sa présence. Pour ce faire, le logiciel Metamorph est employé pour tracer un masque autour de chaque cellule ainsi qu'une région en arrière-plan. Les endosomes générés par masque sont détectés et quantifiés en utilisant une fonction Matlab écrite par David Perrais de l'Institut interdisciplinaire de neurosciences. Ensuite, le nombre total d'endosomes par condition est normalisé par rapport à la condition contrôle : **1)** cellules non enrichies en AGPI et stimulées par l'agoniste du RD2 ou le RB2A, **2)** cellules non enrichies en AGPI et incubées en présence de la Tfn-A568 pour le RTf1.

Pour l'imagerie des cellules vivantes, les images (1 image/10s) sont acquises au niveau du plan équatorial de la cellule à l'aide du même microscope. Le logiciel ImageJ est utilisé pour le rajout de la barre d'échelle.

- ❖ **Avantages :**

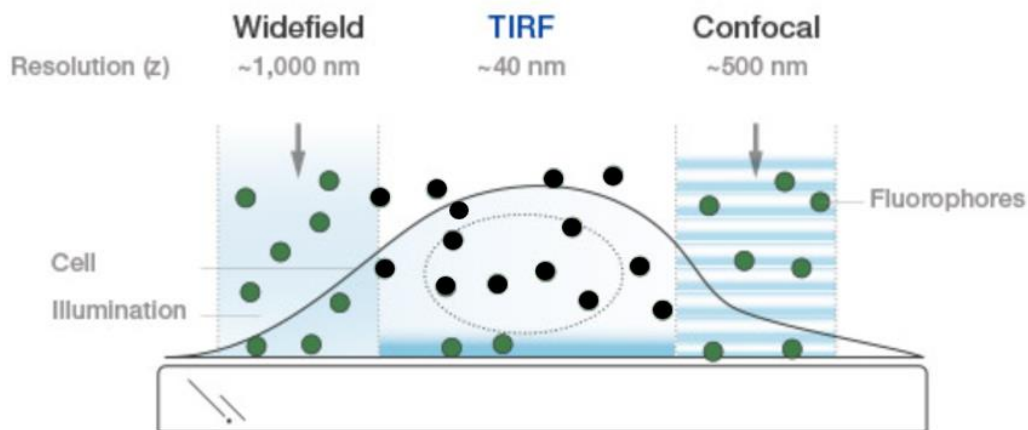
- ✓ Très bonne résolution temporelle : possibilité d'acquisition des phénomènes dynamiques rapides
- ✓ Résolution latérale (xy) accrue (30%) par rapport à la microscopie conventionnelle
- ✓ Permet le balayage en Z (impossible en microscopie conventionnelle)
- ✓ Possibilité d'obtenir des images 3D à haute résolution

### ❖ Inconvénients :

- ✓ Possibilité de photo-destruction cellulaire : la puissance de l'émission laser (entre 1mW et 10mW) entraîne une dégradation des spécimens observés dans tous l'épaisseur

#### iv. La microscopie de fluorescence par réflexion totale interne (TIRF) :

La microscopie TIRF appelée aussi microscopie à champ évanescent est une forme de microscopie de fluorescence permettant d'imager une fine section optique de l'échantillon ayant une épaisseur comprise entre 20 et 200 nm contre environ 400 nm pour la microscopie confocale (**figure 10**) [220].



**Figure 10** : Gain de la résolution axiale avec la microscopie TIRF. Image issue du site [[olympus-lifescience.com](http://olympus-lifescience.com)].

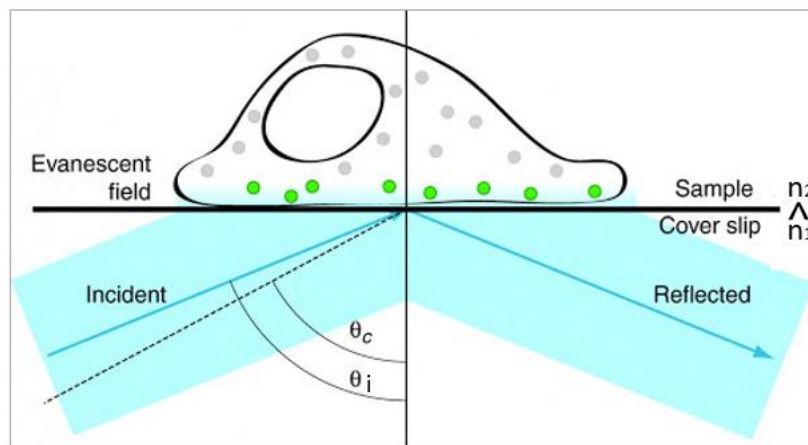
En effet, l'excitation de l'échantillon se fait dans des conditions de réflexion totale interne, du rayon incident, caractérisées par la formation d'une onde évanescente qui pénètre dans l'échantillon à une profondeur de seulement quelques centaines de nanomètres. L'onde évanescente est générée lorsque la lumière incidente est totalement réfléchi à l'interface de deux milieux : un milieu à indice de réfraction  $n_1$  élevé et un milieu à faible indice de réfraction,  $n_2$  (**figure 11**).

## Matériels et Méthodes

Ce phénomène ne se produit que lorsque l'angle d'incidence  $\theta_i$  est supérieure à une valeur critique. L'angle d'incidence qui provoque ce phénomène est appelée angle d'incidence critique  $\theta_c$  définie par la formule ci-dessous :

$$\theta_c = \sin^{-1} \left( \frac{n_2}{n_1} \right) \quad (7)$$

Où  $\theta_c$  représente l'angle critique,  $n_1$  représente l'indice de réfraction du rayon incident,  $n_2$  représente l'indice de réfraction du rayon réfléchi.



**Figure 11** : Principe de la microscopie TIRF. Une onde évanescente est produite suite au passage du faisceau laser d'un milieu d'indice  $n_1$  (lame de verre) à un milieu d'indice  $n_2$  (cellule vivante) avec ( $n_1 > n_2$  et  $\theta_i > \theta_c$ ). L'intensité de cette onde décroît exponentiellement avec la distance et permet de sonder seulement les fluorophores (représentés en vert ici) qui se trouvent à quelques dizaines de nanomètres de la lame en verre. Image tirée de [221].

En confinant la lumière d'excitation dans une petite zone, le rapport signal-bruit est amélioré avec la possibilité d'imager des molécules isolées à l'échelle nanométrique. Grâce à l'important gain en matière de résolution axiale apporté par cette technique, le TIRF est devenu l'outil d'investigation de choix pour de nombreux événements cellulaires qui font intervenir la membrane plasmique, tels que : le trafic des récepteurs membranaires, le recrutement des protéines cytosoliques sur la membrane plasmique, les phénomènes d'exocytose et endocytose.

Dans ce projet de thèse, l'imagerie TIRF est employée pour évaluer l'impact de l'enrichissement membranaire en AGPI sur le trafic membranaire (clustering) du RD2 ainsi que sur l'étape de recrutement de la  $\beta$ -arrestine-2. Pour ce faire, une étiquette SEP (Superecliptic pHluorin), une version génétiquement modifiée de la GFP (green fluorescent protein), est fusionnée à l'extrémité N-terminale du RD2. Quant à  $\beta$ -arrestine-2, elle est fusionnée à une protéine fluorescente rouge dite "mCherry".

### Protocole expérimental :

- **Préparation des cellules :**

Les cellules HEK-293 exprimant transitoirement le SEP-RD2, la GRK-2 et la  $\beta$ -arrestine-2-mCherry sontensemencées (250 000 cellules/ puit) dans une plaque 12 puits, sur des lamelles de verre recouvertes de poly-L-lysine, puis enrichies en AGPI pendant 24h.

Après 24 h, les cellules sont lavées 2 fois avec le milieu FluoroBrite™ DMEM et imagées pendant 10 min. Après 2 min d'imagerie, les cellules sont stimulées avec l'agoniste du RD2 (dopamine ou quinpirole) pour induire l'internalisation du SEP-RD2 ainsi que le recrutement de la  $\beta$ -arrestine-2-mCherry.

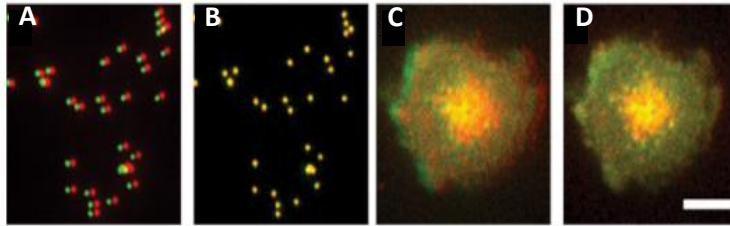
- **Imagerie cellulaire et analyse des résultats :**

L'imagerie TIRF des cellules est réalisée à 37°C à l'aide d'un microscope inversé (Olympus IX71) équipé d'un objectif à immersion (Olympus UAPON150XOTIRF, 63X), de deux sources lasers combinées dans un banc laser (Cobolt Lasers 06-DPL 473 nm, 100 mW et 06-MLD 561 nm, 50 mW) et de deux caméras EMCCD contrôlées par le logiciel Metamorph 7.10 (Molecular Devices).

Les images sont acquises simultanément par les deux caméras (1 image/2s ; 300 images pour 10 min d'imagerie) avec un temps d'exposition de 100 ms. Le logiciel d'acquisition génère deux images dans un cadre unique correspondant aux deux caméras. La première étape d'analyse consiste à aligner ces deux images en utilisant une image de billes fluorescentes [222], [223]. En effet, les billes sont imagées avec les mêmes paramètres utilisés auparavant pour l'imagerie des cellules. L'image de billes générée est également composée de deux images correspondant aux mêmes caméras.

L'utilisation d'une fonction Matlab écrite par David Perrais a permis de superposer ces deux images tout en alignant les billes les unes par rapport aux autres (**figure 12**). Grace à cette étape, les paramètres d'alignement sont déterminés et appliqués pour toutes les images des cellules obtenues. Après l'alignement, chaque image est divisée pour générer deux images : une première image qui correspond au canal du SEP-RD2 et une deuxième image qui correspond au canal de la  $\beta$ -arrestine-2-mCherry.





**Figure 12** : Alignement des canaux (vert et rouge). Les panneaux **A** et **B** montrent les images des billes avec la superposition des canaux avant (**A**) et après (**B**) l'alignement. Le panneau **C** montre l'image d'une cellule avant l'alignement des canaux. Les paramètres d'alignement utilisés en **B** sont appliqués à l'image présentée en **C** pour générer l'image en **D**. Barre d'échelle = 4 $\mu$ m. Images issues de [223].

Enfin, le même logiciel est utilisé pour quantifier l'intensité de la fluorescence mesurée dans les deux canaux pendant 10 min. Les valeurs de fluorescence mesurées pendant les 60 premières secondes, avant l'ajout de l'agoniste, sont moyennées et soustraites des valeurs de fluorescence mesurées toute les 2 secondes en utilisant l'équation ci-dessous :

$$IF = IF_x - MIF_{1-60} \quad (8)$$

Avec

IF : l'intensité de fluorescence normalisée utilisée pour tracer les courbes de variation de fluorescence en fonction du temps.

IF<sub>x</sub> : l'intensité de fluorescence mesurée toutes les deux secondes pendant 10 min : 300 intensités sont mesurées pour 300 images générées.

MIF : moyenne de l'intensité de fluorescence mesurée pendant les 60 premières secondes : moyenne des 60 intensités mesurées pour 60 images générées.

### ❖ Les avantages

- ✓ Limitation de la cytotoxicité de l'illumination : faible profondeur d'excitation du fluorophore
- ✓ Haute résolution axiale : excitation limitée à une fine couche
- ✓ Pas de fluorescence en dehors du plan focal : meilleur rapport signal/bruit

### ❖ Les inconvénients

- ✓ Non adapté aux échantillons épais : parties de tissu ou cellules de mammifère épaisses

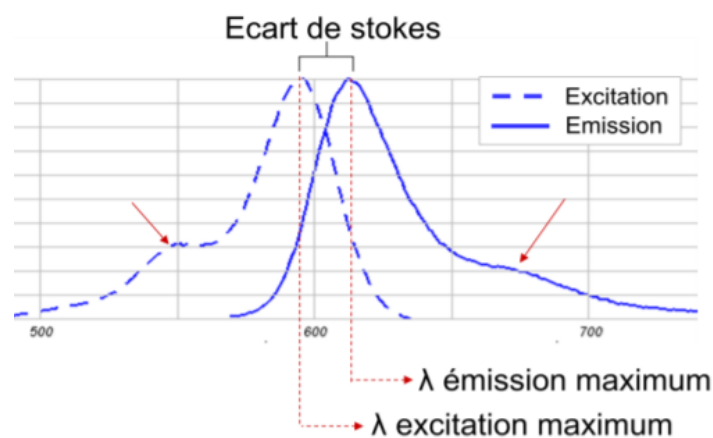
### 2.8. Spectroscopie de fluorescence :

La spectroscopie de fluorescence est une méthode analytique basée sur les propriétés de fluorescence de l'échantillon à analyser. Comme expliqué dans le précédent paragraphe, le phénomène d'émission de fluorescence est l'un des mécanismes par lequel une molécule revient à son état fondamental après avoir été excitée par l'absorption d'un rayonnement incident. Ainsi, chaque fluorophore possède un spectre de longueur d'onde capable de l'exciter dit **spectre d'excitation** et un spectre de longueur d'onde de fluorescence dit **spectre d'émission** [224] .

Le spectre d'excitation correspond aux différentes longueurs d'onde pour lesquelles une molécule excitée émet de la fluorescence. Il est obtenu en fixant la longueur d'onde d'émission ( $\lambda_E$ ) et en balayant la longueur d'onde d'excitation ( $\lambda_A$ ). En ce qui concerne le spectre d'émission de fluorescence, il traduit la quantité de photons émis par un fluorophore à différentes longueurs d'onde d'observation qui sont associés à la désexcitation du fluorophore. Ce dernier est obtenu suite au balayage de la  $\lambda_E$  tout en fixant la  $\lambda_A$ .

Ces deux spectres sont définis par plusieurs caractéristiques illustrées dans la **figure 13** :

- Une longueur d'onde d'excitation maximale  $\lambda_{Amax}$  et une longueur d'onde d'émission maximale  $\lambda_{Emax}$  spécifique à chaque fluorophore.
- Une symétrie spectrale entre les deux spectres : une apparente symétrie en miroir des spectres d'excitation et d'émission
- Le déplacement de stokes : un écart entre les valeurs maximales d'excitation et d'émission car le photon de fluorescence émis présente une plus grande longueur d'onde que le photon incident.

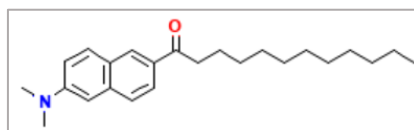


**Figure 13** : spectre d'excitation et d'émission de la sulfo-rhodamine 101.

## Matériels et Méthodes

Plusieurs paramètres physiques liés au phénomène de fluorescence tels que la durée de vie de fluorescence et le rendement quantique de fluorescence ( $\phi_F$ ) défini par le rapport entre l'énergie émise par fluorescence et l'énergie totale absorbée, jouent un rôle essentiel dans les analyses des spectres de fluorescence. En plus de ces paramètres, l'environnement de la molécule fluorescente (la variation du pH, de la température ou de la polarité du solvant) pourrait aussi affecter les spectres de cette dernière. De ce fait, la spectroscopie de fluorescence est largement utilisée pour : **1)** étudier les interactions intermoléculaires **2)** caractériser les solvants organiques **3)** étudier les propriétés physicochimiques des membranes cellulaires, notamment la compacité membranaire.

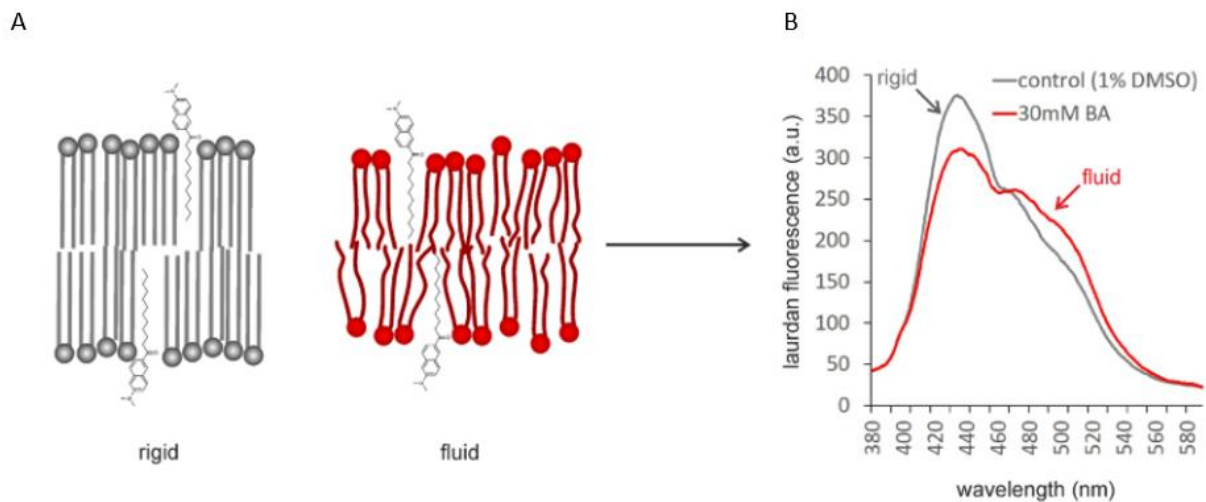
Dans ce contexte une sonde synthétisée en 1979 par Farris et Weber dite sonde Laurdan est utilisée dans ce projet pour évaluer l'impact de l'enrichissement cellulaire en AG sur la compacité des lipides membranes. Sa fluorescence provient de la présence d'un groupement naphthalène auquel est greffé une chaîne d'acyle de 10 carbones qui favorise l'insertion du Laurdan dans la membrane cellulaire (**figure 14**) [225].



**Figure 14** : structure de la sonde Laurdan : 6-Propionyl-2-(diméthylamino) naphthalène. [PubChem CID : 104983](#).

Il a été montré que la fluorescence du Laurdan est très sensible à la polarité de son environnement et donc au niveau d'hydratation des membranes étudiées. En effet, lorsqu'il est excité, son dipôle s'accroît d'où la réorientation des dipôles des molécules d'eau autour du naphthalène. Ainsi, son spectre d'émission se décale vers le rouge, plus l'accessibilité du Laurdan au solvant est importante plus ce décalage est important [226]–[228].

L'excitation du Laurdan à 360 nm induit une émission maximale de fluorescence à deux longueurs d'onde (435 nm et 490 nm), ces intensités sont relatives à une organisation de la membrane en phase gel (435 nm) et à une organisation en phase liquide (490 nm) (**figure 15**).



**Figure 15** : Etude de la compacité membranaire par la fluorescence du Laurdan **A**. Structure et orientation de la molécule de Laurdan à l'intérieur d'une membrane en phase gel (rigide, en gris) et une membrane en phase liquide (fluide, en rouge). **B**. Les spectres d'émission du Laurdan inséré dans deux membranes différentes. Plus la membrane est fluide plus le spectre d'émission est décalé vers la droite. Figures issues de [228].

Un paramètre appelé Polarisation Généralisée (PG) a été défini par Parasassi et Gratton en 1995 :

$$PG = \frac{I_{435} - I_{490}}{I_{435} + I_{490}} \quad (9)$$

Avec  $I_{435}$  et  $I_{490}$  sont les intensités de fluorescence respectivement dans le bleu (435 nm) et le rouge (490 nm). La valeur de PG varie d'une valeur maximale de 1, qui correspond à une membrane en phase gel (très ordonnée), à une valeur négative minimale -1 qui correspond à une membrane fluide (désordonnée).

### Protocole expérimental :

300 000 cellules (HEK-293) par puit sontensemencées dans une plaque 6 puits. A 50 % de confluence, le milieu DMEM complet est remplacé par le même milieu contenant 30  $\mu$ M d'AG ou 0,1 % d'éthanol. Après 24 h d'incubation, la surface cellulaire est rincée délicatement avec 1 ml de tampon PBS préchauffé à 37°C. Suite au rinçage, les cellules sont récupérées à l'aide d'un grattoir stérile puis centrifugées à 1500 rpm pendant 5 minutes. Le surnageant est ensuite aspiré et le culot cellulaire est resuspendu dans 2 ml de PBS. Cette opération est répétée deux autres fois puis le culot cellulaire obtenu est repris dans 2 ml de PBS contenant 10  $\mu$ M de Laurdan. Après une bonne homogénéisation, le mélange (cellules contrôles ou enrichies + Laurdan) est incubé pendant 1 H à 37 °C et 5 % CO<sub>2</sub>.

## Matériels et Méthodes

Au terme de l'incubation, le mélange est homogénéisé avant la préparation d'une plaque 96 puits contenant 200  $\mu$ l du mélange par puit.

Le lecteur de plaque "Tecan M1000 pro" est ensuite utilisé pour l'acquisition du spectre d'émission du Laurdan tout en maintenant la température de mesure constante à 37 °C. Pour cela, la longueur d'onde d'excitation est fixée à 365 nm avec une bande passante de 5 nm et une bande passante de 2,5 nm pour l'émission. Le spectre d'émission est mesuré entre 400 et 650 nm et la valeur du coefficient **PG** est calculé pour les différentes conditions pour évaluer l'impact de chaque AG sur la fluidité membranaire.

### ❖ Les avantages

- ✓ Approche non destructive pour les cellules

### ❖ Les inconvénients

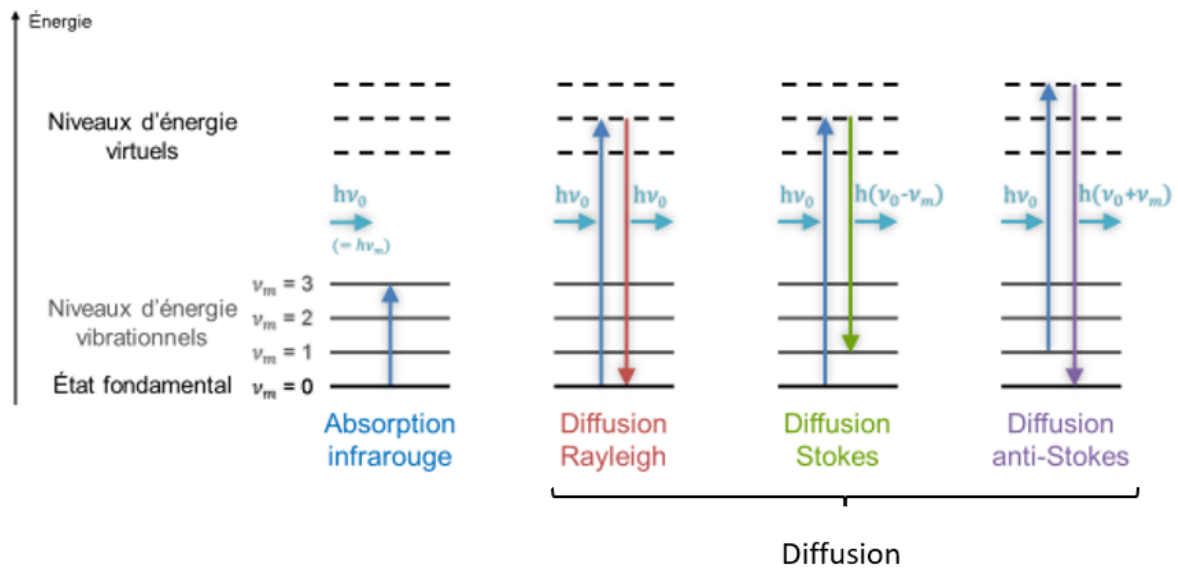
- ✓ Grande sensibilité de la fluorescence du Laurdan à d'autres facteurs environnementaux : la température, le pH...

### 2.9. La micro-spectroscopie Raman :

La spectroscopie de diffusion Raman est une technique de spectroscopie vibrationnelle permettant l'analyse non invasive et non destructive d'un matériau. Les informations obtenues permettent : **1)** l'identification de groupements chimiques (C-H, OH, C=O amide, C=O ester) des molécules présentes dans le matériau (lipides, protéines, etc..) et **2)** la détermination de la structure de molécules ainsi que leur organisation spatiale. En effet, lorsqu'un échantillon est exposé à un rayonnement lumineux monochromatique d'énergie  $h\nu_0$ , les photons incidents peuvent être transmis, réfléchis, absorbés ou diffusés. La majeure partie des photons diffusés va subir une diffusion élastique de type Rayleigh qui se produit lorsque les photons diffusés possèdent la même énergie que les photons issus de la source d'excitation. Une très faible fraction (1 pour 10 millions environ) sera diffusée de manière inélastique. Ce deuxième type de diffusion est caractérisé par un décalage d'énergie entre les photons incidents et les photons diffusés [229], [230] (**figure 16**).

Ce décalage d'énergie est appelé **effet Raman** et est constitué de deux parties décalées symétriquement par rapport à la diffusion Rayleigh :

- Diffusion Raman Stokes : les photons diffusés possèdent une énergie plus faible que les photons incidents :  $h\nu_0 > h(\nu_0 - \nu_m)$
- Diffusion Raman anti-Stokes : les photons diffusés possèdent une énergie plus importante que les photons incidents :  $h\nu_0 < h(\nu_0 + \nu_m)$



**Figure 16** : Diagramme de Jablonski montrant les différents phénomènes qui peuvent être induits suite à l'interaction d'une onde électromagnétique avec les niveaux énergétiques d'une molécule.  $\nu_0$  et  $\nu_m$  sont des fréquences,  $h$  la constante de Planck. Figure adaptée de [230].

D'après la distribution de Boltzmann, les photons diffusés par les radiations Stokes sont statistiquement plus nombreux que ceux provenant des radiations anti-Stokes, puisque l'effet Stokes part de l'état vibrationnel le plus stable et donc le plus peuplé. Ainsi, l'effet Stokes génère des raies d'intensités plus importantes que celle de l'effet anti-Stokes. Dans la pratique, les mesures Raman conventionnelles consistent à détecter l'énergie des photons issus de la diffusion Stokes. Ces énergies détectées sont à l'origine d'un spectre Raman contenant des bandes caractéristiques des groupements moléculaires de l'échantillon analysé.

Chaque bande de ce spectre est caractérisée par : **1**) sa position (en nombre d'onde exprimé en  $\text{cm}^{-1}$ ) qui dépend de l'énergie d'un mode de vibration spécifique à une liaison chimique ainsi que de la masse réduite des atomes qui constituent la liaison. La grandeur utilisée pour indiquer la position de la bande sur un spectre Raman est le nombre d'onde relatif ( $\bar{\nu}_d - \bar{\nu}_0$ ) correspondant à l'écart entre le nombre d'onde de la raie diffusée ( $\bar{\nu}_d$ ), Raman, et celui de la raie excitatrice ( $\bar{\nu}_0$ ), Rayleigh, [231], **2**) l'intensité de la raie qui est proportionnelle à la concentration des espèces diffusantes, **3**) la largeur à mi-hauteur qui permet d'avoir des informations sur la complexité de l'environnement chimique. Ainsi, la spectroscopie Raman permet d'obtenir des informations sur la structure des molécules et sur leurs interactions dans le milieu environnant par la détection de modes de vibrations moléculaires spécifiques.



## Matériels et Méthodes

Cette technique optique est pertinente pour la caractérisation de composés biologiques, tels que les protéines et les lipides en milieu biologique, au sein d'une cellule ou d'un organe. Le couplage de la spectroscopie Raman avec un microscope confocal permet d'obtenir des informations spatialement résolues (1 $\mu$ m) utiles pour la détermination de la localisation de composés d'intérêt (imagerie, cartographie Raman).

Dans ce projet de thèse, nous avons choisi d'utiliser la microscopie confocale Raman, pour compléter les analyses lipidomiques (CG-SM), dans le but de localiser l'accumulation des AG exogènes (AB, DHA, DPA) dans les cellules enrichies.

Le microscope RAMAN utilisé au cours de ces travaux est un WiTec alpha300RS (Ulm, Allemagne), il est constitué de :

- Une source laser qui sert d'excitatrice (deux longueurs d'onde sont disponibles :  $\lambda=532$  nm et  $\lambda=633$  nm)
- Un microscope confocal qui permet la focalisation et la collection de la lumière diffusée
- Une platine piézoélectrique pour les déplacements de l'échantillon
- Un système de filtrage optique qui rejette les photons élastiques Rayleigh et les photons inélastiques anti-Stokes
- Un spectromètre muni d'un réseau dispersif permettant de séparer les photons diffusés aux différentes longueurs d'ondes
- Un détecteur type caméra EMCDD (Electron Multiplying Charged Coupled Device) pour collecter les photons

### Protocol expérimental :

- **Préparation des cellules :**

Les cellules HEK-293 sontensemencées (50 000 cellules/ puit) dans une plaque 4 puits, sur des lamelles de verre recouvertes de poly-L-lysine. Le lendemain les cellules sont incubées en présence de 30  $\mu$ M d'AG d'intérêt (AB-D43, DHA-Alcyne, DHA et DPA) pendant 24h.

Après 24 h d'incubation, les cellules contrôles, traitées avec 0.1% d'éthanol, et enrichies, traitées avec 30  $\mu$ M d'AG, sont lavées 3 fois avec le milieu DMEM pour éviter la détection des AG exogènes éventuellement adsorbés sur les cellules.

## Matériels et Méthodes

Les cellules sont ensuite fixées au PFA (4%), comme expliqué précédemment, et rincées plusieurs fois au PBS. Les sels présents dans ce tampon sont éliminés, progressivement, par plusieurs lavages (**tableau 13**). Les lamelles sont ensuite séchées doucement à l'air comprimé dans le but de s'affranchir des signaux Raman de l'eau et de pouvoir utiliser un objectif à sec x100.

**Tableau 13** : composition des tampons de lavage

Lavages	Composition du tampon de lavage
Lavage 1	75% PBS + 25% d'eau
Lavage 2	50% PBS + 50% d'eau
Lavage 3	25% PBS + 75% d'eau
Lavage 4	10% PBS + 90% d'eau

- **Imagerie cellulaire et analyse des données :**

Toutes les mesures Raman ont été réalisées avec un objectif Olympus (100x/ 0.95 NA) à la longueur d'onde  $\lambda = 532$  nm et à une résolution spectrale de  $8 \text{ cm}^{-1}$  grâce à un réseau dispersif de 600 traits/mm. La résolution axiale du système est d'environ 0.5 microns. Les spectres sont enregistrés avec un temps d'intégration de 2 secondes/point. Les images hyper-spectrales sont acquises en mesurant un spectre en chaque point, avec une platine motorisée qui déplace l'échantillon sous le faisceau laser (en XY) dans une coupe optique choisie à environ  $2 \mu\text{m}$  au-dessus de la surface de la lamelle. Ceci correspond approximativement au maximum de signal sur la cellule très fine du fait du séchage. Les images sont mesurées avec une résolution latérale de  $1 \mu\text{m}$  par pixel.

Les données Raman obtenues sont traitées par le logiciel ProjectPlus WiTec GmbH (Ulm, Allemagne). Après l'acquisition Raman, la première étape consiste à prétraiter les données pour s'affranchir des bruits cosmiques (cosmic rays). Le deuxième prétraitement appliqué est la correction de la ligne de base. La cartographie, ou l'imagerie chimique, est réalisée par intégration de l'intensité d'une bande d'intérêt, ce qui permet de localiser les différents AG d'intérêt.

Pour la détection des AG marqués, l'AB-D43 et le DHA-Alcyne, des images d'intensité ont été réalisées dans les bandes spectrales correspondant aux vibrations spécifiques des composés d'intérêt: vibrations d'élongation du groupement alcyne ( $\nu\text{C}\equiv\text{C}$ ) pour le DHA-Alcyne ( $2100 \pm 30 \text{ cm}^{-1}$ ), vibrations d'élongation symétrique et antisymétrique du groupement  $\text{CD}_2$  pour l'AB-deutééré ( $2150 \pm 250 \text{ cm}^{-1}$ ) [232], [233].

Pour les AGPI non marqués, DHA et DPA, les bandes caractéristiques des chaînes lipidiques insaturées choisies sont les modes de vibrations d'élongation des groupements  $\nu\text{C-H}$  ( $1260 \pm 30 \text{ cm}^{-1}$  et  $3015 \pm 30 \text{ cm}^{-1}$ ) et la vibration d'élongation de la double liaison ( $\nu\text{C=C}$ ) ( $1657 \pm 30 \text{ cm}^{-1}$ ) [234]. L'accumulation des différents AG (AB-D43, DHA-Alcyne, DHA et DPA) est possible par la comparaison des spectres moyens des différents groupes de cellules (enrichies et contrôles).

### ❖ Avantages :

- ✓ Analyse non invasive et non destructive
- ✓ Technique sans marquage

### ❖ Inconvénients :

- ✓ La possible dégradation de l'échantillon suite à une acquisition longue pour collecter un nombre suffisant de photons
- ✓ Difficulté de discriminer les composés endogènes de l'échantillon quand leur nature chimique est identique à l'échantillon.

# Chapitre III

## Modification de la composition lipidique membranaire : Enrichissement en AG

### Résumé :

L'étude des différents phénomènes complexes impliquant les lipides membranaires et les RCPG nécessite d'avoir la possibilité de modifier la composition et la nature de l'environnement lipidique dans lequel se trouve le récepteur d'intérêt. Comme évoqué dans le précédent chapitre, trois approches sont principalement utilisées dans la littérature : **1**) la modélisation moléculaire : une approche théorique basée sur la simulation numérique de l'environnement lipidique d'un RCPG; **2**) l'approche d'étude *in vitro* basée sur la reconstitution du récepteur d'intérêt dans des systèmes lipidiques modèles, notamment dans des liposomes, mimant une composition lipidique particulière ; **3**) l'approche *in cellulo* qui consiste à exprimer le RCPG dans un système cellulaire dont la composition lipidique est spécifiquement modulée (enrichie ou déplétée). Sachant que le but de ce projet de thèse consiste à identifier l'impact de la composition lipidique membranaire en AGPI sur la voie d'internalisation du RD2, la seule approche adaptée à notre étude est l'approche *in cellulo* (**3**). Le modèle cellulaire choisi pour ce projet est la lignée cellulaire HEK-293, un modèle cellulaire de référence pour l'étude de l'internalisation des RCPG. De plus, cette lignée présente l'avantage d'être facilement transfectable avec un très bon niveau d'expression des protéines recombinantes.

En ce qui concerne l'approche d'étude choisie, De Smedt-Peyrusse *et al* ont décrit une méthode simple permettant d'enrichir les cellules microgliales murines (BV-2) en DHA [235]. Cette méthode consiste à incuber les cellules, pendant 24h, dans un milieu de culture riche en DHA. Ainsi, nous nous sommes inspirés de cette méthode de modulation de la composition lipidique membranaire en AGPI pour examiner l'impact de l'enrichissement cellulaire en AGPI sur la voie d'internalisation du RD2 exprimé dans les cellules HEK-293. L'effet de ces AG a été déduit d'une comparaison entre le comportement du RD2 dans une membrane native (non-enrichie) et une membrane enrichie avec **1**) le DHA (22 :6- $\omega$ 3) ou **2**) le DPA (22 :5- $\omega$ 6).

Afin d'éviter les effets liés aux différences de longueur entre les chaînes aliphatiques, les deux AGPI choisis possèdent la même longueur de chaîne (22 carbones). Le choix du premier AGPI est basé sur un nombre croissant d'études suggérant qu'une déficience en AGPI- $\omega$ 3, en particulier le DHA, présent d'une façon prépondérante dans le cerveau, pourrait être impliquée dans la pathophysiologie de différentes maladies psychiatriques [135], [236], [237]. Le DPA, ne différant du DHA que par une insaturation en moins, a été choisi pour mettre en évidence l'impact du nombre et de la position des doubles liaisons de la chaîne lipidique sur la voie d'internalisation du RD2.

## Enrichissement membranaire en AG

Outre ces AGPI, un AGS, l'acide béhénique (AB, C22 :0), ayant la même longueur de chaîne carbonée que les deux AGPI, a été également utilisé pour s'assurer que l'effet de l'enrichissement membranaire en AGPI est dû à une augmentation du taux d'insaturation membranaire et non pas à une augmentation du taux des AG à longue chaîne (22 carbones).

Un des objectifs des travaux présentés dans ce chapitre est d'évaluer l'efficacité de la méthode d'enrichissement cellulaire utilisée. Pour cela, l'analyse et la quantification des AG, AGPI et AGS, extraits des membranes cellulaires totales ont été effectuées par la technique de chromatographie gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (CG-SM). La localisation des AG exogènes au sein des cellules enrichies a été établie par une technique de micro-spectroscopie non-invasive : la diffusion Raman. Le deuxième objectif de ce chapitre est d'étudier les propriétés biophysiques, notamment la fluidité, des membranes cellulaires enrichies en AGPI ou en AGS. Ceci a été étudié par la spectroscopie de fluorescence d'une sonde, le Laurdan, présentant des longueurs d'onde d'émission caractéristiques pour les lipides moins compacts (en phase fluide) et plus organisés (en phase gel) [238], [239]. Il est important de préciser que toutes les expériences décrites dans ce chapitre ont été réalisées en utilisant une lignée cellulaire (HEK-293) sauvage.

L'ensemble des travaux présentés dans ce chapitre a permis de valider l'approche d'enrichissement adoptée et d'estimer la distribution cellulaire des différents AG qui semblent s'incorporer au niveau de la membrane plasmique exprimant notre récepteur d'intérêt, le RD2, ainsi que les autres récepteurs étudiés dans ce projet de thèse, le R $\beta$ 2A et le RTf1. En accord avec les données bibliographiques, seules les membranes enrichies en AGPI possèdent une fluidité membranaire nettement plus importantes que les membranes natives.

### 1. Analyse lipidomique :

L'objectif de cette partie est de déterminer la teneur en PL membranaires et la composition en AG des membranes cellulaires totales en réponse aux traitements des cellules HEK-293 avec 30  $\mu\text{M}$  d'AG (DHA, DPA ou AB). Les expériences décrites dans cette partie ont été réalisées dans le cadre d'une collaboration avec Dr. Elodie Masson (chercheuse au Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation à Dijon).

#### 1.1. Analyse de la composition en AG des lipides totaux :

La validation de l'approche d'enrichissement membranaire en AG (DHA, DPA ou AB) a nécessité la détermination de la composition en AG des lipides membranaires totaux extraits des cellules contrôles ou incubées, pendant 24h, en présence de 30  $\mu\text{M}$  de l'un des AG d'intérêt. Ainsi, les esters méthyliques d'AG (EMAG) des lipides totaux ont été séparés par un chromatographe en phase gazeuse puis quantifiés par une méthode de quantification sensible, la spectrométrie de masse, permettant de connaître la masse d'EMAG ainsi que ses caractéristiques structurales, notamment la longueur de chaîne aliphatique et le degré d'insaturation, par l'analyse du rapport  $m/z$  (masse/charge).

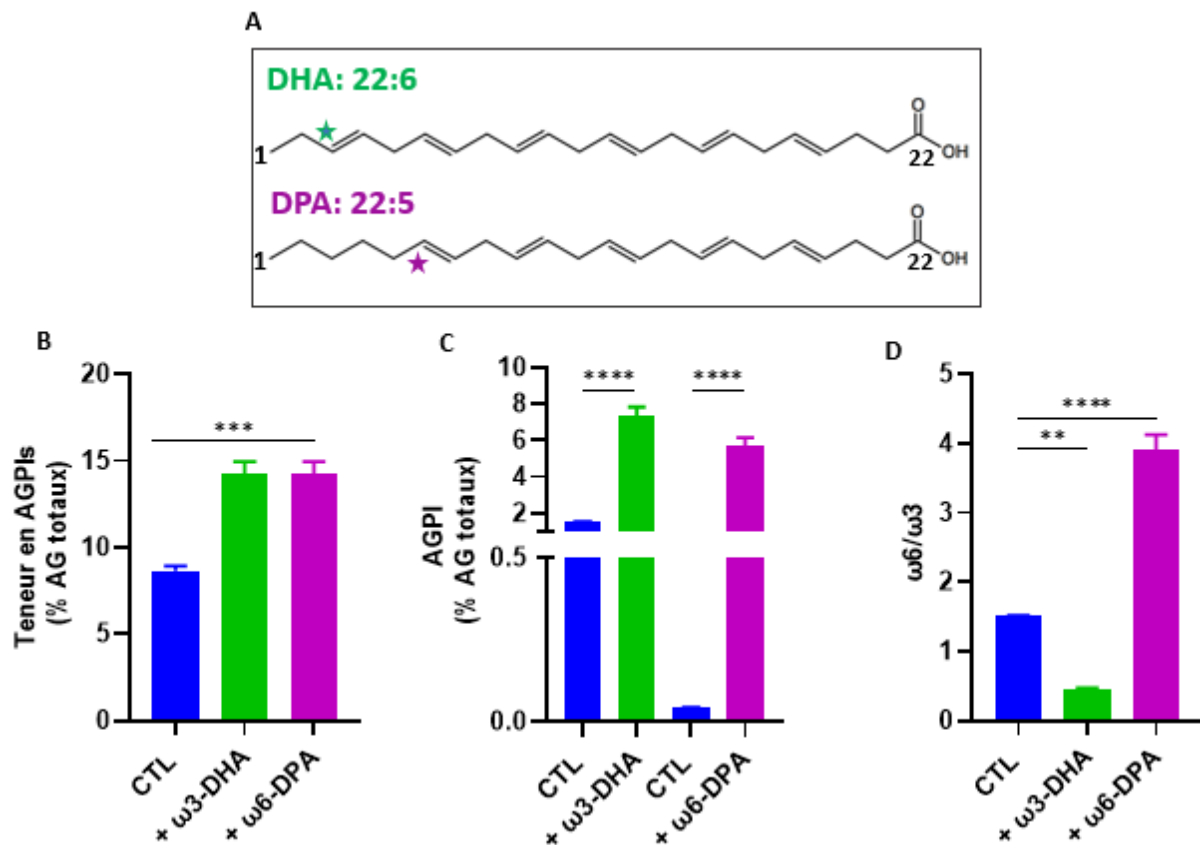
Comme attendu, l'analyse des cellules contrôles et enrichies en AGPI (DHA ou DPA) montre une augmentation significative de la teneur en AGPI en réponse aux traitements des cellules avec 30  $\mu\text{M}$  de DHA ou de DPA. En effet, dans les cellules contrôles, les AGPI représentent environ 8 % des AG totaux tandis que dans les cellules traitées ces derniers représentent environ 14 % des AG totaux (**figure 1A, B**). Ce résultat indique que les deux traitements aboutissent à une composition en AGPI comparable quel que soit l'AGPI utilisé. De plus, en réponse au traitement au DHA, la teneur de ce dernier passe d'environ 1,6 % dans les cellules contrôles à 7 % dans les cellules traitées. De même pour le DPA, sa proportion augmente significativement (de 0,05 % à 5,8 %) dans les cellules traitées en comparaison aux cellules contrôles (**figure 1C**). Ces données montrent que l'enrichissement membranaire en DPA est beaucoup plus important (environ 100 fois) par rapport au DHA (environ 4 fois). Néanmoins, les deux traitements aboutissent à des concentrations globales assez comparables (5,8 % pour le DPA et 7 % pour le DHA).



## Enrichissement membranaire en AG

En outre, la comparaison du ratio  $\omega 6/\omega 3$  a permis de confirmer l'enrichissement membranaire en DHA et en DPA. En effet, comme indiqué dans la **figure 1D**, le traitement des cellules avec l'AGPI- $\omega 3$  induit une diminution remarquable (d'environ 3 fois) du rapport  $\omega 6/\omega 3$ , en comparaison aux cellules contrôles, reflétant une augmentation de la proportion des AGPI de type  $\omega 3$ .

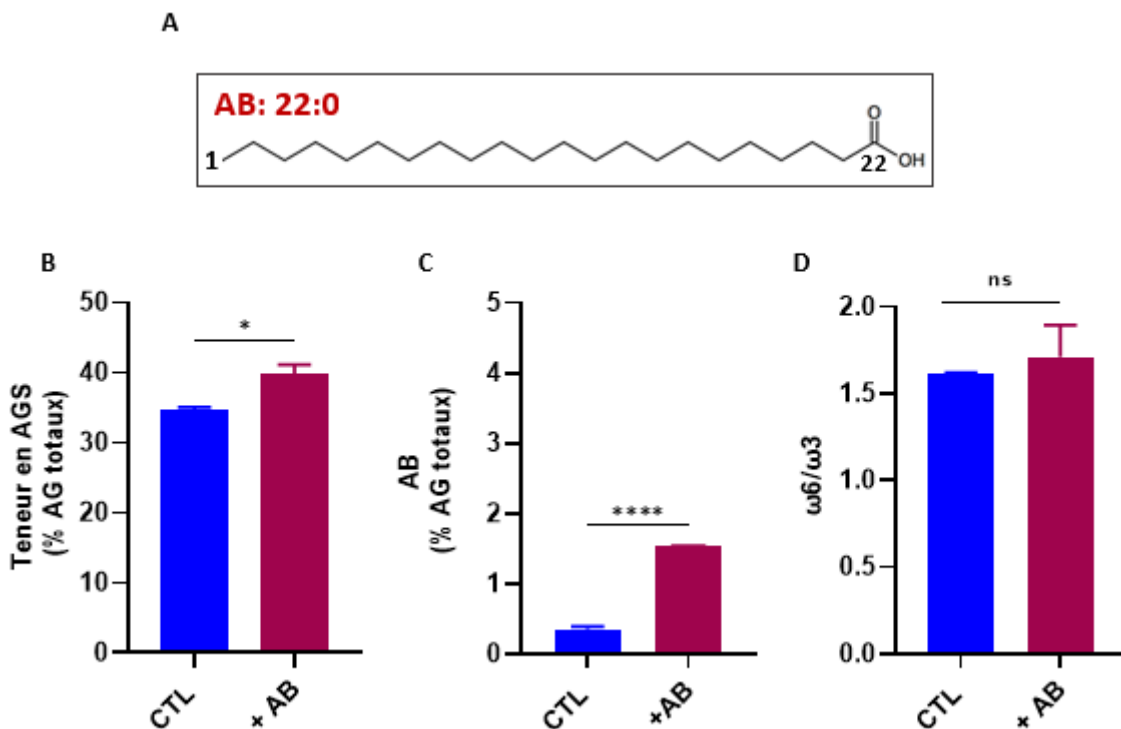
En revanche, l'incubation des cellules en présence de l'AGPI- $\omega 6$ , le DPA, conduit à une augmentation significative (d'environ 2,7 fois) de ce même ratio indiquant l'abondance de la famille de type  $\omega 6$  au détriment de la deuxième famille. L'ensemble des résultats décrits précédemment prouvent que l'approche d'enrichissement choisie permet d'augmenter d'une manière similaire la proportion des AGPI d'intérêt dans les lipides membranaires totaux.



**Figure 1** : Analyse des AG membranaires par CG-SM. Les AG totaux sont extraits des cellules contrôles, cultivées dans du milieu de culture contenant 0,1% d'EtOH, et de cellules cultivées pendant 24h en présence de 30  $\mu$ M de DHA ou de DPA dont les structures sont présentées en (A). **B.C.** Teneurs en AGPI totaux (**B**) et teneurs en AGPI d'intérêt : DHA et DPA (**C**). Les résultats sont présentés en pourcentage de la teneur totale en AG à partir de trois répétitions biologiques indépendantes. **D.** Rapports  $\omega 6/\omega 3$  mesurés dans les différentes conditions. La significativité a été testée par un test one-way ANOVA suivi par une comparaison multiple de type Dunnett : \*\* 0,01 < p < 0,001 ; \*\*\* p < 0,005; \*\*\*\* p < 0,0001.

## Enrichissement membranaire en AG

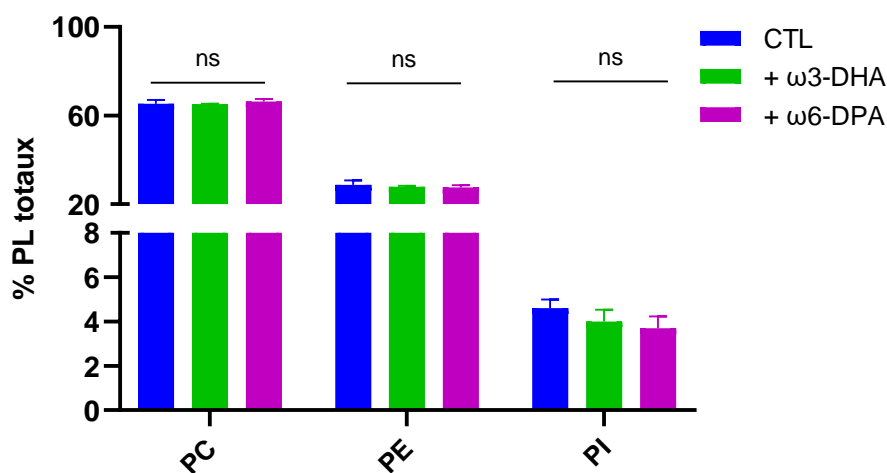
De la même façon, l'analyse des cellules contrôles et traitées avec l'AGS (AB) montre une augmentation significative de la teneur en AGS en réponse aux traitements des cellules avec 30  $\mu\text{M}$  d'AB (**figure 2A, B**). De plus, ce même traitement aboutit à une augmentation de la proportion d'AB qui passe d'environ 0,35 % dans les cellules contrôles à 1,5% dans les cellules traitées (**figure 2C**). Contrairement à ce qui a été observé pour les cellules enrichies en DHA et en DPA, aucun changement dans le rapport  $\omega 6/\omega 3$  n'a été observé (**figure 2D**). Ceci suggère que l'enrichissement cellulaire en AB ne module pas les proportions des AGPI de type  $\omega 3$  et  $\omega 6$ .



**Figure 2:** Analyse des AG membranaires par CG-SM. Les AG totaux sont extraits des cellules contrôles, cultivées dans du milieu de culture contenant 0,1% d'EtOH, et les cellules traitées pendant 24H par 30  $\mu\text{M}$  d'AB dont la structure est présentée en **A**. **B.C.** Les teneurs en AGS totaux (**B**) et les teneurs en AB (**C**), issues de trois répétitions indépendantes, sont présentés en pourcentage de la teneur totale en AG. **D.** Les rapports  $\omega 6/\omega 3$  mesurés dans les deux différentes conditions. La significativité a été testée par un test de Student : ns :  $p \geq 0,05$  ; \*  $0,01 < p < 0,05$  ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

### 1.2. Analyse de la teneur en PL :

Outre l'analyse des AG, l'analyse de la teneur en PL a été également réalisée par chromatographie en phase liquide (CL corona). Le but de cette étude est d'évaluer l'impact de l'enrichissement membranaire en DHA et en DPA sur les proportions des différentes classes de PL membranaires, notamment le PI, le PE et la PC. Comme le montre la **figure 3**, l'enrichissement en DHA et DPA n'a aucun effet significatif sur l'abondance des trois phospholipides les plus abondants au sein des membranes cellulaires.

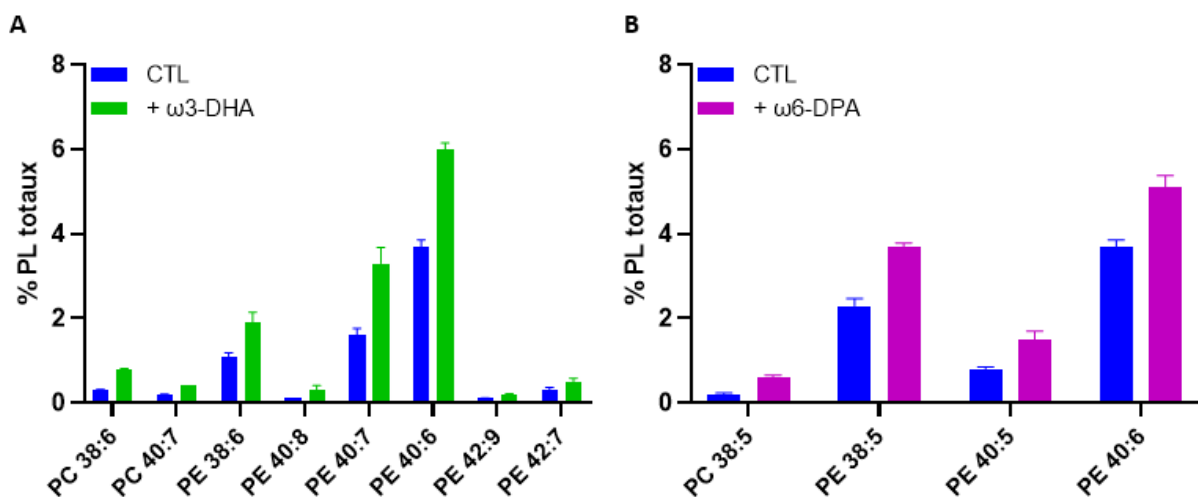


**Figure 3 :** Analyse de la teneur en PL (**PE**, **PC** et **PI**) extraits des cellules soumises aux traitements suivants : 0,1% EtOH (contrôles), 30 μM de DHA ou de DPA pendant 24h. Les PL d'intérêt sont analysés par CL-corona et quantifiés par rapport aux PL totaux. **PC**, phosphatidylcholine ; **PE**, phosphatidyléthanolamine ; **PI**, phosphatidylinositol. La significativité a été testée par un test de Student : ns :  $p \geq 0,05$ .

## Enrichissement membranaire en AG

Malgré le fait que l'enrichissement cellulaire en DHA et en DPA ne module pas les proportions des PE et PC totales, l'analyse de la composition en AG de ces derniers, par la chromatographie en phase liquide conjuguée à la spectrométrie de masse (CL-SM), a permis de montrer que l'enrichissement cellulaire en DHA conduit à une augmentation de la proportion de deux espèces de PC contenant du **DHA** : PC (38:6=16:0/22:6) et PC (40:7=18:1/22:6). Similairement, l'enrichissement en DPA conduit à une augmentation de la proportion du PC (38:5=16:0/22:5) qui contient ce dernier (**figure 4**). En ce qui concerne le PE, les mêmes analyses ont montré que la supplémentation en DHA aboutit à une augmentation de la proportion de plusieurs espèces de PE : PE (38:6=16:0/22:6), PE (40:8=18:2/22:6), PE (40:7=18:1/22:6), PE (40:6=18:0/22:6), PE (42:9=20:3/22:6) et le PE (42:7=20:1/22:6). De façon comparable, la supplémentation en DPA induit une augmentation de la proportion de différentes espèces de PE, notamment le PE (38:5=16:0/22:5), le PE (40:5=18:0/22:5) et le PE (40:6=18:0/22:5) (**figure 4**).

L'augmentation de ces différentes espèces suggère que les AGPI d'intérêt s'incorporent principalement dans les PE et les PC avec une préférence pour les PE. Quant à l'AGS (AB), nous n'avons pas évalué l'impact de son enrichissement cellulaire sur l'abondance et la composition en AG des PL membranaires.



**Figure 4** : Analyse de la composition en AG des deux PL (**PC**, **PE**) par CL-SM. Les PL d'intérêt sont extraits des cellules soumises aux traitements suivants : 0,1% EtOH (contrôles), 30 μM de DHA ou de DPA pendant 24h. Les valeurs présentées en pourcentage de la teneur totale en PL sont issues de trois répétitions indépendantes. **PC**, phosphatidylcholine ; **PE**, phosphatidyléthanolamine.

Pour conclure, l'ensemble des résultats décrits dans cette partie démontre que notre approche permet l'enrichissement des membranes cellulaires totales en DHA, DPA et AB. D'après les études de chromatographie en phase liquide, les AGPI s'incorporent dans deux des trois PL membranaires analysés, les PE et les PC, avec une préférence pour les PE.

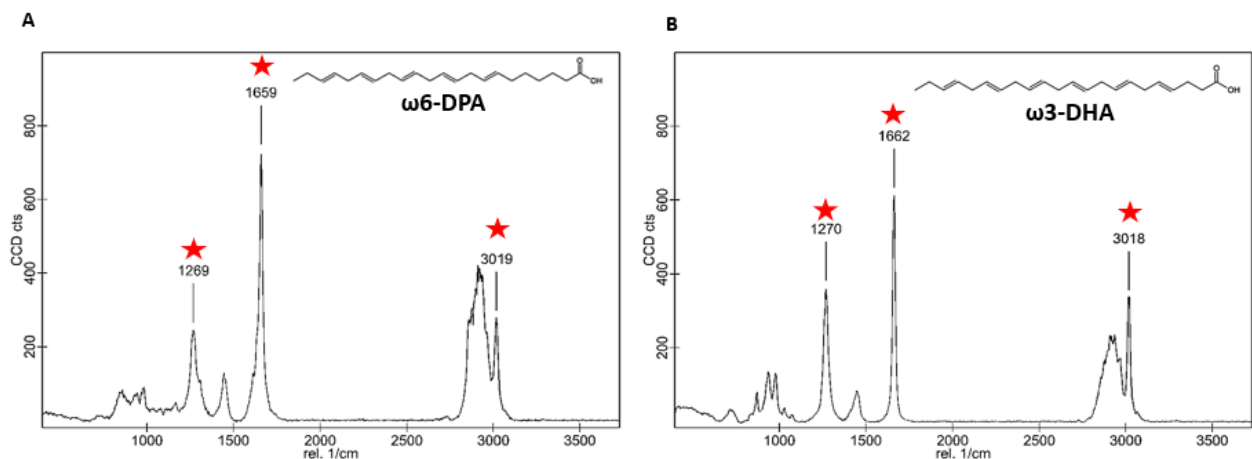
A ce stade, la question suivante a été soulevée : **est-ce que les différents AG d'intérêt s'incorporent au niveau de la membrane plasmique qui constitue l'environnement lipidique des récepteurs membranaires étudiés dans cette thèse : le RD2, le R $\beta$ 2A et le récepteur de la transferrine ?**

### 2. Localisation des AG d'intérêt par la spectroscopie de diffusion Raman :

Sachant que l'enrichissement en DHA, DPA et AB, décrit dans la précédente partie, concerne les membranes cellulaires totales (membranes plasmiques, membranes nucléaires, membranes d'organites), la microscopie de diffusion Raman a été utilisée pour déterminer la localisation de ces composés au sein de la cellule. Comme détaillé dans le deuxième chapitre, la spectroscopie de diffusion Raman permet l'identification des biomolécules présentes au sein d'une cellule (lipides, protéines, ADN, ARN, etc.). En effet, l'intégration de l'intensité d'une bande d'intérêt permet la réalisation d'imagerie chimique : répartition en 2D ou 3D d'une biomolécule au sein de la cellule. Ainsi, le suivi de l'incorporation cellulaire des différents AG est basé sur la sélection de leurs bandes spécifiques et discriminantes.

#### 2.1. Localisation des AGPI :

La Figure 5 présente les spectres de diffusion Raman des AGPI non marqués (DHA et DPA). Les étoiles rouges portées sur les deux spectres indiquent les bandes caractéristiques des lipides insaturés : les modes de vibrations des groupements  $\nu=C-H$  et  $\delta=C-H$  sont observés, respectivement, à  $\sim 3015\text{ cm}^{-1}$  et à  $\sim 1260\text{ cm}^{-1}$ . Le mode de vibration  $\nu C=C$  est observé à  $\sim 1657\text{ cm}^{-1}$  [234], [240]–[243].

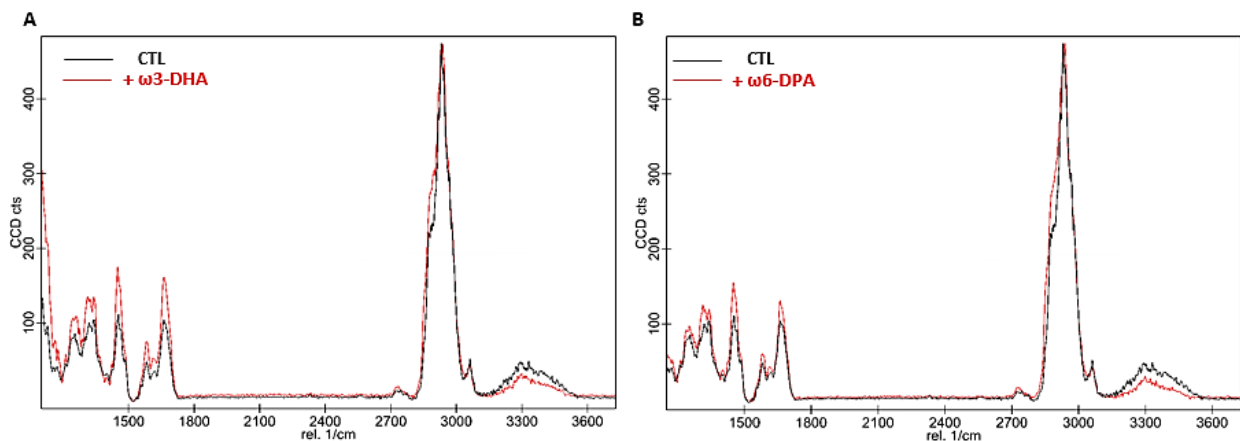


**Figure 5** : Spectres Raman du DPA (A) et DHA (B) purs dissous dans l'EtOH. Les étoiles rouges indiquent les bandes caractéristiques des AGPI.

Le spectre de diffusion Raman moyen des cellules HEK-293 cultivées pendant 24h dans des conditions de culture normale ou enrichies en AGPI (DHA, DPA) est obtenu par moyennage des différents spectres d'une cellule (**figure 6**). Ce spectre comporte plusieurs bandes caractéristiques des lipides dont ceux des liaisons  $\text{CH}_2$  et  $\text{CH}_3$  situés entre  $2850$  à  $2930 \text{ cm}^{-1}$  [234]. Les spectres Raman moyens des cellules contrôles et enrichies en DHA, ou en DPA, ont été comparés afin d'identifier d'éventuelles différences permettant de certifier l'incorporation des AGPI exogènes

Cependant, la comparaison des spectres Raman moyens des cellules contrôles et enrichies ne permet pas de mettre en évidence des différences spectrales au niveau des bandes caractéristiques des AGPI. Ceci est dû au fait que les AGPI utilisés (DHA, DPA) sont présents de façon endogène dans les deux groupes de cellules, ce qui rend leur discrimination très difficile. Cette difficulté suggère que la méthode d'analyse utilisée ne permet pas de mettre en évidence des différences spectrales plus subtiles permettant de distinguer chaque groupe de cellules et de certifier de l'augmentation du taux des AGPI dans les cellules enrichies.

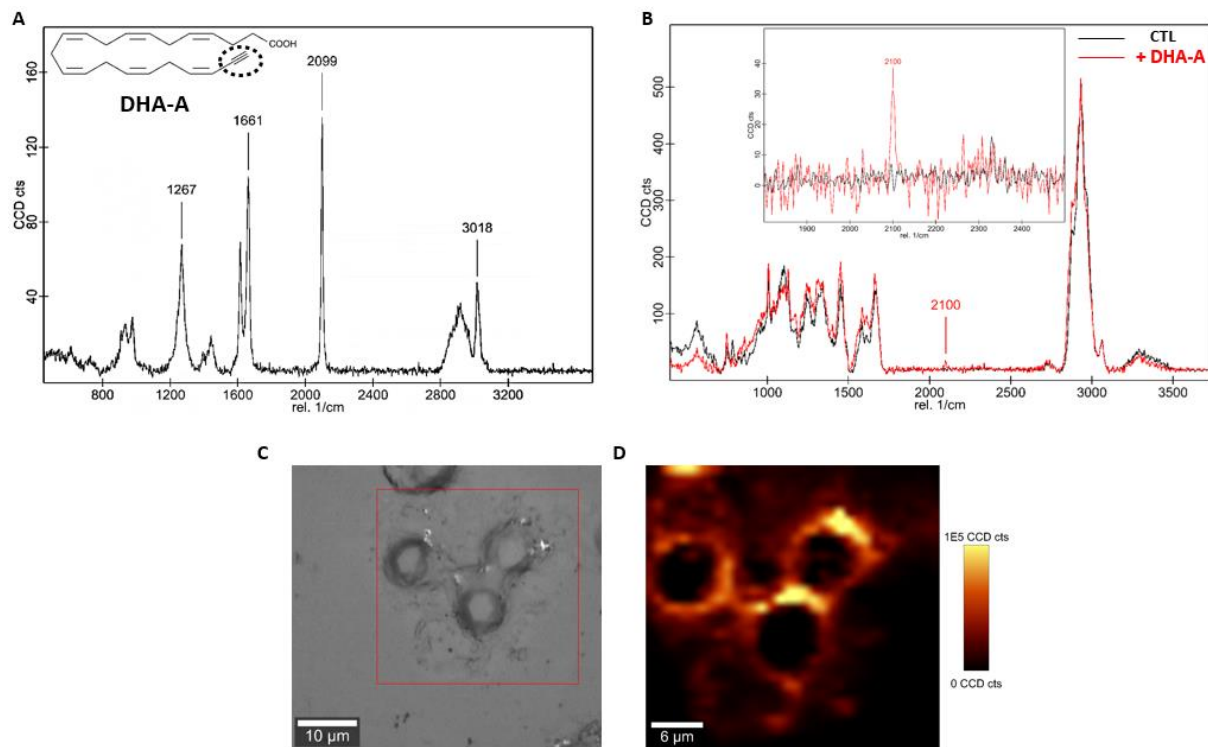
Pour s'affranchir de la contribution des AGPI endogènes, nous avons décidé d'utiliser des composés marqués, le DHA-alcyne en particulier, qui possède un marqueur vibrationnel ( $\nu \text{C}\equiv\text{C}$ ) dans une zone spectrale dépourvue de toute empreinte biologique. Etant non commercialisé, aucune expérience n'a pu être réalisée avec le DPA-alcyne.



**Figure 6** : Etude de l'incorporation des AGPI (DHA, DPA) dans les cellules HEK-293 par spectroscopie Raman. **A.** Superposition des spectres Raman (en noir : spectre moyen d'une cellule contrôle, en rouge : spectre moyen d'une cellule enrichie en DHA). **B.** Superposition des spectres Raman (en noir : spectre moyen d'une cellule contrôle, en rouge : spectre moyen d'une cellule enrichie en DPA).

Ainsi, dans un deuxième temps, les cellules ont été traitées pendant 24h avec le DHA-alcyne. Comme son nom l'indique, cet AG possède une triple liaison ( $C\equiv C$ ) caractérisée par un mode de vibration  $\nu_{C\equiv C}$  observable à  $2100\text{ cm}^{-1}$  (**figure 7A**). [232]. Nous pouvons aussi constater que le DHA-alcyne possède de nombreuses similitudes spectrales avec le DHA comme en témoignent les vibrations moléculaires à  $1267$  et  $3018\text{ cm}^{-1}$  (correspondant aux groupements  $=C-H$ ), à  $1661\text{ cm}^{-1}$  (correspondant aux groupements  $C=C$ ).

Fait intéressant, la comparaison des spectres Raman des cellules contrôle et enrichies en DHA-Alcyne met en évidence l'apparition de la bande caractéristique de la liaison  $C\equiv C$  (à  $2100\text{ cm}^{-1}$ ) dans le spectre des cellules enrichies (**figure 7B**). La figure 7C montre l'image optique (en lumière blanche) des cellules imagées. D'une manière intéressante, l'intégration de l'intensité de la bande à  $2100\text{ cm}^{-1}$  permet de localiser la présence du DHA-Alcyne au sein des cellules enrichies (**figure 7D**). L'image d'intensité obtenue indique que le DHA-alcyne est à l'origine d'un marquage périphérique suggérant son insertion au niveau de la membrane plasmique des cellules enrichies.



**Figure 7** : Etude de l'incorporation du DHA-alcyne dans les cellules HEK-293 par spectroscopie Raman. **A**. Spectres Raman du DHA-Alcyne pur dissous dans l'EtOH. **B**. Superposition des spectres Raman (en noir : spectre moyen d'une cellule contrôlée, en rouge : spectre moyen de la zone de présence du DHA-Alcyne dans une cellule enrichie). **C**. Image en microscopie optique montrant la zone imagée (en rouge). **D**. Images Raman issues de l'intégration de la bande spécifique au DHA-alcyne (à  $2100\text{ cm}^{-1}$ ). L'échelle de couleur est jaune (intensité élevée)>rouge>noir (intensité faible).

### 2.2. Incorporation de l'AGS :

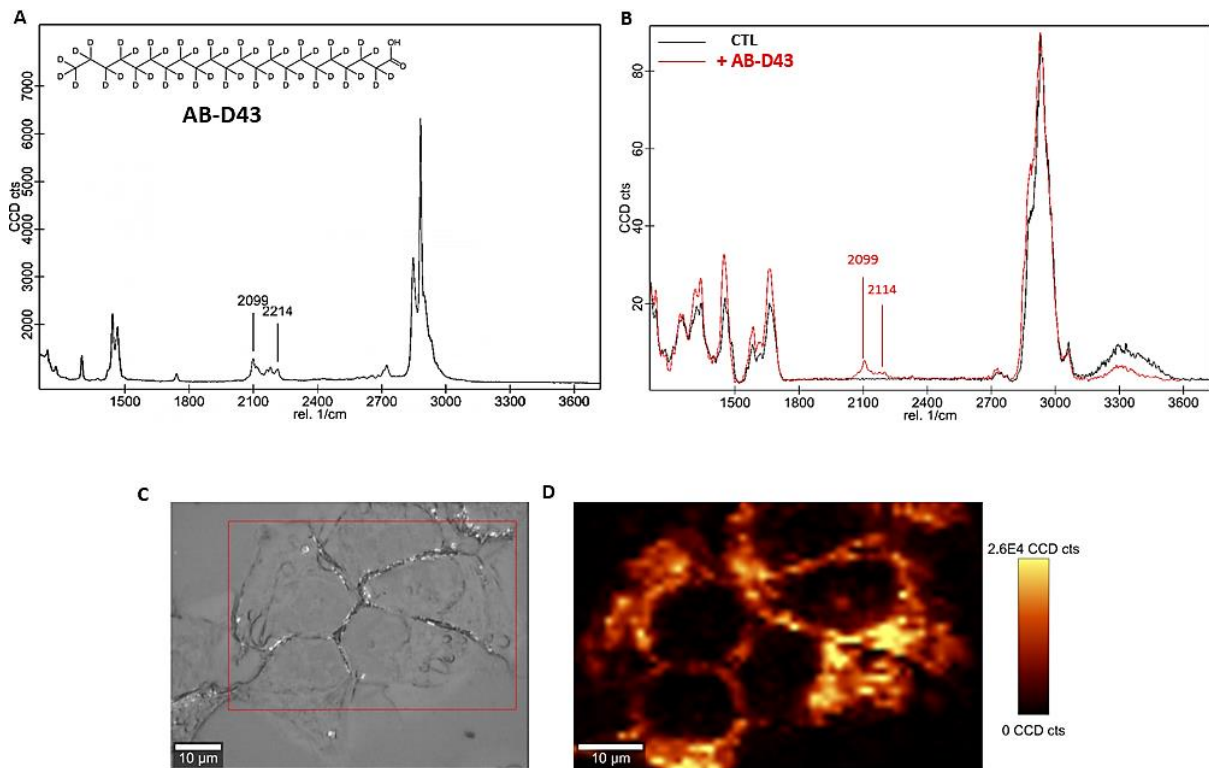
Pour s'affranchir de la contribution de l'AB endogène, les cellules ont été enrichies avec l'AB-deutééré (22:0-D43). Comme pour le groupement alcyne, les modes de vibration symétrique et antisymétrique du groupement  $\text{CD}_2$  sont observées, entre  $2080$  et  $2220\text{ cm}^{-1}$ , dans une région ne contenant pas d'autres bandes pour une cellule (**figure 8A**) [233].

Le spectre rouge, qui est le spectre moyen de la zone enrichie en AB-D43, est caractérisé par la présence des bandes spécifiques du groupement  $\text{CD}_2$  (**figure 8B**). La Figure 8C présente l'image optique des cellules cartographiées en Raman. L'intégration de l'intensité des modes de vibration  $\text{CD}_2$  permet la visualisation de l'AB-D43 au sein des cellules imagées (**figure 8D**). Fait intéressant, le traitement cellulaire avec l'AB-D43 entraîne un marquage principalement à la périphérie des cellules ce qui suggère l'accumulation de cet AGS au niveau de la membrane plasmique exprimant les récepteurs d'intérêt.



## Enrichissement membranaire en AG

En résumé, les résultats obtenus dans cette partie ont permis de certifier l'incorporation des AG marqués (AB-D43 et DHA-alcyne) dans les cellules enrichies et de préciser leur localisation cellulaire, en périphérie des cellules, suggérant leur insertion dans la membrane plasmique.



**Figure 8** : Etude de l'incorporation du AB-D43 dans les cellules HEK-293 par spectroscopie Raman. **A.** Spectres Raman du BA-D43 pur dissous dans l'EtOH. **B.** Superposition des spectres Raman (en noir : spectre moyen d'une cellule contrôle, en rouge : spectre moyen de la zone de présence du DHA-Alcyne d'une cellule enrichie avec le BA-D43). **C.** Image en microscopie optique montrant la zone imagée (en rouge). **D.** Image Raman issue de l'intégration des bandes spécifique au BA-D43 (entre 2080 et 2220  $\text{cm}^{-1}$ ). L'échelle de couleur est jaune (intensité élevée)>rouge>noir (intensité faible).

### 3. Etude de la fluidité membranaire par la spectroscopie de fluorescence :

Pour étudier l'organisation des PL membranaires en réponse à l'enrichissement membranaire en AG (DHA, DPA, AB), leur compacité a été mesurée par la fluorescence du Laurdan. Comme mentionné dans le chapitre matériels et méthodes, le Laurdan est une sonde lipophile affichant une grande sensibilité à la polarité ainsi qu'à la mobilité de son environnement et, de ce fait, à l'état physique des lipides qui l'entourent. En effet, le Laurdan s'insère le long des chaînes d'AG des PL et émet à des longueurs d'onde caractéristiques de l'état de phase des PL constituant les membranes cellulaires. Il est bien documenté que son maximum d'émission de fluorescence à 435 nm correspond à une organisation de la membrane en phase gel ordonnée et que son maximum d'émission à 490 nm correspond à une organisation en phase liquide désordonnée. Ainsi, les variations de l'état de phase (ex. lors de la transition de l'état gel à liquide cristal de PL) provoquent des transitions dans le spectre d'émission du Laurdan qui sont quantifiées par le calcul de la polarisation généralisée (PG). La valeur de ce paramètre varie d'une valeur maximale de 1, relative à une membrane en phase gel, à une valeur négative minimale -1 correspondant à une membrane fluide [225], [226], [244]. Il est important de préciser que, dans le cas d'une cellule, le Laurdan est capable de traverser la membrane plasmique pour s'insérer dans d'autres membranes cellulaires dont la membrane nucléaire [245]. Ainsi, la valeur de PG mesurée correspond à toutes les membranes cellulaires dont les membranes plasmiques qui nous intéressent ici.

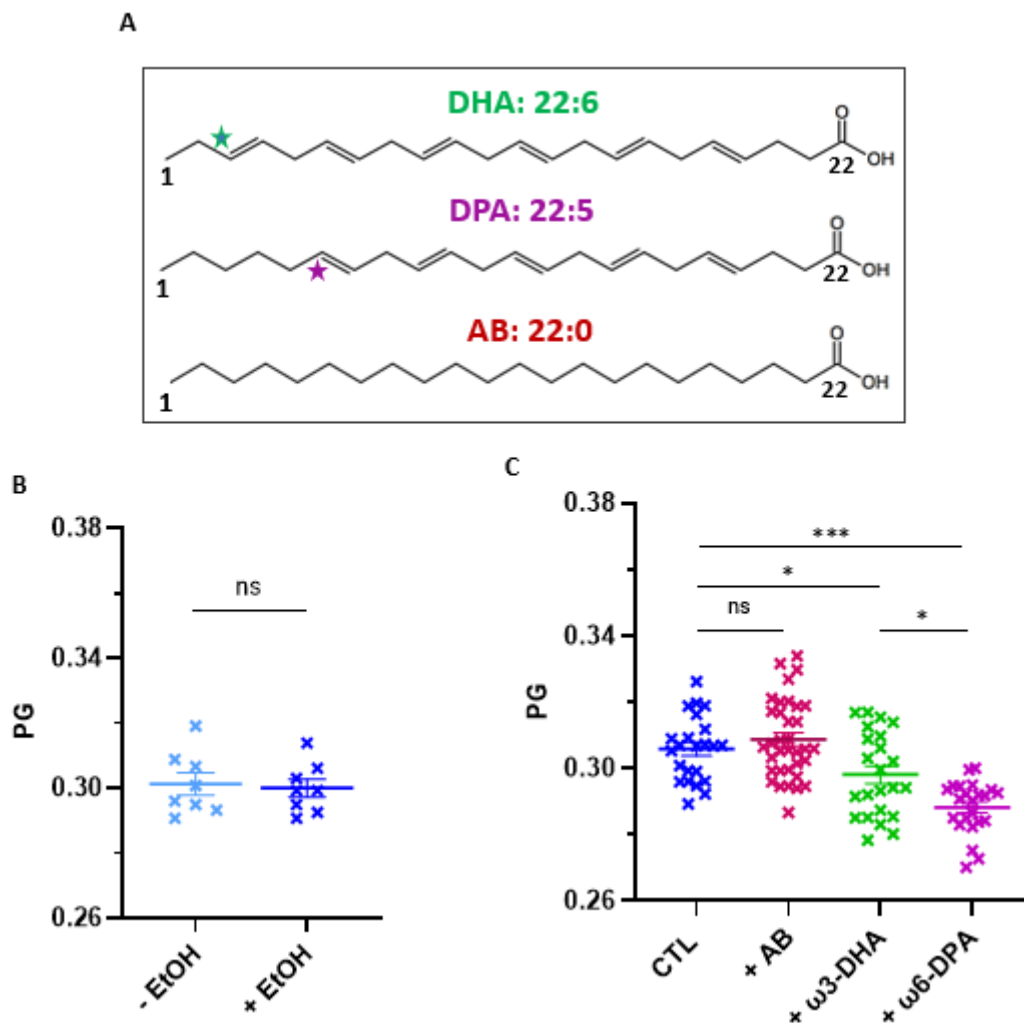
Sachant que les cellules contrôles sont traitées avec 0,1% d'EtOH (solvant des différents AG), nous avons évalué, dans un premier temps, l'impact de ce solvant sur la fluidité membranaire des cellules contrôles. Ainsi, l'effet de l'éthanol a été déduit d'une comparaison entre les valeurs des PG mesurées pour des cellules cultivées, pendant 24h, dans du milieu de culture pur et les cellules incubées en présence de 0,1% d'EtOH. Comme le montre la **figure 9B**, les cellules traitées à l'EtOH possèdent une valeur de PG assez similaire à celle des cellules non traitées avec ce solvant. Ce résultat suggère que la quantité d'éthanol utilisée ici ne module pas le degré d'hydratation, la fluidité, des membranes traitées.

## Enrichissement membranaire en AG

Dans un deuxième temps, la valeur de PG des cellules traitées avec 30  $\mu\text{M}$  d'AGS (AB) ou d'AGPI (DHA, DPA) a été déterminée et comparée à celle des cellules contrôles (traitées avec 0,1% d'EtOH). Les résultats obtenus montrent que l'enrichissement membranaire en AGS n'a aucun effet sur l'état de phase de la membrane le contenant. En revanche, l'enrichissement membranaire avec des chaînes d'acides gras insaturés diminue d'une manière significative la valeur de PG par rapport aux cellules contrôles (**figure 9C**). Ceci indique que l'augmentation du taux d'insaturation membranaire augmente la polarité de l'environnement du Laurdan et favorise l'état liquide désordonné. Etant donné que le Laurdan s'insère dans les membranes plasmiques, entre autres, ces résultats suggèrent que l'enrichissement membranaire en AGPI, et non pas en AGS, augmente la fluidité de ces membranes constituant l'environnement lipidique des récepteurs membranaires d'intérêt : le RD2, le R $\beta$ 2AR et le RTf1.

Ces résultats sont en accord avec plusieurs travaux de la littérature et renforcent la théorie de l'implication directe de la nature des chaînes d'AG dans le maintien de la stabilité et de la fluidité membranaire. A ce regard, Yang *et al* [246] ont évalué l'impact de l'enrichissement des cellules humaines de neuroblastome avec différentes classes d'AG sur la fluidité membranaire. Ces études ont révélé que les AGPI ayant plus de quatre insaturations, comme le DHA (22 :6) et l'EPA (20 :5), augmentent la fluidité membranaire. En revanche, les AGS, comme l'acide stéarique (AS, 18 :0), et les AG ayant moins de quatre insaturations, comme l'acide oléique (AO, 18 :1), l'AL (18 :2), ou l'ALA (18 :3), s'insèrent dans les PL membranaires sans moduler leur état de phase.

A notre surprise, les analyses statistiques montrent que l'enrichissement membranaire en DPA, ayant cinq doubles liaisons, aboutit à des membranes plus fluides que celles enrichies en DHA, ayant six insaturations. Ceci suggère que la fluidité membranaire dépend non seulement du nombre d'insaturations mais aussi de la position de la première insaturation, à partir du méthyle terminal, située en  $\omega$ 3 pour le DHA et en  $\omega$ 6 pour le DPA.

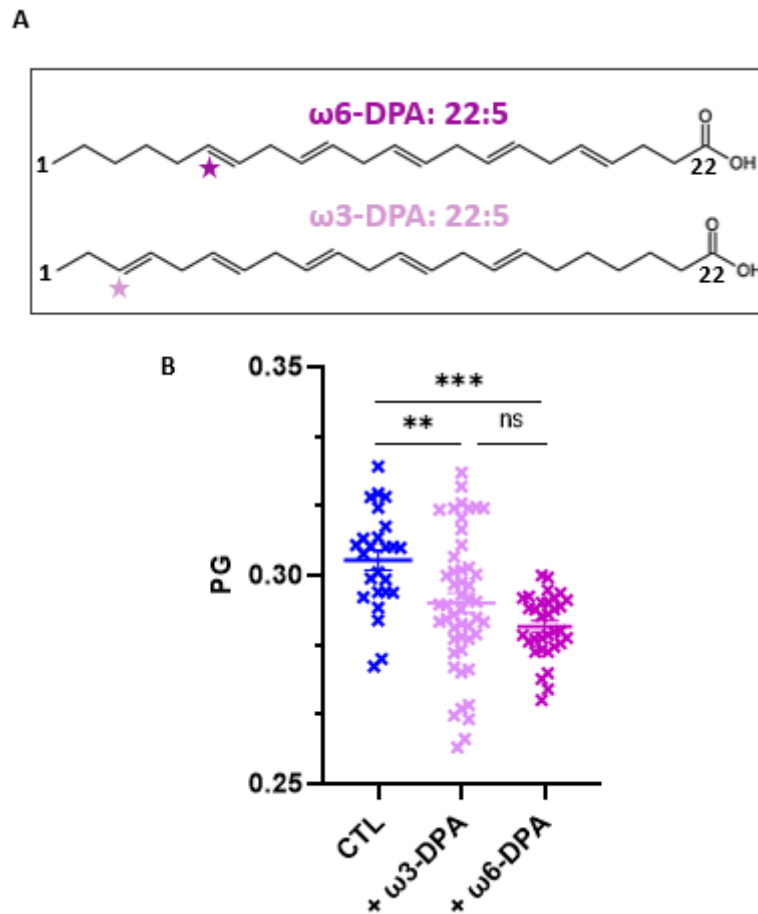


**Figure 9** : Etude de la compacité membranaire par la mesure de la polarisation généralisée (PG) du Laurdan. Ce paramètre est déterminé pour des cellules cultivées, pendant 24h, dans du milieu de culture non modifié (-EtOH), supplémenté avec 0,1 % d'EtOH (+EtOH, CTL) ou supplémenté avec 30  $\mu$ M de l'un des AGs d'intérêt : AB, DHA- $\omega$ 3 ou le DPA- $\omega$ 6. Les mesures sont effectuées de 8 à 23 fois et la significativité a été testée par un test student (**A**) ou un test one-way ANOVA suivi par une comparaison multiple de type Dunnett (**B**) : ns :  $p \geq 0,05$  ; \*  $0,01 < p < 0,05$  ; \*\*\*  $p < 0,005$ .

Pour clarifier ce point, nous avons comparé l'impact de deux types de DPA, qui diffèrent par la position de la première double liaison, le DPA- $\omega$ 3 et le DPA- $\omega$ 6, sur la fluidité membranaire des cellules HEK-293 (**figure 10A**). Comme attendu, l'enrichissement membranaire avec les deux types de DPA augmente d'une manière significative la fluidité membranaire des cellules HEK-293. En revanche, aucune différence significative n'a été observée entre les cellules enrichies avec le DPA- $\omega$ 3 et celles enrichies avec le DPA- $\omega$ 6 (**figure 10B**). Ceci suggère que la différence de fluidité membranaire observée pour le DPA- $\omega$ 6 et le DHA- $\omega$ 3 (**figure 9C**) n'est pas directement corrélée avec la position de la première double liaison.

## Enrichissement membranaire en AG

Ainsi, nous concluons que d'autres mesures sont nécessaires pour identifier l'origine de la fluidité membranaire plus élevée dans les cellules enrichies en DPA- $\omega$ 6 par rapport à celles enrichies en DHA- $\omega$ 3.



**Figure 10** : Etude de la compacité membranaire par la mesure de la polarisation généralisée (PG) du Laurdan. Ce paramètre est déterminé pour des cellules cultivées, pendant 24h, dans du milieu de culture supplémenté avec 0,1 % d'EtOH (CTL) ou supplémenté avec 30  $\mu$ M de l'un des AGs d'intérêt :  $\omega$ 3-DPA et le  $\omega$ 6-DPA. Les mesures sont effectuées de 8 à 23 fois et la significativité a été testée par un test one-way ANOVA suivi par une comparaison multiple de type Dunnett : ns :  $p \geq 0,05$  ; \*\*  $0,01 < p < 0,001$  ; \*\*\*  $p < 0,005$ .

### Conclusions et perspectives :

L'objectif des travaux rapportés dans ce premier chapitre était d'évaluer l'approche d'étude, *in cellulo*, choisie pour l'évaluation de l'impact de la composition lipidique membranaire en AGPI sur la voie d'internalisation du RD2.

Dans un premier temps, les analyses lipidomiques (CG-SM), réalisées sur trois échantillons préparés d'une manière indépendante, ont révélé une augmentation significative de la teneur des différents AG (DHA, DPA, AB) dans les membranes cellulaires totales des cellules enrichies par rapport aux cellules contrôles. L'analyse de la composition en AG des PL les plus abondants dans les membranes de cellules eucaryotes, le PC et le PE [141], [247] a permis de montrer que l'enrichissement cellulaire en DHA ou en DPA conduit à l'augmentation de la proportion de différentes espèces de PC et de PE constituées d'une chaîne insaturée, **PC/PE-DHA** (pour les cellules enrichies en **DHA**), **PC/PE-DPA** (pour celles enrichies en **DPA**). Comme évoqué dans le premier chapitre, les AG libres peuvent être pris en charge par une LPLAT, une enzyme de remodelage appartenant à la classe des transférases (EC2), permettant de convertir les lyso-PL membranaires en PL tout en insérant une chaîne d'AG activé sous forme d'Acyl CoA [248]. Ainsi, l'augmentation de la proportion des **PC/PE-DHA** et des **PC/PE-DPA** est expliquée par l'incorporation des deux AGPI d'intérêt dans les lyso-PC et les lyso-PE membranaires via la LysoPCAT (LPCAT) et la LysoPEAT (LPEAT), respectivement [249]–[252].

Ces mêmes analyses ont montré que plus d'espèces de PE sont formées quel que soit l'AGPI d'intérêt. Ceci peut être expliqué par une meilleure efficacité catalytique de la LPEAT par rapport à la LPCAT et/ou une plus importante disponibilité des lysoPE membranaires par rapport aux lysoPC. Sachant que le PC et le PE sont les principaux PL de la membrane plasmique, l'ensemble des résultats obtenus suggère que les AGPI s'insèrent dans les lysoPC et lysoPE de la membrane plasmique avec une préférence pour les lysoPE. Dans ce contexte, il est bien admis que les PC sont préférentiellement situés dans le feuillet externe de la membrane plasmique tandis que les PE sont plus abondants du côté, interne, cytosolique [140]. Ainsi, nos résultats pointent vers l'insertion des AGPI dans les deux feuillets membranaires avec une préférence pour le feuillet interne.

A cet égard, comme évoqué dans le premier chapitre, les travaux récemment publiés par le groupe de **B. Antony** ont évalué l'impact des chaînes polyinsaturées sur la déformation membranaire selon leur répartition au sein de celle-ci (dans le feuillet interne ou externe) [161]. D'après ces travaux, les PL polyinsaturés favorisent la déformation et la fission de la membrane plasmique mais il n'est pas nécessaire que les deux feuillets soient riches en ces derniers. En effet, seule leur présence dans le feuillet externe à la déformation, le feuillet cytosolique lors de l'endocytose, est nécessaire pour faciliter l'invagination ainsi que la fission des vésicules d'endocytose. Ainsi, il serait intéressant d'identifier la composition des feuillets de la membrane plasmique des cellules HEK-293, en réponse à leur enrichissement avec les AG d'intérêt (DHA, DPA, AB). Comme indiqué dans le premier chapitre, ceci a été déjà étudié pour la membrane plasmique des érythrocytes [141], [253]. Selon les travaux de Lorent *et al*, la détermination de la composition spécifique de chaque feuillet repose sur l'isolation des membranes plasmiques suivie par l'utilisation des enzymes, telles que la PLA<sub>2</sub> ou les sphingomyélinases, permettant de digérer, d'une manière spécifique, les lipides du feuillet externe. De ce fait, l'analyse des lipides issus de la digestion permet d'identifier la composition du feuillet externe. Par conséquent, la composition du feuillet interne est déduite des espèces lipidiques restantes après digestion. Cette étude permettra, également, de déterminer la composition en AG des autres PL telles que la phosphatidylsérine (PS) et le PI que nous n'avons pas étudié dans ce chapitre. Il serait également intéressant d'étudier l'impact de l'enrichissement membranaire sur d'autres composants de la membrane plasmique notamment le PIP2 qui est impliqué dans la voie d'internalisation majeure des RCPG, l'endocytose médiée par la clathrine [254].

Dans un deuxième temps, les premiers résultats de la microscopie Raman nous ont permis de mettre en évidence la localisation cellulaire d'un AGPI marqué, le DHA-Alcyne, et de l'AB deutéré. En ce qui concerne les AGPI modifiés (DHA et DPA), l'optimisation de la méthode d'analyse s'avère indispensable pour obtenir leur distribution spatiale au sein des cellules. Pour cela, le développement de méthodes chimiométriques, telle que la méthode d'analyse en composantes principales, est actuellement en cours de développement au sein du CBMN.

En accord avec les données bibliographiques, nous avons pu montrer que l'enrichissement cellulaire en AGPI est accompagné d'une augmentation de la fluidité des membranes cellulaires. Ces données suggèrent que la membrane plasmique, exprimant nos récepteurs d'intérêt, est beaucoup plus fluide, qu'une membrane plasmique native, lorsqu'elle est enrichie en DHA ou en DPA. Dans ce contexte, il serait intéressant de déterminer la localisation cellulaire du Laurdan par la microscopie confocale afin de certifier que les valeurs de GP mesurées ici reflètent la fluidité des membranes plasmiques [245]. D'une manière intéressante, nous avons également observé que l'enrichissement membranaire en DPA- $\omega 6$  entraîne une fluidité membranaire plus importante que celle obtenue suite à l'enrichissement membranaire en DHA- $\omega 3$ , ayant une insaturation en plus que le DPA. Sachant que nous avons vérifié que ce résultat n'est pas dû à la position de la première liaison, en  $\omega 3$  pour le DHA et en  $\omega 6$  pour le DPA, ce résultat peut être expliqué par une meilleure insertion du DPA dans les domaines rafts, comparativement au DHA, ce qui entraîne la désorganisation de ces domaines ordonnés et l'augmentation de la fluidité membranaire. A l'inverse, comme rapporté dans certains travaux [154], [155], le DHA s'insère à l'extérieur de ces domaines ce qui augmente le désordre et donc la fluidité des domaines désordonnés sans modifier les domaines ordonnés riches en cholestérol. Cette compartimentation membranaire des AGPI utilisés peut donc être à l'origine de la différence de fluidité membranaire observée.



## Chapitre IV

# Impact des AGPI sur la voie d'internalisation du RD2

### Résumé :

Comme évoqué dans le premier chapitre, la désensibilisation des RCPG est un phénomène de régulation essentiel contrôlant finement la durée de l'activation d'un récepteur donné et empêchant les effets toxiques dus à sa stimulation excessive. Malgré la grande diversité des voies de signalisation activées par cette famille de récepteurs, le mécanisme de désensibilisation de ces récepteurs membranaires est universel et englobe les mêmes processus : **1**) le découplage du récepteur et des protéines G ; **2**) l'internalisation des récepteurs depuis la membrane plasmique vers des compartiments intracellulaires ; **3**) la dégradation lysosomale des récepteurs internalisés.

Comme indiqué dans le premier chapitre, l'endocytose  $\beta$ -arrestine et clathrine dépendante est la voie d'internalisation majeure de la majorité des RCPG. En présence de tous les acteurs de l'endocytose ( $\beta$ -arrestine-2, dynamine, protéine adaptatrice-2, etc...), les CCP s'invaginent jusqu'à la formation des vésicules d'endocytose qui acheminent les récepteurs internalisés jusqu'aux endosomes. Une fois arrivés au compartiment endosomal, les récepteurs désensibilisés sont dirigés vers les lysosomes où ils seront dégradés ou alors recyclés vers la membrane plasmique où ils pourront être stimulés de nouveau [255].

Sachant que la membrane plasmique est le point de départ de ce phénomène, et que les RCPG possèdent sept segments transmembranaires insérés dans cette dernière, l'objectif de ce chapitre est d'évaluer l'impact d'un environnement lipidique membranaire enrichi en AGPI sur la voie d'internalisation du récepteur modèle de cette thèse, le RD2. Ceci a été étudié par une approche *in cellulo* qui consiste à exprimer le RD2 humain ainsi que l'ensemble des protéines nécessaires pour reconstituer et mimer sa voie d'internalisation dans des cellules mammifères ayant une composition lipidique membranaire spécifiquement enrichie en AGPI : le DHA de type  $\omega 3$  ou le DPA de type  $\omega 6$ .

L'internalisation du récepteur a été induite par son agoniste endogène, la dopamine, ou son agoniste synthétique, le quinpirole, et est suivie par deux techniques quantitatives adaptées à l'approche d'étude choisie : **1**) La première technique est basée sur le transfert d'énergie par résonance en temps résolu (HTRF) entre le donneur d'énergie (cryptate de terbium) marquant d'une manière irréversible le RD2 présent au niveau de la membrane plasmique et son accepteur compatible, la fluorescéine, présente uniquement au niveau du milieu extracellulaire.

## Impact des AGPI sur la voie d'internalisation du RD2

Ainsi, la stimulation du récepteur par l'un de ses deux agonistes induit son internalisation dans des compartiments intracellulaires aboutissant à la diminution de la proximité spatiale entre le donneur et l'accepteur d'énergie. Par conséquent, l'internalisation du RD2 est suivie expérimentalement en divisant le signal d'émission du donneur par l'émission de l'accepteur (620/520 nm), **2)** La deuxième technique utilisée est la microscopie confocale qui est largement employée pour déterminer la localisation subcellulaire de molécules fluorescentes et pour étudier les phénomènes dynamiques au niveau cellulaire dont l'internalisation des récepteurs membranaires. Pour détecter et localiser le RD2, ce dernier a été marqué par immunomarquage indirect en utilisant un anticorps primaire dirigé contre le récepteur d'intérêt reconnu spécifiquement par un anticorps secondaire marqué par un fluorochrome. Ainsi, l'induction de l'internalisation engendre la formation d'endosomes fluorescents chargés de récepteurs endocytés. Pour cette deuxième technique, l'étude de l'impact des AGPI est basée sur la quantification des endosomes formés dans des cellules contrôles, ayant une composition lipidique non modifiée, et dans des cellules enrichies en AGPI.

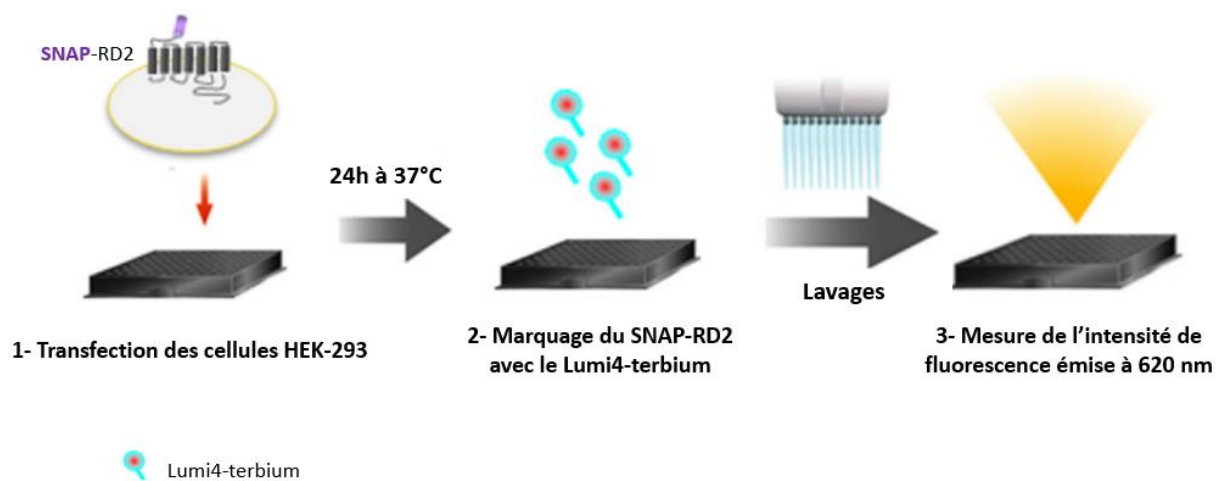
Tous les résultats présentés dans ce chapitre, reproductibles (n=3), révèlent l'existence d'un lien causal et spécifique entre la modulation du taux d'AGPI membranaire et l'internalisation du RD2 induite par deux différents agonistes.

### 1. Etude de l'internalisation du RD2 par la technique d'HTRF

Les travaux de cette partie ont commencé, pendant mon stage de master 2, à l'institut de génomique fonctionnelle de Montpellier, dans le cadre d'une collaboration avec les Dr. T. Durroux et J. Heuinck qui m'ont formé à l'utilisation de la technique HTRF appelée aussi DERET (Diffusion Enhanced Resonance Energy Transfer). Grâce à cette collaboration, j'ai réussi à apporter cette approche dans mon laboratoire d'accueil, le CBMN à Bordeaux.

#### 1.1. Optimisation du système cellulaire :

Tout d'abord, il a été crucial de déterminer le taux d'expression optimal du RD2, fusionné à l'étiquette SNAP, pour l'étude de l'internalisation du RD2 par la technique HTRF. Ainsi, les cellules HEK-29 ont été transfectées par différentes quantités du vecteur d'expression SNAP-RD2. Comme expliqué dans le chapitre "Matériels et méthodes", la première étape de la technique HTRF consiste à marquer irréversiblement le récepteur par le cryptate de terbium (Lumi4®-Tb) par l'intermédiaire de son étiquette SNAP extracellulaire [256]. Etant donné que la membrane plasmique est imperméable à ce fluorophore, le signal d'émission enregistré à 620 nm reflète le taux des récepteurs exprimés au niveau de la membrane plasmique, appelé ici taux d'expression membranaire (**figure 1**).

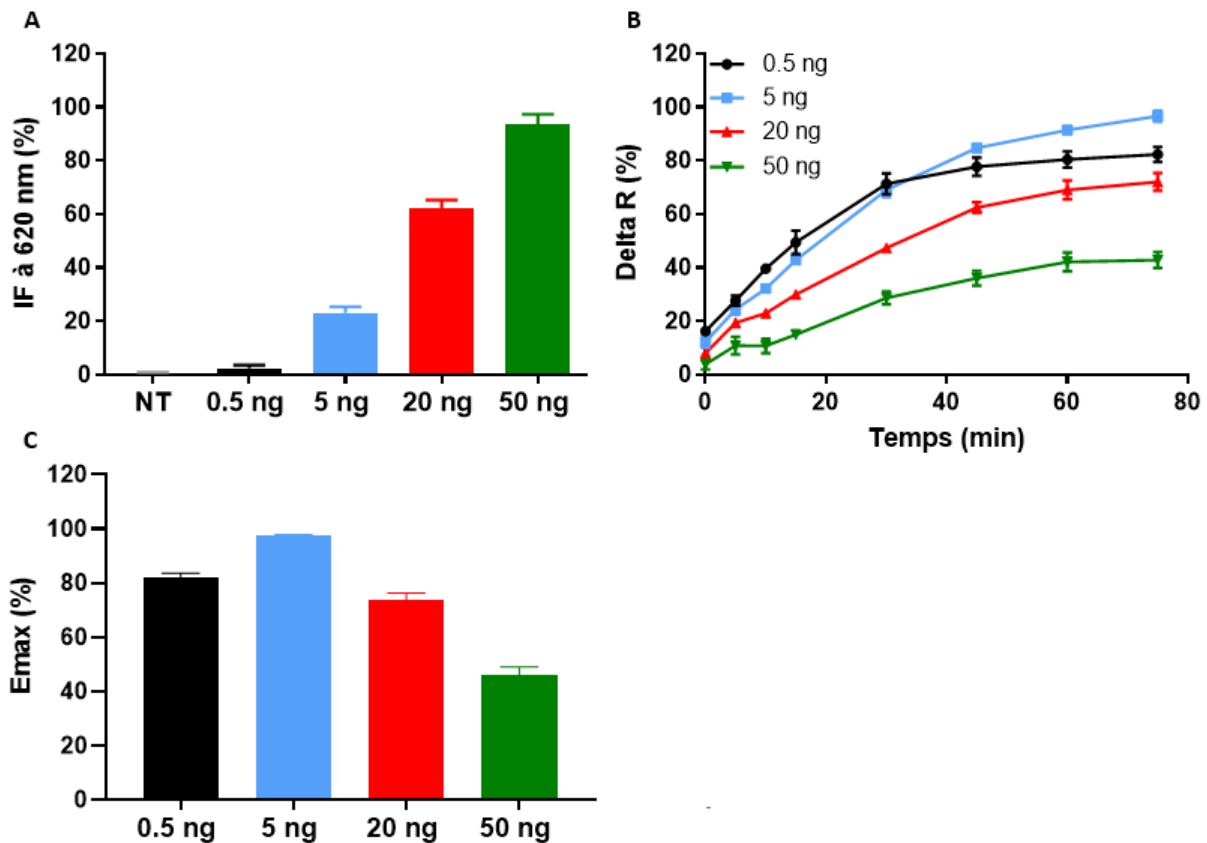


**Figure 1** : Schéma représentant les différentes étapes du protocole de quantification du taux d'expression membranaire du RD2 exprimé d'une manière transitoire dans les cellules HEK-293. Figure adaptée de [216].

## Impact des AGPI sur la voie d'internalisation du RD2

Les résultats obtenus montrent que ce signal d'émission est proportionnel à la quantité de plasmide (SNAP-RD2) utilisée pour la transfection des cellules HEK-293. C'est-à-dire que plus on augmente la quantité du vecteur d'expression plus il est pris en charge par la machinerie d'expression protéique et plus le taux d'expression membranaire du RD2-SNAP est important (**figure 2A**). Quant à l'internalisation du complexe Lumi4-terbium-SNAP-RD2 induite par 10  $\mu$ M de quinpirole, une faible augmentation du ratio (delta R%) en fonction du temps a été notée pour les cellules transfectées avec la plus grande quantité de plasmide (50 ng). Cette faible augmentation peut être expliquée par une saturation du système d'expression avec l'incapacité de la dose de quinpirole utilisée (10  $\mu$ M) à induire l'internalisation de tous les SNAP-RD2 membranaires.

En revanche, l'internalisation du récepteur est bien remarquable lorsque les cellules ont été transfectées par les autres quantités de plasmides (0,5, 5, 20 ng) avec un effet maximal (Emax : delta R maximale) plus important pour les cellules transfectées avec 5 ng de plasmide SNAP-RD2 (**figure 2B, C**). De ce fait, cette quantité, considérée la mieux adaptée pour l'étude de l'internalisation du RD2, a été utilisée pour la suite des travaux de thèse.



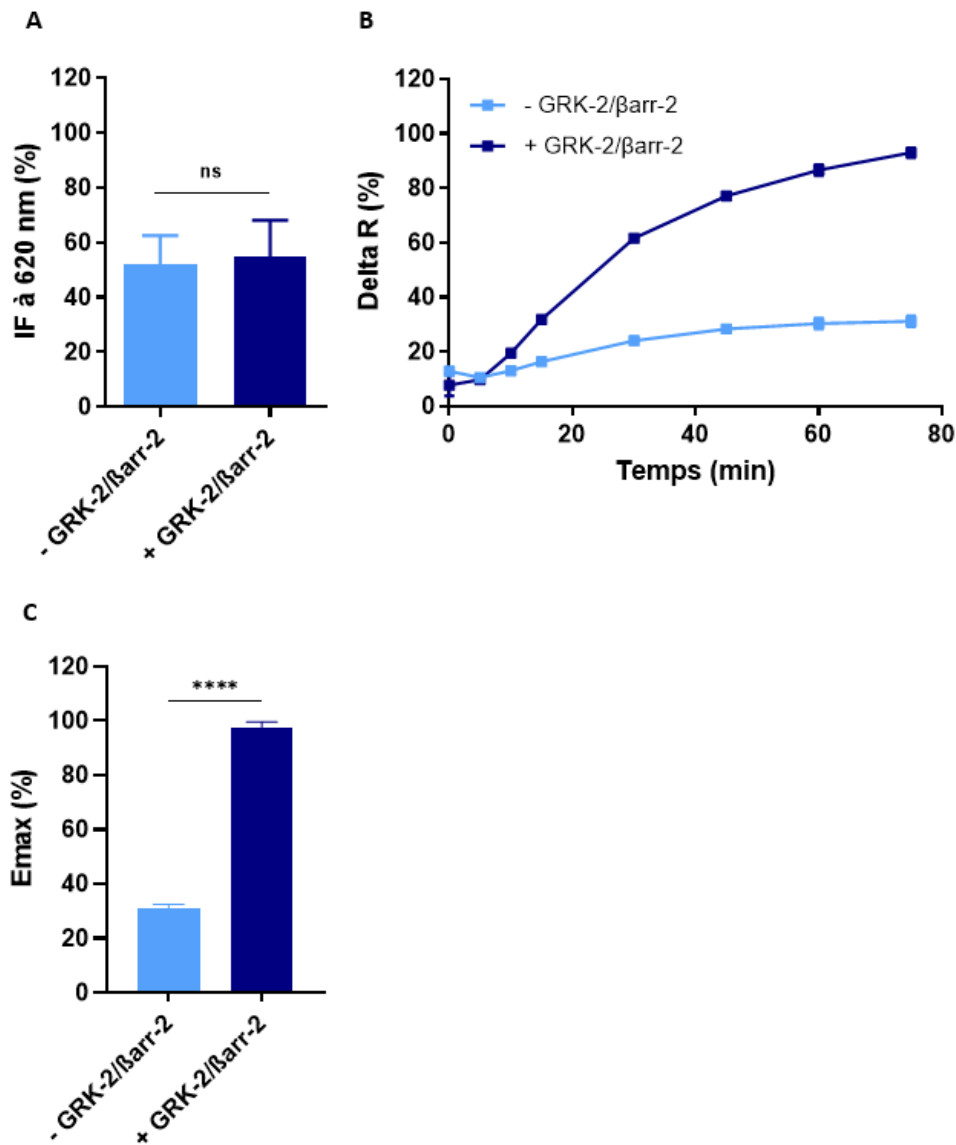
**Figure 2 :** Optimisation du taux d'expression membranaire du RD2 exprimé d'une manière transitoire dans les cellules HEK-293 en utilisant différentes quantités du plasmide SNAP-RD2. **A.** Le pourcentage d'expression membranaire du RD2 estimé par la mesure de l'intensité de fluorescence émise à 620 nm par le lumi4-terbium lié covalentement au RD2. **B.** Cinétique d'internalisation du RD2 suite à la stimulation des cellules HEK-293 par 10  $\mu$ M de quinpirole à t=0 min. **C.** Pourcentage d'internalisation maximale du RD2 déterminée à partir de la figure **2B** à t=80 min.

La majorité des études de la littérature ont montré que le système cellulaire utilisé (HEK-293) n'exprime pas d'une manière suffisante tous les acteurs essentiels pour une internalisation notable du RD2. Dans ce contexte, Kim *et al* ont montré que l'efficacité de l'internalisation du RD2 varie selon le type cellulaire choisi. En effet, dans les cellules COS-7, dérivées de tissu rénal de singe, l'internalisation du RD2 n'a été observée que suite à l'expression exogène des kinases (GRK2/3) ou des  $\beta$ -arrestines (1/2). En accord avec nos premiers résultats, ces mêmes travaux ont montré que le RD2 s'internalise dans les cellules HEK-293 même sans la surexpression exogène des GRK et des  $\beta$ -arrestines.

Parallèlement, les auteurs ont démontré que la co-expression de ces deux protéines auxiliaires potentialise l'internalisation de ce même récepteur. Selon ces travaux, cette différence cellulaire est très probablement due à un niveau d'expression plus élevé des GRK et des  $\beta$ -arrestines dans les cellules HEK-293 par rapport aux cellules COS-7 [257]. Similairement, Heusler *et al* ont démontré que l'internalisation du RD2, exprimé dans les cellules HEK-293, induite avec le quinpirole, est beaucoup plus efficace suite à l'expression de la GRK2 et la  $\beta$ -arrestine-2 [258].

Ainsi, l'internalisation du RD2 a été étudiée en utilisant **1)** des cellules HEK-293 exprimant seulement le SNAP-RD2 et dans **2)** des cellules coexprimant le SNAP-RD2, la GRK-2 et la  $\beta$ -arrestine-2. Pour cela, les cellules ont été transfectées avec 5 ng d'ADN codant pour le SNAP-RD2 ou avec 5 ng d'ADN codant pour chacune des 3 protéines d'intérêt (le SNAP-RD2, la GRK-2 et la  $\beta$ -arrestine-2), afin d'assurer un même ratio entre les différentes protéines.

En résultat, on note que le taux d'expression membranaire du SNAP-RD2 est similaire dans les deux systèmes cellulaires, ceci montre que la co-transfection des cellules par trois vecteurs d'expression n'affecte pas leur capacité à exprimer le SNAP-RD2 (**figure 3A**). En revanche, l'internalisation induite par le quinpirole est beaucoup plus efficace, avec un Emax trois fois plus important, en présence de la GRK-2 et la  $\beta$ -arrestine-2 (**figure 3B, C**). Ce résultat confirme les précédentes études [127], [258], [259] et montre encore une fois que pour une internalisation plus efficace, ce RCPG nécessite l'expression hétérologue de ces deux protéines. Ainsi, ce système plus robuste a été employé pour toutes les expériences suivantes.



**Figure 3** : Internalisation du SNAP-RD2 dans des cellules HEK-293 exprimant seulement le SNAP-RD2 (en bleu ciel) ou coexprimant la  $\beta$ -arrestine-2 et la GRK-2 (en bleu marine). **A**. Pourcentage d'expression membranaire du RD2. **B**. Cinétique d'internalisation du RD2 en présence de 10  $\mu$ M de quinpirole. **C**. Pourcentage d'internalisation maximale du SNAP-RD2 en absence et en présence de la  $\beta$ -arrestine-2 et la GRK-2. La significativité a été testée par un test de Student : ns :  $p \geq 0,05$  ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

### 1.2. Validation de la technique HTRF

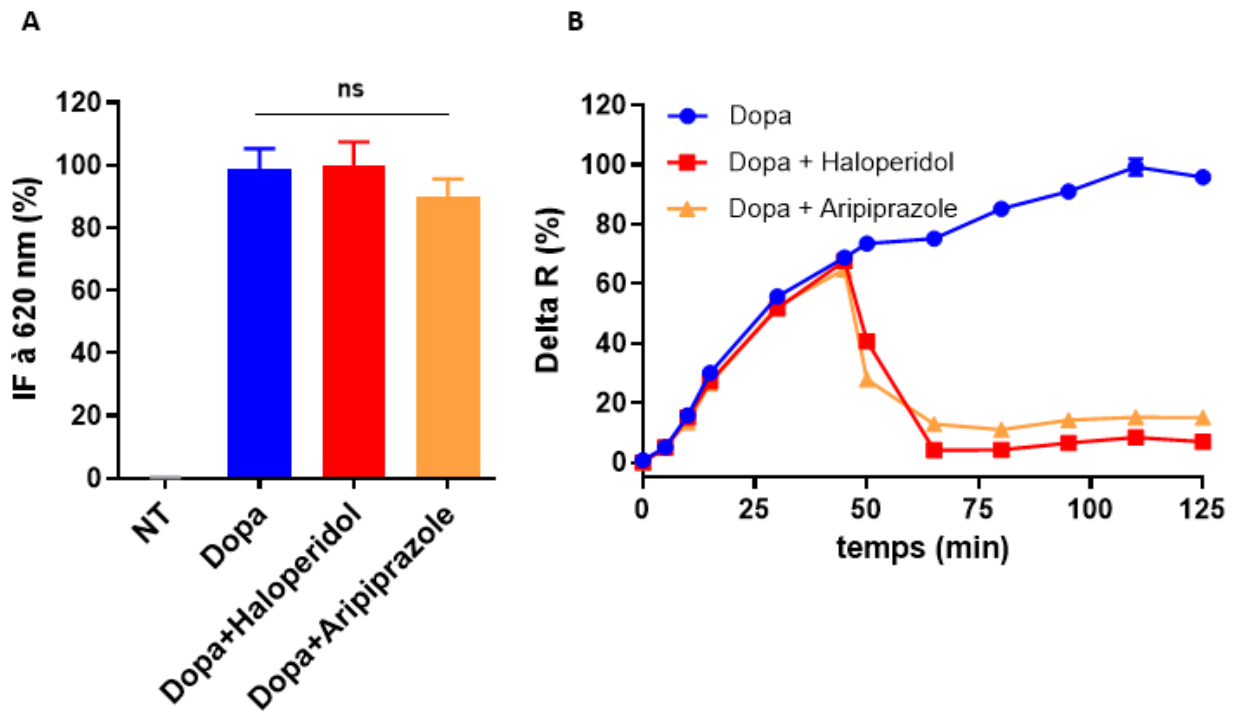
Levoye *et al* ont déjà utilisé cette méthode pour le suivi de l'internalisation de plusieurs RCPG dont le récepteur de la vasopressine (V1a), le récepteur métabotrope du glutamate de type 5 (GluR5) et les récepteurs aux chimiokines (CXCR4, CXCR7) exprimés d'une manière transitoire dans les cellules HEK-293 ou dans les cellules ovariennes de hamster chinois (CHO).



Ces travaux ont permis de valider cette technique en la comparant à d'autres techniques classiques employées dans la littérature pour l'étude de l'internalisation des récepteurs membranaires telles que la cytométrie de flux et la méthode immuno-enzymatique **ELISA** (enzyme-linked immunosorbent assay) [216].

Sachant que les différentes classes de ligands diffèrent dans leur capacité à promouvoir son internalisation [258], [260], la validation de cette approche, pour le RD2, a été effectuée en comparant les profils d'internalisation du récepteur stimulé avec : **1)** la dopamine seule, **2)** la dopamine suivie d'un excès de l'antagoniste sélectif (halopéridol), **3)** la dopamine suivie d'un excès de l'agoniste partiel (aripiprazole). Le choix de ces deux ligands synthétiques, l'halopéridol et l'aripiprazole, repose sur leur incapacité à induire l'internalisation de leur récepteur [261]–[264]. D'après ces précédents travaux, l'incapacité de l'aripiprazole est due à une faible activité intrinsèque médiée par cet agoniste atypique ou au fait que la fixation de l'aripiprazole au RD2 induit un état conformationnel défavorable à la prise en charge du récepteur par la machinerie d'endocytose.

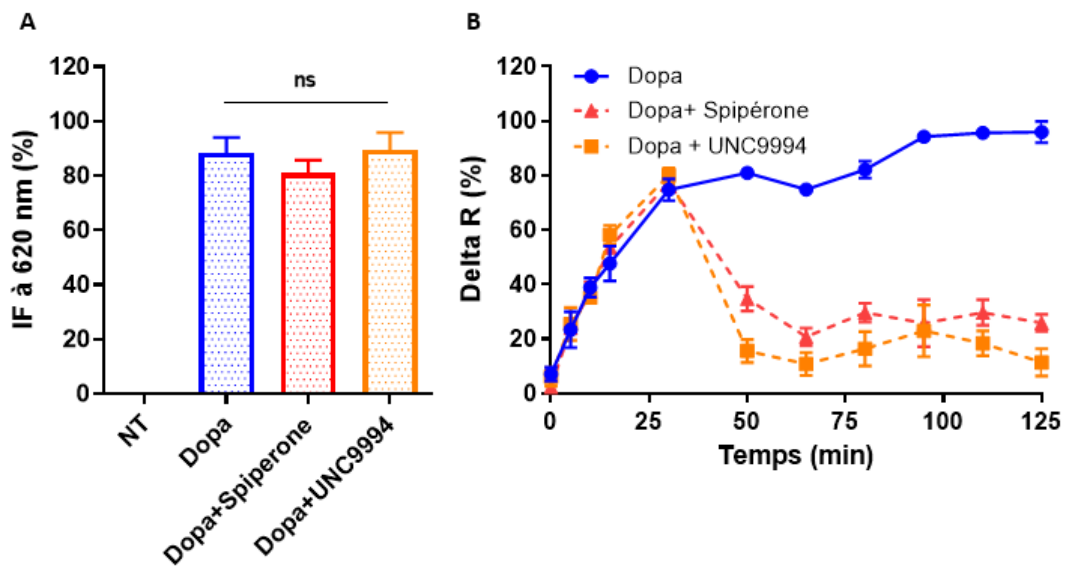
Comme déjà observé pour l'agoniste synthétique, le quinpirole, la stimulation du RD2 par son agoniste endogène entraîne une augmentation remarquable du delta R (%) en fonction du temps reflétant le phénomène d'internalisation. En revanche, l'ajout d'un excès d'halopéridol ou d'aripiprazole (100  $\mu$ M), 45 min après l'ajout de la dopamine, diminue significativement le delta R (%) à une valeur comparable à celle mesurée avant l'induction de l'internalisation ( $t=0$ min) (**figure 4**). Une telle diminution est expliquée par le blocage de l'internalisation, induite par la dopamine, et le recyclage du complexe Lumi4-terbium-SNAP-D2R internalisé à la membrane plasmique, à proximité de la fluorescéine présente dans le milieu extracellulaire [265]. Ces résultats concordent avec des précédentes études et confirment que cette technique est robuste et bien adaptée à l'étude de l'internalisation du D2R en temps réel.



**Figure 4** : Comparaison de l'internalisation du RD2 en présence de différents types de ligands : agoniste endogène (dopamine), antagoniste (halopéridol) et agoniste partiel (aripiprazole). **A.** Pourcentage d'expression membranaire du SNAP-RD2 dans des cellules traitées avec la dopamine seul (bleu), de la dopamine suivie par l'halopéridol à t=45 min (rouge), de la dopamine suivie par l'aripiprazole à t=45 min (orange). **B.** Suivi temporel de l'internalisation du RD2. La significativité a été testée par un test one-way ANOVA suivi par une comparaison multiple de type Dunnett : ns :  $p \geq 0,05$ .

L'effet de deux autres ligands, la spipérone et l'UNC9994, jusqu'ici peu étudiés dans le contexte du processus d'internalisation du RD2 a ainsi pu être caractérisé de la même façon. En effet, la spipérone est un autre antagoniste sélectif du RD2 [266] tandis que l'UNC 9994 est un agoniste capable d'activer partiellement la voie  $\beta$ -arrestine tout en bloquant la voie  $G_{\alpha i}$  [267], [268].

Comme le montre **la figure 5**, l'ajout d'un excès de spipérone ou d'UNC 9994, 30 min après la stimulation des cellules à la dopamine, engendre une réduction significative du ratio (delta R%) reflétant le blocage du phénomène d'internalisation du complexe Lumi4-terbium-SNAP-D2R induit par la dopamine. Par conséquent, nous concluons que la spipérone, antagoniste du RD2, et l'UNC4999, agoniste partiel, agissent d'une manière similaire que l'halopéridol et l'aripiprazole en bloquant l'internalisation du RD2 induite par son agoniste endogène.

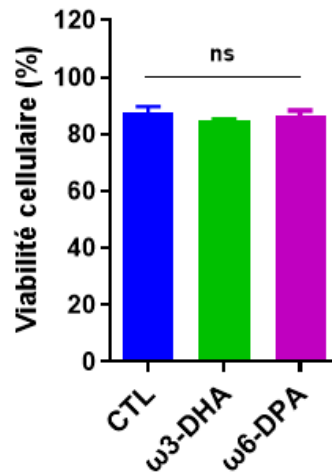


**Figure 5** : Caractérisation de l'effet de la spipéronne et de l'UNC 9994 sur l'internalisation du RD2. **A.** Pourcentage d'expression membranaire du SNAP-RD2 dans des cellules traitées avec la dopamine seule (bleu), la dopamine suivie par la spipéronne à t=30 min (rouge), de la dopamine suivie par l'UNC9994 à t=30 min (orangé). **B.** Cinétique d'internalisation du SNAP-RD2 exprimé dans les différents groupes de cellules. La significativité a été testée par un test one-way ANOVA suivi par une comparaison multiple de type Dunnett : ns :  $p \geq 0,05$ .

### 1.3. Impact de l'enrichissement lipidique membranaire en AGPI sur :

#### i. La viabilité cellulaire :

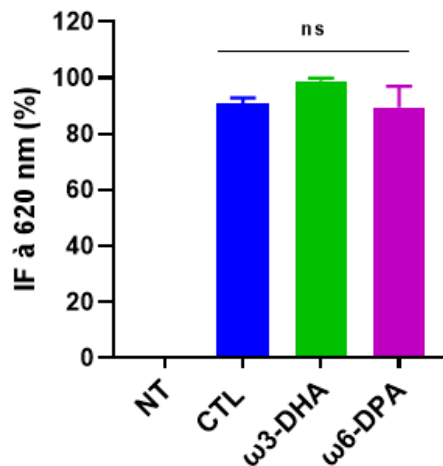
Dans un premier temps, la viabilité cellulaire des cellules HEK-293 a été suivie afin de vérifier si leur incubation en présence de 30  $\mu\text{M}$  d'AGPI entraîne une cytotoxicité cellulaire. Ainsi, la viabilité cellulaire a été mesurée grâce à un test de fluorescence au bleu Alamar permettant de quantifier le taux de cellules viables après l'étape d'enrichissement. Les résultats obtenus montrent qu'aucun des deux AGPI ne présente de cytotoxicité significative (**figure 6**).



**Figure 6** : La viabilité cellulaire mesurée 24h après l'incubation des cellules HEK-293 avec 30μM de DHA ou de DPA, les cellules contrôles ont été incubées en présence de 0,1% d'éthanol utilisé pour dissoudre les deux AGPI. La significativité a été testée par un test one-way ANOVA suivi par une comparaison multiple de type Dunnett : ns :  $p \geq 0,05$ .

#### ii. Le taux d'expression membranaire du RD2

Pour une évaluation précise de l'effet des AGPI sur la voie d'internalisation du RD2, nous avons d'abord examiné l'impact de l'enrichissement cellulaire sur le taux d'expression membranaire du récepteur d'intérêt. Comme expliqué précédemment, le signal d'émission enregistré à 620 nm reflète le taux d'expression membranaire du récepteur d'intérêt. Ainsi, les niveaux d'expression membranaire du RD2 ont été quantifiés dans des cellules enrichies en AGPI (DPA, DHA) et dans des cellules contrôles traitées seulement à l'éthanol (solvant utilisé pour les deux AGPI). En résultat, aucune différence significative n'a été observée entre les trois groupes de cellules indiquant que l'enrichissement des cellules en AGPI n'affecte pas le taux d'expression membranaire du RD2 (**Figure 7**).



**Figure 7** : Le pourcentage d'expression membranaire du RD2 dans les cellules contrôles et celles enrichies en DHA ou en DPA. La significativité a été testée par un test one-way ANOVA suivi par une comparaison multiple de type Dunnett : ns :  $p \geq 0,05$ .

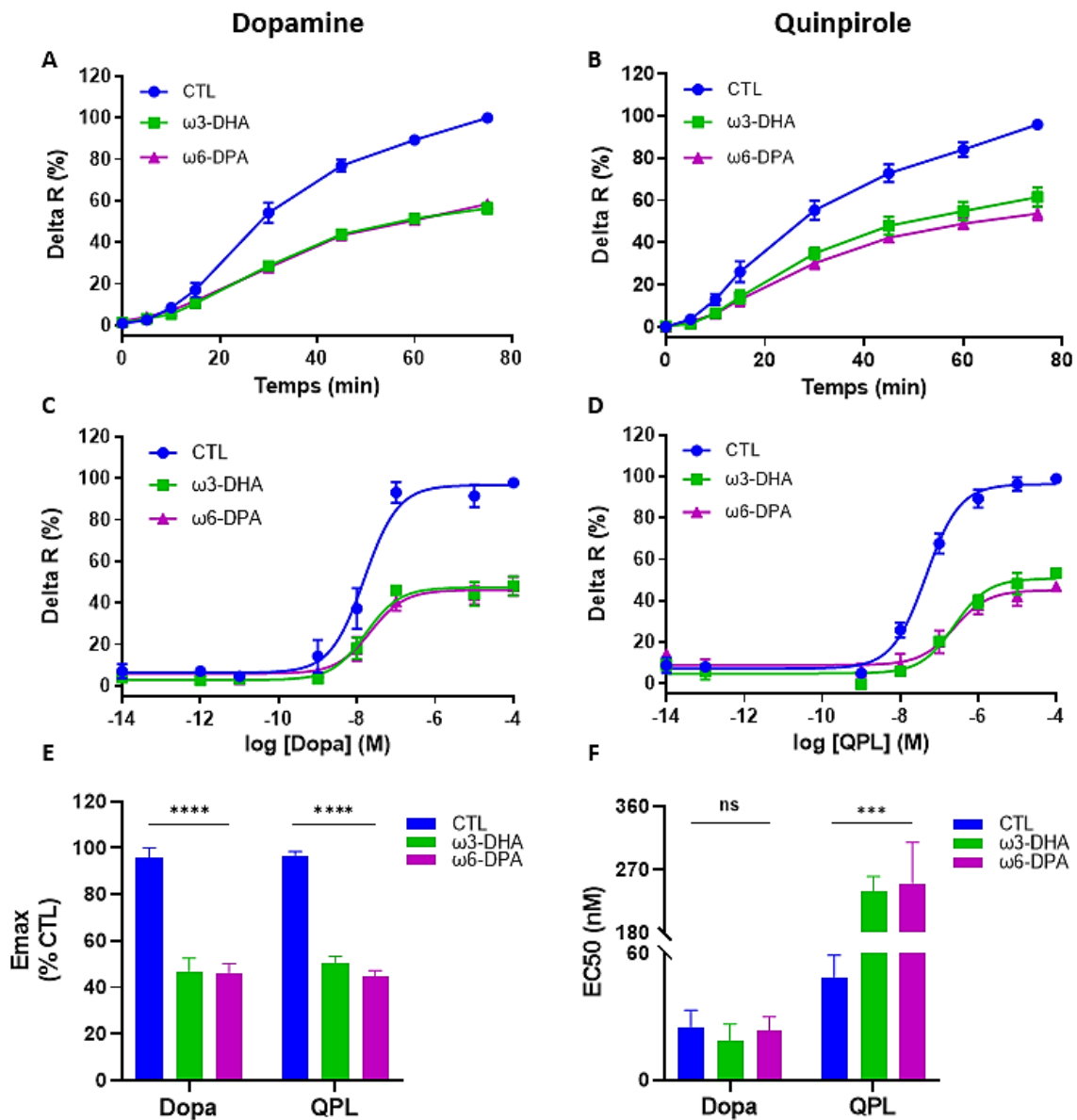
### iii. L'internalisation du RD2 :

Nous avons ensuite étudié l'effet de l'enrichissement cellulaire en AGPI (DHA, DPA) sur l'internalisation du RD2. Pour cela, l'internalisation du récepteur a été suivie, dans des cellules contrôles ou enrichies, en fonction du temps suite à leur stimulation avec  $10 \mu\text{M}$  d'agoniste (dopamine ou quinpirole) ou en présence d'une concentration croissante ( $10^{-14}$ - $10^{-4}$  M) de l'un de ces deux agonistes. Comme le montre **la figure 8**, en présence de la dopamine (**8A**) ou du quinpirole (**8B**), l'internalisation du récepteur augmente en fonction du temps. Cependant, une réduction importante de l'internalisation du RD2 a été observée dans les cellules enrichies avec les deux AGPI (DHA ou DPA) par rapport aux cellules non enrichies. Ce même résultat a été observé dans les courbes dose-réponse, obtenues 30 minutes après l'ajout de la dopamine ou le quinpirole, qui mettent en évidence une diminution de l'amplitude de l'effet maximal ( $E_{\text{max}}$ ) en présence des deux AGPI (**Figure 8C, D et E**). Ce résultat indique que l'efficacité de ces deux agonistes, naturel et synthétique, à induire l'internalisation du RD2 est significativement réduite en présence d'AGPI par rapport à la condition contrôle.

En ce qui concerne la puissance des agonistes, définie par la dose d'agoniste nécessaire pour induire 50 % d'internalisation ( $EC_{50}$ ), aucune différence significative n'a été déterminée pour la dopamine entre les cellules contrôles et enrichies en AGPI. En revanche, l' $EC_{50}$  du quinpirole est significativement plus élevée dans les cellules enrichies par rapport aux cellules contrôles (**Figure 8F**).

## Impact des AGPI sur la voie d'internalisation du RD2

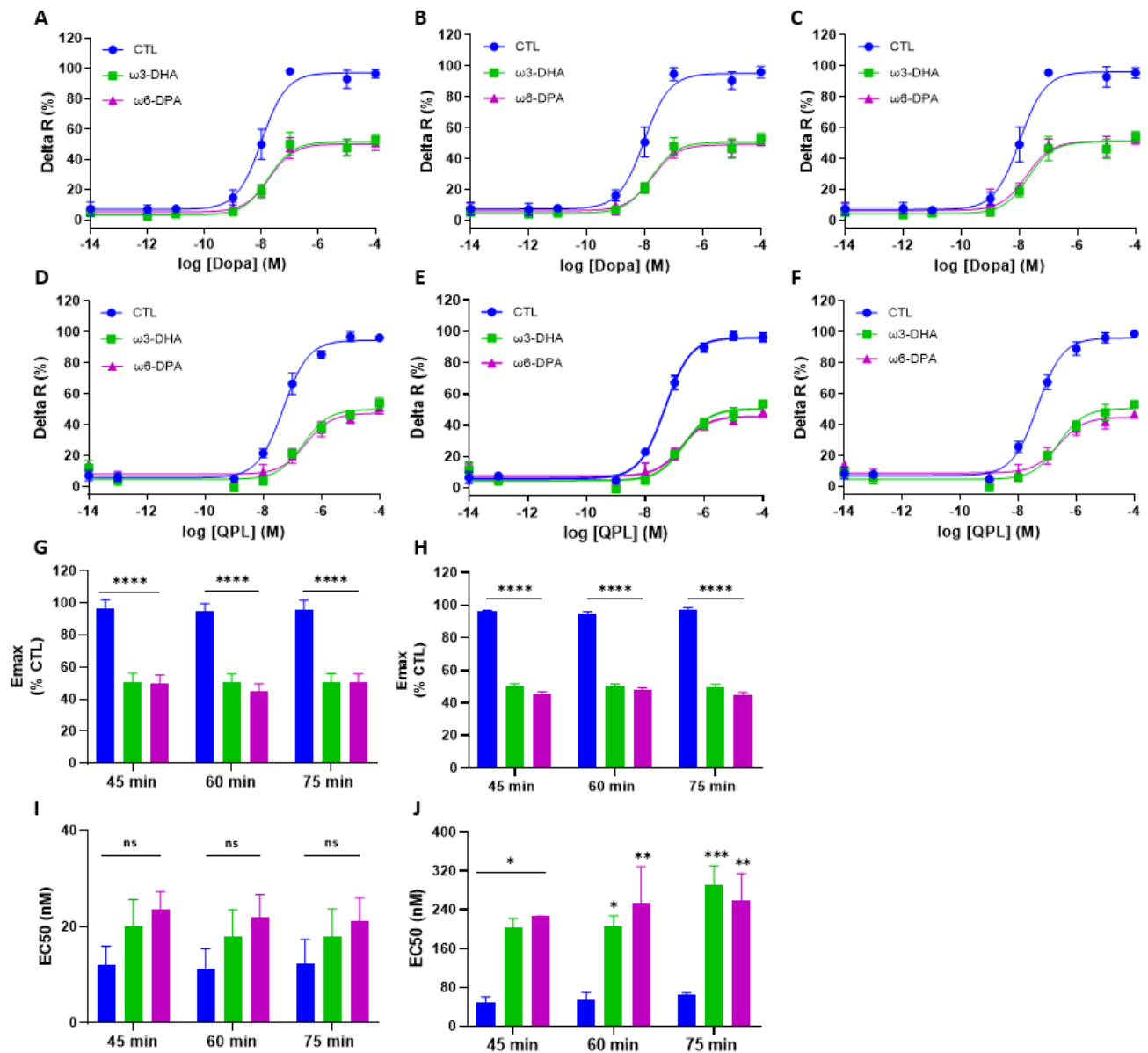
C'est-à-dire que plus de quinpirole, mais pas de dopamine, est nécessaire pour induire 50 % d'internalisation du RD2 exprimé dans les cellules enrichies. Ainsi, seule la puissance de l'agoniste synthétique, vis-à-vis de sa capacité à induire l'internalisation, est significativement affaiblie en présence d'AGPI.



**Figure 8 :** Evaluation de l'impact des AGPI (DHA, DPA) sur l'internalisation du SNAP-RD2 induite par la dopamine ou le quinpirole. **A. B.** Cinétique d'internalisation du SNAP-RD2 dans les cellules contrôles et enrichies en AGPI en présence de 10 μM de dopamine (**A**), ou de quinpirole (**B**). **C. D.** Courbes dose-réponse obtenues 30 min après l'exposition des cellules à une concentration croissante de dopamine (**C**) ou de quinpirole (**D**). **E. F.** Pourcentages de la réponse maximale (E<sub>max</sub>) et les concentrations efficaces médianes (EC<sub>50</sub>) déterminés à partir des deux courbes dose-réponse (**C, D**). La significativité a été testée par un test Two-way ANOVA suivi par une comparaison multiple de type Sidak : ns :  $p \geq 0,05$  ; \*\*\*  $p < 0,005$  ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

## Impact des AGPI sur la voie d'internalisation du RD2

Ces mêmes résultats ont été reproduits dans les courbes dose-réponse obtenues à 45, 60, 75 min, après l'ajout de la dopamine ou du quinpirole, qui confirment l'effet bloqueur des deux AGPI avec une diminution notable de la puissance du quinpirole à induire d'internalisation du récepteur (**Figure 9**).



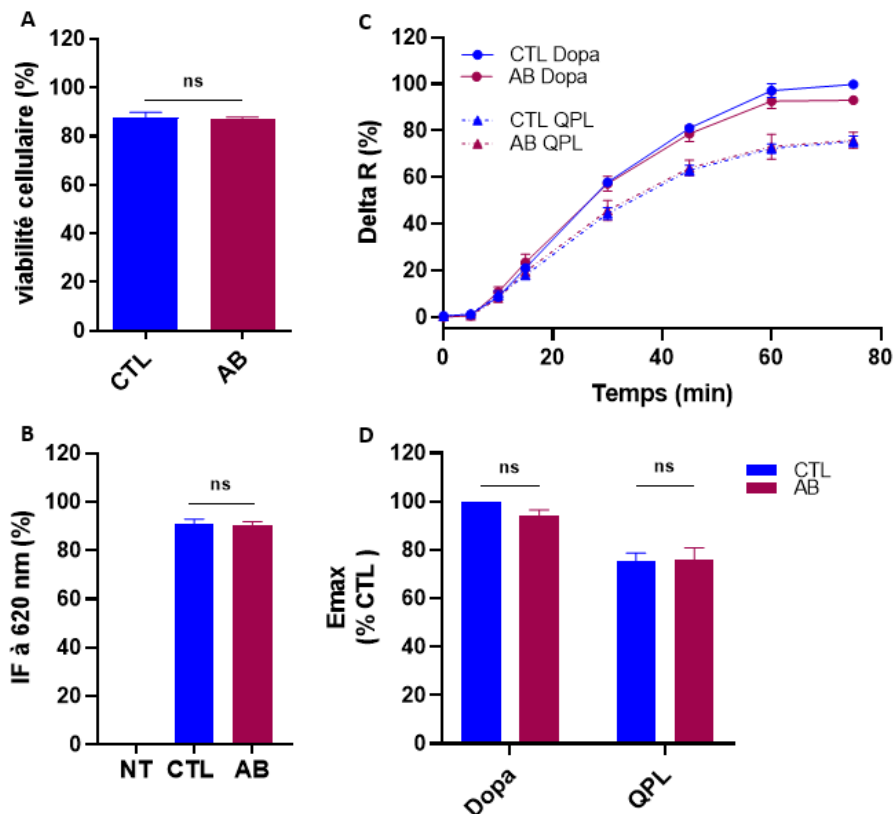
**Figure 9** : Courbes dose-réponse obtenues suite à l'exposition des cellules contrôles et enrichies en AGPI à une concentration croissante de dopamine (A, B, C) ou de quinpirole (D, E, F) pendant 45 (A, D), 60 (B, E) et 75 min (C, F). G. H. Pourcentages d'E<sub>max</sub> obtenus à partir des différentes courbes dose-réponse. I. J. Concentrations efficaces médianes (EC<sub>50</sub>) de la dopamine (I) et du quinpirole (J) déterminées à partir des courbes dose-réponse. La significativité a été testée par un test Two-way ANOVA suivi par une comparaison multiple de type Sidak : ns :  $p \geq 0,05$  ; \*  $0,01 < p < 0,05$  ; \*\*  $0,01 < p < 0,001$  ; \*\*\*  $p < 0,005$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

L'ensemble des résultats obtenus dans cette première partie, suggèrent que la présence du récepteur dans un environnement enrichi en AGPI de type  $\omega 3$ , DHA, ou  $\omega 6$ , DPA, atténue son internalisation induite par les deux agonistes. A ce stade, la question suivante a été abordée : **quelle est l'origine de cette réduction ? Est-elle simplement due à l'augmentation du taux membranaire d'acide gras (AG) ayant une longue chaîne carbonée (22 atomes de carbones pour le DHA et le DPA) ou plutôt liée à la présence du récepteur dans un environnement lipidique ayant un important taux d'insaturation ?**

Pour répondre à cette question, nous avons vérifié, dans un deuxième temps, l'impact de l'enrichissement membranaire en **AG saturé** sur l'internalisation du même récepteur. Pour cela, nous avons choisi l'acide béhénique (AB) ayant la même longueur de chaîne carbonée que les deux AGPI d'intérêt, C<sub>22</sub>. Pour cela, les cellules ont été enrichies avec l'AB dans les mêmes conditions décrites auparavant pour le DHA et le DPA. Aucune cytotoxicité cellulaire n'a été mise en évidence suite à l'enrichissement cellulaire en AB. De même, l'expression membranaire du SNAP-RD2 est similaire dans les cellules contrôles et enrichies en AB (**Figure 10A, B**).

Contrairement à ce qui a été observé avec les AGPI, l'internalisation du récepteur induite avec ses deux agonistes n'est pas impactée par l'enrichissement cellulaire en AB. En effet, aucune différence significative de l'E<sub>max</sub> n'a été observée pour les cellules enrichies en AB comparativement aux cellules contrôles (**Figure 10C, D**). Ainsi, nous concluons que le blocage partiel de l'internalisation du RD2 est directement corrélé à l'augmentation du taux d'insaturation des lipides membranaires enrichies en DHA ou en DPA.





**Figure 10** : Impact de l'acide gras saturé (AB) sur l'internalisation du SNAP-RD2 induite par la dopamine ou le quinpirole. **A.** Viabilité cellulaire mesurée 24 h après le traitement des cellules avec 0,1 % d'éthanol (en bleu) ou 30  $\mu$ M d'acide béhénique (en rouge foncé). **B.** Pourcentage d'expression membranaire du SNAP-RD2 dans les cellules contrôles et enrichies en AB. **C.** Suivi temporel de l'internalisation du SNAP-RD2 induite suite au traitement des cellules contrôles et enrichies en AB avec 10  $\mu$ M de dopamine ou de quinpirole. **D.** Pourcentage d'internalisation maximale ( $E_{max}$ ) du RD2 obtenu de la figure 10C à  $t=80$  min. La significativité a été testée par un test de Student : ns :  $p \geq 0,05$  ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

## 2. Etude de l'internalisation du RD2 par microscopie confocale :

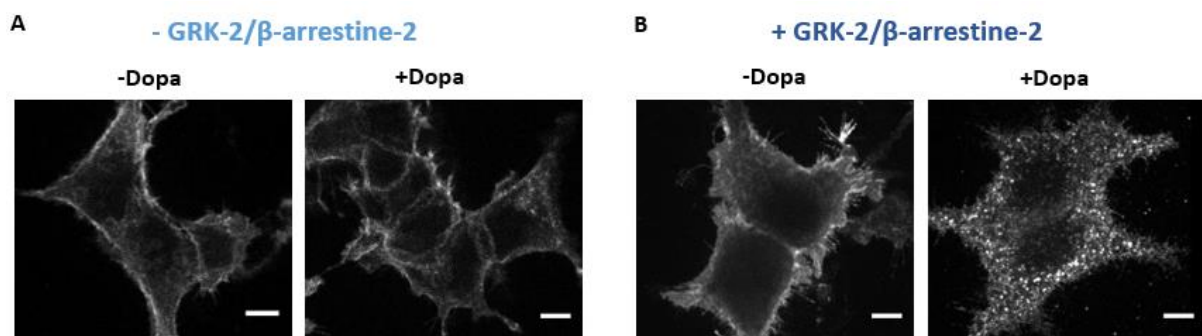
Pour consolider les précédents résultats, la microscopie confocale a été aussi employée pour étudier l'effet des AGPI sur la voie d'internalisation du RD2. Plus précisément, cette technique a permis de quantifier les endosomes produits suite à l'induction de l'internalisation du récepteur par les mêmes agonistes qu'utilisés précédemment.

Toutes les expériences de cette partie ont été réalisées dans le cadre d'une collaboration avec les Dr. D. Perrais et S. Sposini de l'institut interdisciplinaire de neuroscience de Bordeaux (IINS).

### 2.1. Système cellulaire utilisé :

Pour cela, le RD2 fusionné à une étiquette FLAG sur son extrémité extracellulaire (N-terminale), la GRK-2 et la  $\beta$ -arrestine-2 ont été coexprimés dans les cellules HEK-293, contrôles et enrichies en AGPI, en suivant le même protocole utilisé pour la technique HTRF. Le récepteur a été marqué par la méthode d'immunofluorescence indirect qui consiste à traiter les cellules, fixées ou vivantes, avec un anticorps primaire qui reconnaît spécifiquement l'étiquette FLAG suivi d'un anticorps secondaire couplé à l'Alexa Fluor 555.

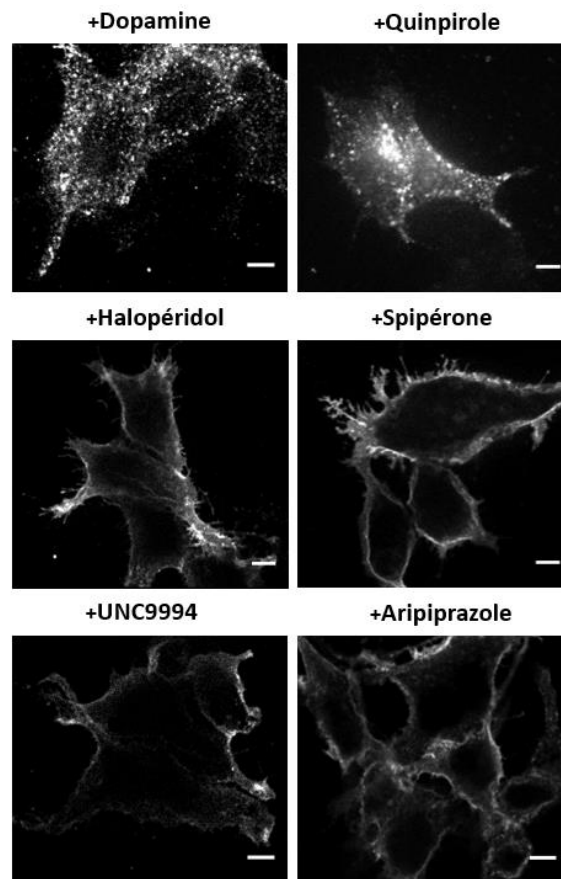
Dans un premier temps nous avons vérifié l'efficacité de l'internalisation du FLAG-RD2 en présence et en absence de la GRK-2 et de la  $\beta$ -arrestine-2. Comme le montre **la figure 11**, en absence de dopamine, un marquage membranaire est majoritairement observé dans les cellules exprimant seulement le FLAG-RD2 ainsi que dans les cellules coexprimant les trois protéines : FLAG-RD2, la GRK-2 et la  $\beta$ -arrestine-2. Ce marquage membranaire reflète l'expression membranaire du FLAG-RD2 fluorescent. En outre, la stimulation des cellules avec la dopamine met en évidence un marquage intracellulaire très important dans les cellules coexprimant le FLAG-RD2, la GRK-2 et la  $\beta$ -arrestine-2 par rapport aux cellules exprimant uniquement le récepteur d'intérêt. Ce résultat concorde avec les résultats HTRF et démontrent que l'expression exogène de la GRK-2 et la  $\beta$ -arrestine-2 est indispensable à la formation des endosomes contenant les récepteurs internalisés. De ce fait, le même système cellulaire, précédemment adapté pour les expériences HTRF, a été utilisé pour toutes les expériences de cette partie. La seule différence réside dans l'expression du RD2 fusionné à l'étiquette FLAG au lieu de l'étiquette SNAP.



**Figure 11** : Images de microscopie confocale des cellules HEK-293 exprimant uniquement le RD2 marqué par l'Alexa Fluor 555 (A) ou coexprimant la GRK-2 et la  $\beta$ -arrestine-2 (B). Les cellules ont été fixées après leur incubation en absence (-Dopa) ou en présence (+Dopa) de 10  $\mu$ M de dopamine pendant 30 min. L'échelle des images est égale à 5  $\mu$ m.

## Impact des AGPI sur la voie d'internalisation du RD2

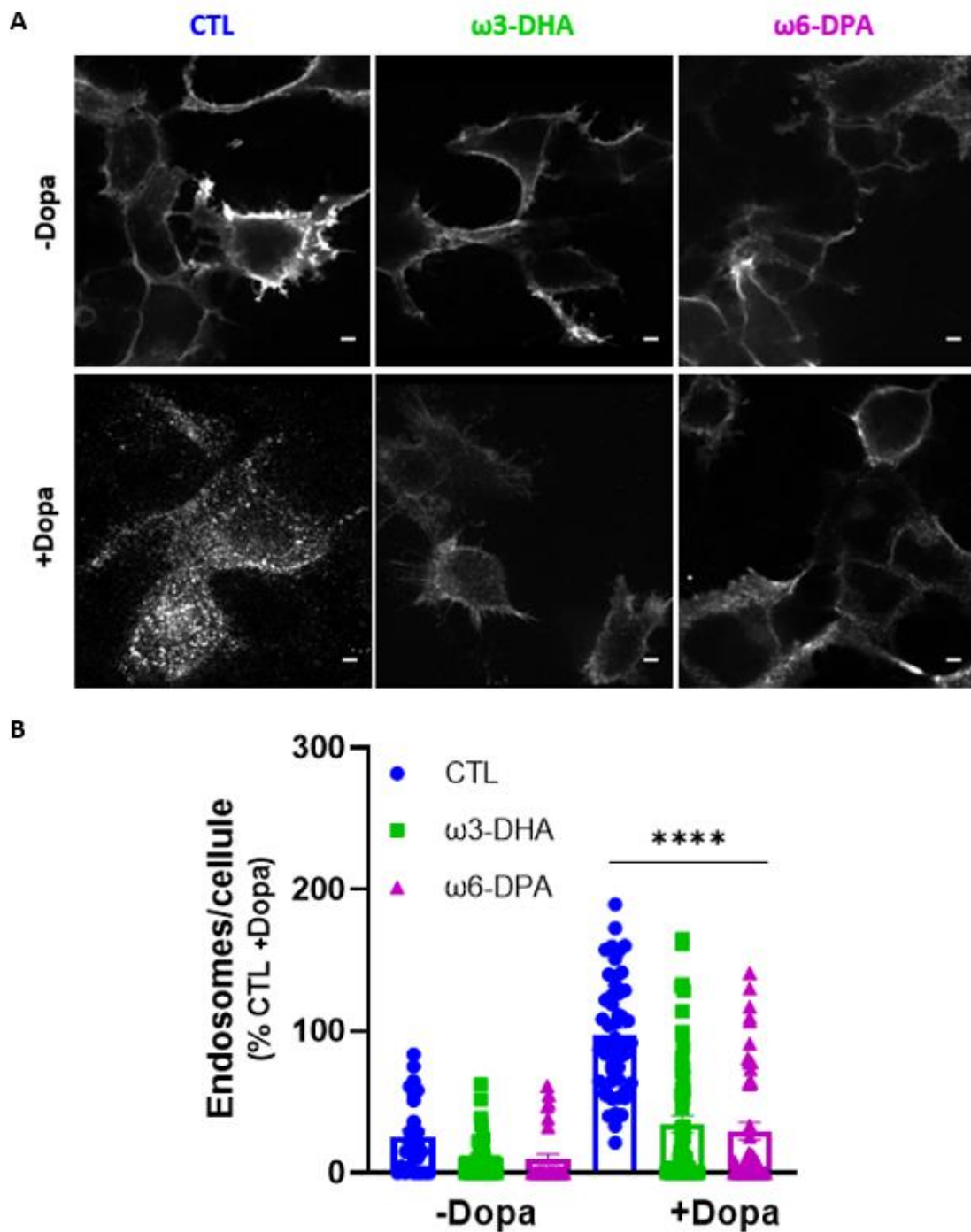
Ensuite, nous avons évalué l'effet des différents types de ligands, agoniste, antagoniste et agoniste partiel sur l'internalisation du FLAG-RD2. Comme attendu, et similairement à la dopamine, l'ajout du quinpirole favorise la formation d'endosomes enrichis en FLAG-RD2. En revanche, un marquage intracellulaire négligeable est observé en présence des antagonistes (halopéridol et spipéronne) ou des agonistes partiels (aripiprazole et UNC9994) indiquant que ces ligands n'induisent pas l'internalisation du récepteur et la formation d'endosomes le contenant (**figure 12**).



**Figure 12** : Images de microscopie confocale des cellules HEK-293 exprimant le FLAG-RD2 marqué par l'Alexa Fluor 555, ainsi que la GRK-2 et la  $\beta$ -arrestine-2, montrant la localisation cellulaire du récepteur stimulé par différents types de ligands. Les cellules ont été fixées après leur incubation en présence de 10  $\mu$ M de dopamine, quinpirole, halopéridol, spipéronne, UNC9994 ou aripiprazole pendant 30 min. L'échelle des images est égale à 5  $\mu$ m.

### 2.2. Impact des AGPI sur l'internalisation du RD2 :

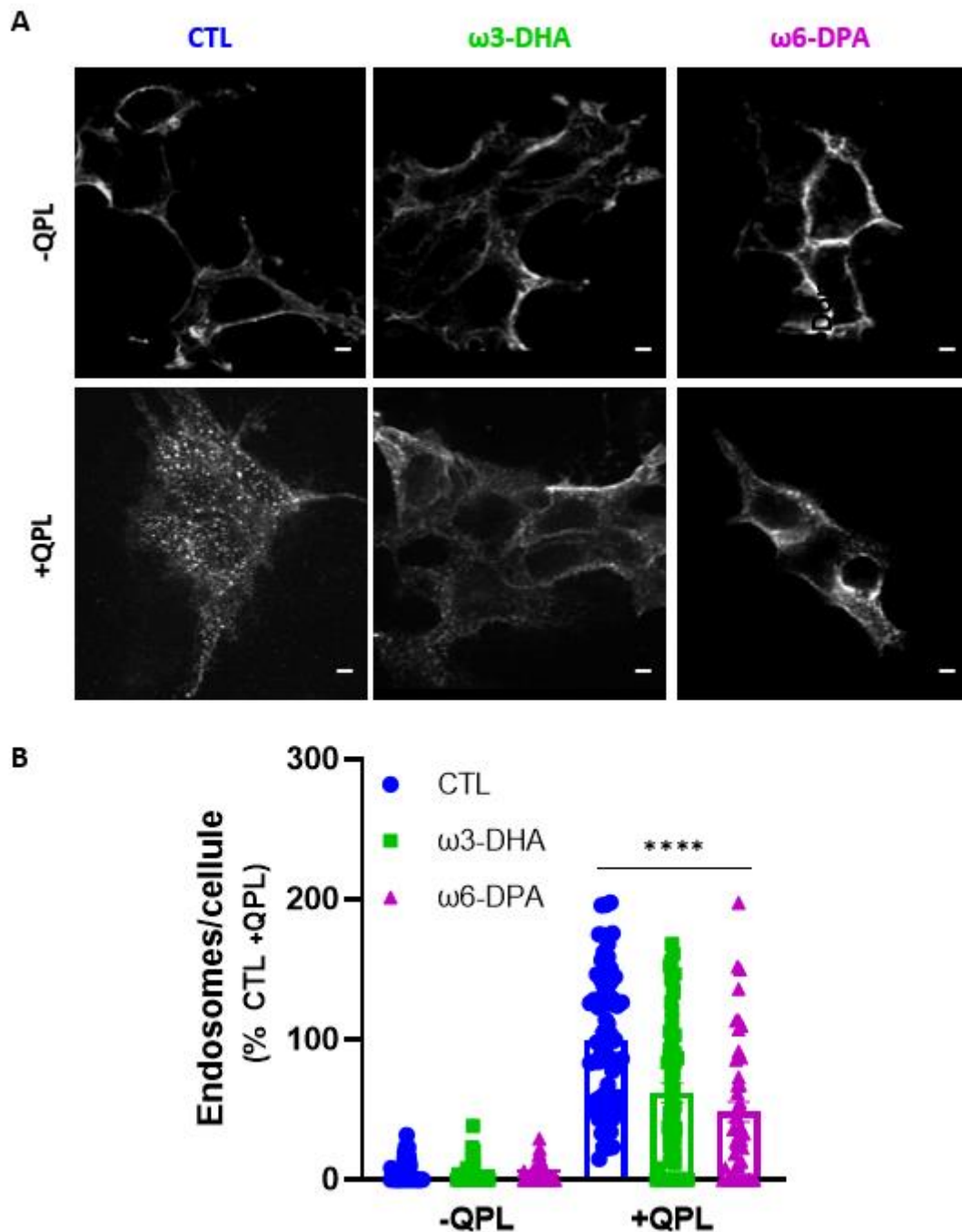
Pour évaluer l'effet des deux AGPI sur la formation d'endosomes chargés de récepteurs endocytés, l'internalisation du RD2 a été déclenchée par les mêmes agonistes qu'utilisés précédemment. Comme illustré dans la **figure 13A**, en absence de dopamine, le RD2 est majoritairement localisé au niveau de la membrane plasmique quel que soit son environnement lipidique membranaire (enrichi ou pas en AGPI). En revanche, les images réalisées 30 min après l'ajout de la dopamine montrent un faible marquage intracellulaire dans les cellules enrichies en DHA ou en DPA, par rapport aux cellules contrôles, reflétant la formation d'une faible population internalisée du RD2. Ces observations ont été confirmés par la quantification des endosomes fluorescents grâce à une méthode d'analyse mise au point par Dr. David Perrais (**Figure 13B**).



**Figure 13:** Comparaison de l'internalisation du FLAG-RD2 exprimé dans les cellules HEK-293 contrôles et enrichies en AGPI en absence (-Dopa) et en présence de dopamine (+Dopa). **A.** Images de microscopie confocale montrant la localisation cellulaire du FLAG-RD2 exprimé dans les cellules contrôles et enrichies en AGPI traitées ou pas avec 10  $\mu$ M de dopamine. **B.** Quantification des endosomes formés (50-60 cellules par condition) en absence et en présence de 10  $\mu$ M de dopamine. Les cellules analysées pour chaque condition sont issues de 3 transfections indépendantes. La significativité a été testée par un test one-way ANOVA suivi par une comparaison multiple de type Dunnett : \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . L'échelle des images est égale à 3  $\mu$ m.

## Impact des AGPI sur la voie d'internalisation du RD2

Fait intéressant, les résultats obtenus révèlent une réduction significative du nombre d'endosomes formés, avec une diminution d'environ 9 fois, dans les cellules enrichies par rapport aux cellules contrôles (**Figure 13B**). Ces mêmes résultats ont été obtenus avec le quinpirole indiquant que le récepteur est moins internalisé dans les cellules enrichies en DHA et en DPA (**Figure 14**).

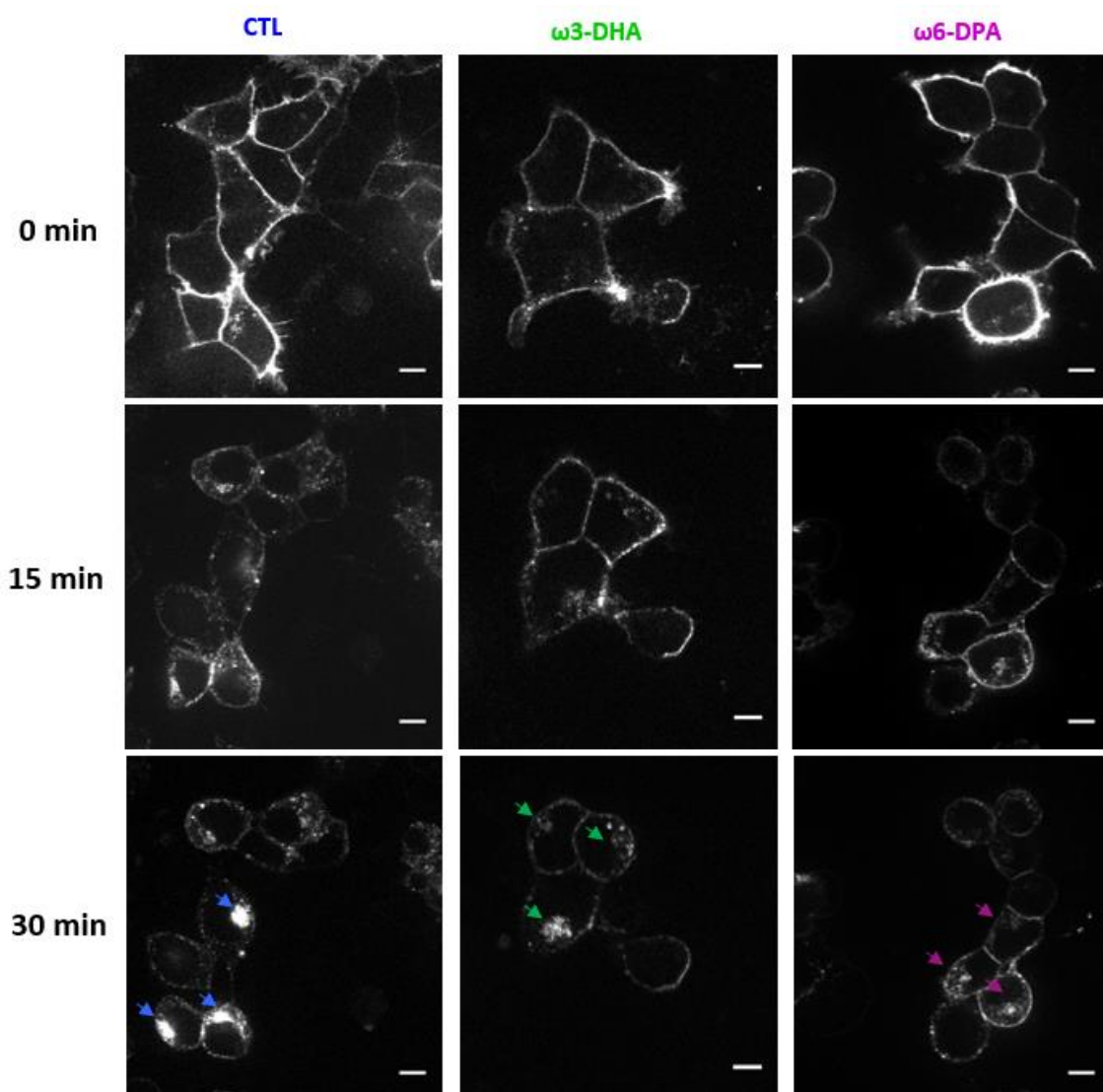


**Figure 14** : Comparaison de l'internalisation du FLAG-RD2 exprimé dans les cellules HEK-293 contrôles et enrichies en AGPI en absence (-QPL) et en présence de quinpirole (+QPL). **A.** Images de microscopie confocale montrant la localisation cellulaire du FLAG-RD2 exprimé dans les cellules contrôles et enrichies en AGPI traitées ou pas avec 10  $\mu$ M de quinpirole. **B.** Quantification des endosomes formés (68-70 cellules par condition) en absence et en présence de 10  $\mu$ M de quinpirole. Les cellules analysées pour chaque condition sont issues de 3 transfections indépendantes. La significativité a été testée par un test one-way ANOVA suivi par une comparaison multiple de type Dunnett : \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . L'échelle des images est égale à 3  $\mu$ m.



## Impact des AGPI sur la voie d'internalisation du RD2

Afin d'appuyer ces résultats, l'imagerie de cellules vivantes, permettant d'étudier la dynamique spatiotemporelle du RD2 immuno-marqué, a été également employée. Pour cela, les cellules vivantes, contrôles ou enrichies en AGPI, ont été imagées pendant 30 min avec l'ajout de la dopamine à  $t = 2$  min. Comme le montre la **figure 15**, le récepteur marqué est faiblement internalisé lorsqu'il est exprimé dans les cellules enrichies en AGPI. En revanche, dans les cellules contrôles, le récepteur est majoritairement localisé dans le cytoplasme reflétant un important taux d'internalisation. Ces données s'accordent avec les précédents résultats obtenus avec les deux différentes techniques et confirment l'altération du phénomène d'internalisation lors d'un enrichissement membranaire avec l'un ou l'autre des AGPI.



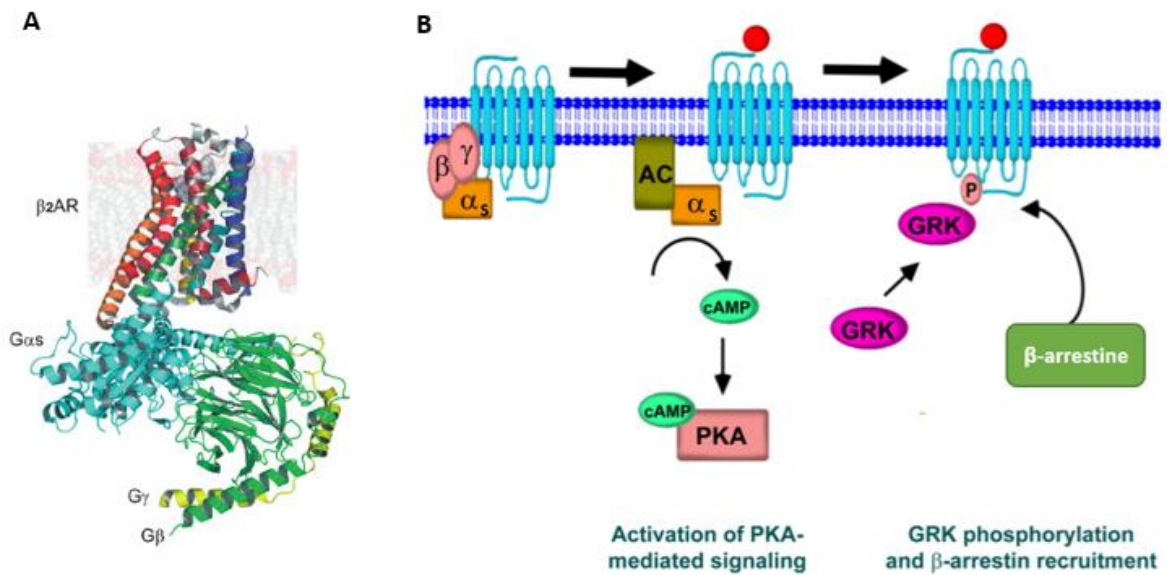
**Figure 15:** Images de microscopie confocale des cellules vivantes (enrichies ou pas en AGPI) mettant en évidence le trafic cellulaire du RD2 fluorescent vers le cytoplasme en présence de 10 µM de dopamine. Les flèches indiquent la formation de la population internalisée du RD2 fluorescent. L'échelle des images est égale à 5 µm.



L'ensemble de ces résultats concorde avec les résultats HTRF et révèle qu'une grande partie de la population membranaire du RD2 reste bloquée au niveau de la membrane plasmique enrichie en AGPI. La principale question posée par la suite était de déterminer si la réduction de l'internalisation, en présence d'AGPI, est spécifique au RCPG d'intérêt ou pourrait être observé avec d'autres récepteurs de cette famille.

### 3. Impact des AGPI sur l'internalisation du R $\beta$ 2A :

Pour répondre à cette question, nous avons décidé d'étudier l'impact de l'enrichissement lipidique membranaire en AGPI sur l'internalisation du R $\beta$ 2A (**figure 16**). C'est un récepteur exprimé en quantité importante au niveau des cellules musculaires lisses (voies respiratoires, vaisseaux sanguins, tractus digestif et uro-génital) mais également dans le cerveau [269], [270]. Son activation par ses ligands endogènes, adrénaline et noradrénaline, favorise son couplage avec la protéine Gs qui active l'adénylate cyclase, d'où l'augmentation de l'AMP cyclique intracellulaire et l'activation de la protéine kinase A [271]. Similairement au RD2, l'internalisation de ce récepteur est initiée par la phosphorylation de ses résidus sérines situés au niveau de la troisième boucle intracellulaire de sa queue cytoplasmique. Elle est opérée par des sérine kinases, notamment les GRK 2/3 [62], [66], [272], [273]. Cette phosphorylation favorise l'interaction du récepteur avec la  $\beta$ -arrestine d'où la dissociation du complexe R $\beta$ 2A/protéine Gs. Une fois recrutée, la  $\beta$ -arrestine interagit avec les deux composants structurels du CCP (la clathrine et l'AP-2) favorisant ainsi l'endocytose du récepteur [274], [275].



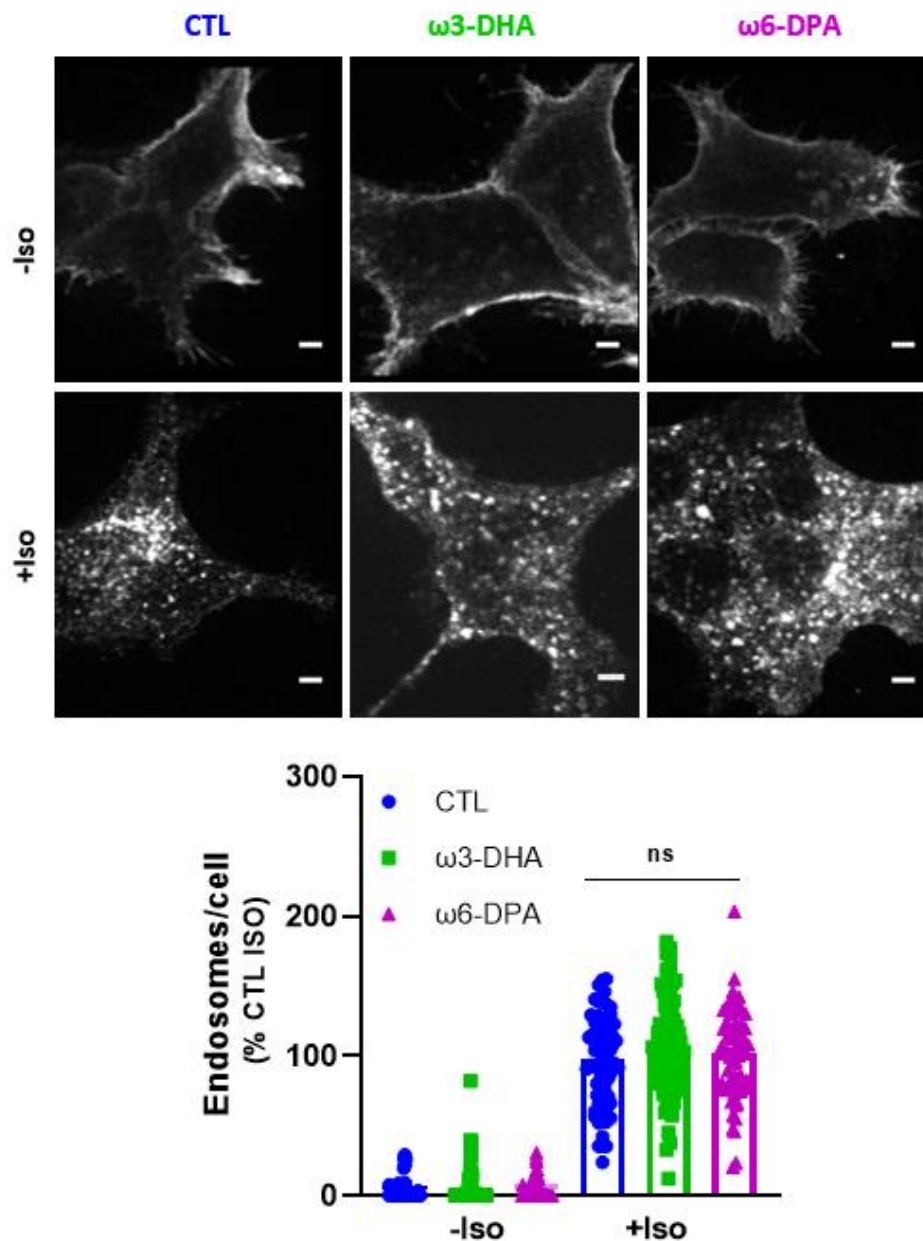
**Figure 16 :** Structure tridimensionnelle et voies de signalisation du Rβ2A. **A.** Structure 3D du Rβ2 lié à sa protéine G trimérique Gs/βγ, [code PDB 3SN6](#), [11]. **B.** Voies de signalisation du Rβ2A dépendante de la protéine G et de la β-arrestine d'après [276].

Le choix de ce récepteur repose sur plusieurs aspects : **1)** c'est le récepteur modèle pour l'étude des mécanismes moléculaires de désensibilisation de la famille des RCPG [277] ; **2)** il appartient à la même classe de RCPG (classe A) que le RD2 [278] ; **3)** il s'exprime également au niveau du système nerveux central ainsi que dans d'autres organes [270] ; **4)** il a déjà été montré que l'affinité de ce récepteur à ses ligands ainsi que son activité dépendent de la composition lipidique membranaire. En effet, Dawaliby *et al* ont évalué l'effet de la nature des têtes polaires sur l'affinité de ce récepteur et ont montré que les têtes anioniques favorisent l'état fonctionnel actif du Rβ2A [279]. De plus, les études de Manna *et al* ont montré que l'activité de ce récepteur est impacté par le cholestérol qui se fixe au récepteur via des sites de liaison spécifiques [280].

Pour répondre à notre question, le FLAG-Rβ2A, la β-arrestine-2 et la GRK-2 ont été coexprimés dans les cellules HEK-293 contrôles et enrichies en AGPI. L'internalisation du FLAG-Rβ2A a été induite suite à la stimulation des cellules avec son agoniste synthétique, l'isoprotérénol, pendant 30 min. Les cellules ont été fixées puis imagées dans les mêmes conditions décrites auparavant pour le FLAG-RD2. Comme le montre **la figure 17 A**, en absence d'agoniste, le FLAG-Rβ2A marqué par l'alexa555 est localisé au niveau de la membrane plasmique. Après 30 min d'induction avec l'isoprotérénol, le récepteur est majoritairement localisé dans le compartiment intracellulaire reflétant son internalisation dans les endosomes.

## Impact des AGPI sur la voie d'internalisation du RD2

Contrairement à ce qui a été observé avec le FLAG-RD2, la quantification des endosomes formés en présence d'isoprotérénol montre que leur nombre est similaire quel que soit l'environnement lipidique entourant ce récepteur (**figure 17 B**).



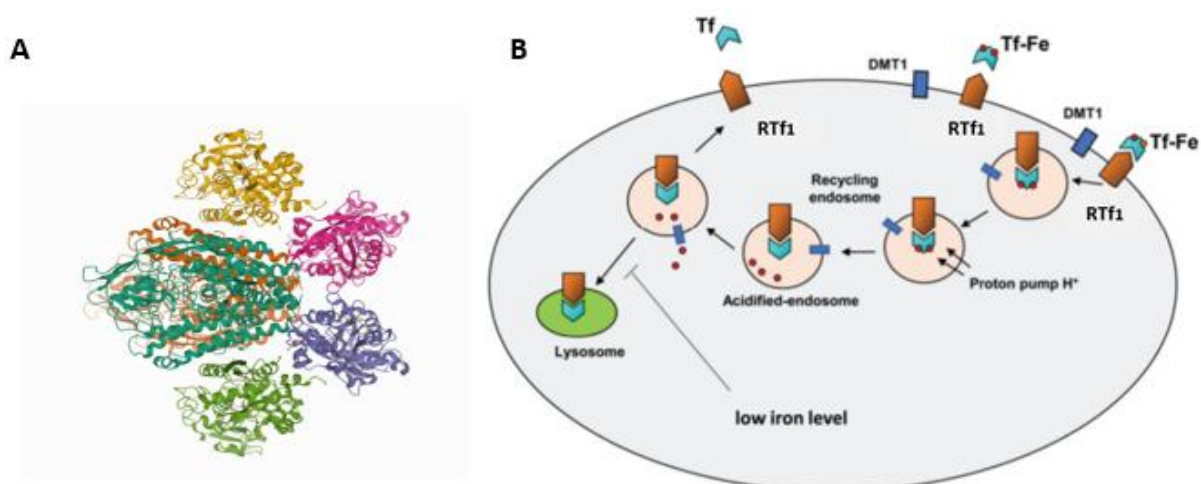
**Figure 17** : Comparaison de l'internalisation du FLAG-R $\beta$ 2A exprimé dans les cellules HEK-293 contrôles et enrichies en AGPI en absence (-Iso) et en présence d'isoprotérénol (+Iso). **A**. Images de microscopie confocale montrant la localisation cellulaire du FLAG-R $\beta$ 2A exprimé dans les cellules contrôles et enrichies en AGPI traitées ou pas avec 10  $\mu$ M d'isoprotérénol. **B**. Quantification des endosomes formés (67-75 cellules par condition) en absence et en présence de 10  $\mu$ M d'isoprotérénol. Les cellules analysées pour chaque condition sont issues de 3 transfections indépendantes. La significativité a été testée par un test one-way ANOVA suivi par une comparaison multiple de type Dunnett : ns :  $p \geq 0,05$ . L'échelle des images est égale à 3  $\mu$ m.

## Impact des AGPI sur la voie d'internalisation du RD2

Au regard de ces données, nous concluons que l'internalisation du R $\beta$ 2A, appartenant à la même classe de récepteurs membranaires que le RD2, n'est pas altérée par l'enrichissement lipidique membranaire en AGPI. Ceci suggère que les AGPI membranaires n'ont pas un impact général sur l'internalisation des RCPG de classe A. Etant donné que les deux récepteurs ont un mécanisme d'endocytose commun, dépendant de la clathrine, ces résultats suggèrent que l'altération de ce mécanisme n'est pas à l'origine de la réduction d'internalisation du RD2. Afin de confirmer cette hypothèse, l'impact de l'enrichissement lipidique membranaire en AGPI sur l'internalisation d'un récepteur modèle de la voie d'endocytose dépendante de la clathrine a été étudié: le récepteur à transferrine (RTf-1) exprimé naturellement dans les cellules HEK-293 [281].

### 4. Impact des AGPI sur l'internalisation du RTf-1 :

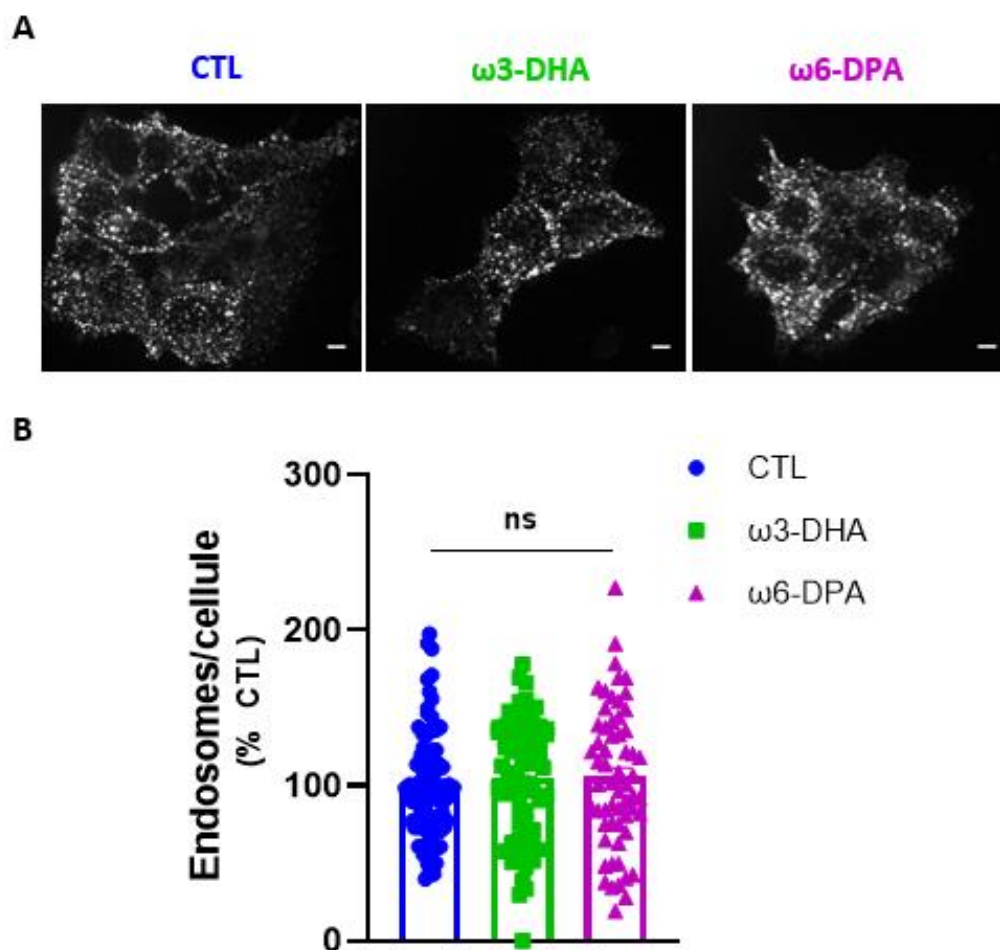
Le RTf-1 est un homodimère transmembranaire codé par le gène TFR1 (**figure 18A**). Il s'exprime à la surface de nombreux tissus pour assurer l'assimilation cellulaire en fer. En effet, le fer est véhiculé dans la circulation sanguine par une glycoprotéine appelée transferrine (Tf) capable de fixer deux atomes de fer ferrique ( $2\text{Fe}^{3+}$ ) [282]. La liaison de la Tf chargée ( $\text{Tf}+2\text{Fe}^{3+}$ ) au RTf à la surface des cellules est suivie par l'endocytose du complexe RTf/ $\text{Tf}+2\text{Fe}^{3+}$  par la voie dépendante de la clathrine. Après l'endocytose, l'acidification de l'endosome induit un changement de conformation de la Tf conduisant ainsi à la libération des atomes de fer [283], [284] (**figure 18B**).



**Figure 18** : A. Structure tridimensionnelle du complexe RTf-1/Tf, [code PDB 1SUV](#), [285]. B. Représentation schématique du mécanisme d'absorption du fer via le complexe RTf-1/Tf, [286].

## Impact des AGPI sur la voie d'internalisation du RD2

Pour visualiser les endosomes issus de l'endocytose du complexe RTf/Tf+2Fe<sup>3+</sup>, les cellules contrôles et enrichies en AGPI ont été cultivées en présence de la Tf marquée par l'alexa fluor 568 (Tf-A568) puis placées à pH et température physiologiques pour favoriser l'endocytose du complexe marqué. La figure **19A** met en évidence la présence d'endosomes contenant du Tf-A568 dans le milieu intracellulaire des cellules contrôles et enrichies en AGPI. La quantification de ces endosomes ne montre aucune différence significative du nombre d'endosomes formés dans les deux environnements lipidiques du RTf (**figure 19B**). Par conséquent, ces résultats prouvent que le mécanisme d'endocytose dépendant de la clathrine est préservé suite à l'enrichissement lipidique membranaire en AGPI.



**Figure 19 :** Comparaison de l'endocytose du complexe RTf/Tf-A568 exprimé dans les cellules HEK-293 contrôles et enrichies en AGPI. **A.** Images de microscopie confocale montrant la localisation cellulaire de la Tf-A568. **B.** Quantification des endosomes formés (60-80 cellules par condition) dans cellules enrichies ou pas en AGPI. Les cellules analysées pour chaque condition sont issues de 3 transfections indépendantes. La significativité a été testée par un test one-way ANOVA suivi par une comparaison multiple de type Dunnett : ns :  $p \geq 0,05$ . L'échelle des images est égale à 3  $\mu\text{m}$ .

### Conclusions et perspectives :

A ce jour, toutes les études de la littérature s'intéressent uniquement aux impacts des AGPI de type  $\omega 3$  sur l'affinité et l'activité de quelques RCPG, notamment la rhodopsine [189], [287]. Avec le choix de deux différents types d'AGPI (DHA- $\omega 3$  et DPA- $\omega 6$ ), ayant la même longueur de chaîne carbonée et une insaturation en plus pour le DHA, nous avons montré, pour la première fois et avec deux techniques complémentaires, que les AGPI sont directement impliqués dans le contrôle du mécanisme de désensibilisation du RD2.

En effet, les deux techniques utilisées pour cette étude ont permis de montrer que l'internalisation du RD2 induite par deux agonistes différents, endogène et synthétique, est significativement réduite quel que soit le type,  $\omega 3$  ou  $\omega 6$ , d'AGPI utilisé. En testant un acide gras saturé (AB), ayant la même longueur de chaîne carbonée que le DHA et DPA, nous avons conclu que cette réduction dépend des doubles liaisons présentes exclusivement dans la structure des AGPI utilisés.

Les expériences HTRF ont montré que seule la puissance du quinpirole à induire l'internalisation du RD2 est significativement réduite. En effet, il est bien connu de la littérature que les RCPG, dont le RD2, adoptent des formes conformationnelles, dites actives, différentes en fonction du ligand présent dans leur site de liaison [288]–[290]. Ceci suggère que l'enrichissement membranaire en AGPI impacte la conformation induite par le quinpirole ce qui réduit sa capacité à induire l'internalisation. Fait intéressant, cette réduction de puissance n'a pas été observée pour l'agoniste endogène. Ceci est probablement dû au fait que la conformation du RD2 induite par la dopamine ne soit pas sensible à l'enrichissement membranaire en AGPI ou au fait que l'impact des AGPI sur la puissance de la dopamine soit moindre et donc difficile à révéler par les approches expérimentales utilisées.

Comme évoqué dans le premier chapitre, deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer l'origine de l'influence de la composition lipidique membranaire en AGPI sur l'internalisation du RD2. En effet, beaucoup d'études proposent que les lipides membranaires puissent exercer leur action soit d'une manière indirecte suite à la modulation des propriétés biophysiques de la membrane plasmique telles que la fluidité, l'épaisseur et la courbure de la membrane plasmique où sont insérées ces protéines (1). D'autres études suggèrent que les lipides membranaires agissent d'une manière directe en interagissant avec ces protéines membranaires au niveau des sites de liaison spécifiques (2).



## Impact des AGPI sur la voie d'internalisation du RD2

Comme détaillé précédemment, l'évaluation de l'effet des deux AGPI sur la voie d'internalisation d'un autre RCPG de classe A, le R $\beta$ 2A, a permis de démontrer que le blocage de l'internalisation observé avec le RD2 ne s'applique pas au R $\beta$ 2A. Ceci a permis d'exclure l'idée d'un effet général de l'environnement lipidique enrichi en AGPI sur la modulation de la voie d'internalisation des récepteurs membranaires appartenant à la famille de RCPG et de révéler une spécificité pour notre récepteur d'intérêt.

Nous avons également montré que cet effet spécifique n'est pas dû à l'altération de la voie d'endocytose médiée par la clathrine. Deux arguments directs soutiennent cette hypothèse :

- 1) La voie d'internalisation du R $\beta$ 2A, dépendante de la clathrine, est préservée suite à l'expression de ce récepteur dans des cellules enrichies en DHA ou en DPA.
- 2) De même pour le prototype du mécanisme d'endocytose via la clathrine, le RTf1, exprimé naturellement dans les cellules HEK-293.

Ainsi, les résultats obtenus avec le R $\beta$ 2A et le RTf1 rendent la première hypothèse (1) peu plausible et suggèrent que les AGPI impactent d'une façon assez spécifique l'environnement lipidique du RD2. Dans ce contexte, les études de modélisation moléculaire réalisées par Jobin *et al* (**annexe 3**) ont mis en évidence la formation de micro-domaines de DHA et de DPA autour du RD2. En effet, la simulation du RD2 dans une bicouche préformée de PL composée d'une chaîne 18:0 en sn-1 et une chaîne poly-insaturée en sn-2, DHA ou DPA, a permis de montrer un assemblage de ces AGPI à proximité du récepteur, qui interagissent préférentiellement avec les hélices transmembranaires TM1, TM2, et TM7. Ces interactions sont probablement à l'origine d'une modification de la conformation active du récepteur ce qui défavorise le recrutement des acteurs indispensables à son internalisation, notamment la GRK-2 et la  $\beta$ -arrestine-2 qui ont la capacité à reconnaître la conformation activée d'un RCPG.

Au vu des résultats obtenus avec le R $\beta$ 2A, on peut émettre l'hypothèse que la dynamique d'interaction des AGPI avec le R $\beta$ 2A est différente en comparaison du RD2. Ainsi, dans un premier temps, il serait intéressant de réaliser les mêmes expériences de modélisation moléculaire avec le R $\beta$ 2A afin d'éclaircir ce point indispensable à la compréhension de l'origine de l'effet délétère des AGPI sur l'internalisation du RD2.

## Impact des AGPI sur la voie d'internalisation du RD2

Par la suite, il serait pertinent de confirmer expérimentalement l'interaction des AGPI avec le RD2. Pour cela, nous envisageons d'utiliser la microscopie de fluorescence à l'échelle de la molécule unique permettant de sonder localement l'environnement lipidique du récepteur dans le but d'étudier la dynamique et l'organisation membranaire des AGPI vis-à-vis du RD2 et vice-versa [291].

Pour cela, un PL fluorescent (PL-F) ayant une chaîne d'AGPI en position sn-2 est en cours de synthèse par notre collaborateur Dr. E. Badarau. Le marquage fluorescent du phospholipide repose sur la fixation d'une sonde fluorescente sur la tête polaire de ce dernier par "la chimie click". Le RD2 sera également marqué d'une manière covalente en utilisant un substrat fluorescent de l'étiquette SNAP [256]. Cette étude sera réalisée par une approche *in cellulo* basée sur l'expression du SNAP-RD2 dans des cellules enrichies en PL-F. Ceci sera appuyé par une étude *in vitro* qui consiste à reconstituer le SNAP-RD2 dans des modèles de membranes cellulaires ayant une composition lipidique bien contrôlée. Cette étude nous permettra d'accéder à la localisation des molécules uniques (SNAP-RD2 et PL-F) ce qui servira à étudier leur dynamique d'interaction.

Pour confirmer l'hypothèse d'un changement conformationnel du RD2 en présence d'AGPI, il serait envisageable de générer un « switch sensor », c'est-à-dire un récepteur fusionné à des sondes fluorescentes permettant de rapporter les changements conformationnels du récepteur activé par un ligand. En effet, Kobilka et ses collaborateurs ont développé un biosenseur FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) permettant de distinguer les conformations adoptées par l'extrémité C-terminale du R $\beta$ 2A en présence de différentes classes de ligand [292] [293]. Ce biosenseur est basé sur l'insertion d'un donneur et d'un accepteur d'énergie dans différentes régions du récepteur, notamment dans les boucles intracellulaires et les hélices transmembranaires. Ainsi, l'étude de l'impact d'un environnement membranaire enrichi en AGPI sur la conformation du récepteur est possible en examinant l'efficacité du transfert d'énergie, entre le couple donneur/accepteur, fusionné à deux différentes hélices transmembranaires du récepteur exprimé dans des cellules ayant une composition lipidique enrichie en AGPI. En ce qui concerne le choix des hélices, il serait intéressant de cibler les hélices transmembranaires TM 5-6-7, préalablement identifiées par des études *in silico*, qui changent de conformation en réponse à la fixation d'un agoniste [125].



# Chapitre V

## Impact des AGPI sur le recrutement de la $\beta$ -arrestine-2

### Résumé :

Depuis quelques années, les données expérimentales s'accumulent pour montrer que les  $\beta$ -arrestines occupent un rôle crucial dans l'initiation de la désensibilisation de la grande majorité des RCPG (le RD1/2, le R $\beta$ 2A, le récepteur  $\mu$  aux opioïdes, ou encore le récepteur de la vasopressine entre autres) [129], [294]–[296]. La phosphorylation des résidus sérines-thréonines, présents sur l'extrémité C-terminale ou sur la troisième boucle intracellulaire de ces RCPG, par les GRK, fait partie intégrante des mécanismes de désensibilisation de ces récepteurs membranaires. En effet, la phosphorylation de ces résidus stabilise l'état conformationnel du récepteur et lui permet d'interagir avec les partenaires moléculaires impliqués dans la machinerie de l'endocytose. En particulier, l'affinité de la  $\beta$ -arrestine pour le récepteur est élevée lorsqu'il est phosphorylé. Une fois recruté au niveau de la membrane plasmique, cette dernière interagit avec la sous-unité  $\beta$  de la protéine adaptatrice (AP-2) qui établit un pont moléculaire entre le complexe RD2/ $\beta$ -arrestine-2 et la principale protéine du manteau de la vésicule d'endocytose, la clathrine [275], [297], [298]. D'après plusieurs travaux, le recrutement de la  $\beta$ -arrestine va permettre de plus l'enrichissement des récepteurs activés au niveau des zones de formation des futures vésicules d'endocytose [299], plus précisément au niveau des puits recouverts de clathrine (CCP) préexistants dans certaines zones de la membrane plasmique [300], [301].

Il est également admis que les  $\beta$ -arrestines possèdent une queue hydrophobe permettant la création d'un point d'ancrage dans la membrane plasmique [302]. L'ancrage lipidique de cette protéine plasmique ainsi que son implication directe dans le mécanisme d'internalisation du RD2, font de la  $\beta$ -arrestine-2 un bon candidat pour la compréhension de l'origine de l'effet des AGPI sur l'internalisation du RD2 discuté dans le précédent chapitre. Ainsi, l'objectif principal de ce chapitre est de comprendre l'influence d'un environnement lipidique enrichi en AGPI sur deux étapes essentielles pour l'internalisation du RD2, le recrutement membranaire de la  $\beta$ -arrestine-2 et le trafic membranaire des récepteurs activés, dans le but de déchiffrer les mécanismes moléculaires à l'origine de la réduction de l'internalisation du RD2. Pour cela, le même système cellulaire, détaillé dans le précédent chapitre, exprimant d'une manière transitoire le RD2, la GRK-2 ainsi que la  $\beta$ -arrestine-2, a été utilisé ici.

## Impact des AGPI sur le recrutement de la $\beta$ -arrestine-2

Le DHA- $\omega$ 3 et le DPA- $\omega$ 6 ont été également employés pour enrichir l'environnement lipidique du RD2 en AGPI. La microscopie confocale a d'abord été utilisée pour étudier le recrutement membranaire de la  $\beta$ -arrestine-2, dans un environnement lipidique non modifié, en présence de différents types de ligand : l'agoniste complet (dopamine), l'antagoniste (spipéron) et l'agoniste partiel (aripiprazole).

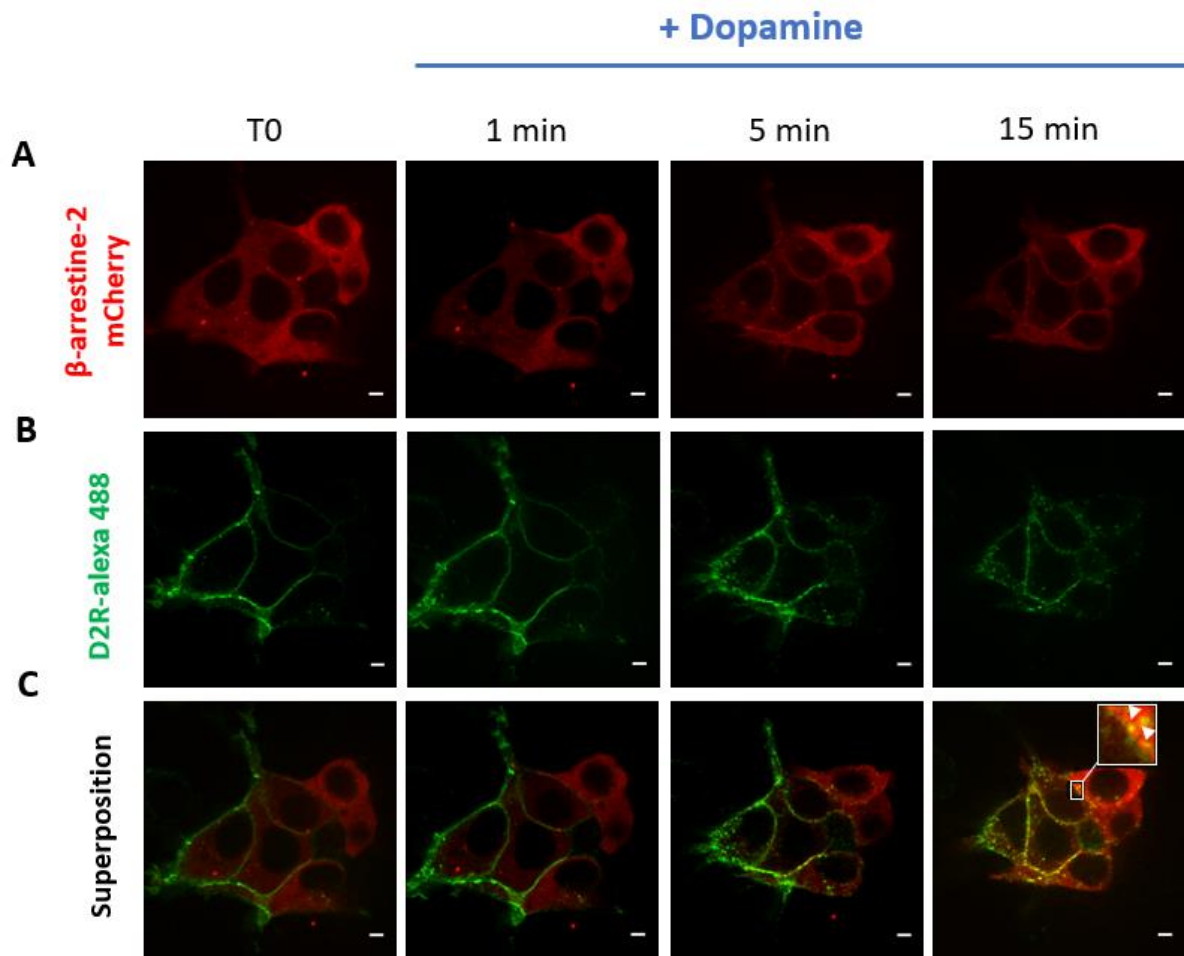
Dans un deuxième temps, la microscopie TIRF en temps réel a permis d'étudier d'une manière qualitative mais surtout quantitative le recrutement de la  $\beta$ -arrestine-2 et le trafic membranaire du RD2 dans des cellules contrôles ainsi que dans des cellules enrichies en DHA- $\omega$ 3 ou en DPA- $\omega$ 6. Les résultats de ce chapitre confirment l'implication de la  $\beta$ -arrestine-2 dans le processus d'internalisation du RD2 et révèlent que les AGPI membranaires impactent significativement l'étape de recrutement de cette protéine cytoplasmique quel que soit l'agoniste du RD2 utilisé.

### 1. La visualisation du recrutement membranaire de la $\beta$ -arrestine-2 par la microscopie confocale en temps réel :

La cinétique de recrutement de la  $\beta$ -arrestine-2 et sa colocalisation concomitante avec le récepteur étiqueté, FLAG-RD2, ont été examinées par la microscopie confocale. Pour cela, les cellules HEK-293 ont été transfectées de manière transitoire avec la même quantité (150 ng) des vecteurs suivants :  $\beta$ -arrestine-2-mCherry, GRK-2 et FLAG-RD2. Le premier vecteur permet l'expression de la  $\beta$ -arrestine-2 fusionnée en position C-terminale avec une protéine fluorescente rouge " mCherry". Quant au récepteur, il a été visualisé par immuno-marquage à l'aide d'un anticorps primaire anti-FLAG et d'un anticorps secondaire couplé à l'Alexa 488 qui émet une fluorescence verte. Les cellules vivantes ont été imagées pendant 15 min avec l'ajout du ligand d'intérêt à  $t=1$  min.

Comme le montre la **figure 1**, en absence de dopamine (à  $t_0$ ), la  $\beta$ -arrestine-2-mCherry est distribuée uniformément dans le cytoplasme. Tandis que le FLAG-RD2 est localisé à la surface cellulaire, comme illustré par l'intense marquage vert au niveau de la membrane plasmique (**figure 1A**). L'addition de la dopamine mène à l'apparition d'un marquage intracellulaire vert observé à  $t=5$  min et  $t=15$  min reflétant le phénomène d'internalisation du RD2. Parallèlement, le marquage rouge devient plus intense au niveau de la membrane plasmique indiquant la redistribution membranaire de la  $\beta$ -arrestine-2-mCherry (**figure 1B**). Par conséquent, la couleur jaune obtenue suite à la superposition des deux images obtenus 15 min après l'ajout de la dopamine dénote une colocalisation des deux protéines marquées dans des zones ponctuelles de la membrane plasmique (**figure 1C**).

Ces résultats confirment que l'internalisation du récepteur induite par la dopamine est accompagnée par le recrutement membranaire de la  $\beta$ -arrestine-2 [129], [298].

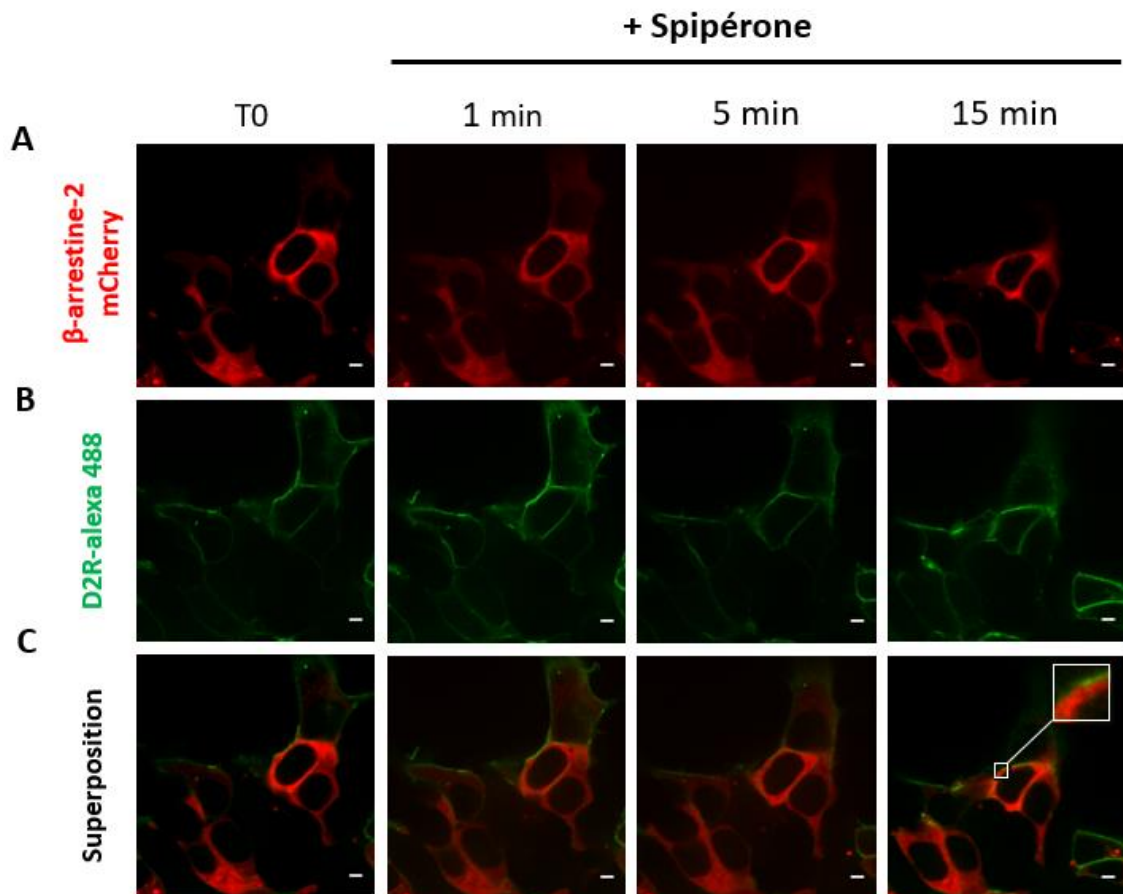


**Figure 1** : Etude de la localisation cellulaire du FLAG-RD2 et de la  $\beta$ -arrestine-2 en absence et en présence de dopamine : images de microscopie confocale des cellules vivantes coexprimant la  $\beta$ -arrestine-2-mCherry, le FLAG-RD2 immuno-marqué par l'alexa-488 et la GRK-2. Les cellules ont été imagées pendant 15 min suite à l'ajout de 10  $\mu$ M de dopamine à  $t=1$  min. **A.** Localisation cellulaire de la  $\beta$ -arrestine-2-mCherry révélée par la fluorescence rouge de la mCherry. **B.** Localisation cellulaire du FLAG-RD2-Alexa-488 mise en évidence par la fluorescence verte de l'alexa-488. **C.** Superposition des deux marquages ; les flèches en blanc indiquent la présence des zones jaunes reflétant la colocalisation des deux protéines marquées (à  $t=15$  min). L'échelle des images est égale à 5  $\mu$ m.

Ensuite, la même expérience a été réalisée en stimulant les cellules avec un des deux antipsychotiques, aripiprazole ou spipéronne, connus pour leur incapacité à induire l'internalisation du RD2. Comme déjà discuté dans les précédents chapitres, étant un antagoniste, la spipéronne occupe le site de fixation du RD2 sans activer les différentes voies de signalisation en aval de ce récepteur (voies dépendantes de la protéine Gi- $\beta\gamma$  et de la  $\beta$ -arrestine-2) et sans induire son internalisation.

## Impact des AGPI sur le recrutement de la $\beta$ -arrestine-2

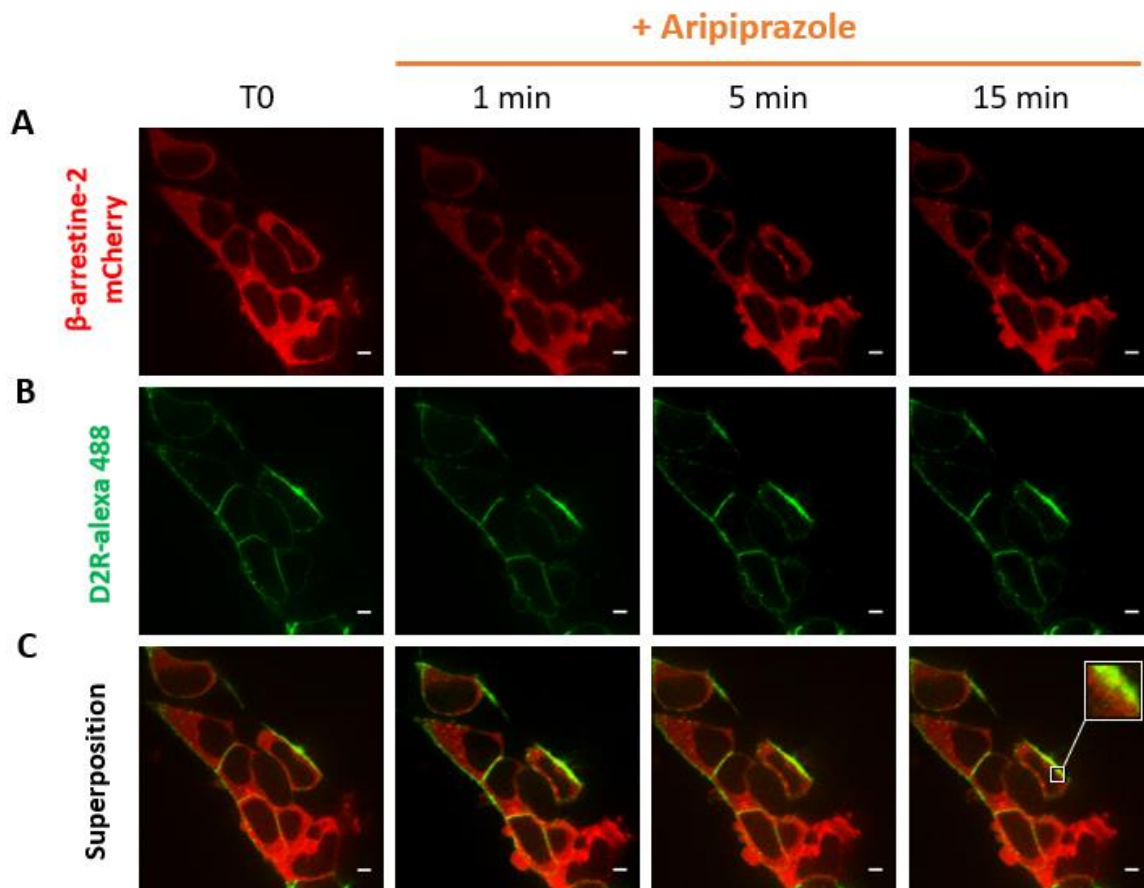
Comme attendu, contrairement à la dopamine, en présence de la spipérone, le RD2 reste localisé au niveau de la surface cellulaire et le marquage rouge issu de la  $\beta$ -arrestine-2 est maintenu homogène même après 15 min de stimulation (**figure 2A, B**). Comme illustré dans la **figure 2C**, la superposition des deux images obtenus 15 min après l'ajout de la spipérone ne met en évidence aucun marquage jaune. Ces résultats confirment que ce ligand se fixe au récepteur sans induire ni le recrutement de la  $\beta$ -arrestine-2 ni l'internalisation du RD2.



**Figure 2** : Images de microscopie confocale montrant la localisation cellulaire de la  $\beta$ -arrestine-2-mCherry et du FLAG-RD2 immuno-marqué par l'alexa-488, en absence et en présence de spipérone, réalisées dans les mêmes conditions décrites pour la **figure 1**. Les cellules vivantes ont été imagées pendant 15 min avec l'ajout de 10  $\mu$ M de spipérone à  $t=1$  min. **A.B.** Localisation cellulaire de la  $\beta$ -arrestine-2-mCherry (**A**) et du FLAG-RD2-Alexa-488 (**B**). **C.** Superposition des deux marquages ; Aucun marquage jaune n'a été mis en évidence dans la zone zoomée (à  $t=15$  min). L'échelle des images est égale à 5  $\mu$ m.

## Impact des AGPI sur le recrutement de la $\beta$ -arrestine-2

Fait intéressant, similairement à l'antagoniste, l'aripiprazole se fixe au RD2 sans induire ni le recrutement membranaire de la  $\beta$ -arrestine-2 ni l'internalisation du récepteur (**Figure 3**). En effet, l'image obtenue suite à la superposition des deux marquages (à t=15 min) ne montre pas de zones de colocalisation des deux protéines fluorescentes qui conservent leur distribution basale.



**Figure 3** : Images de microscopie confocale montrant la localisation cellulaire du FLAG-RD2-Alexa-488 et de la  $\beta$ -arrestine-2-mCherry, en absence et en présence d'aripiprazole, réalisées dans les mêmes conditions décrites pour la **figure 1** et **2**. Les cellules vivantes ont été imagées pendant 15 min avec l'ajout de 10  $\mu$ M d'aripiprazole à t=1 min. **A.B.** Localisation cellulaire de la  $\beta$ -arrestine-2-mCherry (**A**) et du FLAG-RD2-Alexa-488 (**B**). **C.** Superposition des deux marquages ; la zone zoomée (à t=15 min) ne montre pas de marquage jaune. L'échelle des images est égale à 5  $\mu$ m.

## Impact des AGPI sur le recrutement de la $\beta$ -arrestine-2

Les données obtenues dans cette première partie rejoignent les travaux de Klewe *et al* [303] qui ont évalué l'effet de l'aripiprazole sur l'étape de recrutement de la  $\beta$ -arrestine-2 par la technique de BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer). Cette étude a montré que le phénomène de transfert d'énergie entre le couple  $\beta$ -arrestine-2/RD2, reflétant le recrutement membranaire de cette protéine cytosolique et son interaction avec le récepteur, est très négligeable lorsque les cellules HEK-293 sont traitées avec les agonistes partiels du RD2, dont l'aripiprazole. Ce travail a permis de confirmer que cet agoniste, utilisé comme antipsychotique pour traiter beaucoup de pathologies psychiatriques, est inefficace vis à vis de la voie de transmission dépendante de la  $\beta$ -arrestine-2 [264].

### 2. La visualisation du recrutement membranaire de la $\beta$ -arrestine-2 et du trafic membranaire du RD2 par la microscopie TIRF en temps réel :

Ensuite l'imagerie TIRF, ayant une meilleure résolution axiale (en  $z$ ) que la microscopie confocale, largement employée pour étudier les événements moléculaires intervenant à la surface cellulaire, a été utilisée pour suivre, simultanément, le recrutement membranaire de la  $\beta$ -arrestine-2 ainsi que le trafic membranaire du RD2.

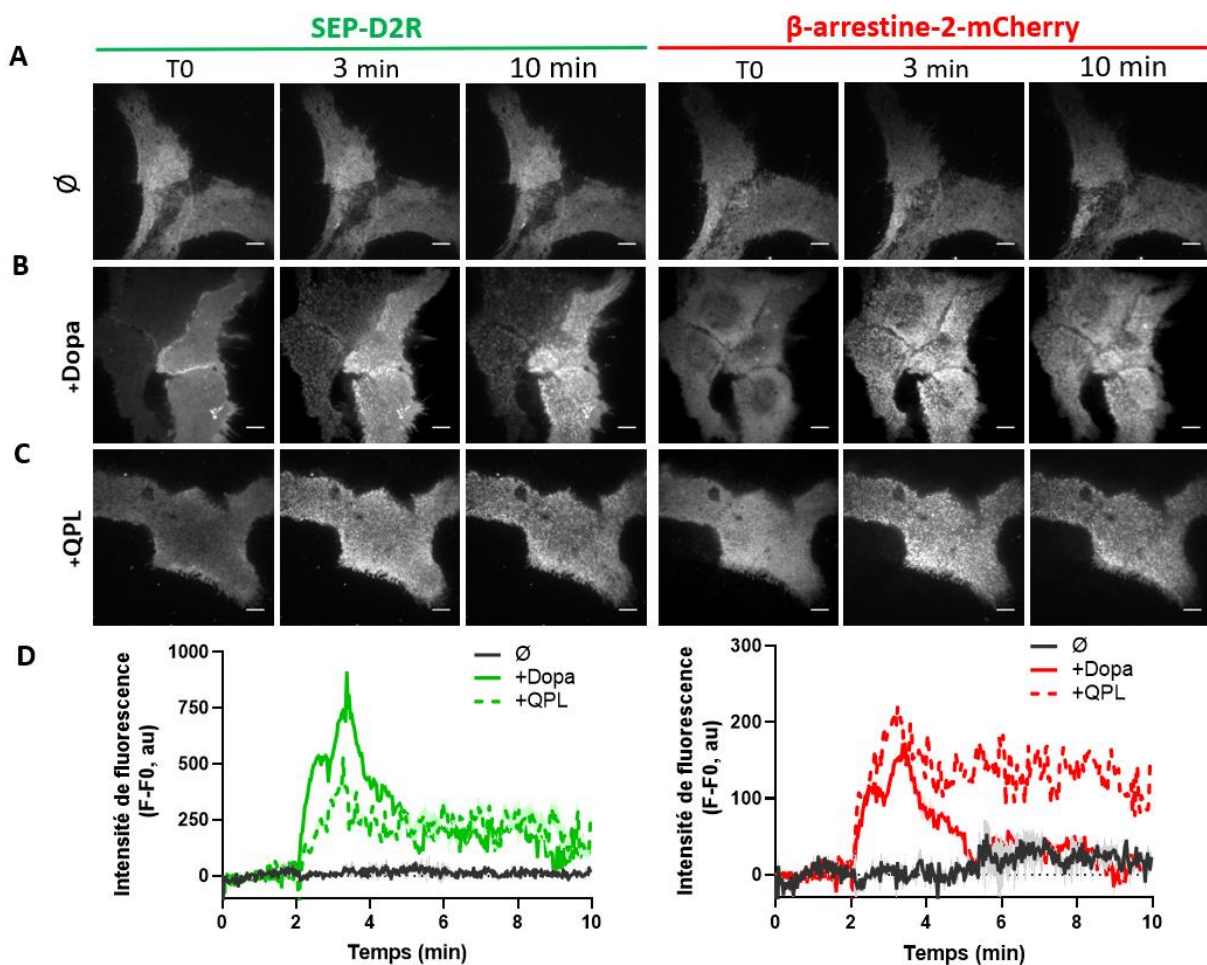
Pour le suivi de ces deux phénomènes, les cellules HEK-293 ont été transfectées pour exprimer le RD2 fusionné à l'étiquette SEP (SuperEcliptic PHluorin) sur son extrémité N-terminale, la GRK-2 ainsi que la  $\beta$ -arrestine-2 fusionnée à la mCherry. Il est important de noter que l'étiquette SEP est une variante génétiquement modifiée de la protéine fluorescente verte (Green Fluorescent Protein, GFP). La particularité de cette étiquette, sensible au pH, est qu'elle n'émet aucune fluorescence verte lorsqu'elle est présente dans un milieu ayant un pH inférieur à 6. Ainsi, à pH expérimentale (pH=7,3), seul les SEP-RD2 localisés au niveau de la surface cellulaire sont fluorescents ce qui permet de suivre leur trafic.

Grace à ces marquages fluorescents, les cellules ont été imagées pendant 10 min avec l'ajout de 10  $\mu$ M d'agoniste (dopamine ou quinpirole) à  $t=2$ min. Les cellules contrôles, non stimulées, ont été traitées avec le milieu d'imagerie (FluoroBrite™ DMEM), utilisé pour dissoudre les agonistes du RD2. Comme illustré dans la **figure 4A** en absence d'agoniste, seul un marquage homogène est observé pour les deux protéines reflétant leur expression par les cellules HEK-293. Par contre, l'ajout du quinpirole ou de la dopamine, à  $t=2$  min, provoque une hétérogénéité des deux marquages (**figure 4B, C**) visible dès l'addition de l'agoniste en question.



## Impact des AGPI sur le recrutement de la $\beta$ -arrestine-2

Cette hétérogénéité est due au recrutement de la  $\beta$ -arrestine-2-mCherry au niveau de la membrane plasmique et à l'accumulation "clustering" des récepteurs fluorescents (SEP-RD2) au niveau des zones spécifiques de la membrane plasmique. Ces deux événements, marquant l'initiation du phénomène d'internalisation, ont été mis en évidence par la mesure de l'intensité de fluorescence des deux protéines fluorescentes en fonction du temps (**figure 4D**). En effet, l'ajout d'agoniste à  $t = 2$  min, induit une augmentation significative et immédiate de l'intensité de fluorescence du SEP-RD2 et de la  $\beta$ -arrestine-2-mCherry. Cette augmentation est caractérisée par un pic de fluorescence assez fort, inexistant en absence d'agoniste, suivi d'une lente diminution au cours du temps.



**Figure 4** : Visualisation de la  $\beta$ -arrestine-2-mCherry et du SEP-RD2, en absence et en présence de 10  $\mu$ M d'agoniste (dopamine ou quinpirole), exprimés dans les cellules HEK-293. Les deux protéines fluorescentes ont été imagées pendant 10 min avec l'ajout du milieu d'imagerie (A), de la dopamine (B) ou du quinpirole (C) à  $t = 2$  min. D. Suivi temporel de l'intensité de fluorescence pendant 10 min en absence et en présence d'agoniste. Chaque courbe représente la moyenne des intensités de fluorescence enregistrées dans la (les) cellule(s) représentée(s) en A, B et C. Une valeur d'intensité de fluorescence est acquise toutes les deux secondes. L'échelle des images est égale à 5  $\mu$ m.

### 3. L'impact des AGPI sur le clustering du RD2 et sur le recrutement membranaire de la $\beta$ -arrestine-2

Ensuite, nous avons évalué l'effet des mêmes AGPI (DHA et DPA) sur l'assemblage membranaire du RD2 ainsi que sur le recrutement de la  $\beta$ -arrestine induits par les deux agonistes, dopamine ou quinpirole. Comme cela a été expliqué dans la partie précédente, les deux protéines fluorescentes, SEP-RD2 et  $\beta$ -arrestine-2-mCherry, ainsi que la GRK-2 ont été exprimés dans les cellules HEK-293 contrôles et enrichies en AGPI. La dynamique des deux protéines d'intérêt a été suivie, simultanément, par l'imagerie TIRF pendant 10 min avec l'ajout de la dopamine ou du quinpirole à  $t=2$  min.

#### 3.1. L'impact des AGPI membranaires sur le clustering du RD2 :

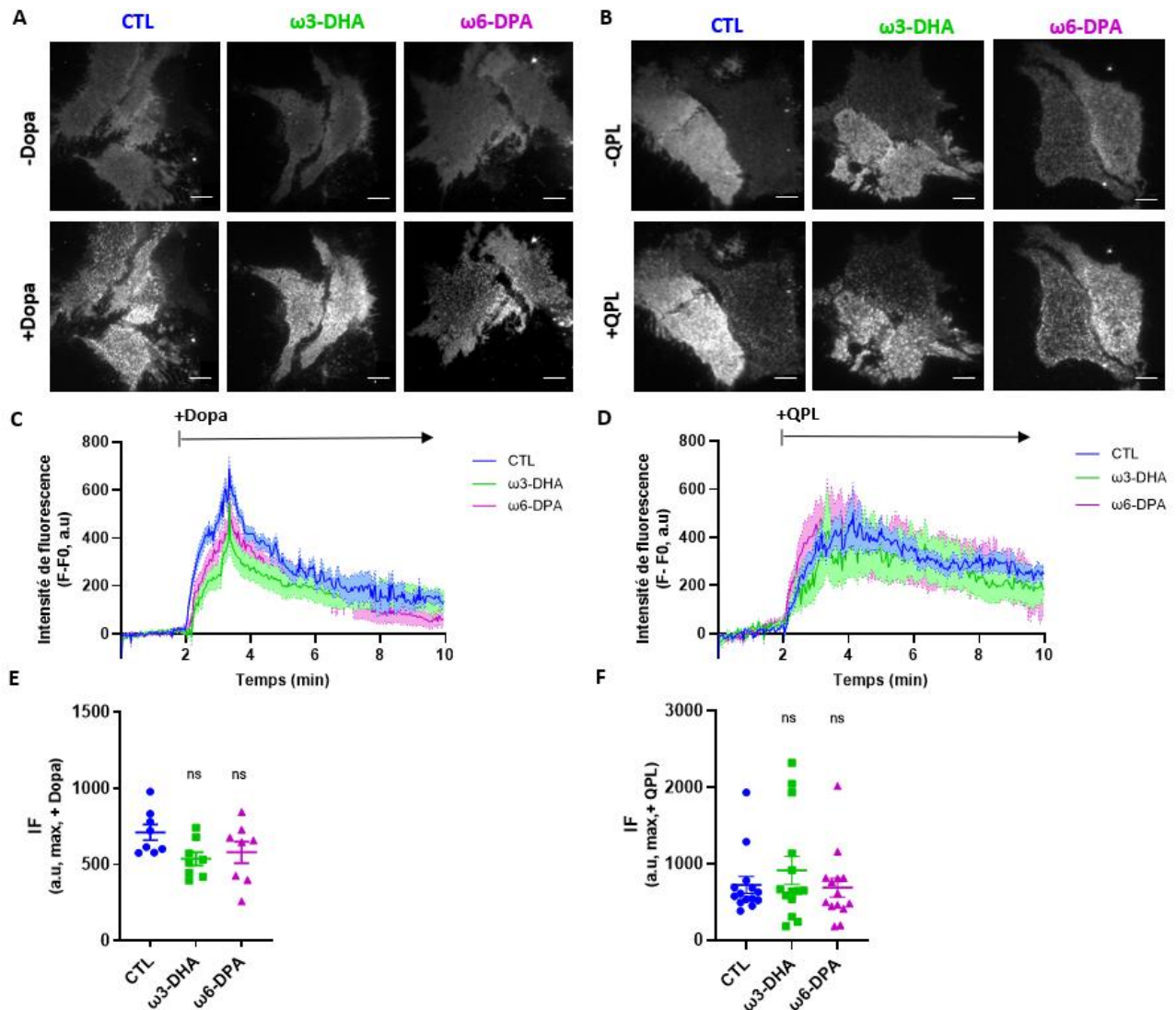
Comme cela a été montré précédemment, les images obtenues en absence d'agoniste montrent un marquage homogène du SEP-RD2 reflétant une distribution homogène de ce dernier au niveau de la membrane plasmique. Par contre, les images acquises à  $t=3$  min (1 min après la stimulation des cellules avec la dopamine ou le quinpirole) mettent en évidence le clustering membranaire des récepteurs fluorescents (**figure 5A, B**). Les images obtenues en présence des deux agonistes ne soulignent pas de différence de clustering du SEP-RD2 entre les cellules contrôles et enrichies en AGPI.

Pour avoir une idée quantitative de l'impact des AGPI, nous avons comparé les intensités de fluorescence du SEP-RD2, mesurés en fonction du temps, dans les cellules contrôles et celles enrichies en DHA- $\omega$ 3 ou en DPA- $\omega$ 6. Comme le montre la **figure 5C et D**, les courbes de fluorescence ont un profil très similaire quel que soit l'environnement lipidique membranaire du SEP-RD2. Ceci est confirmé par la comparaison des intensités de fluorescence maximales qui sont assez comparables dans les trois conditions (**figure 5E et F**). Ainsi, nous concluons que le clustering membranaire des récepteurs activés n'est pas altéré suite à l'expression du récepteur d'intérêt dans un environnement enrichi en AGPI de type  $\omega$ 3 ou  $\omega$ 6.

En conclusion, indépendamment de la nature de l'agoniste utilisé (endogène ou synthétique), le clustering des récepteurs activés est préservé dans un environnement enrichi en AGPI. Dans le même contexte, Sarselli *et al* [304] ont aussi étudié le rôle de la composition lipidique membranaire et plus précisément celui du cholestérol sur le clustering du R $\beta$ 2A exprimé dans les cellules Hela.

## Impact des AGPI sur le recrutement de la $\beta$ -arrestine-2

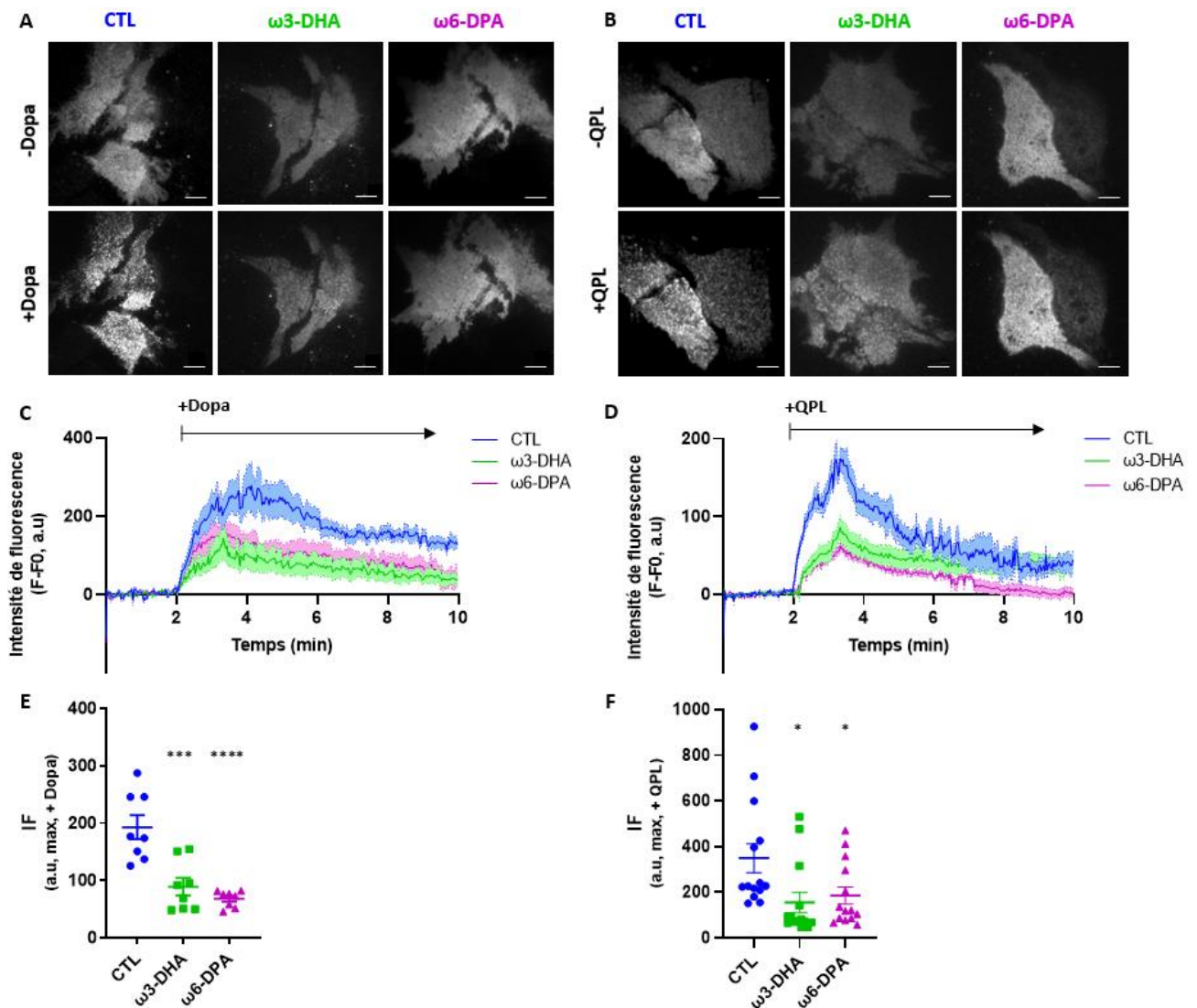
De façon comparable à nos observations, cette étude a montré que la déplétion du cholestérol membranaire par le méthyl- $\beta$ -cyclodextrine n'altère pas l'assemblage de ce récepteur. Ainsi, il semble que la composition lipidique membranaire n'impacte pas le clustering des RCPG.



**Figure 5** : Etude du trafic membranaire du SEP-RD2 dans les cellules contrôles et enrichies en DHA ou en DPA. **A. B.** Images de la microscopie TIRF qui mettent en évidence l'assemblage des récepteurs fluorescents en présence de la dopamine (+Dopa) ou du quinpirole (+QPL). Les images (-Dopa, -QPL) sont obtenues à  $t=0$  et les images (+Dopa, +QPL) sont acquises à  $t = 3$  min. **C. D.** Enregistrement de l'intensité de fluorescence pendant 10 min avant et après l'application de  $10 \mu\text{M}$  de quinpirole ou de dopamine (à  $t = 2$  min). Chaque courbe représente la moyenne des intensités de fluorescence enregistrées dans 8 (**C**) ou 14 (**D**) cellules différentes issues de 3 transfections indépendantes. Une valeur d'intensité de fluorescence est acquise toutes les deux secondes. **E. F.** La moyenne des intensités maximales enregistrées dans 8 (**E**) ou 14 (**F**) cellules par condition. La significativité a été testée par un test one-way ANOVA suivi par une comparaison multiple de type Dunnett : ns :  $p \geq 0,05$ . L'échelle des images est égale à  $5 \mu\text{m}$ .

### 3.2. L'impact des AGPI membranaires sur le recrutement de la $\beta$ -arrestine-2 :

Contrairement à ce qui a été montré pour le clustering membranaire du RD2, le recrutement de la  $\beta$ -arrestine-2-mCherry semble dépendre des AGPI membranaires. En effet, les images acquises après le rajout d'agonistes, dopamine ou quinpirole, mettent en évidence un marquage négligeable, issue de la mCherry, dans les cellules enrichies par rapport aux cellules contrôles (**figure 6A, B**). La comparaison des courbes de fluorescence obtenues en mesurant l'intensité de fluorescence de la  $\beta$ -arrestine-2-mCherry en fonction du temps (**figure 6C, D**) révèlent que l'augmentation de l'intensité de fluorescence induite par le rajout d'agoniste est moins prononcée dans les cellules enrichies en DHA ou en DPA par rapport aux cellules contrôles. De plus, les tests statistiques réalisés montrent une différence significative des intensités de fluorescence maximales enregistrées dans les deux types de cellules (**figure 6E, F**). De ce fait, ces résultats montrent que le recrutement de la  $\beta$ -arrestine-2 vers une membrane plasmique enrichie en AGPI est fortement réduit. Etant un facteur clef pour la régulation négative du récepteur d'intérêt, le faible recrutement de cette protéine cytosolique observé dans les cellules enrichies en DHA- $\omega$ 3 ou en DPA- $\omega$ 6 peut être corrélé avec la réduction de l'internalisation du RD2, discuté dans le précédent chapitre.



**Figure 6 :** Etude du recrutement membranaire de la  $\beta$ -arrestine-2-mCherry dans les cellules contrôles et enrichies en DHA ou en DPA. **A. B.** Images de microscopie TIRF qui mettent en évidence l'accumulation de la  $\beta$ -arrestine-2-mCherry suite à l'addition de la dopamine (Dopa) ou du quinpirole (QPL). Les images (-Dopa, -QPL) sont obtenues à  $t=0$  min et les images (+Dopa, +QPL) sont acquises à  $t = 3$  min. **C. D.** Enregistrement de l'intensité de fluorescence pendant 10 min avant et après l'application de  $10 \mu\text{M}$  de quinpirole ou de dopamine (à  $t = 2$  min). Chaque courbe représente la moyenne des intensités de fluorescence enregistrées dans 8 (**C**) ou 14 (**D**) cellules différentes issues de 3 transfections indépendantes. Une valeur d'intensité de fluorescence est acquise toutes les deux secondes. **E. F.** La moyenne des intensités maximales enregistrées dans 8 (**E**) ou 14 (**F**) cellules par condition. La significativité a été testée par un test one-way ANOVA suivi par une comparaison multiple de type Dunnett : \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ . L'échelle des images est égale à  $5 \mu\text{m}$ .



### Conclusions et perspectives :

Dans la continuité du chapitre précédent, les travaux réalisés ci-dessus ont permis d'étudier deux étapes cruciales dans le phénomène de désensibilisation du RD2. L'objectif principal de cette étude est de déchiffrer le mécanisme par lequel les AGPI membranaires réduisent l'internalisation du RD2.

Comme nous l'avons vu précédemment, le clustering membranaire du RD2 observé en présence d'agoniste n'est pas altéré par l'enrichissement cellulaire en AGPI. Ce résultat suggère que les récepteurs activés s'accumulent normalement au niveau des puits recouverts de clathrine (CCP) quel que soit l'environnement lipidique du SEP-RD2. Néanmoins, il est important de mentionner qu'aucun marquage des CCP n'a été utilisé dans cette étude. De ce fait, aucune conclusion n'a pu être tirée concernant l'impact des AGPI sur le clustering des RD2 activés au niveau des zones de formation des puits recouverts de clathrine.

Dans un deuxième temps, nous avons montré que le recrutement de la  $\beta$ -arrestine-2 est significativement réduit dans l'environnement lipidique enrichi en AGPI. D'après les travaux de Gurevich et Benovic [305], le recrutement des  $\beta$ -arrestines et leur interaction avec les RCPG impliquent l'engagement au niveau de l'arrestine d'un site capable de discriminer entre les formes actives, inactives et les différents états de phosphorylation du récepteur. En se basant sur ces travaux, deux hypothèses ont été émises pour expliquer le faible recrutement de la  $\beta$ -arrestine-2 dans un environnement enrichi en AGPI : **1)** La première hypothèse proposée concerne la faible accessibilité de la kinase (GRK-2) aux sites de phosphorylation du RD2 ce qui conduit à une faible affinité de la  $\beta$ -arrestine à ce dernier. Cette inaccessibilité peut résulter d'un changement de la conformation du récepteur exprimé dans un environnement riche en AGPI ou au fait que ces derniers interagissent avec le récepteur tout en masquant les résidus sérines et thréonines, de la BI3, impliquées dans le phénomène de phosphorylation. **2)** La deuxième hypothèse est que les AGPI n'affectent pas la phosphorylation du récepteur mais plutôt déstabilisent sa forme activée, et phosphorylée, reconnue par la  $\beta$ -arrestine. A ce stade, il n'est pas clair si l'action des AGPI se résume à moduler la conformation du récepteur ou si ces derniers démasquent les sites de phosphorylation du RD2 sans impacter sa conformation. Ainsi, d'autres expériences sont indispensables pour étudier ces deux hypothèses.

## Impact des AGPI sur le recrutement de la $\beta$ -arrestine-2

Etant donné que l'affinité de la  $\beta$ -arrestine au RD2 dépend du degré de phosphorylation de ce dernier [127], il serait intéressant d'étudier l'influence des AGPI sur l'étape de phosphorylation du RD2 induite par ses agonistes (dopamine et quinpirole). Dans le même contexte, des expériences de BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer) pourront être envisagées pour étudier directement l'interaction, ainsi que la dissociation, du couple RD2/ $\beta$ -arrestine exprimés dans des cellules enrichies ou pas en AGPI [306], [307]. Il serait également pertinent de faire ces mêmes expériences avec le R $\beta$ 2A ayant une internalisation préservée en présence du DHA et du DPA. Ces travaux permettront de clarifier les résultats obtenus et de confirmer (ou non) l'existence d'un lien causal entre la diminution de recrutement de la  $\beta$ -arrestine-2 et l'internalisation réduite du récepteur d'intérêt, observées en enrichissant les membranes cellulaires en AGPI.

En ce qui concerne l'impact de la composition lipidique membranaire sur le recrutement de la  $\beta$ -arrestine, des données concluantes concernant le rôle crucial des phosphoinositides membranes (PI) et notamment le PIP2 (Phosphatidyl inositol 4,5 biphosphate) dans l'endocytose  $\beta$ -arrestine dépendante sont disponibles dans la littérature. En effet, il est bien admis que les  $\beta$ -arrestines interagissent avec le PIP2, pour augmenter la stabilité du complexe RCPG/ $\beta$ -arrestine pendant le processus d'internalisation [308]. Ces études suggèrent que ces protéines cytosoliques possèdent un site de liaison au PIP2, de haute affinité, situé sur leurs extrémité C-terminale. Dans ce contexte, les travaux de Gaidarov *et al* ont montré que la mutation d'un des aa composant ce site de liaison (Lys233, Arg237 et Lys2516) abolit le recrutement du R $\beta$ 2A au niveau des CCP [308]. Ceci prouve que la formation du complexe PIP2/ $\beta$ -arrestine est crucial pour la prise en charge des RCPG par l'endocytose clathrine et  $\beta$ -arrestine dépendante.

Ainsi, la question suivante a été soulevée : **Est-ce que l'enrichissement membranaire en AGPI altère l'interaction du PIP2 membranaires avec la  $\beta$ -arrestine-2, via une réorganisation des lipides membranaires, d'où son faible recrutement au niveau de la membrane plasmique ?** Sachant que l'enrichissement lipidique membranaire en AGPI n'affecte pas la voie d'internalisation du R $\beta$ 2A,  $\beta$ -arrestine et PIP2 dépendante [309], cette hypothèse est peu probable mais reste à être testée. Pour cela, des analyses lipidomiques supplémentaires sont nécessaires pour évaluer l'impact de l'enrichissement membranaire en AGPI sur la teneur de la membrane plasmique en phosphoinositides.

## Impact des AGPI sur le recrutement de la $\beta$ -arrestine-2

Pour conclure, les résultats obtenus dans ce chapitre suggèrent que le blocage du RD2 au niveau de la membrane plasmique en présence d'AGPI est dû à l'altération du recrutement d'un composant indispensable au déclenchement de ce mécanisme, la  $\beta$ -arrestine-2. Comme évoqué précédemment, le clustering membranaire du récepteur n'est pas impacté par l'enrichissement membranaire en AGPI. Il serait donc intéressant de vérifier que le clustering du RD2, observé par la microscopie TIRF, correspond à l'accumulation de ce dernier au niveau des zones de formation des CCP. Ainsi, des études de colocalisation des protéines cibles, notamment le RD2 et un des acteurs moléculaires impliqués dans le CME (clathrine ou AP-2) par la microscopie confocale pourront clarifier ce point [300].



# Chapitre VI

## Conclusions et perspectives générales

## Conclusions et perspectives générales

L'ensemble des travaux menés dans ce projet de thèse a permis d'apporter des éléments de réponse quant à l'influence du taux d'insaturation membranaire sur **1)** la fluidité membranaire ; **2)** l'internalisation de deux RCPG, le RD2 et le R $\beta$ 2A, induite par leurs agonistes complets; **3)** le mécanisme d'endocytose clathrine dépendante ; **4)** le trafic membranaire (clustering) du RD2 ainsi que l'étape de recrutement membranaire de la  $\beta$ -arrestine en réponse à la stimulation du RD2 avec deux différents agonistes complets.

Dans un premier temps, nous avons montré que notre approche cellulaire permettait de moduler efficacement l'environnement lipidique des récepteurs d'intérêt, enrichi en AGPI par rapport à l'environnement natif. En effet, l'utilisation de la microscopie Raman, qui apporte des informations spatialement résolues, a permis d'élucider la distribution cellulaire de l'AGS (l'AB) ainsi que d'un AGPI (le DHA). Ces derniers semblent s'incorporer dans les membranes plasmiques exprimant les différents récepteurs membranaires (RD2, R $\beta$ 2A et TfR1). Dans le même contexte, les analyses lipidomiques (CG-SM et CL) pointent vers une estérification des AGPI au sein de deux espèces de PL (PC et PE), avec une préférence pour le PE qui est plus abondant dans le feuillet cytosolique. Ceci suggère que l'enrichissement membranaire en AGPI est probablement à l'origine d'une asymétrie des chaînes insaturées au sein des feuillets membranaires.

A notre surprise, les deux AGPI d'intérêt (DHA- $\omega$ 3 et DPA- $\omega$ 6) ont révélé un effet différent sur la fluidité membranaire des cellules enrichies. En effet, nos résultats ont montré que le DHA- $\omega$ 3, ayant six insaturations, entraîne une fluidité membranaire moins importante que celle du DPA- $\omega$ 6 ayant cinq insaturations. Sachant que nous avons montré que cette différence d'effet n'est pas due à la position de la première insaturation, des données supplémentaires seront nécessaires pour mieux comprendre l'origine de cette différence. A cet égard, des simulations de dynamique moléculaire pourront être envisagées pour étudier les mouvements des lipides membranaires le long des membranes modèles ayant un taux de chaînes de DHA- $\omega$ 3 ou de DPA- $\omega$ 6 bien contrôlé.

Notre approche cellulaire nous a permis de montrer par deux techniques quantitatives différentes, le DERET et la microscopie confocale sur des cellules fixées et vivantes, que la présence du RD2 dans un environnement enrichi en AGPI, de type  $\omega$ 3 ou  $\omega$ 6, défavorisait son internalisation dans le compartiment intracellulaire et réduisait le nombre d'endosomes formés dans les cellules enrichies par rapport aux cellules contrôles. Autrement dit, la disponibilité du RD2 au niveau de la membrane plasmique est plus élevée lorsque ce dernier est exprimé dans un environnement riche en AGPI.

## Conclusions et perspectives générales

Au vu de ces résultats, nous avons poussé cette étude plus loin afin de vérifier l'existence d'un lien de causalité entre le taux d'insaturation membranaire et la voie d'internalisation du RD2. Dans ce contexte, nous avons montré que l'enrichissement membranaire en AGS n'altérait pas la voie d'internalisation de notre récepteur d'intérêt. Ces observations nous ont amené à la conclusion suivante : **l'augmentation des taux d'AGPI est directement responsable de l'altération du processus d'internalisation du RD2.**

Ensuite, nous avons étendu notre étude en nous intéressant à l'impact du taux d'insaturation membranaire sur l'internalisation d'un autre RCPG de classe A, le R $\beta$ 2A. Comme évoqué plus haut, l'objectif principal de cette étude était de vérifier si l'impact observé pour le RD2 est général à tous les RCPG de classe A. De façon intéressante, nos études de microscopie confocale ont mis en évidence un nombre assez comparable d'endosomes chargés de R $\beta$ 2A internalisé quel que soit son environnement lipidique membranaire. Ceci peut être expliqué par un effet spécifique de l'environnement lipidique enrichi en AGPI sur la voie d'internalisation du RD2. Comme discuté dans le chapitre 4, cette spécificité d'impact peut être due à une dynamique d'interaction différente entre les chaînes d'AGPI membranaires et les deux RCPG. Etant donné que nous avons déjà montré, par des études de modélisation moléculaire, que les chaînes de DHA et de DPA se localisent préférentiellement autour du RD2, il serait pertinent de réaliser cette même étude avec le R $\beta$ 2A dans le but de vérifier l'existence d'une différence d'organisation de ces chaînes insaturées autour de ce dernier.

Etant donné que les deux RCPG s'internalisent via le même mécanisme d'endocytose clathrine et  $\beta$ -arrestine dépendante, les données obtenues à ce stade nous ont poussé à investiguer l'impact du taux d'insaturation sur le mécanisme d'endocytose clathrine dépendante. Ainsi, notre choix s'est porté sur un récepteur membranaire n'appartenant pas à la famille des RCPG, le RTF1 permettant d'internaliser la transferrine via une endocytose assistée par la clathrine. Similairement au R $\beta$ 2A, nos résultats n'ont révélé aucun impact de l'enrichissement membranaire en AGPI sur ce mécanisme d'internalisation ce qui suggère que le blocage partiel de la voie d'internalisation du RD2 n'est pas dû à l'altération de la mise en place de la machinerie d'endocytose.

En résumé, l'ensemble des résultats présentés précédemment suggère l'existence d'un lien causal, et probablement spécifique, entre la composition membranaire en AGPI et l'internalisation du RD2.

## Conclusions et perspectives générales

Le second volet de notre étude s'attache à vérifier l'impact d'un environnement lipidique enrichi en AGPI sur le clustering du RD2, et sur le recrutement de la  $\beta$ -arrestine, en réponse à la stimulation du récepteur RD2 avec deux différents agonistes complets (la dopamine et le quinpirole). Grâce à la microscopie TIRF, permettant de sonder ces événements intervenant à la surface cellulaire, nous avons pu montrer que le clustering des RD2 membranaires n'est pas modifié quel que soit son environnement lipidique.

En revanche, ces mêmes études ont mis en évidence une réduction significative de l'étape de recrutement des  $\beta$ -arrestines ( $\beta$ -arrestine-2) exprimées dans les cellules enrichies en AGPI. Cette observation est en faveur de l'existence d'une corrélation positive entre l'enrichissement cellulaire en AGPI, la réduction de l'internalisation du RD2 et l'altération de l'étape de recrutement de la  $\beta$ -arrestine-2. Comme évoqué à plusieurs reprises, l'efficacité du recrutement de la  $\beta$ -arrestine-2 dépend de la capacité de cette protéine cytosolique à reconnaître la conformation activée ainsi que l'état phosphorylé du RCPG. De ce fait, il serait intéressant d'étudier l'impact de l'enrichissement membranaire en AGPI sur la conformation du RD2 ainsi que sur son état de phosphorylation, en réponse à son induction par ses agonistes complets. Dans ce même contexte, il serait intéressant d'étudier l'effet du taux d'insaturation sur la voie de signalisation  $\beta$ -arrestine dépendante. Ceci nous permettrait de déterminer les conséquences du recrutement réduit, dans le cas du RD2, sur les voies de signalisation en aval de la  $\beta$ -arrestine telle que la voie des MAP-kinases.

Sachant que les deux RCPG étudiés ici utilisent le mécanisme d'endocytose  $\beta$ -arrestine et clathrine dépendante, il serait crucial de déterminer l'impact d'un tel environnement lipidique sur le recrutement de la  $\beta$ -arrestine suite à l'induction de l'internalisation du R $\beta$ 2A. Ceci aiderait à éclaircir la différence de l'effet des AGPI sur les voies d'internalisation des deux RCPG. A ce propos, il est important de noter que le R $\beta$ 2A est capable de s'internaliser par un mécanisme indépendant de la  $\beta$ -arrestine, via l'endocytose dépendante des cavéoles. Ainsi, la différence d'impact des AGPI, observée pour les deux RCPG de classe A, peut-être expliquée par le fait que le R $\beta$ 2A est capable d'emprunter cette voie indépendante de la  $\beta$ -arrestine pour compenser un éventuel effet des AGPI.

Malgré les points qui restent à éclaircir, nos données constituent une avancée dans la compréhension du rôle structurel et fonctionnel de deux différents AGPI, estérifiés dans les PL membranaires, sur la voie d'internalisation du RD2. A long terme, nos données pourront aider à identifier les mécanismes moléculaires expliquant le rôle des AGPI dans la transmission dopaminergique et dans la genèse de certaines maladies psychiatriques.



# Références bibliographiques

## Références:

- [1] D. M. Perez, "The Evolutionarily Triumphant G-Protein-Coupled Receptor," *Mol. Pharmacol.*, vol. 63, no. 6, pp. 1202–1205, Jun. 2003, doi: 10.1124/mol.63.6.1202.
- [2] J. Bockaert, "Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success," *EMBO J.*, vol. 18, no. 7, pp. 1723–1729, Apr. 1999, doi: 10.1093/emboj/18.7.1723.
- [3] R. Fredriksson and H. B. Schiöth, "The Repertoire of G-Protein–Coupled Receptors in Fully Sequenced Genomes," *Mol. Pharmacol.*, vol. 67, no. 5, pp. 1414–1425, May 2005, doi: 10.1124/mol.104.009001.
- [4] S. Takeda, S. Kadowaki, T. Haga, H. Takaesu, and S. Mitaku, "Identification of G protein-coupled receptor genes from the human genome sequence," *FEBS Lett.*, vol. 520, no. 1–3, pp. 97–101, Jun. 2002, doi: 10.1016/S0014-5793(02)02775-8.
- [5] D. K. Vassilatis *et al.*, "The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 100, no. 8, pp. 4903–4908, Apr. 2003, doi: 10.1073/pnas.0230374100.
- [6] M. G. Caron, Y. Srinivasan, J. Pitha, K. Kocielek, and R. J. Lefkowitz, "Affinity chromatography of the beta-adrenergic receptor.," *J. Biol. Chem.*, vol. 254, no. 8, pp. 2923–7, Apr. 1979.
- [7] A. Wise, K. Gearing, and S. Rees, "Target validation of G-protein coupled receptors," *Drug Discov. Today*, vol. 7, no. 4, pp. 235–246, Feb. 2002, doi: 10.1016/S1359-6446(01)02131-6.
- [8] R. R. Ania de la Nuez Veulens, "G Protein-coupled receptors as targets for drug design," *Biotechnol. Apl.*, pp. 26:24-33, 2009.
- [9] C. V. R. H. Gebhard F. X. Schertler, "Projection structure of rhodopsin ," *Nature*, 1993.
- [10] K. Palczewski *et al.*, "Crystal Structure of Rhodopsin: A G Protein-Coupled Receptor," *Science (80-. )*, vol. 289, no. 5480, pp. 739–745, Aug. 2000, doi: 10.1126/science.289.5480.739.
- [11] S. G. F. Rasmussen *et al.*, "Crystal structure of the  $\beta$  2 adrenergic receptor-Gs protein complex," *Nature*, vol. 477, no. 7366, pp. 549–557, Sep. 2011, doi: 10.1038/nature10361.
- [12] T. Warne *et al.*, "Structure of a  $\beta$ 1-adrenergic G-protein-coupled receptor," *Nature*, vol. 454, no. 7203, pp. 486–491, Jul. 2008, doi: 10.1038/nature07101.
- [13] V.-P. Jaakola *et al.*, "The 2.6 Angstrom Crystal Structure of a Human A<sub>2A</sub> Adenosine Receptor Bound to an Antagonist," *Science (80-. )*, vol. 322, no. 5905, pp. 1211–1217, Nov. 2008, doi: 10.1126/science.1164772.
- [14] E. Y. T. Chien *et al.*, "Structure of the Human Dopamine D3 Receptor in Complex with a D2/D3 Selective Antagonist," *Science (80-. )*, vol. 330, no. 6007, pp. 1091–1095, Nov. 2010, doi: 10.1126/science.1197410.
- [15] S. Wang, T. Che, A. Levit, B. K. Shoichet, D. Wacker, and B. L. Roth, "Structure of the D2 dopamine receptor bound to the atypical antipsychotic drug risperidone," *Nature*, vol. 555, no. 7695, pp. 269–273, Mar. 2018, doi: 10.1038/nature25758.
- [16] L. F. Kolakowski, "GCRDb: a G-protein-coupled receptor database.," *Receptors Channels*, vol. 2, no. 1, pp. 1–7, 1994.

- [17] R. Fredriksson, M. C. Lagerström, L.-G. Lundin, and H. B. Schiöth, "The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogue Groups, and Fingerprints," *Mol. Pharmacol.*, vol. 63, no. 6, pp. 1256–1272, Jun. 2003, doi: 10.1124/mol.63.6.1256.
- [18] B. P. Ceresa and L. E. Limbird, "Mutation of an aspartate residue highly conserved among G-protein-coupled receptors results in nonreciprocal disruption of alpha 2-adrenergic receptor-G-protein interactions. A negative charge at amino acid residue 79 forecasts alpha 2A-adrenergic receptor sensitivity to allosteric modulation by monovalent cations and fully effective receptor/G-protein coupling.," *J. Biol. Chem.*, vol. 269, no. 47, pp. 29557–64, Nov. 1994.
- [19] G. E. Rovati, V. Capra, and R. R. Neubig, "The Highly Conserved DRY Motif of Class A G Protein-Coupled Receptors: Beyond the Ground State," *Mol. Pharmacol.*, vol. 71, no. 4, pp. 959–964, Apr. 2007, doi: 10.1124/mol.106.029470.
- [20] R. He, D. D. Browning, and R. D. Ye, "Differential Roles of the NPXXY Motif in Formyl Peptide Receptor Signaling," *J. Immunol.*, vol. 166, no. 6, pp. 4099–4105, Mar. 2001, doi: 10.4049/jimmunol.166.6.4099.
- [21] L. J. Miller, M. Dong, and K. G. Harikumar, "Ligand binding and activation of the secretin receptor, a prototypic family B G protein-coupled receptor," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 166, no. 1, pp. 18–26, May 2012, doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01463.x.
- [22] H. Wu *et al.*, "Structure of a Class C GPCR Metabotropic Glutamate Receptor 1 Bound to an Allosteric Modulator," *Science (80-. )*, vol. 344, no. 6179, pp. 58–64, Apr. 2014, doi: 10.1126/science.1249489.
- [23] E. J. Neer, "Heterotrimeric G proteins: Organizers of transmembrane signals," *Cell*, vol. 80, no. 2, pp. 249–257, Jan. 1995, doi: 10.1016/0092-8674(95)90407-7.
- [24] S. Pandey, "Heterotrimeric G-Protein Signaling in Plants," in *Sensory Biology of Plants*, Singapore: Springer Singapore, 2019, pp. 189–226.
- [25] G. Milligan and E. Kostenis, "Heterotrimeric G-proteins: a short history," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 147, no. S1, pp. S46–S55, Jan. 2006, doi: 10.1038/sj.bjp.0706405.
- [26] D. J. Spring and E. J. Neer, "A 14-amino acid region of the G protein gamma subunit is sufficient to confer selectivity of gamma binding to the beta subunit.," *J. Biol. Chem.*, vol. 269, no. 36, pp. 22882–22886, Sep. 1994, doi: 10.1016/S0021-9258(17)31727-1.
- [27] E. Hermans, "Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors," *Pharmacol. Ther.*, vol. 99, no. 1, pp. 25–44, Jul. 2003, doi: 10.1016/S0163-7258(03)00051-2.
- [28] D. K. Grammatopoulos, H. S. Randeve, M. A. Levine, K. A. Kanellopoulou, and E. W. Hillhouse, "Rat cerebral cortex corticotropin-releasing hormone receptors: evidence for receptor coupling to multiple G-proteins," *J. Neurochem.*, vol. 76, no. 2, pp. 509–519, Jan. 2001, doi: 10.1046/j.1471-4159.2001.00067.x.
- [29] A. Ulloa-Aguirre, D. Stanislaus, J. A. Janovick, and P. M. Conn, "Structure-Activity Relationships of G Protein-Coupled Receptors," *Arch. Med. Res.*, vol. 30, no. 6, pp. 420–435, Nov. 1999, doi: 10.1016/S0188-0128(99)00041-X.
- [30] J. Wess, "Molecular Basis of Receptor/G-Protein-Coupling Selectivity," *Pharmacol. Ther.*, vol. 80, no. 3, pp. 231–264, Dec. 1998, doi: 10.1016/S0163-7258(98)00030-8.

- [31] J. Wess, T. I. Bonner, F. Dörje, and M. R. Brann, "Delineation of muscarinic receptor domains conferring selectivity of coupling to guanine nucleotide-binding proteins and second messengers.," *Mol. Pharmacol.*, vol. 38, no. 4, pp. 517–23, Oct. 1990.
- [32] T. M. Cabrera-Vera *et al.*, "Insights into G Protein Structure, Function, and Regulation," *Endocr. Rev.*, vol. 24, no. 6, pp. 765–781, Dec. 2003, doi: 10.1210/er.2000-0026.
- [33] R. Taussig and G. Zimmermann, "Type-specific regulation of mammalian adenylyl cyclases by G protein pathways," 1997, pp. 81–98.
- [34] D. E. Logothetis, Y. Kurachi, J. Galper, E. J. Neer, and D. E. Clapham, "The  $\beta\gamma$  subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K<sup>+</sup> channel in heart," *Nature*, vol. 325, no. 6102, pp. 321–326, Jan. 1987, doi: 10.1038/325321a0.
- [35] C. Knall and G. L. Johnson, "G-Protein Regulatory Pathways: Rocketing into the Twenty-first Century," 1998.
- [36] R. J. Lefkowitz and S. K. Shenoy, "Transduction of Receptor Signals by  $\beta$ -Arrestins," *Science (80-. )*, vol. 308, no. 5721, pp. 512–517, Apr. 2005, doi: 10.1126/science.1109237.
- [37] L. M. Luttrell *et al.*, " $\beta$ -Arrestin-Dependent Formation of  $\beta_2$  Adrenergic Receptor-Src Protein Kinase Complexes," *Science (80-. )*, vol. 283, no. 5402, pp. 655–661, Jan. 1999, doi: 10.1126/science.283.5402.655.
- [38] C. Pfister *et al.*, "Retinal S Antigen Identified as the 48K Protein Regulating Light-Dependent Phosphodiesterase in Rods," *Science (80-. )*, vol. 228, no. 4701, pp. 891–893, May 1985, doi: 10.1126/science.2988124.
- [39] C. M. Craft, D. H. Whitmore, and A. F. Wiechmann, "Cone arrestin identified by targeting expression of a functional family.," *J. Biol. Chem.*, vol. 269, no. 6, pp. 4613–4619, Feb. 1994, doi: 10.1016/S0021-9258(17)41820-5.
- [40] M. J. Lohse, J. L. Benovic, J. Codina, M. G. Caron, and R. J. Lefkowitz, " $\beta$ -Arrestin: a Protein that Regulates  $\beta$ -adrenergic Receptor Function," *Science (80-. )*, vol. 248, no. 4962, pp. 1547–1550, Jun. 1990, doi: 10.1126/science.2163110.
- [41] H. Attramadal *et al.*, "Beta-arrestin2, a novel member of the arrestin/beta-arrestin gene family.," *J. Biol. Chem.*, vol. 267, no. 25, pp. 17882–90, Sep. 1992.
- [42] M. Nakagawa *et al.*, "Ascidian arrestin (Ci-arr), the origin of the visual and nonvisual arrestins of vertebrate.," *Eur. J. Biochem.*, vol. 269, no. 21, pp. 5112–5118, Nov. 2002, doi: 10.1046/j.1432-1033.2002.03240.x.
- [43] S. K. Milano, H. C. Pace, Y.-M. Kim, C. Brenner, and J. L. Benovic, "Scaffolding Functions of Arrestin-2 Revealed by Crystal Structure and Mutagenesis " *Biochemistry*, vol. 41, no. 10, pp. 3321–3328, Mar. 2002, doi: 10.1021/bi015905j.
- [44] J. Granzin, U. Wilden, H.-W. Choe, J. Labahn, B. Krafft, and G. Büldt, "X-ray crystal structure of arrestin from bovine rod outer segments," *Nature*, vol. 391, no. 6670, pp. 918–921, Feb. 1998, doi: 10.1038/36147.
- [45] V. V. Gurevich and E. V. Gurevich, "The structural basis of arrestin-mediated regulation of G-protein-coupled receptors," *Pharmacol. Ther.*, vol. 110, no. 3, pp. 465–502, Jun. 2006, doi: 10.1016/j.pharmthera.2005.09.008.
- [46] K. Min *et al.*, "Crystal Structure of  $\beta$ -Arrestin 2 in Complex with CXCR7 Phosphopeptide," *Structure*, vol. 28, no. 9, pp. 1014–1023.e4, Sep. 2020, doi: 10.1016/j.str.2020.06.002.



- [47] M. Han, V. V Gurevich, S. A. Vishnivetskiy, P. B. Sigler, and C. Schubert, "Crystal Structure of  $\beta$ -Arrestin at 1.9 Å," *Structure*, vol. 9, no. 9, pp. 869–880, Sep. 2001, doi: 10.1016/S0969-2126(01)00644-X.
- [48] X. E. Zhou *et al.*, "Identification of Phosphorylation Codes for Arrestin Recruitment by G Protein-Coupled Receptors," *Cell*, vol. 170, no. 3, pp. 457–469.e13, Jul. 2017, doi: 10.1016/j.cell.2017.07.002.
- [49] V. V Gurevich and E. V Gurevich, "The molecular acrobatics of arrestin activation," *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 25, no. 2, pp. 105–111, Feb. 2004, doi: 10.1016/j.tips.2003.12.008.
- [50] X. Song, S. Coffa, H. Fu, and V. V Gurevich, "How does arrestin assemble MAPKs into a signaling complex?," *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 1, pp. 685–695, Jan. 2009, doi: 10.1074/jbc.M806124200.
- [51] X. Deupi and B. Kobilka, "Activation of G Protein–Coupled Receptors," 2007, pp. 137–166.
- [52] I. D. Alves *et al.*, "Selectivity, Cooperativity, and Reciprocity in the Interactions between the  $\delta$ -Opioid Receptor, Its Ligands, and G-proteins," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 43, pp. 44673–44682, Oct. 2004, doi: 10.1074/jbc.M404713200.
- [53] P. Ghanouni *et al.*, "Functionally Different Agonists Induce Distinct Conformations in the G Protein Coupling Domain of the  $\beta$ 2Adrenergic Receptor," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 27, pp. 24433–24436, Jan. 2001, doi: 10.1074/jbc.C100162200.
- [54] P. R. Robinson, G. B. Cohen, E. A. Zhukovsky, and D. D. Oprian, "Constitutively active mutants of rhodopsin," *Neuron*, vol. 9, no. 4, pp. 719–725, Oct. 1992, doi: 10.1016/0896-6273(92)90034-B.
- [55] R. A. Bond and A. P. IJerman, "Recent developments in constitutive receptor activity and inverse agonism, and their potential for GPCR drug discovery," *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 27, no. 2, pp. 92–96, Feb. 2006, doi: 10.1016/j.tips.2005.12.007.
- [56] D. Wacker, R. C. Stevens, and B. L. Roth, "How Ligands Illuminate GPCR Molecular Pharmacology," *Cell*, vol. 170, no. 3, pp. 414–427, Jul. 2017, doi: 10.1016/j.cell.2017.07.009.
- [57] T. Kenakin, "Functional Selectivity through Protean and Biased Agonism: Who Steers the Ship?," *Mol. Pharmacol.*, vol. 72, no. 6, pp. 1393–1401, Dec. 2007, doi: 10.1124/mol.107.040352.
- [58] Z. Rankovic, T. F. Brust, and L. M. Bohn, "Biased agonism: An emerging paradigm in GPCR drug discovery," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 26, no. 2, pp. 241–250, Jan. 2016, doi: 10.1016/j.bmcl.2015.12.024.
- [59] S. M. DeWire and J. D. Violin, "Biased Ligands for Better Cardiovascular Drugs," *Circ. Res.*, vol. 109, no. 2, pp. 205–216, Jul. 2011, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.231308.
- [60] M. T. Drake, S. K. Shenoy, and R. J. Lefkowitz, "Trafficking of G Protein–Coupled Receptors," *Circ. Res.*, vol. 99, no. 6, pp. 570–582, Sep. 2006, doi: 10.1161/01.RES.0000242563.47507.ce.
- [61] N. A. McDonald, C. M. Henstridge, C. N. Connolly, and A. J. Irving, "An Essential Role for Constitutive Endocytosis, but Not Activity, in the Axonal Targeting of the CB<sub>1</sub> Cannabinoid Receptor," *Mol. Pharmacol.*, vol. 71, no. 4, pp. 976–984, Apr. 2007, doi: 10.1124/mol.106.029348.
- [62] J. A. Pitcher, N. J. Freedman, and R. J. Lefkowitz, "G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR KINASES," 1998. [Online]. Available: [www.annualreviews.org](http://www.annualreviews.org).

- [63] A. B. Tobin, "G-protein-coupled receptor phosphorylation: where, when and by whom," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 153, no. S1, pp. S167–S176, Mar. 2008, doi: 10.1038/sj.bjp.0707662.
- [64] J. L. Benovic, F. Mayor, R. L. Somers, M. G. Caron, and R. J. Lefkowitz, "Light-dependent phosphorylation of rhodopsin by  $\beta$ -adrenergic receptor kinase," *Nature*, vol. 321, no. 6073, pp. 869–872, Jun. 1986, doi: 10.1038/321869a0.
- [65] S. S. G. Ferguson, "Evolving Concepts in G Protein-Coupled Receptor Endocytosis: The Role in Receptor Desensitization and Signaling," 2001. [Online]. Available: <http://pharmrev.aspetjournals.org>.
- [66] M. Bouvier *et al.*, "Removal of phosphorylation sites from the beta 2-adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization," *Nat. Publ. Gr.*, 1988.
- [67] H. NAKATA, K. KAMEYAMA, K. HAGA, and T. HAGA, "Location of agonist-dependent-phosphorylation sites in the third intracellular loop of muscarinic acetylcholine receptors (m2 subtype)," *Eur. J. Biochem.*, vol. 220, no. 1, pp. 29–36, Feb. 1994, doi: 10.1111/j.1432-1033.1994.tb18595.x.
- [68] A. Mann *et al.*, "New phosphosite-specific antibodies to unravel the role of GRK phosphorylation in dopamine D2 receptor regulation and signaling," *Sci. Rep.*, vol. 11, no. 1, p. 8288, Dec. 2021, doi: 10.1038/s41598-021-87417-2.
- [69] J. A. Pitcher *et al.*, "Role of  $\beta\gamma$  Subunits of G Proteins in Targeting the  $\beta$ -Adrenergic Receptor Kinase to Membrane-Bound Receptors," *Science (80-. )*, vol. 257, no. 5074, pp. 1264–1267, Aug. 1992, doi: 10.1126/science.1325672.
- [70] STEPHEN S. G. FERGUSON, "Evolving Concepts in G Protein-Coupled Receptor Endocytosis: The Role in Receptor Desensitization and Signaling," *Pharmacol. Rev.*, 2001.
- [71] N. Yuan, J. Friedman, B. S. Whaley, and R. B. Clark, "cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C consensus site mutations of the beta-adrenergic receptor. Effect on desensitization and stimulation of adenylyl cyclase.," *J. Biol. Chem.*, vol. 269, no. 37, pp. 23032–8, Sep. 1994.
- [72] T. M. Tran, J. Friedman, E. Qunaibi, F. Baameur, R. H. Moore, and R. B. Clark, "Characterization of Agonist Stimulation of cAMP-Dependent Protein Kinase and G Protein-Coupled Receptor Kinase Phosphorylation of the  $\beta_2$ -Adrenergic Receptor Using Phosphoserine-Specific Antibodies," *Mol. Pharmacol.*, vol. 65, no. 1, pp. 196–206, Jan. 2004, doi: 10.1124/mol.65.1.196.
- [73] E. Ungewickell and D. Branton, "Assembly units of clathrin coats," *Nature*, vol. 289, no. 5796, pp. 420–422, Jan. 1981, doi: 10.1038/289420a0.
- [74] C. J. Smith, "Clathrin coats at 21Å resolution: a cellular assembly designed to recycle multiple membrane receptors," *EMBO J.*, vol. 17, no. 17, pp. 4943–4953, Sep. 1998, doi: 10.1093/emboj/17.17.4943.
- [75] M. M. PERRY and A. B. GILBERT, "Electron microscopy imaging of clathrin endocytosis," *Cell Sci.*, 1979.
- [76] B. M. Collins, A. J. McCoy, H. M. Kent, P. R. Evans, and D. J. Owen, "Molecular Architecture and Functional Model of the Endocytic AP2 Complex," *Cell*, vol. 109, no. 4, pp. 523–535, May 2002, doi: 10.1016/S0092-8674(02)00735-3.
- [77] C. Rodemer and V. Haucke, "Clathrin/AP-2-Dependent Endocytosis: A Novel Playground for the Pharmacological Toolbox?," 2008, pp. 105–122.

- [78] E. M. Schmid *et al.*, "Role of the AP2  $\beta$ -Appendage Hub in Recruiting Partners for Clathrin-Coated Vesicle Assembly," *PLoS Biol.*, vol. 4, no. 9, p. e262, Aug. 2006, doi: 10.1371/journal.pbio.0040262.
- [79] B. Marks *et al.*, "GTPase activity of dynamin and resulting conformation change are essential for endocytosis," *Nature*, vol. 410, no. 6825, pp. 231–235, Mar. 2001, doi: 10.1038/35065645.
- [80] S. L. Schmid and V. A. Frolov, "Dynamin: Functional Design of a Membrane Fission Catalyst," *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 27, no. 1, pp. 79–105, Nov. 2011, doi: 10.1146/annurev-cellbio-100109-104016.
- [81] R. J. Lefkowitz, K. Rajagopal, and E. J. Whalen, "New Roles for  $\beta$ -Arrestins in Cell Signaling: Not Just for Seven-Transmembrane Receptors," *Mol. Cell*, vol. 24, no. 5, pp. 643–652, Dec. 2006, doi: 10.1016/j.molcel.2006.11.007.
- [82] D. S. Kang, R. C. Kern, M. A. Puthenveedu, M. von Zastrow, J. C. Williams, and J. L. Benovic, "Structure of an Arrestin2-Clathrin Complex Reveals a Novel Clathrin Binding Domain That Modulates Receptor Trafficking," *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 43, pp. 29860–29872, Oct. 2009, doi: 10.1074/jbc.M109.023366.
- [83] Y.-M. Kim and J. L. Benovic, "Differential Roles of Arrestin-2 Interaction with Clathrin and Adaptor Protein 2 in G Protein-coupled Receptor Trafficking," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 34, pp. 30760–30768, Aug. 2002, doi: 10.1074/jbc.M204528200.
- [84] J. G. Krupnick, F. Santini, A. W. Gagnon, J. H. Keen, and J. L. Benovic, "Modulation of the Arrestin-Clathrin Interaction in Cells," *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 51, pp. 32507–32512, Dec. 1997, doi: 10.1074/jbc.272.51.32507.
- [85] A. Burtey *et al.*, "The Conserved Isoleucine-Valine-Phenylalanine Motif Couples Activation State and Endocytic Functions of  $\beta$ -Arrestins," *Traffic*, vol. 8, no. 7, pp. 914–931, Jul. 2007, doi: 10.1111/j.1600-0854.2007.00578.x.
- [86] C. L. Mayberry, A. N. Soucy, C. R. Lajoie, J. K. DuShane, and M. S. Maginnis, "JC Polyomavirus Entry by Clathrin-Mediated Endocytosis Is Driven by  $\beta$ -Arrestin," *J. Virol.*, vol. 93, no. 8, Apr. 2019, doi: 10.1128/JVI.01948-18.
- [87] E. M. Smyth, S. C. Austin, M. P. Reilly, and G. A. FitzGerald, "Internalization and Sequestration of the Human Prostacyclin Receptor," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 41, pp. 32037–32045, Oct. 2000, doi: 10.1074/jbc.M003873200.
- [88] K. B. Lee, R. Pals-Rylaarsdam, J. L. Benovic, and M. M. Hosey, "Arrestin-independent Internalization of the m1, m3, and m4 Subtypes of Muscarinic Cholinergic Receptors," *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 21, pp. 12967–12972, May 1998, doi: 10.1074/jbc.273.21.12967.
- [89] R. Pals-Rylaarsdam, V. V. Gurevich, K. B. Lee, J. A. Ptasienski, J. L. Benovic, and M. M. Hosey, "Internalization of the m2 Muscarinic Acetylcholine Receptor," *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 38, pp. 23682–23689, Sep. 1997, doi: 10.1074/jbc.272.38.23682.
- [90] A. Bhatnagar, D. L. Willins, J. A. Gray, J. Woods, J. L. Benovic, and B. L. Roth, "The Dynamin-dependent, Arrestin-independent Internalization of 5-Hydroxytryptamine 2A (5-HT<sub>2A</sub>) Serotonin Receptors Reveals Differential Sorting of Arrestins and 5-HT<sub>2A</sub> Receptors during Endocytosis," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 11, pp. 8269–8277, Mar. 2001, doi: 10.1074/jbc.M006968200.
- [91] A. Fraile-Ramos, T. A. Kohout, M. Waldhoer, and M. Marsh, "Endocytosis of the Viral Chemokine Receptor US28 Does Not Require Beta-Arrestins But Is Dependent on the Clathrin-Mediated Pathway," *Traffic*, vol. 4, no. 4, pp. 243–253, Apr. 2003, doi: 10.1034/j.1600-0854.2003.00079.x.

- [92] J. A. Gray, A. Bhatnagar, V. V. Gurevich, and B. L. Roth, "The Interaction of a Constitutively Active Arrestin with the Arrestin-Insensitive 5-HT<sub>2A</sub> Receptor Induces Agonist-Independent Internalization," *Mol. Pharmacol.*, vol. 63, no. 5, pp. 961–972, May 2003, doi: 10.1124/mol.63.5.961.
- [93] J. K. L. Walker, R. T. Premont, L. S. Barak, M. G. Caron, and M. A. Shetzline, "Properties of Secretin Receptor Internalization Differ from Those of the  $\beta$ 2-Adrenergic Receptor," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 44, pp. 31515–31523, Oct. 1999, doi: 10.1074/jbc.274.44.31515.
- [94] I. Rapoport *et al.*, "Regulatory interactions in the recognition of endocytic sorting signals by AP-2 complexes," *EMBO J.*, vol. 16, no. 9, pp. 2240–2250, May 1997, doi: 10.1093/emboj/16.9.2240.
- [95] B. Chini and M. Parenti, "G-protein coupled receptors in lipid rafts and caveolae: how, when and why do they go there?," *J. Mol. Endocrinol.*, vol. 32, no. 2, pp. 325–338, Apr. 2004, doi: 10.1677/jme.0.0320325.
- [96] T. Okamoto, A. Schlegel, P. E. Scherer, and M. P. Lisanti, "Caveolins, a Family of Scaffolding Proteins for Organizing 'Preassembled Signaling Complexes' at the Plasma Membrane," *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 10, pp. 5419–5422, Mar. 1998, doi: 10.1074/jbc.273.10.5419.
- [97] P. Candela *et al.*, "Physiological Pathway for Low-Density Lipoproteins across the Blood-Brain Barrier: Transcytosis through Brain Capillary Endothelial Cells In Vitro," *Endothelium*, vol. 15, no. 5–6, pp. 254–264, Jan. 2008, doi: 10.1080/10623320802487759.
- [98] S. E. W. A. M. P. L. BABAK RAZANI, "Caveolae: From Cell Biology to Animal Physiology," *Pharmacol. Rev.*, 2002.
- [99] N. J. Freedman, A. S. Ament, M. Oppermann, R. H. Stoffel, S. T. Exum, and R. J. Lefkowitz, "Phosphorylation and Desensitization of Human Endothelin A and B Receptors," *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 28, pp. 17734–17743, Jul. 1997, doi: 10.1074/jbc.272.28.17734.
- [100] M. Chun, U. K. Liyanage, M. P. Lisanti, and H. F. Lodish, "Signal transduction of a G protein-coupled receptor in caveolae: colocalization of endothelin and its receptor with caveolin.," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 91, no. 24, pp. 11728–11732, Nov. 1994, doi: 10.1073/pnas.91.24.11728.
- [101] M. Scarselli and J. G. Donaldson, "Constitutive Internalization of G Protein-coupled Receptors and G Proteins via Clathrin-independent Endocytosis," *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 6, pp. 3577–3585, Feb. 2009, doi: 10.1074/jbc.M806819200.
- [102] E. Kelly, C. P. Bailey, and G. Henderson, "Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 153, no. S1, pp. S379–S388, Mar. 2008, doi: 10.1038/sj.bjp.0707604.
- [103] A. C. Magalhaes, H. Dunn, and S. S. Ferguson, "Regulation of GPCR activity, trafficking and localization by GPCR-interacting proteins," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 165, no. 6, pp. 1717–1736, Mar. 2012, doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01552.x.
- [104] C. Raiborg and H. Stenmark, "The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins," *Nature*, vol. 458, no. 7237, pp. 445–452, Mar. 2009, doi: 10.1038/nature07961.
- [105] J. L. Whistler *et al.*, "Modulation of Postendocytic Sorting of G Protein-Coupled Receptors," *Science (80-. )*, vol. 297, no. 5581, pp. 615–620, Jul. 2002, doi: 10.1126/science.1073308.

- [106] M. Tanowitz and M. von Zastrow, "Ubiquitination-independent Trafficking of G Protein-coupled Receptors to Lysosomes," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 52, pp. 50219–50222, Dec. 2002, doi: 10.1074/jbc.C200536200.
- [107] P. Temkin, B. Lauffer, S. Jäger, P. Cimermancic, N. J. Krogan, and M. von Zastrow, "SNX27 mediates retromer tubule entry and endosome-to-plasma membrane trafficking of signalling receptors," *Nat. Cell Biol.*, vol. 13, no. 6, pp. 715–721, Jun. 2011, doi: 10.1038/ncb2252.
- [108] M. von Zastrow, "Proteomic Approaches to Investigate Regulated Trafficking and Signaling of G Protein-Coupled Receptors," *Mol. Pharmacol.*, vol. 99, no. 5, pp. 392–398, May 2021, doi: 10.1124/molpharm.120.000178.
- [109] R. M. Gage, E. A. Matveeva, S. W. Whiteheart, and M. von Zastrow, "Type I PDZ Ligands Are Sufficient to Promote Rapid Recycling of G Protein-coupled Receptors Independent of Binding to N-Ethylmaleimide-sensitive Factor," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 5, pp. 3305–3313, Feb. 2005, doi: 10.1074/jbc.M406934200.
- [110] K. A. MONTAGU, "Catechol Compounds in Rat Tissues and in Brains of Different Animals," *Nature*, Aug. 1957.
- [111] J. D. Berke, "What does dopamine mean?," *Nat. Neurosci.*, vol. 21, no. 6, pp. 787–793, Jun. 2018, doi: 10.1038/s41593-018-0152-y.
- [112] S. C. Daubner, T. Le, and S. Wang, "Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 508, no. 1, pp. 1–12, Apr. 2011, doi: 10.1016/j.abb.2010.12.017.
- [113] W. J. van den Brink, S. Palic, I. Köhler, and E. C. M. de Lange, "Access to the CNS: Biomarker Strategies for Dopaminergic Treatments," *Pharm. Res.*, vol. 35, no. 3, p. 64, Mar. 2018, doi: 10.1007/s11095-017-2333-x.
- [114] U. Ungerstedt, "Striatal Dopamine Release after Amphetamine or Nerve Degeneration Revealed by Rotational Behaviour," *Acta Physiol. Scand.*, vol. 82, no. S367, pp. 49–68, Dec. 1971, doi: 10.1111/j.1365-201X.1971.tb10999.x.
- [115] J. W. Keibian, G. L. Petzold, and P. Greengard, "Dopamine-sensitive adenylate cyclase in caudate nucleus of rat brain, and its similarity to the 'dopamine receptor,'" *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 69, no. 8, pp. 2145–2149, Aug. 1972, doi: 10.1073/pnas.69.8.2145.
- [116] K. A. Neve, "Dopamine Receptors," in *Encyclopedia of Biological Chemistry*, Elsevier, 2013, pp. 169–173.
- [117] Y. Wang, T. Sasaoka, and M. T. Dang, "A Molecular Genetic Approach to Uncovering the Differential Functions of Dopamine D2 Receptor Isoforms," 2013, pp. 181–200.
- [118] J. Guiramand, J.-P. Montmayeur, J. Ceraline, M. Bhatia, and E. Borrelli, "Alternative Splicing of the Dopamine D2 Receptor Directs Specificity of Coupling to G-proteins," *J. Biol. Chem.*, vol. 270, no. 13, pp. 7354–7358, Mar. 1995, doi: 10.1074/jbc.270.13.7354.
- [119] J. P. Montmayeur, J. Guiramand, and E. Borrelli, "Preferential coupling between dopamine D2 receptors and G-proteins.," *Mol. Endocrinol.*, vol. 7, no. 2, pp. 161–170, Feb. 1993, doi: 10.1210/mend.7.2.7682286.
- [120] D. Radl, M. Chiacchiarretta, R. G. Lewis, K. Brami-Cherrier, L. Arcuri, and E. Borrelli, "Differential regulation of striatal motor behavior and related cellular responses by dopamine D2L and D2S isoforms," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 115, no. 1, pp. 198–203, Jan. 2018, doi: 10.1073/pnas.1717194115.

- [121] R. T. Kendall and S. E. Senogles, "Investigation of the alternatively spliced insert region of the D2L dopamine receptor by epitope substitution," *Neurosci. Lett.*, vol. 393, no. 2–3, pp. 155–159, Jan. 2006, doi: 10.1016/j.neulet.2005.09.057.
- [122] D. K. Grandy *et al.*, "Cloning of the cDNA and gene for a human D2 dopamine receptor.," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 86, no. 24, pp. 9762–9766, Dec. 1989, doi: 10.1073/pnas.86.24.9762.
- [123] D. Im *et al.*, "Structure of the dopamine D2 receptor in complex with the antipsychotic drug spiperone," *Nat. Commun.*, vol. 11, no. 1, p. 6442, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41467-020-20221-0.
- [124] L. Fan *et al.*, "Haloperidol bound D2 dopamine receptor structure inspired the discovery of subtype selective ligands," *Nat. Commun.*, vol. 11, no. 1, p. 1074, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41467-020-14884-y.
- [125] J. Yin *et al.*, "Structure of a D2 dopamine receptor–G-protein complex in a lipid membrane," *Nature*, 2020, doi: 10.1038/s41586-020-2379-5.
- [126] J. M. Beaulieu and R. R. Gainetdinov, "The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors," *Pharmacological Reviews*, vol. 63, no. 1, pp. 182–217, Mar. 2011, doi: 10.1124/pr.110.002642.
- [127] K. Ito, T. Haga, J. Lamah, and W. S. Âe, "Sequestration of dopamine D2 receptors depends on coexpression of G-protein-coupled receptor kinases 2 or 5," 1999.
- [128] N. Ozaki, K. Moroi, T. Kadota, S. Suzuki, and K. Kadota, "Dopamine D1 and D2 Receptors and Their Signal System Present in Coated Vesicles Prepared from Bovine Striatal Tissue," *J. Neurochem.*, vol. 62, no. 2, pp. 582–591, Nov. 2002, doi: 10.1046/j.1471-4159.1994.62020582.x.
- [129] M. Skinbjerg *et al.*, "Arrestin3 mediates D2 dopamine receptor internalization," *Synapse*, vol. 63, no. 7, pp. 621–624, Jul. 2009, doi: 10.1002/syn.20636.
- [130] C. A. Marsden, "Dopamine: the rewarding years," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 147, no. S1, pp. S136–S144, Jan. 2006, doi: 10.1038/sj.bjp.0706473.
- [131] S. Moritz, B. C. Schneider, J. Peth, S. Arlt, and L. Jelinek, "Metacognitive Training for Depression (D-MCT) reduces false memories in depression. A randomized controlled trial," *Eur. Psychiatry*, vol. 53, pp. 46–51, Sep. 2018, doi: 10.1016/j.eurpsy.2018.05.010.
- [132] N. M. Urs, S. M. Peterson, and M. G. Caron, "New Concepts in Dopamine D2 Receptor Biased Signaling and Implications for Schizophrenia Therapy," *Biol. Psychiatry*, vol. 81, no. 1, pp. 78–85, Jan. 2017, doi: 10.1016/j.biopsych.2016.10.011.
- [133] A. H. Tran *et al.*, "Altered accumbens neural response to prediction of reward associated with place in dopamine D2 receptor knockout mice," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 99, no. 13, pp. 8986–8991, Jun. 2002, doi: 10.1073/pnas.132284599.
- [134] P. Trifilieff *et al.*, "Increasing dopamine D2 receptor expression in the adult nucleus accumbens enhances motivation," *Mol. Psychiatry*, vol. 18, no. 9, pp. 1025–1033, Sep. 2013, doi: 10.1038/mp.2013.57.
- [135] E. Messamore and R. K. McNamara, "Detection and treatment of omega-3 fatty acid deficiency in psychiatric practice: Rationale and implementation," *Lipids Health Dis.*, vol. 15, no. 1, pp. 1–13, 2016, doi: 10.1186/s12944-016-0196-5.
- [136] E. D. Korn, "Structure and Function of the Plasma Membrane," *J. Gen. Physiol.*, vol. 52, no. 1, pp. 257–278, Jul. 1968, doi: 10.1085/jgp.52.1.257.

- [137] S. Vanni, L. Riccardi, G. Palermo, and M. De Vivo, "Structure and Dynamics of the Acyl Chains in the Membrane Trafficking and Enzymatic Processing of Lipids," *Acc. Chem. Res.*, vol. 52, no. 11, pp. 3087–3096, Nov. 2019, doi: 10.1021/acs.accounts.9b00134.
- [138] S. Sonnino and A. Prinetti, "Membrane Domains and the Lipid Raft Concept," *Curr. Med. Chem.*, vol. 20, no. 1, pp. 4–21, Dec. 2012, doi: 10.2174/0929867311302010004.
- [139] P. A. Janmey and P. K. J. Kinnunen, "Biophysical properties of lipids and dynamic membranes," *Trends Cell Biol.*, vol. 16, no. 10, pp. 538–546, Oct. 2006, doi: 10.1016/j.tcb.2006.08.009.
- [140] B. Fadeel and D. Xue, "The ins and outs of phospholipid asymmetry in the plasma membrane: Roles in health and disease," *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 44, no. 5, pp. 264–277, 2009, doi: 10.1080/10409230903193307.
- [141] J. H. Lorent *et al.*, "Plasma membranes are asymmetric in lipid unsaturation, packing and protein shape," *Nat. Chem. Biol.*, vol. 16, no. 6, pp. 644–652, Jun. 2020, doi: 10.1038/s41589-020-0529-6.
- [142] S. Takamori *et al.*, "Molecular Anatomy of a Trafficking Organelle," *Cell*, vol. 127, no. 4, pp. 831–846, Nov. 2006, doi: 10.1016/j.cell.2006.10.030.
- [143] R. P. Bazinet and S. Layé, "Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 15, no. 12, pp. 771–785, Dec. 2014, doi: 10.1038/nrn3820.
- [144] S. A. Moore, "Polyunsaturated Fatty Acid Synthesis and Release," *J. Mol. Neurosci.*, vol. 16, no. 2–3, pp. 195–200, 2001, doi: 10.1385/JMN:16:2-3:195.
- [145] R. K. Saini and Y.-S. Keum, "Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance — A review," *Life Sci.*, vol. 203, pp. 255–267, Jun. 2018, doi: 10.1016/j.lfs.2018.04.049.
- [146] A. Yamashita *et al.*, "Acyltransferases and transacylases that determine the fatty acid composition of glycerolipids and the metabolism of bioactive lipid mediators in mammalian cells and model organisms," *Prog. Lipid Res.*, vol. 53, pp. 18–81, Jan. 2014, doi: 10.1016/j.plipres.2013.10.001.
- [147] A. Yamashita *et al.*, "Glycerophosphate/Acylglycerophosphate Acyltransferases," *Biology (Basel)*, vol. 3, no. 4, pp. 801–830, Nov. 2014, doi: 10.3390/biology3040801.
- [148] F. Elinder and S. I. Liin, "Actions and Mechanisms of Polyunsaturated Fatty Acids on Voltage-Gated Ion Channels," *Front. Physiol.*, vol. 8, Feb. 2017, doi: 10.3389/fphys.2017.00043.
- [149] L. Wang *et al.*, "Metabolic Interactions between the Lands Cycle and the Kennedy Pathway of Glycerolipid Synthesis in *Arabidopsis* Developing Seeds," *Plant Cell*, vol. 24, no. 11, pp. 4652–4669, Nov. 2012, doi: 10.1105/tpc.112.104604.
- [150] V. A. Bankaitis, "The Cirque du Soleil of Golgi membrane dynamics," *J. Cell Biol.*, vol. 186, no. 2, pp. 169–171, Jul. 2009, doi: 10.1083/jcb.200907008.
- [151] D. A. Los and N. Murata, "Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1666, no. 1–2, pp. 142–157, Nov. 2004, doi: 10.1016/j.bbamem.2004.08.002.
- [152] K. M. J. H. I. T. H. R. B. O. G. M. Jesper Lemmich, "The effect of cholesterol in small amounts on lipid-bilayer softness in the region of the main phase transition," *Eur. Biophys. J.*, 1997.

- [153] V. A. M. Villar, S. Cuevas, X. Zheng, and P. A. Jose, "Localization and signaling of GPCRs in lipid rafts," in *Methods Cell Biol*, 2016, pp. 3–23.
- [154] S. R. Wassall and W. Stillwell, "Docosahexaenoic acid domains: the ultimate non-raft membrane domain," *Chem. Phys. Lipids*, vol. 153, no. 1, pp. 57–63, May 2008, doi: 10.1016/j.chemphyslip.2008.02.010.
- [155] S. R. Wassall and W. Stillwell, "Polyunsaturated fatty acid–cholesterol interactions: Domain formation in membranes," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1788, no. 1, pp. 24–32, Jan. 2009, doi: 10.1016/j.bbamem.2008.10.011.
- [156] K. R. Levental *et al.*, "Polyunsaturated Lipids Regulate Membrane Domain Stability by Tuning Membrane Order," *Biophys. J.*, vol. 110, no. 8, pp. 1800–1810, Apr. 2016, doi: 10.1016/j.bpj.2016.03.012.
- [157] W. Stillwell *et al.*, "Docosahexaenoic acid affects cell signaling by altering lipid rafts," *Reprod. Nutr. Dev.*, vol. 45, no. 5, pp. 559–579, 2005, doi: 10.1051/rnd:2005046i.
- [158] S. R. Shaikh, "Biophysical and biochemical mechanisms by which dietary N-3 polyunsaturated fatty acids from fish oil disrupt membrane lipid rafts," *J. Nutr. Biochem.*, vol. 23, no. 2, pp. 101–105, Feb. 2012, doi: 10.1016/j.jnutbio.2011.07.001.
- [159] G. R. Ravacci *et al.*, "Lipid raft disruption by docosahexaenoic acid induces apoptosis in transformed human mammary luminal epithelial cells harboring HER-2 overexpression," *J. Nutr. Biochem.*, vol. 24, no. 3, pp. 505–515, Mar. 2013, doi: 10.1016/j.jnutbio.2012.02.001.
- [160] M. Pinot *et al.*, "Polyunsaturated phospholipids facilitate membrane deformation and fission by endocytic proteins," *Science (80- )*, vol. 345, no. 6197, pp. 693–697, Aug. 2014, doi: 10.1126/science.1255288.
- [161] M. M. Manni, M. L. Tiberti, S. Pagnotta, H. Lè Ne Barelli, R. Gautier, and B. Antonny, "Acyl chain asymmetry and polyunsaturation of brain phospholipids facilitate membrane vesiculation without leakage," doi: 10.7554/eLife.34394.001.
- [162] M. L. Tiberti, B. Antonny, and R. Gautier, "The transbilayer distribution of polyunsaturated phospholipids determines their facilitating effect on membrane deformation," *Soft Matter*, vol. 16, no. 7, pp. 1722–1730, Feb. 2020, doi: 10.1039/c9sm02107h.
- [163] P. S. Sastry, "Lipids of nervous tissue: Composition and metabolism," *Prog. Lipid Res.*, vol. 24, no. 2, pp. 69–176, Jan. 1985, doi: 10.1016/0163-7827(85)90011-6.
- [164] R. K. McNamara and S. E. Carlson, "Role of omega-3 fatty acids in brain development and function: Potential implications for the pathogenesis and prevention of psychopathology," *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fat. Acids*, vol. 75, no. 4–5, pp. 329–349, Oct. 2006, doi: 10.1016/j.plefa.2006.07.010.
- [165] C. Joffre, "Polyunsaturated Fatty Acid Metabolism in the Brain and Brain Cells," in *Feed Your Mind - How Does Nutrition Modulate Brain Function throughout Life?*, IntechOpen, 2019.
- [166] D. Ma *et al.*, "Cellular localization of epidermal-type and brain-type fatty acid-binding proteins in adult hippocampus and their response to cerebral ischemia," *Hippocampus*, p. NA-NA, 2009, doi: 10.1002/hipo.20682.
- [167] J. Edmond, "Essential Polyunsaturated Fatty Acids and the Barrier to the Brain: The Components of a Model for Transport," *J. Mol. Neurosci.*, vol. 16, no. 2–3, pp. 181–194, 2001, doi: 10.1385/JMN:16:2-3:181.



- [168] J. A. Hamilton and K. Brunaldi, "A Model for Fatty Acid Transport into the Brain," *J. Mol. Neurosci.*, vol. 33, no. 1, pp. 12–17, Sep. 2007, doi: 10.1007/s12031-007-0050-3.
- [169] M. Montecillo-Aguado *et al.*, "Importance of the Role of  $\omega$ -3 and  $\omega$ -6 Polyunsaturated Fatty Acids in the Progression of Brain Cancer," *Brain Sci.*, vol. 10, no. 6, p. 381, Jun. 2020, doi: 10.3390/brainsci10060381.
- [170] M. Huan *et al.*, "Suicide attempt and n-3 fatty acid levels in red blood cells: A case control study in china," *Biol. Psychiatry*, vol. 56, no. 7, pp. 490–496, Oct. 2004, doi: 10.1016/j.biopsych.2004.06.028.
- [171] M. R. Garland *et al.*, "Lipids and essential fatty acids in patients presenting with self-harm," *Br. J. Psychiatry*, vol. 190, no. 2, pp. 112–117, Feb. 2007, doi: 10.1192/bjp.bp.105.019562.
- [172] R. K. McNamara *et al.*, "Abnormalities in the fatty acid composition of the postmortem orbitofrontal cortex of schizophrenic patients: Gender differences and partial normalization with antipsychotic medications," *Schizophr. Res.*, vol. 91, no. 1–3, pp. 37–50, Mar. 2007, doi: 10.1016/j.schres.2006.11.027.
- [173] R. K. McNamara *et al.*, "Deficits in docosahexaenoic acid and associated elevations in the metabolism of arachidonic acid and saturated fatty acids in the postmortem orbitofrontal cortex of patients with bipolar disorder," *Psychiatry Res.*, vol. 160, no. 3, pp. 285–299, Sep. 2008, doi: 10.1016/j.psychres.2007.08.021.
- [174] R. K. McNamara *et al.*, "Selective Deficits in the Omega-3 Fatty Acid Docosahexaenoic Acid in the Postmortem Orbitofrontal Cortex of Patients with Major Depressive Disorder," *Biol. Psychiatry*, vol. 62, no. 1, pp. 17–24, Jul. 2007, doi: 10.1016/j.biopsych.2006.08.026.
- [175] S.-W. Kim *et al.*, "Relationship between Erythrocyte Fatty Acid Composition and Psychopathology in the Vienna Omega-3 Study," *PLoS One*, vol. 11, no. 3, p. e0151417, Mar. 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0151417.
- [176] M. P. Freeman and M. H. Rapaport, "Omega-3 Fatty Acids and Depression: From Cellular Mechanisms to Clinical Care," *J. Clin. Psychiatry*, vol. 72, no. 02, pp. 258–259, Feb. 2011, doi: 10.4088/JCP.11ac06830.
- [177] H. Braarud *et al.*, "Maternal DHA Status during Pregnancy Has a Positive Impact on Infant Problem Solving: A Norwegian Prospective Observation Study," *Nutrients*, vol. 10, no. 5, p. 529, Apr. 2018, doi: 10.3390/nu10050529.
- [178] E. M. Loomans, B. R. H. Van den Bergh, M. Schelling, T. G. M. Vrijkotte, and M. van Eijsden, "Maternal Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acid Status during Early Pregnancy and Children's Risk of Problem Behavior at Age 5-6 Years," *J. Pediatr.*, vol. 164, no. 4, pp. 762–768, Apr. 2014, doi: 10.1016/j.jpeds.2013.11.069.
- [179] I. Fedorova and N. Salem, "Omega-3 fatty acids and rodent behavior," *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fat. Acids*, vol. 75, no. 4–5, pp. 271–289, Oct. 2006, doi: 10.1016/j.plefa.2006.07.006.
- [180] S.-Y. Lim, J. Hoshiba, T. Moriguchi, and N. Salem, "N-3 Fatty Acid Deficiency Induced by a Modified Artificial Rearing Method Leads to Poorer Performance in Spatial Learning Tasks," *Pediatr. Res.*, vol. 58, no. 4, pp. 741–748, Oct. 2005, doi: 10.1203/01.PDR.0000180547.46725.CC.
- [181] F. Ducrocq *et al.*, "Causal Link between n-3 Polyunsaturated Fatty Acid Deficiency and Motivation Deficits," *Cell Metab.*, Mar. 2020, doi: 10.1016/j.cmet.2020.02.012.

- [182] J. E. Mellor, J. D. E. Laugharne, and M. Peet, "Schizophrenic symptoms and dietary intake of n-3 fatty acids," *Schizophr. Res.*, vol. 18, no. 1, pp. 85–86, Dec. 1995, doi: 10.1016/0920-9964(95)00084-4.
- [183] G. P. Amminger *et al.*, "Long-Chain  $\omega$ -3 Fatty Acids for Indicated Prevention of Psychotic Disorders," *Arch. Gen. Psychiatry*, vol. 67, no. 2, p. 146, Feb. 2010, doi: 10.1001/archgenpsychiatry.2009.192.
- [184] A. T. Chen, J. T. Chibnall, and H. A. Nasrallah, "A meta-analysis of placebo-controlled trials of omega-3 fatty acid augmentation in schizophrenia: Possible stage-specific effects.," *Ann. Clin. Psychiatry*, vol. 27, no. 4, pp. 289–96, Nov. 2015.
- [185] M. E. Sublette, S. P. Ellis, A. L. Geant, and J. J. Mann, "Meta-Analysis of the Effects of Eicosapentaenoic Acid (EPA) in Clinical Trials in Depression," *J. Clin. Psychiatry*, vol. 72, no. 12, pp. 1577–1584, Dec. 2011, doi: 10.4088/JCP.10m06634.
- [186] G. Grosso *et al.*, "Role of Omega-3 Fatty Acids in the Treatment of Depressive Disorders: A Comprehensive Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials," *PLoS One*, vol. 9, no. 5, p. e96905, May 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0096905.
- [187] S. Jazayeri *et al.*, "Comparison of Therapeutic Effects of Omega-3 Fatty Acid Eicosapentaenoic Acid and Fluoxetine, Separately and in Combination, in Major Depressive Disorder," *Aust. New Zeal. J. Psychiatry*, vol. 42, no. 3, pp. 192–198, Mar. 2008, doi: 10.1080/00048670701827275.
- [188] L. Gertsik, R. E. Poland, C. Bresee, and M. H. Rapaport, "Omega-3 Fatty Acid Augmentation of Citalopram Treatment for Patients With Major Depressive Disorder," *J. Clin. Psychopharmacol.*, vol. 32, no. 1, pp. 61–64, Feb. 2012, doi: 10.1097/JCP.0b013e31823f3b5f.
- [189] D. C. Mitchell, S. L. Niu, and B. J. Litman, "DHA-rich phospholipids optimize G-protein-coupled signaling," in *Journal of Pediatrics*, 2003, vol. 143, no. 4 SUPPL., doi: 10.1067/s0022-3476(03)00405-0.
- [190] D. C. Mitchell, S.-L. Niu, and B. J. Litman, "Enhancement of G Protein-Coupled Signaling by DHA Phospholipids," 2003.
- [191] B. J. Litman, S. L. Niu, A. Polozova, and D. C. Mitchell, "The role of docosahexaenoic acid containing phospholipids in modulating G protein-coupled signaling pathways: Visual transduction," *J. Mol. Neurosci.*, vol. 16, no. 2–3, pp. 237–242, 2001, doi: 10.1385/JMN:16:2-3:237.
- [192] D. C. Mitchell, S. L. Niu, and B. J. Litman, "Quantifying the differential effects of DHA and DPA on the early events in visual signal transduction," in *Chemistry and Physics of Lipids*, May 2012, vol. 165, no. 4, pp. 393–400, doi: 10.1016/j.chemphyslip.2012.02.008.
- [193] D. C. Mitchell, M. Straume, and B. J. Litman, "Role of sn-1-Saturated,sn-2-Polyunsaturated Phospholipids in Control of Membrane Receptor Conformational Equilibrium: Effects of Cholesterol and Acyl Chain Unsaturation on the Metarhodopsin I-Metarhodopsin II Equilibrium," 1992. [Online]. Available: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>.
- [194] B. J. Litman and D. C. Mitchell, "A role for phospholipid polyunsaturation in modulating membrane protein function," *Lipids*, vol. 31, no. 3 SUPPL., 1996, doi: 10.1007/bf02637075.
- [195] S. L. Niu *et al.*, "Reduced G protein-coupled signaling efficiency in retinal rod outer segments in response to n-3 fatty acid deficiency," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 30, pp. 31098–31104, Jul. 2004, doi: 10.1074/jbc.M404376200.

- [196] B. Jastrzebska, A. Debinski, S. Filipek, and K. Palczewski, "Role of membrane integrity on G protein-coupled receptors: Rhodopsin stability and function," *Progress in Lipid Research*, vol. 50, no. 3. pp. 267–277, Jul. 2011, doi: 10.1016/j.plipres.2011.03.002.
- [197] A. Grossfield, S. E. Feller, and M. C. Pitman, "A role for direct interactions in the modulation of rhodopsin by-3 polyunsaturated lipids," 2006. [Online]. Available: [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0508352103](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0508352103).
- [198] J. N. Horn, T.-C. Kao, and A. Grossfield, "Coarse-Grained Molecular Dynamics Provides Insight into the Interactions of Lipids and Cholesterol with Rhodopsin," 2014, pp. 75–94.
- [199] O. Soubias, W. E. Teague, and K. Gawrisch, "Evidence for specificity in lipid-rhodopsin interactions," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 44, pp. 33233–33241, Nov. 2006, doi: 10.1074/jbc.M603059200.
- [200] M. Lafourcade *et al.*, "Nutritional Omega-3 deficiency abolishes endocannabinoid mediated neuronal functions Omega-3 deficiency abolishes endocannabinoid mediated neuronal functions," *Nat. Neurosci.*, vol. 14, no. 3, 2011, doi: 10.1038/nn.2736i.
- [201] S. S. Naughton, M. L. Mathai, D. H. Hryciw, and A. J. McAinch, "Fatty acid modulation of the endocannabinoid system and the effect on food intake and metabolism," *International Journal of Endocrinology*, vol. 2013. 2013, doi: 10.1155/2013/361895.
- [202] R. Guixà-González *et al.*, "Membrane omega-3 fatty acids modulate the oligomerisation kinetics of adenosine A2A and dopamine D2 receptors," *Sci. Rep.*, vol. 6, Jan. 2016, doi: 10.1038/srep19839.
- [203] T. Mizumura *et al.*, "Activation of adenosine A 2A receptor by lipids from docosahexaenoic acid revealed by NMR," 2020. [Online]. Available: <https://www.science.org>.
- [204] F. S. G. Silva, I. G. Starostina, V. V. Ivanova, A. A. Rizvanov, P. J. Oliveira, and S. P. Pereira, "Determination of metabolic viability and cell mass using a tandem resazurin/sulforhodamine B assay," *Curr. Protoc. Toxicol.*, vol. 2016, pp. 1–15, May 2016, doi: 10.1002/cptx.1.
- [205] Y. Tang *et al.*, "Identification of the endophilins (SH3p4p8p13) as novel binding partners for the 1-adrenergic receptor." [Online]. Available: [www.pnas.org](http://www.pnas.org).
- [206] S. Sposini and A. C. Hanyaloglu, "Spatial encryption of G protein-coupled receptor signaling in endosomes; Mechanisms and applications," *Biochemical Pharmacology*, vol. 143. Elsevier Inc., pp. 1–9, Nov. 01, 2017, doi: 10.1016/j.bcp.2017.04.028.
- [207] V. A. JabtoJiski in Warschau, "Über den Mechanismus der Photolumineszenz von Farbstoffphosphoren."
- [208] C. Hoffmann, A. Zürn, M. Bünemann, and M. J. Lohse, "Conformational changes in G-protein-coupled receptors - The quest for functionally selective conformations is open," in *British Journal of Pharmacology*, Mar. 2008, vol. 153, no. SUPPL. 1, doi: 10.1038/sj.bjp.0707615.
- [209] M. J. Lohse, V. O. Nikolaev, P. Hein, C. Hoffmann, J. P. Vilardaga, and M. Bünemann, "Optical techniques to analyze real-time activation and signaling of G-protein-coupled receptors," *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 29, no. 3. Elsevier Ltd, pp. 159–165, 2008, doi: 10.1016/j.tips.2007.12.002.
- [210] M. J. Lohse, S. Nuber, and C. Hoffmann, "Fluorescence/bioluminescence resonance energy transfer techniques to study g-protein-coupled receptor activation and signaling," *Pharmacological Reviews*, vol. 64, no. 2. pp. 299–336, Apr. 2012, doi: 10.1124/pr.110.004309.

- [211] S. Angers *et al.*, "Detection of 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET)," *PNAS*, 2000. [Online]. Available: [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.060590697](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.060590697).
- [212] L. Stryer, "FLUORESCENCE ENERGY TRANSFER AS A SPECTROSCOPIC RULER." [Online]. Available: [www.annualreviews.org](http://www.annualreviews.org).
- [213] A. Kaur, P. Kaur, and S. Ahuja, "Förster resonance energy transfer (FRET) and applications thereof," *Analytical Methods*, vol. 12, no. 46. Royal Society of Chemistry, pp. 5532–5550, Dec. 14, 2020, doi: 10.1039/d0ay01961e.
- [214] M. Cottet *et al.*, "BRET and time-resolved FRET strategy to study GPCR oligomerization: From cell lines toward native tissues," *Frontiers in Endocrinology*, vol. 3, no. JUL. 2012, doi: 10.3389/fendo.2012.00092.
- [215] A. Keppler, S. Gendreizig, T. Gronemeyer, H. Pick, H. Vogel, and K. Johnsson, "A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules in vivo," *Nat. Biotechnol.*, vol. 21, no. 1, pp. 86–89, Jan. 2003, doi: 10.1038/nbt765.
- [216] A. Levoye *et al.*, "A broad G protein-coupled receptor internalization assay that combines SNAP-tag labeling, diffusion-enhanced resonance energy transfer, and a highly emissive terbium cryptate," *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, vol. 6, no. NOV, 2015, doi: 10.3389/fendo.2015.00167.
- [217] Marvin Minsky, "Microscopy apparatus," *US Pat.*, 1957.
- [218] W. B. Amos, J. G. White, and M. Fordham, "Use of confocal imaging in the study of biological structures," 1987.
- [219] J. Oreopoulos, R. Berman, and M. Browne, "Spinning-disk confocal microscopy. present technology and future trends," in *Methods in Cell Biology*, vol. 123, Academic Press Inc., 2014, pp. 153–175.
- [220] K. N. Fish, "Total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy," *Current Protocols in Cytometry*, no. SUPPL.50. John Wiley and Sons Inc., 2009, doi: 10.1002/0471142956.cy1218s50.
- [221] A. L. Mattheyses, S. M. Simon, and J. Z. Rappoport, "Imaging with total internal reflection fluorescence microscopy for the cell biologist," *Journal of Cell Science*, vol. 123, no. 21. pp. 3621–3628, Nov. 01, 2010, doi: 10.1242/jcs.056218.
- [222] S. Sposini, M. Rosendale, L. Claverie, T. N. N. Van, D. Jullié, and D. Perrais, "Imaging endocytic vesicle formation at high spatial and temporal resolutions with the pulsed-pH protocol," *Nat. Protoc.*, vol. 15, no. 9, pp. 3088–3104, Sep. 2020, doi: 10.1038/s41596-020-0371-z.
- [223] T. J. Crites, L. Chen, and R. Varma, "A TIRF microscopy technique for real-time, simultaneous imaging of the TCR and its associated signaling proteins.," *J. Vis. Exp.*, no. 61, 2012, doi: 10.3791/3892.
- [224] Joseph R Lakowicz, "Principles of Fluorescence Spectroscopy," *springer Sci.*, 2006.
- [225] Y. Verwey, J. G. Th. T. of, G. Weber, and F. J. Farris, "Nature (London) 190, 779," Wiley, 1976. [Online]. Available: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>.
- [226] K. Scheinpflug, O. Krylova, and H. Strahl, "Measurement of cell membrane fluidity by Laurdan GP: Fluorescence spectroscopy and microscopy," in *Methods in Molecular Biology*, vol. 1520, Humana Press Inc., 2017, pp. 159–174.

- [227] S. Hofstetter, C. Denter, R. Winter, L. M. McMullen, and M. G. Gänzle, "Use of the fluorescent probe LAURDAN to label and measure inner membrane fluidity of endospores of *Clostridium* spp.," *J. Microbiol. Methods*, vol. 91, no. 1, pp. 93–100, Oct. 2012, doi: 10.1016/j.mimet.2012.07.023.
- [228] M. Wenzel, N. Vischer, H. Strahl, and L. Hamoen, "Assessing Membrane Fluidity and Visualizing Fluid Membrane Domains in Bacteria Using Fluorescent Membrane Dyes," *BIO-PROTOCOL*, vol. 8, no. 20, 2018, doi: 10.21769/bioprotoc.3063.
- [229] Banwell CN, "Fundamentals of Molecular Spectroscopy: McGraw-Hill Book company(UK) limited; 1972."
- [230] M. Scherman, J. Barros, R. Santagata, A. Bresson, and B. Attal-Tretout, "Thermométrie Raman cohérente pour l'étude de la combustion," *Photoniques*, no. 96, pp. 23–29, May 2019, doi: 10.1051/photon/20199623.
- [231] A. C. S. Talari, Z. Movasaghi, S. Rehman, and I. U. Rehman, "Raman spectroscopy of biological tissues," *Applied Spectroscopy Reviews*, vol. 50, no. 1. Taylor and Francis Inc., pp. 46–111, Jan. 02, 2015, doi: 10.1080/05704928.2014.923902.
- [232] L. Wei *et al.*, "Live-cell imaging of alkyne-tagged small biomolecules by stimulated Raman scattering," *Nat. Methods*, vol. 11, no. 4, pp. 410–412, 2014, doi: 10.1038/nmeth.2878.
- [233] R. Mendelsohn and C. C. Koch, "Deuterated phospholipids as Raman spectroscopic probes of membrane structure phase diagrams for the dipalmitoyl phosphatidylcholine (and its d62 derivative)-dipalmitoyl phosphatidylethanolamine system," 1980.
- [234] H. Wu, J. V. Volponi, A. E. Oliver, A. N. Parikh, B. A. Simmons, and S. Singh, "In vivo lipidomics using single-cell Raman spectroscopy," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, no. 9, pp. 3809–3814, Mar. 2011, doi: 10.1073/pnas.1009043108.
- [235] V. De Smedt-Peyrusse, F. Sargueil, A. Moranis, H. Harizi, S. Mongrand, and S. Layé, "Docosahexaenoic acid prevents lipopolysaccharide-induced cytokine production in microglial cells by inhibiting lipopolysaccharide receptor presentation but not its membrane subdomain localization," *J. Neurochem.*, vol. 105, no. 2, pp. 296–307, 2008, doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.05129.x.
- [236] N. G. Bazan and B. L. Scott, "Dietary omega-3 fatty acids and accumulation of docosahexaenoic acid in rod photoreceptor cells of the retina and at synapses," *Ups. J. Med. Sci. Suppl.*, vol. 48, p. 97–107, 1990, [Online]. Available: <http://europepmc.org/abstract/MED/2150242>.
- [237] M. Martínez and I. Mougan, "Fatty Acid Composition of Human Brain Phospholipids During Normal Development," *J. Neurochem.*, vol. 71, no. 6, pp. 2528–2533, Nov. 2002, doi: 10.1046/j.1471-4159.1998.71062528.x.
- [238] F. M. Harris, K. B. Best, and J. D. Bell, "Use of laurdan fluorescence intensity and polarization to distinguish between changes in membrane fluidity and phospholipid order," 2002. [Online]. Available: [www.bba-direct.com](http://www.bba-direct.com).
- [239] T. Parasassi, E. K. Krasnowska, L. Bagatolli, and E. Gratton, "Laurdan and Prodan as Polarity-Sensitive Fluorescent Membrane Probes," *J. Fluoresc.*, vol. 8, no. 4, pp. 365–373, 1998, doi: 10.1023/A:1020528716621.
- [240] V. Baeten, P. Hourant, M. T. Morales, and R. Aparicio, "Oil and Fat Classification by FT-Raman Spectroscopy," 1998. [Online]. Available: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>.

- [241] K. Majzner, S. Tott, L. Roussille, V. Deckert, S. Chlopicki, and M. Baranska, "Uptake of fatty acids by a single endothelial cell investigated by Raman spectroscopy supported by AFM," *Analyst*, vol. 143, no. 4, pp. 970–980, Feb. 2018, doi: 10.1039/c7an01043e.
- [242] O. Samek *et al.*, "Raman microspectroscopy of individual algal cells: Sensing unsaturation of storage lipids in vivo," *Sensors*, vol. 10, no. 9, pp. 8635–8651, Sep. 2010, doi: 10.3390/s100908635.
- [243] H. Rosales-Solano, V. Galievsky, K. Murtada, P. V. Radovanovic, and J. Pawliszyn, "Profiling of Unsaturated Lipids by Raman Spectroscopy Directly on Solid-Phase Microextraction Probes," *Anal. Chem.*, vol. 94, no. 2, pp. 606–611, Jan. 2022, doi: 10.1021/acs.analchem.1c04054.
- [244] M. Amaro, F. Reina, M. Hof, C. Eggeling, and E. Sezgin, "Laurdan and Di-4-ANEPPDHQ probe different properties of the membrane," *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 50, no. 13, Mar. 2017, doi: 10.1088/1361-6463/aa5dbc.
- [245] W. Yu, P. T. So, T. French, and E. Gratton, "Fluorescence generalized polarization of cell membranes: a two-photon scanning microscopy approach," *Biophys. J.*, vol. 70, no. 2, pp. 626–36, Feb. 1996, doi: 10.1016/S0006-3495(96)79646-7.
- [246] X. Yang, W. Sheng, G. Y. Sun, and J. C. M. Lee, "Effects of fatty acid unsaturation numbers on membrane fluidity and  $\alpha$ -secretase-dependent amyloid precursor protein processing," *Neurochem. Int.*, vol. 58, no. 3, pp. 321–329, Feb. 2011, doi: 10.1016/j.neuint.2010.12.004.
- [247] J. E. Vance, "Phospholipid Synthesis and Transport in Mammalian Cells," *Traffic*, vol. 16, no. 1. Blackwell Munksgaard, pp. 1–18, Jan. 01, 2015, doi: 10.1111/tra.12230.
- [248] J. I. S. MacDonald and H. Sprecher, "Phospholipid fatty acid remodeling in mammalian cells," *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.*, vol. 1084, no. 2, pp. 105–121, Jul. 1991, doi: 10.1016/0005-2760(91)90209-Z.
- [249] E. Soupene, H. Fyrst, and F. A. Kuypers, "Mammalian acyl-CoA:lysophosphatidylcholine acyltransferase enzymes," 2007. [Online]. Available: [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0709737104](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0709737104).
- [250] M. Eto, H. Shindou, S. Yamamoto, M. Tamura-Nakano, and T. Shimizu, "Lysophosphatidylethanolamine acyltransferase 2 (LPEAT2) incorporates DHA into phospholipids and has possible functions for fatty acid-induced cell death," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 526, no. 1, pp. 246–252, May 2020, doi: 10.1016/j.bbrc.2020.03.074.
- [251] J. Cao *et al.*, "Molecular identification of a novel mammalian brain isoform of acyl-CoA:lysophospholipid acyltransferase with prominent ethanolamine lysophospholipid acylating activity, LPEAT2," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 27, pp. 19049–19057, Jul. 2008, doi: 10.1074/jbc.M800364200.
- [252] D. Hishikawa, H. Shindou, S. Kobayashi, H. Nakanishi, R. Taguchi, and T. Shimizu, "Discovery of a lysophospholipid acyltransferase family essential for membrane asymmetry and diversity," 2008. [Online]. Available: [www.pnas.org/cgi/content/full/](http://www.pnas.org/cgi/content/full/).
- [253] Jos A. F. Op Den Kamp, "LIPID ASYMMETRY IN MEMBRANES," *Annu. Rev. Biochem.*, 1979.
- [254] Y. Posor, M. Eichhorn-Grünig, and V. Haucke, "Phosphoinositides in endocytosis," *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, vol. 1851, no. 6. Elsevier B.V., pp. 794–804, 2015, doi: 10.1016/j.bbalip.2014.09.014.

- [255] B. L. Wolfe and J. A. Trejo, "Clathrin-dependent mechanisms of G protein-coupled receptor endocytosis," *Traffic*, vol. 8, no. 5, pp. 462–470, May 2007, doi: 10.1111/j.1600-0854.2007.00551.x.
- [256] P. J. Bosch *et al.*, "Evaluation of fluorophores to label SNAP-Tag fused proteins for multicolor single-molecule tracking microscopy in live cells," *Biophys. J.*, vol. 107, no. 4, pp. 803–814, Aug. 2014, doi: 10.1016/j.bpj.2014.06.040.
- [257] K. M. Kim, K. J. Valenzano, S. R. Robinson, W. D. Yao, L. S. Barak, and M. G. Caron, "Differential Regulation of the Dopamine D2 and D3 Receptors by G Protein-coupled Receptor Kinases and  $\beta$ -Arrestins," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 40, pp. 37409–37414, Oct. 2001, doi: 10.1074/jbc.M106728200.
- [258] P. Heusler, A. Newman-Tancredi, T. Loock, and D. Cussac, "Antipsychotics differ in their ability to internalise human dopamine D2S and human serotonin 5-HT1A receptors in HEK293 cells," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 581, no. 1–2, pp. 37–46, Feb. 2008, doi: 10.1016/j.ejphar.2007.11.046.
- [259] R. H. Oakley, S. A. Laporte, J. A. Holt, M. G. Caron, and L. S. Barak, "Differential affinities of visual arrestin,  $\beta$ arrestin1, and  $\beta$ arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 22, pp. 17201–17210, Jun. 2000, doi: 10.1074/jbc.M910348199.
- [260] J. L. Goggi, A. Sardini, A. Egerton, P. G. Strange, and P. M. Grasby, "Agonist-dependent internalization of D2 receptors: Imaging quantification by confocal microscopy," *Synapse*, vol. 61, no. 4, pp. 231–241, Apr. 2007, doi: 10.1002/syn.20360.
- [261] L. de Vries, F. Finana, C. Cathala, B. Ronsin, and D. Cussac, "Innovative bioluminescence resonance energy transfer assay reveals differential agonist-induced D2 receptor intracellular trafficking and arrestin-3 recruitment," *Mol. Pharmacol.*, vol. 96, no. 3, pp. 308–319, Sep. 2019, doi: 10.1124/mol.119.115998.
- [262] J. D. Urban, G. A. Vargas, M. Von Zastrow, and R. B. Mailman, "Aripiprazole has functionally selective actions at dopamine D2 receptor-mediated signaling pathways," *Neuropsychopharmacology*, vol. 32, no. 1, pp. 67–77, Jan. 2007, doi: 10.1038/sj.npp.1301071.
- [263] E. W. Tuplin and M. R. Holahan, "Aripiprazole, A Drug that Displays Partial Agonism and Functional Selectivity," *Curr. Neuropharmacol.*, vol. 15, no. 8, Apr. 2017, doi: 10.2174/1570159x15666170413115754.
- [264] B. Masri *et al.*, "Antagonism of dopamine D2 receptor/ $\beta$ -arrestin 2 interaction is a common property of clinically effective antipsychotics," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 36, pp. 13656–13661, Sep. 2008, doi: 10.1073/pnas.0803522105.
- [265] S. N. Roed *et al.*, "Real-time trafficking and signaling of the glucagon-like peptide-1 receptor," *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 382, no. 2, pp. 938–949, 2014, doi: 10.1016/j.mce.2013.11.010.
- [266] D. Thompson and J. L. Whistler, "Dopamine D3 receptors are down-regulated following heterologous endocytosis by a specific interaction with G protein-coupled receptor-associated sorting protein-1," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 2, pp. 1598–1608, Jan. 2011, doi: 10.1074/jbc.M110.158345.
- [267] S. Aringhieri *et al.*, "Molecular targets of atypical antipsychotics: From mechanism of action to clinical differences," *Pharmacology and Therapeutics*, vol. 192. Elsevier Inc., pp. 20–41, Dec. 01, 2018, doi: 10.1016/j.pharmthera.2018.06.012.

- [268] J. A. Allen *et al.*, “Discovery of  $\beta$ -arrestin-biased dopamine D 2 ligands for probing signal transduction pathways essential for antipsychotic efficacy,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, no. 45, pp. 18488–18493, Nov. 2011, doi: 10.1073/pnas.1104807108.
- [269] M. Johnson, “Beta2 -adrenoceptors: Mechanisms of action of beta2-agonists,” *Paediatr. Respir. Rev.*, vol. 2, no. 1, pp. 57–62, 2001, doi: 10.1053/prrv.2000.0102.
- [270] L. Hertz, D. Lovatt, S. A. Goldman, and M. Nedergaard, “Adrenoceptors in brain: Cellular gene expression and effects on astrocytic metabolism and  $[Ca^{2+}]_i$ ,” *Neurochem. Int.*, vol. 57, no. 4, pp. 411–420, Nov. 2010, doi: 10.1016/j.neuint.2010.03.019.
- [271] O. BRODDEt Biochemisches Forschungslobor, “Beta 1- and beta 2-adrenoceptors in the human heart: properties, function, and alterations in chronic heart failure.”
- [272] W. P. Hausdorffs, M. Bouvier\$, B. F. O’ dowd, G. P. Irons, M. G. Caron, and R. J. Lefkowitz, “Phosphorylation Sites on Two Domains of the  $\beta$ -Adrenergic Receptor Are Involved in Distinct Pathways of Receptor Desensitization,” 1989.
- [273] A. Ruiz-Gó Mez and F. Mayor, “Adrenergic Receptor Kinase (GRK2) Colocalizes with-Adrenergic Receptors during Agonist-induced Receptor Internalization\*,” 1997. [Online]. Available: <http://www-jbc.stanford.edu/jbc/>.
- [274] A. Jie Zhang, Larry S. Barak, Pieter H. Anborgh, Stephane A. Laporte, Marc G. Caron and S. S. G. Ferguson, “Cellular trafficking of G protein-coupled receptor beta-arrestin endocytic complexes.”
- [275] O. B. Goodman *et al.*, “ $\beta$ -Arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the  $\beta$ 2-adrenergic receptor,” *Nature*, vol. 383, no. 6599, pp. 447–450, Oct. 1996, doi: 10.1038/383447a0.
- [276] E. Toraih, M. H. Hussein, and A. El-Serafi, “Beta2-Adrenergic Receptor Gene Haplotypes in Chronic Obstructive Pulmonary Disease,” 2015. [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/302549208>.
- [277] M. Bouvier, “The  $\beta$ 2-adrenergic receptor a model for studying the molecular mechanisms of GPCRs desensitization,” *Med. Sci.*, 1995.
- [278] J. Shonberg, R. C. Kling, P. Gmeiner, and S. Löber, “GPCR crystal structures: Medicinal chemistry in the pocket,” *Bioorganic Med. Chem.*, vol. 23, no. 14, pp. 3880–3906, Jun. 2015, doi: 10.1016/j.bmc.2014.12.034.
- [279] R. Dawaliby *et al.*, “Allosteric regulation of G protein-coupled receptor activity by phospholipids,” *Nat. Chem. Biol.*, vol. 12, no. 1, pp. 35–39, Jan. 2016, doi: 10.1038/nchembio.1960.
- [280] M. Manna *et al.*, “Mechanism of allosteric regulation of  $\beta$ 2-adrenergic receptor by cholesterol,” *Elife*, vol. 5, no. NOVEMBER2016, Nov. 2016, doi: 10.7554/eLife.18432.001.
- [281] H. Ta *et al.*, “Mapping molecules in scanning far-field fluorescence nanoscopy,” *Nat. Commun.*, vol. 6, Aug. 2015, doi: 10.1038/ncomms8977.
- [282] C. L. Hershberger *et al.*, “A Cloned Gene for Human Transferrin,” *Ann N Y Acad Sci*, 1996.
- [283] K. M. Mayle, A. M. Le, and D. T. Kamei, “The intracellular trafficking pathway of transferrin,” *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, vol. 1820, no. 3. pp. 264–281, Mar. 2012, doi: 10.1016/j.bbagen.2011.09.009.



- [284] R. M. Graham *et al.*, "Liver iron transport," *World J Gastroenterol*, vol. 13, no. 35, pp. 4725–4736, 2007, [Online]. Available: [www.wjgnet.com/http://www.wjgnet.com/1007-9327/13/4725.asp](http://www.wjgnet.com/http://www.wjgnet.com/1007-9327/13/4725.asp).
- [285] Y. Cheng, O. Zak, P. Aisen, S. C. Harrison, and T. Walz, "Structure of the Human Transferrin Receptor-Transferrin Complex and distributing iron. In vertebrates, iron is transported in the serum bound to transferrin (Tf), which also delivers it to cells using an endocytotic pathway involving the," 2004. [Online]. Available: [www.cell.com/cgi/content/full/116/4/565/DC1](http://www.cell.com/cgi/content/full/116/4/565/DC1).
- [286] E. Gammella, P. Buratti, G. Cairo, and S. Recalcati, "The transferrin receptor: The cellular iron gate," *Metallomics*, vol. 9, no. 10. Royal Society of Chemistry, pp. 1367–1375, Oct. 01, 2017, doi: 10.1039/c7mt00143f.
- [287] S. L. Niu *et al.*, "Reduced G protein-coupled signaling efficiency in retinal rod outer segments in response to n-3 fatty acid deficiency," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 30, pp. 31098–31104, Jul. 2004, doi: 10.1074/jbc.M404376200.
- [288] K. A. N. Wang, "Contribution of Serine Residues to Constitutive and Agonist-Induced Signaling via the D 2S Dopamine Receptor: Evidence for Multiple, Agonist-Specific Active Conformations," Hwa and Perez, 1989. [Online]. Available: <http://www.molpharm.org>.
- [289] P. Ghanouni *et al.*, "Functionally Different Agonists Induce Distinct Conformations in the G Protein Coupling Domain of the  $\beta_2$  Adrenergic Receptor," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 27, pp. 24433–24436, Jul. 2001, doi: 10.1074/jbc.C100162200.
- [290] G. Swaminath, Y. Xiang, T. W. Lee, J. Steenhuis, C. Parnot, and B. K. Kobilka, "Sequential binding of agonists to the  $\beta_2$  adrenoceptor. Kinetic evidence for intermediate conformational states," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 1, pp. 686–691, Jan. 2004, doi: 10.1074/jbc.M310888200.
- [291] A. Beghin *et al.*, "Localization-based super-resolution imaging meets high-content screening," *Nat. Methods*, vol. 14, no. 12, pp. 1184–1190, Dec. 2017, doi: 10.1038/nmeth.4486.
- [292] S. Granier *et al.*, "Structure and conformational changes in the C-terminal domain of the  $\beta_2$ -adrenoceptor: Insights from fluorescence resonance energy transfer studies," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 18, pp. 13895–13905, May 2007, doi: 10.1074/jbc.M611904200.
- [293] S. Granier, S. Kim, J. J. Fung, M. P. Bokoch, and C. Parnot, "FRET-based measurement of GPCR conformational changes," *Methods Mol. Biol.*, vol. 552, pp. 253–268, 2009, doi: 10.1007/978-1-60327-317-6\_18.
- [294] R. H. Oakley, S. A. Laporte, J. A. Holt, M. G. Caron, and L. S. Barak, "Differential affinities of visual arrestin,  $\beta$ arrestin1, and  $\beta$ arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 22, pp. 17201–17210, Jun. 2000, doi: 10.1074/jbc.M910348199.
- [295] N. R. Orem, L. Xia, and P. J. Dolph, "An essential role for endocytosis of rhodopsin through interaction of visual arrestin with the AP-2 adaptor," *J. Cell Sci.*, vol. 119, no. 15, pp. 3141–3148, Aug. 2006, doi: 10.1242/jcs.03052.
- [296] D. S. Kang, X. Tian, and J. L. Benovic, "Role of  $\beta$ -arrestins and arrestin domain-containing proteins in G protein-coupled receptor trafficking," *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 27, no. 1. pp. 63–71, Apr. 2014, doi: 10.1016/j.ceb.2013.11.005.
- [297] H. Lan, Y. Liu, M. I. Bell, V. V. Gurevich, and K. A. Neve, "A dopamine D 2 receptor mutant capable of G protein- mediated signaling but deficient in arrestin binding," *Mol. Pharmacol.*, vol. 75, no. 1, pp. 113–123, Jan. 2009, doi: 10.1124/mol.108.050534.

- [298] C. C. Clayton, P. Donthamsetti, N. A. Lambert, J. A. Javitch, and K. A. Neve, "Mutation of three residues in the third intracellular loop of the dopamine D2 receptor creates an internalization-defective receptor," *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 48, pp. 33663–33675, Nov. 2014, doi: 10.1074/jbc.M114.605378.
- [299] S. A. Laporte, R. H. Oakley, J. A. Holt, L. S. Barak, and M. G. Caron, "The interaction of  $\beta$ -arrestin with the AP-2 adaptor is required for the clustering of  $\beta$ 2-adrenergic receptor into clathrin-coated pits," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 30, pp. 23120–23126, Jul. 2000, doi: 10.1074/jbc.M002581200.
- [300] M. G. H. Scott, A. Benmerah, O. Muntaner, and S. Marullo, "Recruitment of activated G protein-coupled receptors to pre-existing clathrin-coated pits in living cells," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 5, pp. 3552–3559, Feb. 2002, doi: 10.1074/jbc.M106586200.
- [301] F. Santini, I. Gaidarov, and J. H. Keen, "G protein-coupled receptor/arrestin3 modulation of the endocytic machinery," *J. Cell Biol.*, vol. 156, no. 4, pp. 665–676, Feb. 2002, doi: 10.1083/jcb.200110132.
- [302] C. C. M. Lally, B. Bauer, J. Selent, and M. E. Sommer, "C-edge loops of arrestin function as a membrane anchor," *Nat. Commun.*, vol. 8, Feb. 2017, doi: 10.1038/ncomms14258.
- [303] I. V. Klewe *et al.*, "Recruitment of  $\beta$ -arrestin2 to the dopamine D2 receptor: Insights into anti-psychotic and anti-parkinsonian drug receptor signaling," *Neuropharmacology*, vol. 54, no. 8, pp. 1215–1222, Jun. 2008, doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.03.015.
- [304] M. Scarselli, P. Annibale, and A. Radenovic, "Cell type-specific  $\beta$ 2-adrenergic receptor clusters identified using photoactivated localization microscopy are not lipid raft related, but depend on actin cytoskeleton integrity," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 20, pp. 16768–16780, May 2012, doi: 10.1074/jbc.M111.329912.
- [305] V. V. Gurevich and J. L. Benovic, "Visual Arrestin Binding to Rhodopsin," *J. Biol. Chem.*, vol. 270, no. 11, pp. 6010–6016, Mar. 1995, doi: 10.1074/jbc.270.11.6010.
- [306] M. Kamal, M. Marquez, V. Vauthier, A. Leloire, P. Froguel, and R. Jockers, "Improved donor/acceptor BRET couples for monitoring  $\beta$ -arrestin recruitment to G protein-coupled receptors," *Biotechnol. J.*, vol. 4, no. 9, pp. 1337–1344, 2009, doi: 10.1002/biot.200900016.
- [307] M. Kocan and K. D. G. Pflieger, "Detection of GPCR/ $\beta$ -arrestin interactions in live cells using bioluminescence resonance energy transfer technology.," *Methods Mol. Biol.*, vol. 552, pp. 305–317, 2009, doi: 10.1007/978-1-60327-317-6\_22.
- [308] I. Gaidarov, J. G. Krupnick, J. R. Falck, J. L. Benovic, and J. H. Keen, "Arrestin function in G protein-coupled receptor endocytosis requires phosphoinositide binding," *EMBO J.*, vol. 18, no. 4, pp. 871–881, Feb. 1999, doi: 10.1093/emboj/18.4.871.
- [309] J. Janetzko, R. Kise, B. Barsi-ryne, and D. H. Siepe, "Membrane phosphoinositides stabilize GPCR-arrestin complexes and offer temporal control of complex assembly and dynamic," *bioRxiv*, 2021.

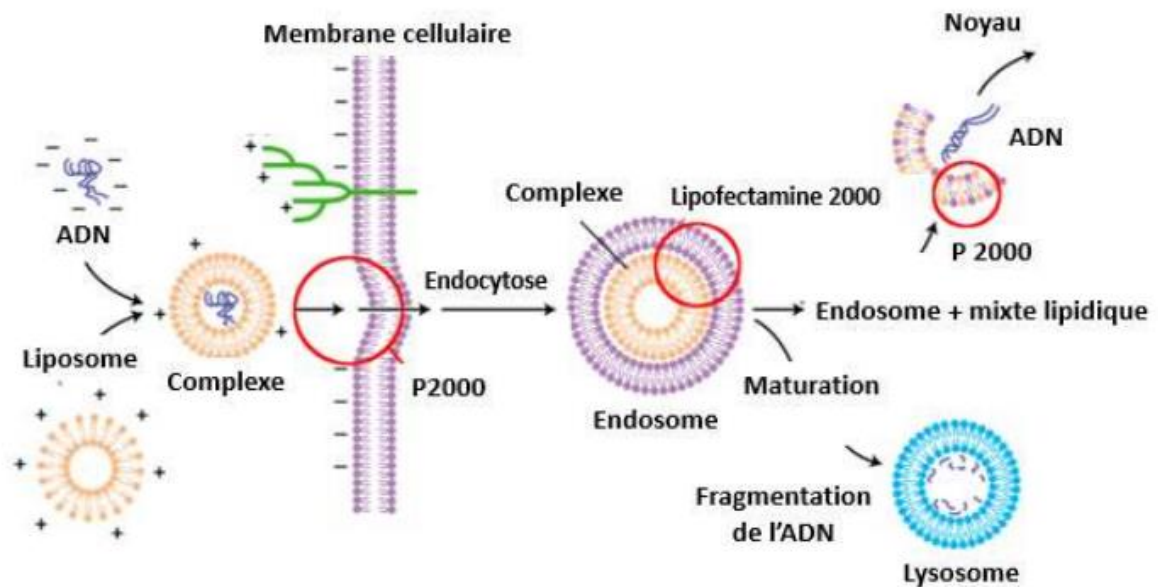


# Annexes

## Annexe 1

### **Principe de la transfection transitoire des cellules HEK-293 par la lipofectamine 2000**

Cet agent de transfection consiste en une formulation de liposomes cationiques qui se complexe avec les molécules d'acide nucléique (plasmide) chargées négativement pour surmonter la répulsion électrostatique de la membrane cellulaire. Le complexe (ADN/liposome) pénètre ainsi dans le cytoplasme par endocytose et l'ADN d'intérêt atteint le noyau pour qu'il soit transcrit puis traduit en une protéine d'intérêt. Figure obtenue du site [www.cambridge.org](http://www.cambridge.org).



## Annexe 2

# **The role of the lipid environment in the activity of G-protein coupled receptors**

Rim Baccouch<sup>1</sup>, Estelle Rascol<sup>1</sup>, Kaja Stoklosa<sup>1</sup>, Isabel D. Alves<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>CBMN UMR 5248 CNRS, U. of Bordeaux, B14 allée Geoffroy St. Hilaire, 33600 Pessac, France

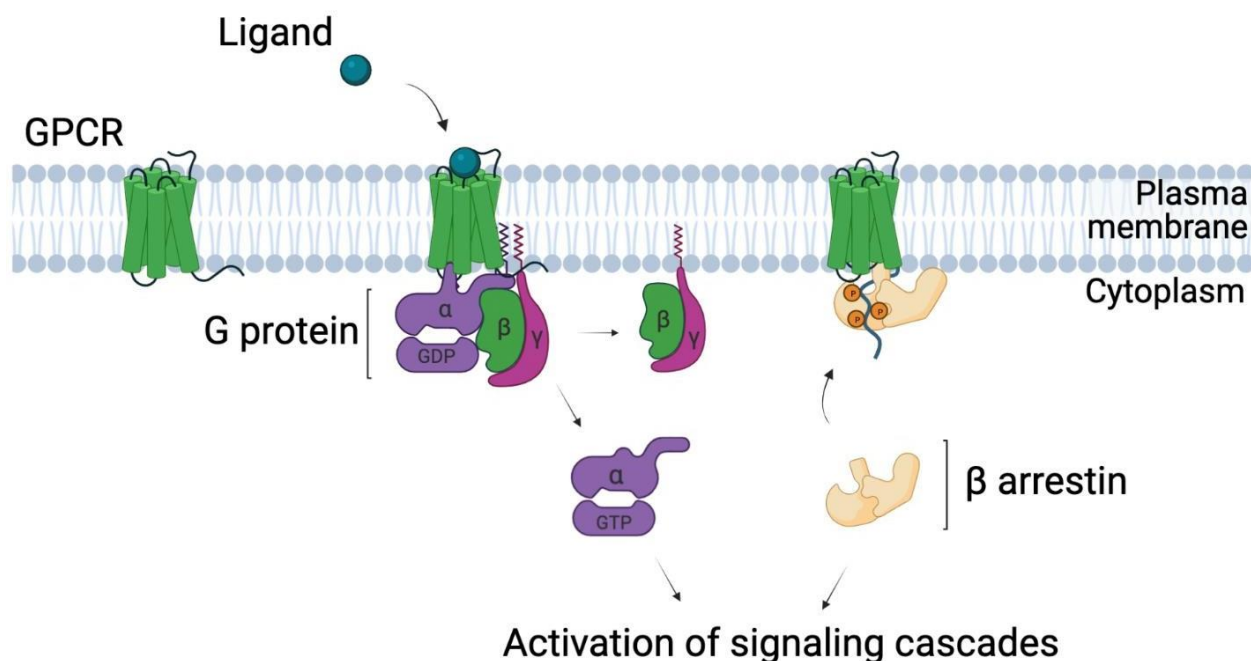
G-protein coupled receptors (GPCRs) are a class of membrane proteins that sense extracellular signals ranging from light to odorants and small molecules and activate intracellular signaling pathways that control important physiological responses. Being composed of 7 transmembrane helices linked by extracellular and intracellular loops, the great majority of the sequence of these receptors is embedded in the lipid membrane. Therefore, it is expected GPCR structure and function to be impacted by the surrounding lipid environment and the lipid membrane physico-chemical and mechanical properties. A large number of examples from the literature are provided to highlight the role of the lipid nature (lipid headgroup, membrane polyunsaturation and cholesterol) and membrane physical and mechanical properties (curvature elastic stress, membrane thickness and hydrophobic mismatch, fluidity) in the activity of different GPCRs. In addition, lipids are important co-factors being identified in very specific locations in several GPCRs structures. GPCRs and G-proteins can also be lipid post-translational modified and such events can significantly impact membrane binding, trafficking and signaling. These aspects are all treated in this review. Understanding how the lipid can modulate GPCR activity is important from the fundamental point of view but also due to the fact that certain pathologies where GPCRs are central targets have been associated with important lipid imbalance. Establishing a link between the lipid pathological imbalance and the receptor functioning in such environment is thus essential as it can open avenues to potentially innovative therapeutic strategies.

**Keywords:** G-protein coupled receptors; lipids; receptor activation and signaling; lipid membrane physico-chemical properties;

## Introduction

G-protein coupled receptors (GPCRs) are the largest protein superfamily in the human genome, counting with approximately 800 individual members (1). GPCRs play key roles at many levels of intercellular communication, regulating biological processes from vision, cell growth to synaptic signal transmission. Due to their physiological importance and their good accessibility as cell surface receptors, GPCRs are one of the most important drug targets today and present a great pharmacological potential (2). Over the last decades, our understanding on how GPCRs function has greatly advanced, mostly triggered by the raise in determination of over 350 GPCR structures by x-ray crystallography and cryo-EM (see, e.g., GPCRdb.org). Structural atomistic details in combination with important biophysical studies have greatly contributed to the understanding of their activation and signaling mechanisms.

GPCRs are integral membrane proteins with seven transmembrane  $\alpha$ -helices connected by intracellular and extracellular loops. They associate with heterotrimeric G proteins on the cytosolic side of membranes. Upon binding of an extracellular ligand, GPCRs catalyze GDP/GTP exchange on the G protein  $\alpha$  subunit, eliciting an intracellular signaling cascade resulting in events such as apoptosis or cell proliferation (3). On the other hand, upon receptor phosphorylation on their intracellular side, GPCRs also bind to  $\beta$ -arrestins leading to its desensitization and internalization but also triggering additional signaling cascades (4) (Fig. 1).



**Figure 1. General representation of GPCR ligand-activation and main signaling cascades activated by G-proteins and  $\beta$ -arrestin.** Ligand present in the extracellular side interacts with the receptor, triggers its conformational change and the dissociation of the G-protein (composed of the  $\alpha\beta\gamma$  trimer) following GDP/GTP exchange at the  $\alpha$ -subunit. Both  $\alpha$  and  $\beta\gamma$  subunits will activate downstream signaling cascades. In parallel, the receptor gets phosphorylated on its intracellular side leading to  $\beta$ -arrestin recruitment that results in both receptor desensitization and the activation of diverse signaling cascades.

The concept of biased signaling that is related to the specificity in the signaling pathway taken upon activation by a specific ligand is extremely important in drug design (5). While originating from the ligand side via its different properties and from the receptor due to potential mutations or isoforms, lipids can provide an additional source by modulating receptor and effector properties and their potential encounters. The current model proposes that receptors explore complex conformational landscapes populated with multiple states of distinct functional properties, and that the relative distribution of these states is modulated by ligands, signaling proteins, and the environment, which all together dictate the signaling output (4). In terms of the environment, the cell membrane does not only provide the physiological environment necessary for the stability of the native fold of membrane proteins but it also modulates their function through an impact on their conformational dynamics and signaling events. Lipid compositional dependence of GPCRs is important because the composition of the plasma membrane varies with age, diet, and certain pathologies, making lipid bilayer modulation of GPCR function a possible mode of disease etiology (6). Variation in plasma membrane composition across tissues may lead widely distributed GPCRs to behave differently in different tissue types. Therefore, to draw a complete picture of GPCR activation and signaling events it is crucial to include the lipid component.

In this review we tackle the question concerning the role of the lipid membrane for the activity of GPCRs by addressing both the lipid chemical nature (headgroup type, level of polyunsaturation, cholesterol) but also the lipid impact on the membrane physical and mechanical properties (membrane curvature elastic stress, membrane thickness and hydrophobic mismatch, membrane fluidity). On the other hand, we provide an overview about lipids as cofactors in GPCR functioning that establish specific and direct interactions with receptors and at the interface between receptors and G proteins or  $\beta$ -arrestins. Finally, the subject of receptor and effectors lipidation, more commonly known as post-translational modifications, is presented. The different lipid molecules mentioned in the different reported studies are presented in Figure 2, 3 and Table 1.

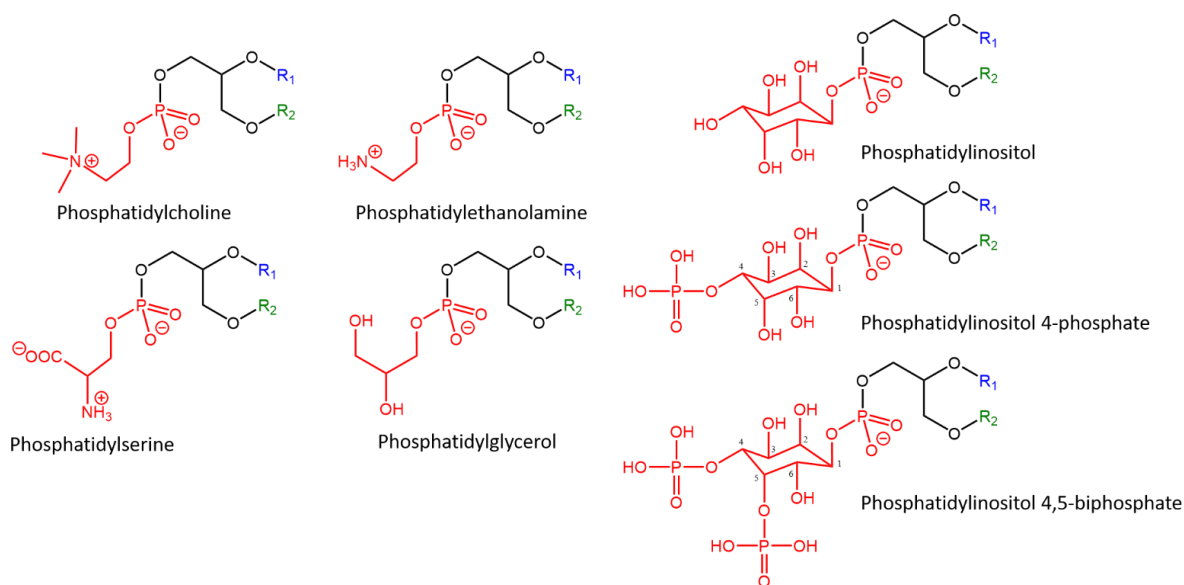
## **1) Lipid impact in GPCR activity – on the role of the lipid nature**

Regarding the role of the lipid nature, herein we focus in both the headgroup type of phospholipids, the level of polyunsaturation and cholesterol. Concerning the headgroup type this factor can both impact the type of molecular interactions (electrostatic interactions, H-bonding) that can be established directly between the receptor or effectors with lipids but can also influence the physical properties of the membrane, this later will be treated in section 3. When considering the hydrophobic core of the lipid membrane, two important aspects are the level of lipid polyunsaturation and the presence of cholesterol, these can highly impact the ordering, packing, fluidity and lateral organization of membranes (e.g. formation of domains). The property of membrane fluidity will be further discussed in detail in section 3.

### **a) The importance of the lipid headgroup**

The nature of the phospholipid headgroup constitutes an important parameter regarding lipid modulation of GPCR activation and signaling because of their impact in certain membrane properties: the overall membrane charge; the capacity of establishment of H-bonds, electrostatic

bonds or other type of specific interactions between the protein and the lipids; membrane mechanical and physical properties as membrane intrinsic curvature, surface tension and others.



**Figure 2. Structures of main lipid headgroups. R1 and R2 represent variable fatty acyl chains.** Phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylethanolamine (PE) are two zwitterionic headgroups, with a positive charge on a tertiary amine for PC and a primary amine for PE. The other headgroups are anionic.

Govaerts and collaborators have characterized the effect of biological relevant phospholipids on the  $\beta$ 2-adrenergic receptor ( $\beta$ 2AR), namely they investigated how the nature of lipid headgroup impacts the structure and activity of  $\beta$ 2AR (7). They have shown that the phospholipids modulate ligand binding to the receptor and agonist-induced conformational states with the anionic lipids DOPG, DOPS and DOPI promoting receptor activation, whereas DOPE favors the inactive state. Interestingly, the effect of lipids on the receptor structure was observed in the absence of ligand demonstrating that it is not due to interactions between the ligands and the lipids. Moreover, negatively charged lipids favor receptor activation in the absence of a bilayer (as they have performed experiments in detergent system in presence of lipids but absence of liposomes) and in a dose-dependent manner thus acting as true positive allosteric modulators. According to the authors, it is unlikely that the differences observed between the lipid species are due to differences in the affinity for the receptor as they are observed in nanodiscs, where the very high local concentration of lipids ensures permanent interaction. Their studies indicate that lipids investigated differentially affect the conformational kinetics of the receptor. Indeed, they have observed that the presence of dioleoyl phosphatidylglycerol (DOPG) maintains the cytoplasmic side of the  $\beta$ 2AR in an open conformation for a longer (average) time than the binding of other lipids, leading to a larger apparent stimulation by the agonist Nb80, with almost complete receptor activation after 10 min. Thus, the binding of negatively charged lipids favors transmembrane (TM) 6, opening through specific binding of the headgroup to the protein, most likely on the intracellular side of the receptor. The authors suggest that the strong effect of negatively charged phospholipids indicate ionic interactions between receptor side chains and lipid headgroup. The stronger effect observed with DOPG as compared to dioleoyl phosphatidylserine (DOPS) or dioleoyl phosphatidylinositol (DOPI) indicates a clear level of specificity in such interactions. Few years later, the Giraldo team has investigated by long-timescale molecular dynamics simulations (MDS), the allosteric modulation and conformational changes in the  $\beta$ 2AR that



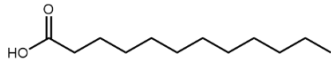
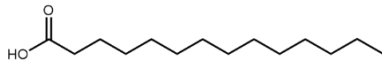
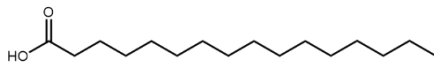
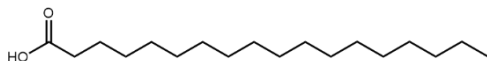
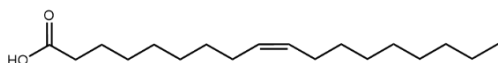
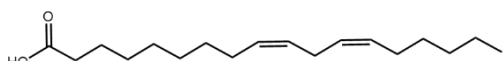
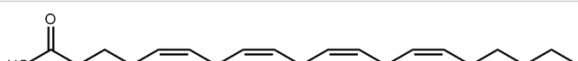
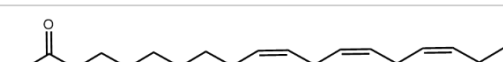


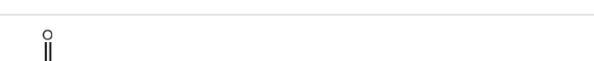
occur as a result of interactions with anionic (DOPG) and zwitterionic phospholipids dioleoyl phosphatidylcholine (DOPC) and dioleoyl phosphatidylethanolamine (DOPE). Their studies show that net negatively charged lipids stabilize an active-like state of the receptor that is able to bind to G-protein, while net-neutral zwitterionic lipids inactivate the receptor, generating a fully inactive or intermediate states with kinetics depending on the lipid headgroup charge distribution (8). Their studies revealed that such lipid modulation of the receptor activity is governed by the chemistry of protein-interacting lipid headgroups, as modeling studies are performed in absence of ligand and G-proteins, and that the intracellular loop 3 (ICL3) establish important electrostatic interactions with the lipid headgroups and influences the conformation of TM6. Moreover, their studies suggest that the nature of the phospholipid headgroup may contribute to control the receptor basal activity via receptor deactivation. Indeed, receptor interactions of anionic lipids may provide the energy necessary for the receptor to go from the inactive to the active state when in absence of agonist.

Besides an impact in the equilibrium between the inactive and active states of the receptor and its conformational dynamics by the nature of the lipid headgroup, this lipid property can also modulate the recruitment and interactions with effectors as G-proteins or  $\beta$ -arrestins. A study by the Grisshammer group on the impact of the anionic lipid POPG on both the ligand activation and G-protein recruitment of the Neurotensin 1 receptor (NTS1R) reported that an increased negative charge density dramatically affects the NTS1R-catalyzed GDP/GTP $\gamma$ S nucleotide exchange rates for G $\alpha$ q, whereas agonist binding shows little influence by the surrounding lipid type (9). In a cryo-EM structural study of the serotonin receptor (5-HT) bound to the G-protein either in absence or presence of ligand, the presence of phosphatidylinositol at the receptor/G protein interface was revealed (10). The PIP<sub>4</sub> headgroup is inserted into a cavity formed between the TM3, TM6 and TM7 of the receptor and the helix 5 of the G-protein G $\alpha$ i1. Analysis of GTP hydrolysis activity of the G-protein in absence and presence of PI4P, indicated that this lipid enhanced GTP hydrolysis. Such impact in hydrolysis was markedly less in presence of PI or PIP<sub>2</sub> and almost absent when other anionic lipids as PG and PS were used, demonstrating a certain level of lipid specificity in such impact. One of the two acyl chains of PI4P was found to be sandwiched between two cholesterol molecules, suggesting a role of cholesterol in stabilizing PI4P binding. This study joins a previous study by mass spectrometry that identified key residues on cognate G $\alpha$  subunits that mediate simultaneous PIP<sub>2</sub> bridging interactions between basic residues on class A receptors (11).

In a recent study combining experimental and computational methods Baneres and coworkers, have reported that ghrelin receptor conformational equilibrium was shown to be highly impacted by the presence of PIP<sub>2</sub> in the lipid membrane, that shifted the equilibrium away from the inactive state, favoring basal and agonist-induced G protein activation (12). Their study identified a preferential binding of PIP<sub>2</sub> to specific intracellular sites in the receptor active state. Following the determination of the structure of certain GPCRs in complex with  $\beta$ -arrestin, it came to light that, like with what has been observed with G-proteins, a PIP<sub>2</sub> molecule is found in the cryoEM structure of the complex forming a bridge between the membrane side of NTS1R in TM1 and TM4 and the C-lobe of arrestin (13). In a recent report, Kobilka and collaborators have shown that GPCRs which only transiently engage  $\beta$ -arrestin require phosphoinositide binding for  $\beta$ -arrestin recruitment. By using NTSR1 as a model system they found that specific phosphorylation sites are linked to this phosphoinositide binding-dependence for arrestin recruitment. Using *in vitro* biochemical, and biophysical assays, they demonstrated that phosphoinositide binding contributes to the stability of a GPCR- $\beta$ -arrestin complex. This study

also shows that phosphoinositides alone are able to promote a partially activated state of arrestin, thereby offering an explanation for how arrestin is able to persist at the plasma membrane once dissociated from a GPCR. Together, these results offer an explanation for how receptors that transiently associate with  $\beta$ -arrestin are able to recruit (and dissociate)  $\beta$ -arrestin in a spatiotemporally resolved manner, and strongly coupled receptors are able to maintain a stable association with arrestin in subcellular compartments yet regain the ability for further G protein engagement from subcellular structures (14). A recent report, suggests phosphoinositides to be key players in GPCR endocytosis where  $\beta$ -arrestin-dependent  $\text{PIP}_2$  synthesis boosts receptor endocytosis (15).

### 1.1. The role of the lipid polyunsaturation

Shorthands	Structure	Common name
C12:0		Lauric acid
C14:0		Myristic acid
C16:0		Palmitic acid
C18:0		Stearic acid
C18:1, n-9		Oleic acid
C18:2, n-6		Linoleic acid
C20:4, n-6		Arachidonic acid
C18:3, n-3		$\alpha$ -Linolenic acid
C20:5, n-3		Eicosapentaenoic acid
C22:5, n-3		Docosapentaenoic acid
C22:6, n-3		Docosaheanoic acid

**Table 1. List of the main fatty acyl chains that can be esterified in membrane phospholipids.**

Poly-unsaturated fatty acids (PUFAs) are important components of cell membrane phospholipids that are particularly enriched in certain organs as the brain where many GPCRs are expressed. PUFA level alterations have been associated with several pathologies in which GPCRs are main targets as psychiatric disorders.

Indeed, PUFA levels are substantially decreased in patients with psychiatric disorders as schizophrenia relative to healthy patients (16). PUFAs are classified into two major classes, the n-6 PUFAs and the n-3 PUFAs depending on the position of the first double bond from the methyl terminal end. In fact, n-6 PUFAs have the first double bond at the sixth carbon whereas n-3 PUFAs at the third (17, 18). These classes are derived biosynthetically from two precursors, linoleate (18:2:n-6) and  $\alpha$ -linolenate (18:3n-3) fatty acids, that are not synthesized *de novo* by mammals and have to be provided by the diet (19). Among the different PUFAs, Eicosapentaenoic acid (EPA), and docosahexaenoic acid (DHA) are the most abundant n-3 fatty acid in human brains (20, 21).

Until recently, unsaturated acyl chains are widely described as important modulators of the spatial regulation of membrane physical properties including fluidity, flexibility and curvature (22–25). A range of evidence from computational and experimental studies indicates that the type of lipid acyl chains directly influences the activity of receptors, in particular of GPCRs. In this context, UV–visible absorption spectroscopy studies of the prototypical GPCR, rhodopsin receptor, widely used as a model to investigate class A GPCRs, have shown that DHA acyl chains facilitate the transition from the light-activated meta-rhodopsin I form to the G protein-binding intermediate meta-rhodopsin II leading to an efficient and rapid propagation of G protein-coupled signaling (26–29). This finding is consistent with previous studies demonstrating that highest levels of meta-rhodopsin II form occurred in DHA-containing bilayers (30, 31).

Moreover, MDs have revealed that DHA forms tight associations with the rhodopsin receptor in specific locations qualitatively different from the nonspecific interactions made by saturated chains (32). Accordingly, NMR experiments on rhodopsin reconstituted into membranes with variable lipid content showed that DHA chains compete with other lipids for contact with a small number of weakly specific sites on rhodopsin (33). Supporting the crucial role of DHA-containing phospholipids for optimal rhodopsin activity, similar studies have showed that DHA deficiency resulted in slower kinetics accompanied by reduced levels of receptor activation and rhodopsin/G-protein coupling (34, 35).

Similarly, *in vivo* studies have found that presynaptic cannabinoid CB<sub>1</sub> receptors (CB<sub>1</sub>Rs), normally responding to endocannabinoids, were uncoupled from their G<sub>i/o</sub> in n-3 PUFAs deficient mice (36). This uncoupling, in PUFA altered environment, directly impairs CB<sub>1</sub>Rs functionality and confirm that long chain n-3 PUFA, especially the DHA, are indispensable to a normal activity of the endocannabinoid system (37).

Receptor dimerization and oligomerization are also thought to be tuned by direct lipid binding or by lipid composition-dependent bilayer properties. Recently, Guixà-González *et al* (38) have combined Martini coarse-grained molecular dynamics (CGMD) simulations and bioluminescence resonance energy transfer (BRET) experiments in order to investigate the effect of membrane DHA on GPCRs (adenosine A<sub>2A</sub> and dopamine D<sub>2</sub> receptors) oligomeric state stability which plays a relevant role in brain functioning. By using low- and high-DHA-content membranes models, they demonstrated that A<sub>2A</sub> and D<sub>2</sub> oligomerisation is clearly increased (~20%) in high compared to low DHA content membranes. This work led the author to propose that DHA effect on GPCRs assembly is purely kinetic resulting from a combination of an increase of the receptor lateral diffusion and the rate of spontaneous receptor–receptor interactions due to their partition into DHA-enriched domains. This was supported by similar studies, combining all atom and CGMD simulations with free energy calculations, indicating that DHA promotes A<sub>2A</sub>AR partitioning into the ordered (Lo) phase while in the absence of DHA the receptor partitioning into the disordered (Ld) phase is favored. According to the authors, the reduction of A<sub>2A</sub> partitioning to its native ordered environment upon PUFA depletion might impact the activity of this GPCR in various neurodegenerative diseases, where

the membrane PUFAs content in the brain are reduced comparing to healthy individuals (39). In this context, a recent NMR study of A2A receptor reconstituted in nanodiscs, showed that DHA chains enhanced the activation of the G-protein by A2AR. Interestingly, these studies revealed that DHA chains accelerate A2AR conformational exchange and shift the equilibrium towards a conformation displaying a large clockwise rotation of TM6, preferable for G-protein binding (40).

All together these studies point to the importance of PUFA, especially DHA acyl chains, in promoting optimal function in G protein-coupled signaling. According to these different studies, bilayers rich in DHA may impact protein function both by a change of general membrane properties as well as by specific interactions with particular regions of the GPCR.

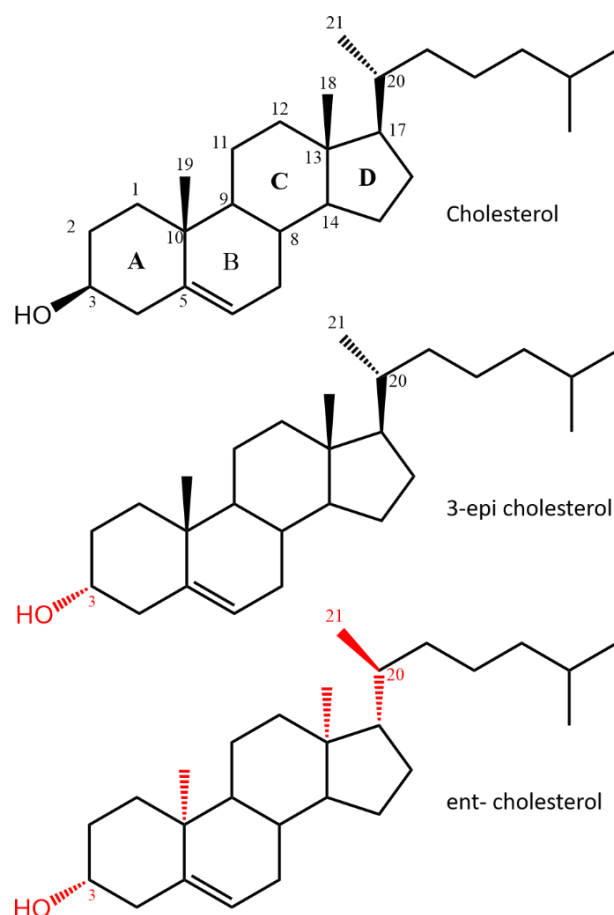
## **b) The role of cholesterol and lipid domains**

Cholesterol is a small molecule containing four rings and a side chain, with a total of 27 carbons. The second ring presents an unsaturation between carbons 5 and 6, while the first ring exhibits a hydroxyl group in position 3. This molecule is amphiphilic, the rigid planar four-ring backbone composing the hydrophobic part, and promoting its insertion in the lipid bilayer composing cell membranes. The hydroxyl group orients cholesterol molecules in the membrane, presenting this hydrophilic group close to the hydrophilic head groups of the phospholipids. Plasma membranes concentrate 80-90% of the total cell cholesterol content, that represents 20-25% of total lipids in the plasma membrane (41), and 25% of the total body content is found in the central nervous system (42). In the membrane, cholesterol interacts preferentially with the saturated acyl chain of phospholipids by its methyl groups corresponding to C18, C19 and the isooctyl chain linked to C17 (43).

The high concentration of cholesterol in plasma membrane and its unique chemical properties leads to a major impact on membrane proteins, including GPCR (44). The influence of cholesterol on GPCR properties, in particular, ligand binding, signalling, recycling, may be the result of specific and/or unspecific effects (see review (45)). The unspecific effects correspond to the influence of cholesterol on the physico-chemical properties of the membrane, also called indirect allosteric modulation. The specific effects relate to specific interactions between cholesterol molecules and some residues of the GPCR, also called direct allosteric modulation (review (46)). Another proposed mechanism is the possible location of cholesterol at nonannular sites (45, 47), which correspond to sites that are not at the immediate annulus surrounding the cross-sectional area of the GPCR. Finally, an orthosteric modulation mechanism has also been suggested (48). Specific binding sites can be nonannular ones, with high cholesterol affinity for the receptor at specific positions, that may constitute favourable environment for lower-affinity and annular cholesterol molecules (49).

The non-superimposable mirror image of cholesterol, the non-natural enantiomer ent-cholesterol, allows the same physico-chemical properties than cholesterol to the membrane (50). On the other hand, the diastereoisomer, 3-epicholesterol, which differs from natural cholesterol by the orientation of hydroxyl group in position 3, induces larger differences in the physico-chemical properties of the membrane (51–53) (Figure 3). Replacement of natural cholesterol by one of these stereoisomers in the membrane allow to distinguish specific and unspecific effects of cholesterol on GPCRs. Serotonin 1A receptor (5HT<sub>1A</sub>) ligand binding affinity is affected by replacement of natural cholesterol by épi-cholesterol but not by ent-cholesterol, indicating that changes in membrane properties affect ligand binding to this GPCR (53). Molecular dynamic simulations with serotonin 2A and 2B receptor subtypes (5HT<sub>2A</sub>, 5HT<sub>2B</sub>) indicated similar sterol density for cholesterol and the two stereoisomers ent-

and epi- cholesterol, close to helix 4. One sterol molecule is also able to enter deep between the helices 2, 3 and 4 in the extracellular leaflet. However, the simulations have shown similar helices motion for ent-cholesterol than natural cholesterol, but it largely differs for epi-cholesterol (51).



**Figure 3. Structures of cholesterol and synthetic cholesterol stereoisomers 3-epi cholesterol and ent-cholesterol.** Cholesterol is composed of 4 rings A, B, C, D, substituted by one hydroxyl group in position 3, 2 methyl groups in position 10 (C18) and 13 (C19), and a carbon chain, resulting in 8 asymmetric carbons. Only 5 are represented here, the three other stereo centers being in position 8, 9 and 14. In 3-epicholesterol, only the hydroxyl group in position 3 presents a different configuration. Ent-cholesterol corresponds to the non-superimposable mirror image of the cholesterol, with inversion in the configuration of all the 8 stereocenters.

Ligand binding affinity is one of the easiest parameter to investigate experimentally allosteric or orthosteric modulation of GPCRs. Cholesterol impacts ligand binding affinity for several GPCRs (54), but the direction of modulation (increasing or decreasing) is controverser. In a C6 cell line, cholesterol depletion induced by methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD) incubation enhanced the specific binding of adenosine A2A receptor (A2AR) selective antagonist (48)). To avoid any controversial role of cholesterol depletion in mammalian cell line, as it can be the case using M $\beta$ CD or statin incubations, ligand binding affinity has also been investigated in model membranes. In one of our study, ligand binding affinity has been investigated after solubilisation, purification and reconstitution of the chemokine receptor CCR5 expressed in *Pichia pastoris* membranes or just reconstitution following cell-free expression (55). For both of these models, CCR5 affinity for maraviroc, a selective antagonist, is drastically reduced in

presence of cholesterol. In contrast, binding affinity of the chemokine receptor CCR3 for its endogenous ligand CCL1 increased in a dose-dependent manner with cholesterol concentration in both styrene: maleic acid lipid particle and proteoliposomes (56). In bovine hippocampal membranes, cholesterol depletion obtained using various M $\beta$ CD concentrations, reduced affinity of a selective agonist to the serotonin<sub>1A</sub> receptor (5HT<sub>1A</sub>) (42). Several studies on oxytocin receptor (OTR) showed also a positive correlation, in cell or reconstituted systems, of cholesterol and agonist binding affinity (54, 57, 58). General influence of cholesterol on ligand binding affinity of GPCRs cannot be drawn as positive or negative correlations exist, as well as no correlation, for cannabinoid receptor 1 (CB1), cholecystokinin 2 (CCK2), serotonin<sub>7</sub> (HT<sub>7</sub>), or tachykinin<sub>1</sub> (NK<sub>1</sub>) for example (summarized in (54)).

In plasma membrane, cholesterol is spontaneously associated to sphingolipids, forming lipid rafts and caveolae. These two types of cholesterol-rich domains have been largely investigated (59). Caveolae are invaginations at the cell surface, stabilized by structural proteins, called caveolins (60). Lipid rafts contain less cholesterol (relative to sphingolipids) than caveolae, and a shorter lifespan. The composition of these 2 distinct microdomains is unique and influences the biological functions of these membrane structures. Cholesterol-rich domains allow particular physico-chemical properties: they rigidify the membrane in the liquid phase (61), enhance the ordering of lipids, causing a tighter packing of lipids, associated to an increased thickness of the membrane (62), and they reduce the dipole potential of membranes (63)(Figure 4c). The protein composition of cholesterol rich domains, lipid rafts or caveolae, may be driven by acylation of the protein, that contribute to partitioning in cholesterol-rich liquid order domains while a caveolin-binding domain in the protein sequence may promote association with caveolae (64). Other structural components may contribute to cholesterol-rich domain partitioning of proteins, such as the presence of particular hydrophobic residues in the amino acid sequence of the proteins.

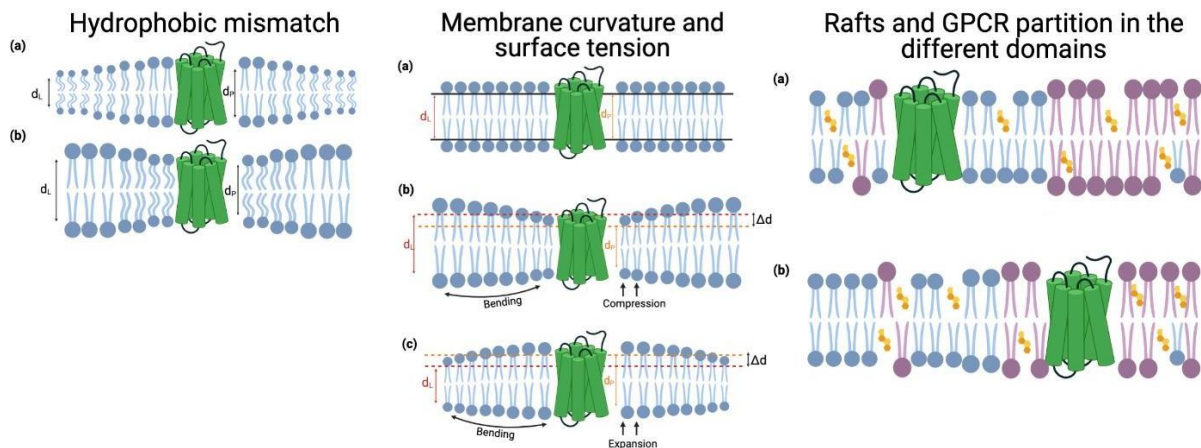
These mechanisms apply for GPCR partitioning in those domains as well as membrane signalling effectors, that may participate in cholesterol impact on GPCR signalling (64, 65). For example, of the nine isoforms of adenylyl cyclase, studies suggest that some of them preferentially localize to caveolae (AC5, AC6) while others were not detected (AC2, AC4) in these lipid domains, also depending of cell types (66). Another important component of GPCR signalling are G proteins. G $\alpha$ s and G $\alpha$ i segregates in lipid rafts while G $\alpha$ q prefers caveolae if present (67). This difference may be due to caveolin binding domain in the G $\alpha$ q sequence (68). The role of cholesterol in GPCR signalling is tightly linked to the composition of signalling complexes that compose membrane lipid domains, and affinity of GPCRs and effector proteins to the different domains, and that can be modulated by the presence of ligands. M $\beta$ CD-induced cholesterol depletion disrupts CCL4 mediated CCR5 signalling (69). Cholesterol depletion reduced intracellular calcium flux, and G $\alpha$ i mediated inhibition of cAMP accumulation, after CCR5 stimulation by CCL4.  $\mu$ -opioid receptor (MOR) translocates to lipid rafts through its interaction with G $\alpha$ i2 subunit while its location in non-raft domains is associated to  $\beta$ -arrestin 2 signalling (65). This receptor has been found in lipid raft domains in absence of ligands. Morphine, the endogenous agonist, induces signalling through G $\alpha$ i2 which inhibits adenylyl-cyclase, and MOR stays in lipid rafts domains. On the contrary, in presence of etorphine, a synthetic agonist, the receptor translocated to non-raft domains disrupting G-protein signalling. In contrast, ERK-MAPK activation by  $\beta$ 2-adrenergic receptor agonist requires receptor translocation to non-raft lipid domains (70). The class 1 metabotropic glutamate receptor association to lipid rafts is promoted by agonists, and this effect is reduced in presence of a non-

competitive antagonist (71). The signalling of A2AR, coupled to G $\alpha$ s is reduced following M $\beta$ CD-induced cholesterol depletion (72). Cholesterol depletion is associated to a decrease in basal cAMP accumulation, and agonist-mediated cAMP accumulation as well. Forskolin induced cAMP accumulation was not influenced by M $\beta$ CD. Importantly, the authors didn't observe a difference in ligand binding affinity in their conditions, contrary to Guixa-Gonzalez 2017(48). This indicates that cholesterol plays an important role in G $\alpha$ s mediated AMPc accumulation, independently of ligand binding stimulation. As some GPCRs are enriched in cholesterol-rich domains, these signalling complexes may also promote interactions between GPCRs. Homo- or heteromerization, that also play a role in the signalling of some GPCRs, may be influenced by membrane cholesterol content (73).

GPCR's trafficking is also under the modulation of cholesterol membrane concentration. In the case of 5HT $_1$ A $R$ , statin-induced cholesterol depletion switched the internalization mechanism following serotonin stimulation from clathrin- to caveolin-mediated endocytosis (74). On the other hand, the same group observed a different effect when cholesterol depletion was obtained by incubation with M $\beta$ CD(75). In this case, cholesterol depletion was associated to a concentration dependent inhibition of serotonin-induced endocytosis of the receptor. For a same cholesterol depletion level induced by lovastatin or M $\beta$ CD (~23%), there is a switch in endocytic pathway with lovastatin but not with M $\beta$ CD. However, both of them showed a re-routing of the receptor toward lysosomal degradation instead of endosomal recycling.

## **2) Lipid impact in GPCR activity – on the role of the membrane physico-chemical and mechanical properties**

Due to the fact that lipid molecules possess different chemical properties and structures, different morphologies leading to different packing and organization when inserted in lipid membranes, they impact membrane physico-chemical and mechanical properties. Herein, we have focused in: 1) membrane curvature elastic stress, a property that is closely related to the shape and relative volumes of lipid headgroups and fatty acid chain region; 2) membrane thickness that is directly related to fatty acid chain length and other lipid properties that can result in hydrophobic mismatch between the lipid and the receptor; 3) membrane fluidity a property related to the presence of lipid unsaturation in the fatty acid region and the presence of cholesterol in the membrane. Certain authors have investigated this membrane property by the use of external membrane fluidizing agents as described below.



**Figure 4. Illustration of some membrane physical and mechanical properties that are modulated by the lipid membrane composition: hydrophobic mismatch, membrane curvature and surface tension, lateral membrane homogeneity – domain (raft) formation. *Hydrophobic mismatch*: the lipid bilayer can distort around the GPCR to adapt the lipid membrane ( $d_L$ ) thickness to that of the protein hydrophobic thickness ( $d_P$ ) that can be larger (a) or smaller (b) than that of the bilayer. *Membrane curvature and surface tension* are involved in the mechanisms that GPCRs and the surrounding lipids adopt to reduce energetically unfavorable scenarios. Changes in GPCR conformation can result in decrease (b) or increase**

**(c) in their hydrophobic thickness ( $d_P$ ) which becomes different than that of the lipid membrane ( $d_L$ ) by the factor  $\Delta d$ . By taking advantage from the fact that different lipids possess different shapes, packing and ordering properties, lipids can reorganize around the receptor resulting in optimal hydrophobic coupling. Local compression or expansion forces of the bilayer adjacent to the protein as well as bending take place in such process. *Lipid membrane domains or rafts* occur as a result of differences in the lipid properties of the membrane, namely the presence of cholesterol, those domains are transitory and kinetically unstable. Partition of GPCRs and effectors in these domains can add in an additional source of signaling complexity, as these domains can function as signaling platforms that control the encounters of the receptors and effectors implicated in the different signaling cascades. More details are found in the text.**

### a) Lipid membrane curvature elastic stress

Curvature is a ubiquitous feature of biological membranes. It ranges in its extent from slight bending as observed in the plasma membrane to the strongly curved membranes of small cellular vesicles. In cellular membranes the curvature is often determined by specific proteins that are associated with the membrane as scaffold proteins such as clathrin, membrane-binding modules such as BAR (highly conserved protein dimerization domains that occur in many proteins involved in membrane dynamics in a cell) domains and other cytoskeletal components, which can actively bend regions of lipid membranes (76). Integral membrane proteins, in contrast, can influence membranes from their location within the bilayer as every membrane protein energetically favors a certain membrane curvature for its complementarity to its overall molecular shape. Membrane curvature and surface tension are involved in the mechanisms that GPCRs and the surrounding lipids adopt to reduce energetically unfavorable scenarios. Changes



in GPCR conformation can result in decrease (b) or increase (c) in their hydrophobic thickness ( $d_p$ ) which becomes different than that of the lipid membrane ( $d_L$ ) by the factor  $\Delta d$  (Figure 4b). By taking advantage from the fact that different lipids possess different shapes, packing and ordering properties, lipids can reorganize around the receptor resulting in optimal hydrophobic coupling. Local compression or expansion forces of the bilayer adjacent to the protein as well as bending take place in such process. Membrane curvature is strongly dependent on the lipid composition of the respective bilayer which intrinsically can possess cylindrical, conical and inverted conical shapes depending on the dimensions of their hydrophobic acyl chains relative to the size of their respective head group. Lipids with small polar headgroups as PE and polyunsaturated hydrocarbon chains such as the six-fold unsaturated DHA, have high tendency to adopt a negative membrane curvature ( $H_{II}$  phase) (77–79). While phospholipids as PC (if not possessing poly-unsaturated fatty acid chains) adopt a more conical shape and contribute to a zero-curvature membrane. For a review on the forces governing the membrane spontaneous curvature please refer to Lee (80).

Most biological membranes contain lipids that, in isolation, prefer to adopt a curved, hexagonal  $H_{II}$  phase rather than the normal, planar, bilayer phase (81, 82). The curvature elastic stress in lipid bilayers is related to the intrinsic propensity of the lipid monolayer to curl in a stress-free environment state. PE is mostly found in the internal leaflet of the plasma membrane (the site where G-protein binds). Membrane curvature has been shown to impact receptor activation and signaling events as described below and mostly studies have implicated rhodopsin.

Elastic curvature stress resulting from nonlamellar lipids in bilayer membranes has been shown to affect the activation of rhodopsin, namely the MI-MII equilibrium, shifting it toward the MII state (83). Brown and coworkers have suggested a mechanism by which stored curvature elastic energy could be linked to a mismatch between the hydrophobic thicknesses of a rhodopsin and the surrounding lipid bilayer (84, 85). One possible response of a system, as it will be presented in section 3.2, when the hydrophobic thickness of a protein is greater than that of the surrounding lipid bilayer is for the fatty acyl chains of the lipids around the protein to stretch, to provide hydrophobic matching. The lipids around the protein will show negative curvature (Fig. 4). This process would be highly unfavorable for lipids have a tendency to form zero membrane curvature as non-unsaturated PC, but formation of a membrane with negative curvature will be favorable for phospholipids such as PE. Thus, if a membrane protein can adopt two conformational states: 1) in which its hydrophobic thickness matches that of the planar bilayer; 2) in which its hydrophobic thickness is greater than that of the planar bilayer, then the presence of phosphatidylethanolamine will favor the thicker form and thus would promote scenario 2. Such effect could explain why phosphatidylethanolamine favors the MII conformation of rhodopsin, if the hydrophobic thickness of MII is greater than that of MI (84, 85). It has been reported by several authors that upon activation rhodopsin increases its average thickness, plasmon resonance experiments have estimated an average thickness increase of the rhodopsin membrane to about 4 Å upon photoactivation (86). Plasmon-waveguide resonance (PWR) studies of rhodopsin embedded in membranes containing or not PE at different levels, also revealed PE to highly enhance the MI-MII transition with the pKa of the transition being shifted by about one unit. Moreover, measurements of the interaction of this rhodopsin and its corresponding G protein transducin ( $\alpha t$ ) in lipid bilayers demonstrated that PE markedly increased receptor affinity for  $\alpha t$  upon light activation, while the affinity of  $\alpha t$  for dark-adapted rhodopsin remained unchanged. In contrast, in pure lamellar PC bilayers the affinity of  $\alpha t$  for light-activated rhodopsin was substantially lower (87), suggesting membrane curvature impact to go beyond the core of the lipid membrane that surrounds the receptor.

Elastic curvature stress was also shown to affect 5-HT<sub>1A</sub>R activity in a study conducted by Gutierrez and collaborators where the receptor was reconstituted in GUPs made from palmitoyl-oleoyl phosphatidylcholine (POPC) and DOPE and its activity followed by the receptor dependent G-protein oligonucleotide exchange (88). Their results indicate that the presence of PE lead to increased receptor activity. The authors suggest has observed and reported for rhodopsin, the presence of DOPE in our GUPs with a lipid/protein ratio of 100:1, and a peak rate of 5-HT<sub>1A</sub>R activity at 7.5–10 mol % DOPE could be explained in terms of the release of elastic curvature stress due to favorable lipid and protein interactions.

In contrast to G protein heterotrimers, the activated monomeric  $\alpha i$ -subunit has been reported to possess a marked preference for pure lamellar structures (89). This would provoke the rapid exit of activated  $\alpha i$ -monomers from the receptor environment where the hexagonal-phase propensity is increased. Both  $\alpha i$  and  $\alpha s$  have been found in lipid rafts (67). On the other hand, dissociated G $\beta\gamma$  dimers still maintain a high affinity for membranes with a hexagonal propensity (89), which may also influence their distribution in native membranes. The general

observation that prenylated proteins are normally not localized in lipid rafts (90) was also corroborated for G $\beta\gamma$  subunits, which were found to be excluded from synthetic lipid rafts (91). This indicates that the G $\beta\gamma$  dimer most probably determines the lipid–protein interaction characteristics of the heterotrimeric G proteins. As such, the G $\beta\gamma$  dimer defines the preference of complete G $\alpha\beta\gamma$  heterotrimers for the hexagonal-phase, thereby masking the lamellar membrane affinity of the G $\alpha$ -subunit. As a result, one of the functions of the G $\beta\gamma$  dimer could be to shuttle the lamellar membrane phase preferring G $\alpha$  subunit to the vicinity of the receptor, making it available for instant activation.

An interesting study on how the membrane curvature regulates ligand-specific sorting of GPCRs in living cells was reported by Rosholm and coworkers (92). While it has long been hypothesized that transmembrane proteins such as GPCRs can partition into their sites of action by recognizing the curvature of the membrane (93–95). However, to date there have been only a few examples of live-cell measurements that investigate membrane curvature-dependent protein sorting (96–98). In this study they have investigated 3 GPCRs from class A: the neuropeptide Y receptor Y2, the  $\beta$ 1 adrenergic receptor and the  $\beta$ 2 adrenergic receptor. They combined fluorescence microscopy approaches with data fitting by a thermodynamic model to quantify how sorting is mediated by an energetic drive to match receptor shape and membrane curvature. The three receptors displayed distinct curvature-dependent responses to ligand activation, revealing multiple layers of regulation and specificity encoded in the sorting process.

## **b) Membrane thickness and hydrophobic mismatch**

The hydrophobic thickness of a lipid membrane is a fundamental property that has a strong effect on transmembrane protein structure and function. Lipid membrane properties as fatty acid chain length, presence of lipid unsaturation and of cholesterol, with consequent lateral lipid heterogeneity, among others, dictate the hydrophobic membrane thickness. Hydrophobic mismatch is a phenomenon that occurs when the hydrophobic thickness of the transmembrane region of a membrane protein does not match the natural hydrophobic thickness of the membrane in which it is located (Fig. 4a) (99). Such mismatch has obvious energetic consequences due to the juxtaposition of energetically unfavorable regions of the membrane lipids and the protein. To deal with that, both lipids and proteins can adapt. There are two different scenarios: 1) the TM domain length of the protein is higher than the hydrophobic membrane thickness, it is called a positive mismatch; 2) the TM domain length is shorter than the hydrophobic membrane thickness, this is called negative mismatch. To minimize such mismatch, the protein can adapt via structural conformational adaptation, by potentially changing tilting of the helices or by self-aggregation to prevent energetically unfavorable exposure of specific residues. The protein can also laterally diffuse to regions of the membrane where hydrophobic match can be satisfied. Else, membrane thickness could deform and adjust to the length of the hydrophobic transmembrane helices in order to avoid an energetic penalty (100, 101). Hydrophobic mismatch could lead to changes in membrane protein folding, conformation, and activity as further discussed below.

Early FRET studies on rhodopsin by Brown's laboratory, revealed that the reduction of membrane thickness or the increase of the protein/lipid molar ratio promote rhodopsin association (102). This observation was assumed to be based on the hydrophobic mismatch induced curvature of the membrane at the protein-lipid interface. Indeed, association of proteins into clusters relieves the curvature free energy. Association of GPCRs to improve the hydrophobic match was since then being extensively analyzed using computational methods (103–107). Periolo *et al* showed by coarse-grained MD simulations on systems containing several copies of rhodopsin embedded in membranes of different thickness, that rhodopsin

alters the membrane thickness at the membrane protein interface (106). The shorter the lipid chain length, the more pronounced was the hydrophobic mismatch induced deformation of the bilayer. Studies by Mondal described the energy penalty associated with the “residual hydrophobic mismatch” (RHM) to be composed of specific local contributions that can be attributed to particular residues. Such RHM can be reduced if proteins oligomerize. They have demonstrated the role of the RHM as a mechanistically important component of GPCR oligomerization in a case study of the  $\beta$ 2AR oligomerization. They show RHM at TMs 1,4, and 5 of the monomeric GPCR to be substantially alleviated in the oligomeric form. The modulation by cholesterol, along with its capacity in modulating membrane thickness, of GPCR oligomerization has been extensively investigated by Böckmann and collaborators, supporting that GPCRs (mostly performed studies on chemokine receptors) association is promoted in presence of cholesterol (108). Interestingly, the impact of cholesterol content in hydrophobic mismatch of GPCRs is not straightforward, as in the case of the  $\beta$ 2AR, hydrophobic mismatch was determined to be higher in presence of cholesterol (109).

Hydrophobic mismatch should impact GPCR activity as this property can depend on the GPCR occupied state, the membrane perpendicular length of the GPCR is shorter in an inactive conformation than in an active one. Few studies have addressed the relation between receptor activity and hydrophobic mismatch. Indeed, we should refer to earlier studies on rhodopsin by the Brown laboratory, that revealed that a membrane composed by a larger variety of lipids and the possibility to harbor regions of distinct thickness and fluidity was shown to facilitate rhodopsin activation (formation of the light-activated meta-rhodopsin II state) (84).

Years later, NMR measurements have also shown that increasing bilayer thickness favors formation of meta-rhodopsin II, while oligomerization favors meta-rhodopsin I (which corresponds to the dark-adapted, inactive conformation) (110). Light-activation of rhodopsin leads to TM6 motion outside of the protomer which overall expands the receptor surface (111) and consequently increases the hydrophobic mismatch. To compensate this effect, the receptor has three options: association with another receptor, translation to a different membrane domain of overall increased thickness, or both. In a more disperse membrane environment, active MII state rhodopsin receptors may likely diffuse to membrane areas with more suitable properties. Receptor movement/partitioning to membrane regions of increased membrane thickness (raft-like) have been observed by Alves and coworkers by plasmon-waveguide resonance in the case of the human delta-opioid receptor (112). The study revealed that receptor partitioning was dictated by its bound-state, being preferentially incorporated in thinner (POPC-rich domains) in the absence of any ligand, while agonist-bound proteins tended to move into increased thickness membrane regions (sphingomyelin-rich domains) (112).

A very recent study on the ghrelin receptor has specifically investigated the impact of membrane thickness in the conformation of the receptor and receptor mediated G-protein activation by the use of nanodiscs composed of different phospholipids that resulted in membrane thickness differences of 5-6 Å without any changes in membrane fluidity (12). The study suggests that changing the membrane thickness of the bilayer had an impact on the conformational features of the active/active-like conformation of the isolated receptor in the absence of G protein. Specifically, the thinner the membrane the shorter the distance between the cytoplasmic ends of TM1 and TM6, with a difference in the 5 Å range. The same trend was observed in the presence of the ligand ghrelin. Further, to assess whether these differences in GHSR conformation had an impact on G protein activation, the authors measured receptor-catalyzed GTP turnover. Together with energy transfer assays, their studies revealed that while not impacting the assembling of the receptor/G protein complex, membrane thickness affected receptor catalyzed G-protein activation.

One could ask whether hydrophobic mismatch could be relevant in cellular membranes. Chattopadhyay and colleagues have nicely addressed this question and reminded that in

eukaryotic cells there is a gradient of increasing bilayer thickness from the endoplasmic reticulum to Golgi to the plasma membrane (113). All membrane proteins traverse this path and hydrophobic mismatch has been proposed to play a crucial role in such sorting (114).

Another interesting type of mismatch can occur between posttranslational lipid modifications of the GPCR and membrane lipids in the bilayer center. This type of mismatch is caused by a misalignment between acyl chains of membrane lipids and the posttranslational receptor modification. Such phenomenon has been computationally observed by Olausson *et al* for the palmitoylated rhodopsin receptor, where they found that lower order parameters of the posttranslational linked palmitoyl chains, combined with the smaller number of methylene groups compared to the lipid chains (STEAs and DHAs) of the membrane resulted in an energetically disfavored mismatch of approximately 3 Å to the center of the membrane (115). The authors suggest that such membrane-centered mismatch could have an effect on the curvature stress and the hydrophobic mismatch within the bilayer which in turn could drive the equilibrium between different substrates of the membrane-embedded rhodopsin.

### **c) Membrane fluidity**

Membrane fluidity, or the reciprocal microviscosity is a property that depends on the lipid composition, especially the type of acid moieties in the phospholipids (with varied length and unsaturation levels) and the amount of cholesterol known to order or rigidify fluid membranes. A general rule is that increasing fatty acid chain length decreases membrane fluidity while increasing the degree of unsaturation increases fluidity (116). Alterations in membrane lipid composition, namely affecting membrane fluidity, have been shown to occur upon aging, have been associated with both metabolic and pathological conditions as well as with nutritional interventions (to cite a few: (117–122)). Membrane fluidity was among the first properties shown to impact the activity of proteins (123) and GPCRs are not an exception. Gurdal and coworkers found a correlation between low membrane fluidity and impaired coupling of  $\alpha_s$  with the  $\beta_2$ -adrenergic receptor, which mediates vasorelaxation and as a result reduction of blood pressure, in aortas of rats (124). In contrast, another study carried out in crude membrane preparations from rat lung showed the opposite relationship, concluding that the age-related alteration in coupling between the receptor and the G protein is difficult to explain by alterations in membrane fluidity (125).

Besides numerous studies implicating cholesterol, which impacts membrane fluidity, cholesterol has also been shown to modulate GPCR activation and signaling (as described in section 2.3), some reports have directly addressed this question. The serotonin receptors have been investigated regarding the impact of membrane fluidity on the receptor activity and conformational equilibrium. Gutierrez *et al* have performed a systematic analysis on the impact of membrane ordering and thus fluidity in the functional activity of the human serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptor by the use of synthetic bilayers (giant unilamellar protein-vesicles, GUPs) of controlled lipid content together with a fluorescent reporting system that detects GPCR-catalyzed activation of G protein to measure receptor-catalyzed oligonucleotide exchange (88). They show that increasing the concentrations of the ordering components (cholesterol and brain sphingomyelin) in POPC membranes results in increased receptor activity as measured by the receptor-catalyzed oligonucleotide exchange. Moreover, they have used a series of cholesterol analogues possessing different membrane ordering profiles in membranes and show that the higher the magnitude of the response they observe in terms of GTPase activity is directly correlated with increasing ordering of cholesterol analogues. Their results show that membrane

order, induced by sterols and sphingomyelin, is the key determinant of 5-HT<sub>1A</sub> receptor activity as revealed by the highest rates of receptor-catalyzed oligonucleotide exchange.

A more recent study by Yoshida *et al*, reported on the impact of membrane fluidity in another human serotonin receptor subtype, the 5-HT<sub>2B</sub> (126). They used the receptor inserted in nanodiscs to control the membrane composition fluidity by incorporating phospholipids with varied fatty acid chain composition: POPC (C16 with no unsaturation and C18 with one unsaturation), DLPC (1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocholine; C12 with no unsaturation), DOPC (two C18 with one unsaturation) and DMPC (1,2-dimyristoyl-snglycero-3-phosphocholine; C16 with no unsaturation). They characterized the membrane fluidity of the different membranes by MDS that suggest, as previous reports, that the membrane of DLPC possessed the highest fluidity of the four phospholipids, and also suggested that the DMPC membrane was more rigid than those composed of the other three phospholipids. In support of this conclusion, the gel-liquid crystal transition temperature of DMPC is higher than that of the others as reported (127). They have used microscale thermophoresis and SPR to measured ligand binding affinity (of agonist serotonin, 5-HT) to the receptor and have found that DMPC totally abolished ligand binding. Surface plasmon resonance (SPR) studies revealed that binding affinities depend mainly on the dissociation rate ( $k_{\text{off}}$ ), suggesting that increased membrane fluidity may stabilize the activated 5-HT<sub>2BR</sub>-ligand complex. Based on these biophysical analyses, they hypothesize that membrane fluidity influences the equilibrium between active and inactive forms of 5-HT<sub>2BR</sub> and have used thermal shift assays to get further insight into this. The results implied that the increased membrane fluidity shifted the equilibrium to favor the active form of the receptor. In contrast, the decreased membrane fluidity, observed in the DMPC would prevent the shift of conformational equilibrium toward the active form of the receptor. Simulation studies suggest that the fluidity of the phospholipid membrane would lower the energy barrier between conformational states of this GPCR by forming the intramolecular interaction of TM1-TM7. This interaction in the receptor would in turn make 5-HT binding more favorable, and make the receptor-ligand complex more stable, leading to the slower  $k_{\text{off}}$  in the SPR. Conformational changes of TM1-TM7 have been shown to be responsible for the activation of A<sub>2A</sub> and  $\beta$ <sub>2A</sub> receptors in previous reports (128), thus the present findings reveal the close relationship between conformations of GPCRs and membrane fluidity at atomic resolution.

An impact of membrane fluidity in the activity and dynamics of the bradykinin B<sub>2</sub> receptor in endothelial cells was determined investigated directly by altering membrane fluidity with increased amounts of benzyl alcohol, a known enhancer of this membrane property (129). By using time-resolved fluorescence microscopy along with FRET to follow GPCR conformation, the authors found that membrane fluidization leads to significant increase in the activity of the receptor, a process that is blocked by an antagonist of the receptor, and that overall membrane fluidity along with cell membrane tension affects the conformational dynamics of this receptor.

#### **d) Lipids as cofactors**

While the bulk of the lipid molecules in contact with a GPCR act as a solvent for the receptor, interacting with it relatively non-specifically, some receptors may also interact with much greater specificity with a small number of specific lipid molecules often essential for activity and acting as cofactors. Cholesterol is certainly one of the most commonly found lipid cofactors in GPCRs, often revealed following structural determination, but with the increasing number

of structures determined over the last year, many other lipids have emerged as cofactors as presented below.

An interesting study by Watts and collaborators, directly measured binding constants by electron spin resonance (ESR) between the rat neurotensin receptor 1 (NTS1) in its oligomeric form and the lipids: PC, PE, PS and cholesterol (130). The measurements of the relative lipid affinities indicated that both PC and PE, showed no relative selectivity for the receptor. As the authors have previously reported that for NTS1 in reconstituted systems, PE is important for effective binding of neurotensin (131), they suggest that this lipid exerts a bulk collective effect on the receptor rather than specific binding. PS showed approximately double the affinity for the receptor compared to zwitterionic PC and PE, while the negatively charged fatty acid showed about five times the affinity compared to that of the zwitterionic lipids. The differences in affinity could, in principle, be due to exposed positively charged residues at the lipid headgroup region of the bilayer as the authors describe in detail herein (130). As per cholesterol, no relative selectivity was found for this receptor, despite the fact that it influences receptor oligomerization and signaling.

The Govaerts team has also reported on the strong effect of negatively charged lipids as PG on agonist binding and activation of the  $\beta$ 2AR (7). While their data cannot rule out the possibility that such receptor modulation arises from changes in membrane bulk properties, the strong effect observed with negatively charged lipids suggest ionic interactions between receptor side chains and lipid headgroups.

The importance of anionic lipid interactions was also revealed by a coarse-grained molecular dynamics simulation study, where the polyanionic lipid PIP<sub>2</sub> was shown to enhance the interaction between the Adenosine A2a receptor and Gs protein (132). The study revealed 4 PIP<sub>2</sub> binding sites in the receptor all located at the intracellular rim of the receptor at interfaces between the different helices that occurred via arginine residue. Besides PIP<sub>2</sub> sites, other lipid binding sites were revealed by this study: GM3 that exhibited five receptor interactions placed in different locations from the N-terminus to the interfaces between TM helices and intra and extracellular loops; cholesterol covering nearly all the hydrophobic grooves between the transmembrane helices of the receptor. The most interesting finding of this study, regards the dual role of PIP<sub>2</sub> on A2aR activation that involves both stabilization of the characteristic outward tilt of TM6 and enhancement of Gs protein association, thus demonstrating that these bound lipids allosterically regulate the functional properties of this receptor. A recent study on the ghrelin receptor that employed FRET measurements between a fluorescent modified phosphatidylinositol and fluorescently labelled amino-acids in different receptor locations, allowed to locate PIP<sub>2</sub> binding sites to the extracellular part of the receptor (133). Then MDS and site-directed mutagenesis have further refined 3 hotspots for PIP<sub>2</sub> binding to the receptor located at: the intracellular parts of TM1 and TM4 that bound two PIP<sub>2</sub> molecules; the interface between TM5 and TM6 and bound two PIP<sub>2</sub>; the interface between TM7 and H8 and bound 1 PIP<sub>2</sub>. Interestingly this third site was also found in the NTS1R (11) and A2AR (132).

As mentioned above, high resolution structure determination of several GPCRs allowed direct visualization of lipid molecules in very specific receptor locations as well as at interfaces between the receptor and effector proteins. In a recent report that determined the structures of the serotonin receptor (5-HT) in different bound states in interaction with G protein complexes, phosphatidylinositol was revealed to be placed at the receptor/G protein interface (10). More precisely, the phosphatidylinositol was found inserted into a cavity formed between TM3, TM6 and TM7 of the receptor and the  $\alpha$ 5 helix of Gai1. The study revealed phosphatidylinositol to be important for the enzymatic activity of the G protein, with a 2.4-fold enhancement in GTP

hydrolysis activity in presence of this lipid. Furthermore, mutation of the residues implicated in such lipid/receptor interaction resulted in reduced G protein activation and abolished the regulatory function of phosphatidylinositol. The cryo-electron microscopy structure of full-length human neurotensin receptor 1 (NTSR1) in complex with truncated human  $\beta$ -arrestin 1 was also determined recently by the Kobilka laboratory (13). Besides the fact that this study revealed that phosphorylation of the receptor was essential to ensure receptor/ $\beta$ -arrestin interactions, the study highlights the importance of a phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) molecule forming a bridge between the membrane side of NTSR1 transmembrane segments 1 and 4 and the C-lobe of arrestin. The presence of this lipid was also confirmed by mass spectrometry analysis and fluorescence studies determined a binding affinity of PIP<sub>2</sub> to both the receptor and  $\beta$ -arrestin in the low  $\mu$ M region. A recent study from the same team, further reported on the importance of PIP<sub>2</sub> in stabilizing the receptor-arrestin complex and offering control of complex assembly and dynamics. Namely, using PIP-binding deficient mutant of arrestin, the study revealed that the three components (receptor,  $\beta$ -arrestin and PIP) act in a concerted manner to provide a mechanism for release of arrestin from GPCRs with insufficient phosphorylation, allowing for the rapid recycling.

Specific cholesterol binding sites, also called nonannular cholesterol, has also been identified and may play a physiological role and influence GPCR activity (134). A cholesterol recognition amino acid consensus (CRAC) motif has been first described in a mitochondrial membrane protein (135). This motif corresponds to a sequence comprising -L/V-(X)<sub>1-5</sub>-Y-(X)<sub>1-5</sub>-R/K-, where (X)<sub>1-5</sub> represents one to five residues of the same amino acid. It is not specific to GPCRs, and can be located in different TM domains of the GPCRs. For example, a CRAC motif has been recently observed in TM7, co-localized with the highly conserved NPxxY motif found in class A GPCRs (136). This motif has been found in 38% of about 285 class A GPCRs analysed structures. However, the presence of the CRAC motif in the sequence is not predictive for cholesterol binding sites as illustrated by this recent work on CCK1R and CCK2R (136). For the first one, ligand binding and downstream signalling are modulated by cholesterol membrane levels. For the second one, even if highly homologous, the activity is not affected by cholesterol levels. Both of them share several cholesterol recognition motif sites, in particular CRAC sequences on TM3, TM5 or TM7, but cholesterol has not been observed to bind on these positions by CGMD simulations. In CCK1R, cholesterol has been found to interact importantly with TM3 but with residues upper to the CRAC motif. On the other hand, no cholesterol interaction with CCK2R has been found. A mirror image of CRAC, also called CARC, has also been described, where R/K is found on the N-terminus and L/V on the C-terminus (137). Another cholesterol binding site has been identified first for the  $\beta$ 2AR (138), called cholesterol consensus motif (CCM), where a charged residue arginine or lysine in the lower part of TM4 interacts with hydrogen bonds with the hydroxyl group of the ring A of cholesterol. This residue is followed by hydrophobic residues such as isoleucine, valine or leucine upper on TM4. An aromatic residue, tyrosine or tryptophan upper on TM4 is highly conserved among class A GPCRs (94%), and seems to highly contribute in the interaction with the sterol ring and the edge of ring D. Another residue, considered of least importance for cholesterol binding is a phenylalanine, a tyrosine or a tryptophan localized on the bottom of TM2. Concerning the  $\beta$ 2AR, CGMD simulations have shown a good correlation between cholesterol localization found in the crystal structure and the residency time measured using a CGMD approach (136). Even if CCM motif is conserved in 44% of human class A GPCRs, it doesn't always correlate with cholesterol binding sites observed in high resolution crystal structures or molecular



simulations. Indeed, these general binding sites, determined based on the sequence or on the crystal structure, are not predictive for cholesterol specific interaction and other cholesterol preferential localizations has also been evidenced, also called “cholesterol hot-spots” that can be specific for each receptor families (109). Complementary experimental data are now necessary to confirm physiologically relevant cholesterol specific binding sites and its role for GPCR structure and dynamics.

### **e) The importance of GPCR and G-protein post-translational lipid modifications**

When considering protein/lipid interactions, one must not forget co- and post-translational modifications of the signaling proteins as the receptor, G-proteins, G-protein coupled effector enzymes and receptor kinases (139–142). Lipid modifications consist in the covalent binding of a hydrophobic lipid molecule to the signaling protein and comprise: myristoylation, palmitoylation and isoprenylation.

In case of GPCRs, and contrarily to G-proteins, protein lipidation is not needed for tight membrane attachment. GPCRs can be palmitoylated through the attachment of a palmitate to one or more cysteine residues via a thioester bond. As this thioester bond is cleavable, the palmitoylation state of a receptor can be used to regulate its activity. Depalmitoylation seems to be regulated by the bound state of the receptor, being accelerated upon agonist binding as demonstrated for certain receptors (dopamine D1, serotonin 4A, delta opioid and adrenergic receptors) but not for all serotonin 1A, for example) (41). Palmitoylation usually occurs in the cytoplasmic (C-terminal tail) of the receptor positioned 10 to 14 amino acids downstream of the last transmembrane domain. At this position, palmitoylation has a profound effect on the local conformation of this domain by the creation of an additional intracellular loop. Although being the common location, GPCR palmitoylation can also occur in other locations as the intracellular loops as evidenced in case of vasopressin receptor (143). Indeed, up to three palmitate groups can be found on GPCRs and different palmitoylation profiles can result in various conformations of the carboxy-terminal tail, which may select for certain G protein interactions (41). Palmitoylation influences many aspects of GPCR signaling. The palmitoylation state of certain receptors can preferentially direct signaling through particular G-proteins upon binding of the same ligand, thus being a source of biased signaling. Palmitoylation can influence the phosphorylation state of the receptor, modulating desensitization and internalization, and can also control internalization independent of phosphorylation. It has been suggested that palmitate binding in the endoplasmic reticulum ensures correct processing and trafficking of receptors, and, once at the cell membrane, may target GPCRs to lipid rafts. However, not all palmitoylated receptors associate with rafts and not all raft-associated GPCRs are palmitoylated (144).

The other type of lipid modification in GPCRs is isoprenylation, a lipid modification that occurs upstream of S-palmitoylation on many protein substrates, facilitating membrane localization and activity of key intracellular signaling proteins. Such lipidation has been shown to exist in the prostacyclin receptor but also in other proteins of the signaling machinery as Ras-type proteins and small GTPases where its deregulation has been connected to pathologies (145) (146). A second lipid modification can further increase the hydrophobicity of the protein, its membrane affinity and membrane residence time. As palmitoylation occurs after isoprenylation, this first signal may also be required to permit an initial interaction with membranes thereby facilitating palmitoylation (147).

G-proteins ( $\alpha\beta\gamma$ ) bind tightly and often reversibly to the cell membrane, thus covalent lipid modifications are essential to mediate such process. G protein  $\alpha$  subunits ( $G\alpha$ ) are modified at their N-terminus by the fatty acids myristate and/or palmitate, while  $\gamma$  subunits of  $\beta\gamma$  dimers ( $G\beta\gamma$ ) are modified by farnesyl or geranylgeranyl isoprenoids at their C-terminus. Myristoylation occurs exclusively on  $G\alpha$  of the  $\alpha_i$  family (148, 149). The N-myristoyltransferase catalyzes the amide bond attachment of the 14-carbon saturated fatty acid myristate to the extreme N-terminus of a protein. This modification occurs co-translationally and requires a glycine at the extreme N-terminus of a substrate protein; thus, a prerequisite is the removal of the initiating methionine by a methionyl amino peptidase. Not all extreme N-terminal glycines, however, are myristoylated and this is an irreversible modification.

Most mammalian  $G\alpha$  proteins undergo palmitoylation via cysteine residues in the N-terminal amino acids of  $G\alpha$ , although rarer palmitoylation can also occur via N-terminal glycine residues, as observed for the  $\alpha_s$  subunit (150). Thus, it is possible that  $\alpha_s$  subunits possess dual palmitoylation, the functional significance for that is yet not understood. As with GPCR palmitoylation the process is reversible. Changes in palmitoylation can clearly affect the subcellular localization and trafficking of  $\alpha_s$ , or other  $G\alpha$ , but understanding the functional significance of such regulated changes in localization is quite challenging.

All mammalian G protein  $\gamma$  subunits are isoprenylated (151) via thioether attachment of either the 20 carbon geranylgeranyl or 15 carbon farnesyl moiety to a C-terminal cysteine in a CaaX motif, in which the cysteine is followed by two aliphatic amino acids and the X amino acid that specifies recognition by either well-characterized geranylgeranyl or farnesyl transferases. After irreversible isoprenylation, most isoprenylated proteins undergo the additional obligate modifications of proteolysis of the C-terminal three -aaX residues and then carboxy methylation of the new isoprenylcysteine C-terminus (152). The role of such subsequent modifications is surprisingly still not clear. Carboxy methylation does appear to increase membrane binding of farnesylated proteins, most likely by a general increase in hydrophobicity. On the other hand, the greater hydrophobicity of the geranylgeranyl lipid compared to farnesyl makes it a strong membrane anchor that does not seem to require

methylation to increase strength of membrane binding. Prenylation of  $\gamma$  subunits is necessary for the membrane localization of heterotrimeric G proteins and for functional heterotrimeric GPCRs and deficiency in G protein gamma subunits prenylation has been shown to disrupt GPCR signaling in the zebrafish signaling (153).

Overall, besides the fact that post-translational modifications are essential to ensure G-protein anchoring to the membrane and the lack of such modifications results in important signaling defects, the additional roles of such modifications in both GPCRs and G-proteins is far from being totally understood.

## Conclusions

The modulation of GPCR activity by lipids has set up the interest of researchers from as early as the 80s, pioneering studies being mostly done in bacteriorhodopsin certainly as a result of facility in obtaining high amounts of this receptor from natural sources (bovine retinas) at low cost, their intrinsic higher stability relative to other receptors (due to the fact that the ligand retinal is naturally present in the protein pocket) and the facility in following protein activation by classical fluorescence spectroscopy and flash photolysis assays commonly available in most laboratories. Rhodopsin was also largely investigated by MDS as presented in this review.

Lipid impact in GPCR functioning regaining some interest by the end of the nineties where lipid rafts have become popular and particularly investigated, and several laboratories have determined receptor localization in or out of such domains and how ligands could affect such receptor partitioning.

With the exploding number of high-resolution structures of GPCRs over the last few years by cryo-EM and X-ray studies, it became evident that specific lipids occupy very particular locations in such structures. The combination of diverse structural information obtained from both static and solution-based fluorescence and NMR techniques applied both to cellular systems but also to receptors in reconstituted model membranes (liposomes, nanodiscs, etc) have highly contributed to gain insight into the implication of such lipids in protein activity and signaling events. Moreover, computational approaches are well placed and have highly contributed to link this information together into a cohesive picture.

It would be interesting in the next years to make a bridge between lipid imbalance observed in different pathologies, some of which may result from aging, and the impact of such lipid alterations in the functioning of the key GPCR targets in such pathologies. With the high potential of lipids as allosteric modulators of GPCRs and associated effector molecules, it remains to be seen whether the development of drugs aiming to alter lipid-protein interaction will become a valuable therapeutic strategy in the future.

## References

- [1] D. M. Perez, "The Evolutionarily Triumphant G-Protein-Coupled Receptor," *Mol. Pharmacol.*, vol. 63, no. 6, pp. 1202–1205, Jun. 2003, doi: 10.1124/mol.63.6.1202.
- [2] J. Bockaert, "Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success," *EMBO J.*, vol. 18, no. 7, pp. 1723–1729, Apr. 1999, doi: 10.1093/emboj/18.7.1723.
- [3] R. Fredriksson and H. B. Schiöth, "The Repertoire of G-Protein-Coupled Receptors in Fully Sequenced Genomes," *Mol. Pharmacol.*, vol. 67, no. 5, pp. 1414–1425, May 2005, doi: 10.1124/mol.104.009001.
- [4] S. Takeda, S. Kadowaki, T. Haga, H. Takaesu, and S. Mitaku, "Identification of G protein-coupled receptor genes from the human genome sequence," *FEBS Lett.*, vol. 520, no. 1–3, pp. 97–101, Jun. 2002, doi: 10.1016/S0014-5793(02)02775-8.
- [5] D. K. Vassilatis *et al.*, "The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 100, no. 8, pp. 4903–4908, Apr. 2003, doi: 10.1073/pnas.0230374100.
- [6] M. G. Caron, Y. Srinivasan, J. Pitha, K. Kociolek, and R. J. Lefkowitz, "Affinity chromatography of the beta-adrenergic receptor.," *J. Biol. Chem.*, vol. 254, no. 8, pp. 2923–7, Apr. 1979.
- [7] A. Wise, K. Gearing, and S. Rees, "Target validation of G-protein coupled receptors," *Drug Discov. Today*, vol. 7, no. 4, pp. 235–246, Feb. 2002, doi: 10.1016/S1359-6446(01)02131-6.
- [8] R. R. Ania de la Nuez Veulens, "G Protein-coupled receptors as targets for drug design," *Biotechnol. Appl.*, pp. 26:24-33, 2009.
- [9] C. V. R. H. Gebhard F. X. Schertler, "Projection structure of rhodopsin ," *Nature*, 1993.
- [10] K. Palczewski *et al.*, "Crystal Structure of Rhodopsin: A G Protein-Coupled Receptor," *Science (80-. )*, vol. 289, no. 5480, pp. 739–745, Aug. 2000, doi:

10.1126/science.289.5480.739.

- [11] S. G. F. Rasmussen *et al.*, “Crystal structure of the  $\beta$  2 adrenergic receptor-Gs protein complex,” *Nature*, vol. 477, no. 7366, pp. 549–557, Sep. 2011, doi: 10.1038/nature10361.
- [12] T. Warne *et al.*, “Structure of a  $\beta$ 1-adrenergic G-protein-coupled receptor,” *Nature*, vol. 454, no. 7203, pp. 486–491, Jul. 2008, doi: 10.1038/nature07101.
- [13] V.-P. Jaakola *et al.*, “The 2.6 Angstrom Crystal Structure of a Human A<sub>2A</sub> Adenosine Receptor Bound to an Antagonist,” *Science (80-. )*, vol. 322, no. 5905, pp. 1211–1217, Nov. 2008, doi: 10.1126/science.1164772.
- [14] E. Y. T. Chien *et al.*, “Structure of the Human Dopamine D3 Receptor in Complex with a D2/D3 Selective Antagonist,” *Science (80-. )*, vol. 330, no. 6007, pp. 1091–1095, Nov. 2010, doi: 10.1126/science.1197410.
- [15] S. Wang, T. Che, A. Levit, B. K. Shoichet, D. Wacker, and B. L. Roth, “Structure of the D2 dopamine receptor bound to the atypical antipsychotic drug risperidone,” *Nature*, vol. 555, no. 7695, pp. 269–273, Mar. 2018, doi: 10.1038/nature25758.
- [16] L. F. Kolakowski, “GCRDb: a G-protein-coupled receptor database.,” *Receptors Channels*, vol. 2, no. 1, pp. 1–7, 1994.
- [17] R. Fredriksson, M. C. Lagerström, L.-G. Lundin, and H. B. Schiöth, “The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogon Groups, and Fingerprints,” *Mol. Pharmacol.*, vol. 63, no. 6, pp. 1256–1272, Jun. 2003, doi: 10.1124/mol.63.6.1256.
- [18] B. P. Ceresa and L. E. Limbird, “Mutation of an aspartate residue highly conserved among G-protein-coupled receptors results in nonreciprocal disruption of alpha 2-adrenergic receptor-G-protein interactions. A negative charge at amino acid residue 79 forecasts alpha 2A-adrenergic receptor sensitivity to allosteric modulation by monovalent cations and fully effective receptor/G-protein coupling.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 269, no. 47, pp. 29557–64, Nov. 1994.
- [19] G. E. Rovati, V. Capra, and R. R. Neubig, “The Highly Conserved DRY Motif of Class A G Protein-Coupled Receptors: Beyond the Ground State,” *Mol. Pharmacol.*, vol. 71, no. 4, pp. 959–964, Apr. 2007, doi: 10.1124/mol.106.029470.
- [20] R. He, D. D. Browning, and R. D. Ye, “Differential Roles of the NPXXY Motif in Formyl Peptide Receptor Signaling,” *J. Immunol.*, vol. 166, no. 6, pp. 4099–4105, Mar. 2001, doi: 10.4049/jimmunol.166.6.4099.
- [21] L. J. Miller, M. Dong, and K. G. Harikumar, “Ligand binding and activation of the secretin receptor, a prototypic family B G protein-coupled receptor,” *Br. J. Pharmacol.*, vol. 166, no. 1, pp. 18–26, May 2012, doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01463.x.
- [22] H. Wu *et al.*, “Structure of a Class C GPCR Metabotropic Glutamate Receptor 1 Bound to an Allosteric Modulator,” *Science (80-. )*, vol. 344, no. 6179, pp. 58–64, Apr. 2014, doi: 10.1126/science.1249489.
- [23] E. J. Neer, “Heterotrimeric C proteins: Organizers of transmembrane signals,” *Cell*, vol. 80, no. 2, pp. 249–257, Jan. 1995, doi: 10.1016/0092-8674(95)90407-7.
- [24] S. Pandey, “Heterotrimeric G-Protein Signaling in Plants,” in *Sensory Biology of Plants*, Singapore: Springer Singapore, 2019, pp. 189–226.

- [25] G. Milligan and E. Kostenis, "Heterotrimeric G-proteins: a short history," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 147, no. S1, pp. S46–S55, Jan. 2006, doi: 10.1038/sj.bjp.0706405.
- [26] D. J. Spring and E. J. Neer, "A 14-amino acid region of the G protein gamma subunit is sufficient to confer selectivity of gamma binding to the beta subunit.," *J. Biol. Chem.*, vol. 269, no. 36, pp. 22882–22886, Sep. 1994, doi: 10.1016/S0021-9258(17)31727-1.
- [27] E. Hermans, "Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors," *Pharmacol. Ther.*, vol. 99, no. 1, pp. 25–44, Jul. 2003, doi: 10.1016/S0163-7258(03)00051-2.
- [28] D. K. Grammatopoulos, H. S. Randeva, M. A. Levine, K. A. Kanellopoulou, and E. W. Hillhouse, "Rat cerebral cortex corticotropin-releasing hormone receptors: evidence for receptor coupling to multiple G-proteins," *J. Neurochem.*, vol. 76, no. 2, pp. 509–519, Jan. 2001, doi: 10.1046/j.1471-4159.2001.00067.x.
- [29] A. Ulloa-Aguirre, D. Stanislaus, J. A. Janovick, and P. M. Conn, "Structure-Activity Relationships of G Protein-Coupled Receptors," *Arch. Med. Res.*, vol. 30, no. 6, pp. 420–435, Nov. 1999, doi: 10.1016/S0188-0128(99)00041-X.
- [30] J. Wess, "Molecular Basis of Receptor/G-Protein-Coupling Selectivity," *Pharmacol. Ther.*, vol. 80, no. 3, pp. 231–264, Dec. 1998, doi: 10.1016/S0163-7258(98)00030-8.
- [31] J. Wess, T. I. Bonner, F. Dörje, and M. R. Brann, "Delineation of muscarinic receptor domains conferring selectivity of coupling to guanine nucleotide-binding proteins and second messengers.," *Mol. Pharmacol.*, vol. 38, no. 4, pp. 517–23, Oct. 1990.
- [32] T. M. Cabrera-Vera *et al.*, "Insights into G Protein Structure, Function, and Regulation," *Endocr. Rev.*, vol. 24, no. 6, pp. 765–781, Dec. 2003, doi: 10.1210/er.2000-0026.
- [33] R. Taussig and G. Zimmermann, "Type-specific regulation of mammalian adenylyl cyclases by G protein pathways," 1997, pp. 81–98.
- [34] D. E. Logothetis, Y. Kurachi, J. Galper, E. J. Neer, and D. E. Clapham, "The  $\beta\gamma$  subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K<sup>+</sup> channel in heart," *Nature*, vol. 325, no. 6102, pp. 321–326, Jan. 1987, doi: 10.1038/325321a0.
- [35] C. Knall and G. L. Johnson, "G-Protein Regulatory Pathways: Rocketing into the Twenty-first Century," 1998.
- [36] R. J. Lefkowitz and S. K. Shenoy, "Transduction of Receptor Signals by  $\beta$ -Arrestins," *Science (80-. )*, vol. 308, no. 5721, pp. 512–517, Apr. 2005, doi: 10.1126/science.1109237.
- [37] L. M. Luttrell *et al.*, " $\beta$ -Arrestin-Dependent Formation of  $\beta_2$  Adrenergic Receptor-Src Protein Kinase Complexes," *Science (80-. )*, vol. 283, no. 5402, pp. 655–661, Jan. 1999, doi: 10.1126/science.283.5402.655.
- [38] C. Pfister *et al.*, "Retinal S Antigen Identified as the 48K Protein Regulating Light-Dependent Phosphodiesterase in Rods," *Science (80-. )*, vol. 228, no. 4701, pp. 891–893, May 1985, doi: 10.1126/science.2988124.
- [39] C. M. Craft, D. H. Whitmore, and A. F. Wiechmann, "Cone arrestin identified by targeting expression of a functional family.," *J. Biol. Chem.*, vol. 269, no. 6, pp. 4613–4619, Feb. 1994, doi: 10.1016/S0021-9258(17)41820-5.
- [40] M. J. Lohse, J. L. Benovic, J. Codina, M. G. Caron, and R. J. Lefkowitz, " $\beta$ -Arrestin: a Protein that Regulates  $\beta$ -adrenergic Receptor Function," *Science (80-. )*, vol. 248, no. 4962,

- pp. 1547–1550, Jun. 1990, doi: 10.1126/science.2163110.
- [41] H. Attramadal *et al.*, “Beta-arrestin2, a novel member of the arrestin/beta-arrestin gene family,” *J. Biol. Chem.*, vol. 267, no. 25, pp. 17882–90, Sep. 1992.
- [42] M. Nakagawa *et al.*, “Ascidian arrestin (Ci-arr), the origin of the visual and nonvisual arrestins of vertebrate,” *Eur. J. Biochem.*, vol. 269, no. 21, pp. 5112–5118, Nov. 2002, doi: 10.1046/j.1432-1033.2002.03240.x.
- [43] S. K. Milano, H. C. Pace, Y.-M. Kim, C. Brenner, and J. L. Benovic, “Scaffolding Functions of Arrestin-2 Revealed by Crystal Structure and Mutagenesis ” *Biochemistry*, vol. 41, no. 10, pp. 3321–3328, Mar. 2002, doi: 10.1021/bi015905j.
- [44] J. Granzin, U. Wilden, H.-W. Choe, J. Labahn, B. Krafft, and G. Büldt, “X-ray crystal structure of arrestin from bovine rod outer segments,” *Nature*, vol. 391, no. 6670, pp. 918–921, Feb. 1998, doi: 10.1038/36147.
- [45] V. V. Gurevich and E. V. Gurevich, “The structural basis of arrestin-mediated regulation of G-protein-coupled receptors,” *Pharmacol. Ther.*, vol. 110, no. 3, pp. 465–502, Jun. 2006, doi: 10.1016/j.pharmthera.2005.09.008.
- [46] K. Min *et al.*, “Crystal Structure of  $\beta$ -Arrestin 2 in Complex with CXCR7 Phosphopeptide,” *Structure*, vol. 28, no. 9, pp. 1014-1023.e4, Sep. 2020, doi: 10.1016/j.str.2020.06.002.
- [47] M. Han, V. V Gurevich, S. A. Vishnivetskiy, P. B. Sigler, and C. Schubert, “Crystal Structure of  $\beta$ -Arrestin at 1.9 Å,” *Structure*, vol. 9, no. 9, pp. 869–880, Sep. 2001, doi: 10.1016/S0969-2126(01)00644-X.
- [48] X. E. Zhou *et al.*, “Identification of Phosphorylation Codes for Arrestin Recruitment by G Protein-Coupled Receptors,” *Cell*, vol. 170, no. 3, pp. 457-469.e13, Jul. 2017, doi: 10.1016/j.cell.2017.07.002.
- [49] V. V Gurevich and E. V Gurevich, “The molecular acrobatics of arrestin activation,” *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 25, no. 2, pp. 105–111, Feb. 2004, doi: 10.1016/j.tips.2003.12.008.
- [50] X. Song, S. Coffa, H. Fu, and V. V Gurevich, “How does arrestin assemble MAPKs into a signaling complex?,” *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 1, pp. 685–695, Jan. 2009, doi: 10.1074/jbc.M806124200.
- [51] X. Deupi and B. Kobilka, “Activation of G Protein–Coupled Receptors,” 2007, pp. 137–166.
- [52] I. D. Alves *et al.*, “Selectivity, Cooperativity, and Reciprocity in the Interactions between the  $\delta$ -Opioid Receptor, Its Ligands, and G-proteins,” *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 43, pp. 44673–44682, Oct. 2004, doi: 10.1074/jbc.M404713200.
- [53] P. Ghanouni *et al.*, “Functionally Different Agonists Induce Distinct Conformations in the G Protein Coupling Domain of the  $\beta$ 2Adrenergic Receptor,” *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 27, pp. 24433–24436, Jan. 2001, doi: 10.1074/jbc.C100162200.
- [54] P. R. Robinson, G. B. Cohen, E. A. Zhukovsky, and D. D. Opryan, “Constitutively active mutants of rhodopsin,” *Neuron*, vol. 9, no. 4, pp. 719–725, Oct. 1992, doi: 10.1016/0896-6273(92)90034-B.
- [55] R. A. Bond and A. P. IJzerman, “Recent developments in constitutive receptor activity and inverse agonism, and their potential for GPCR drug discovery,” *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 27, no. 2, pp. 92–96, Feb. 2006, doi: 10.1016/j.tips.2005.12.007.
- [56] D. Wacker, R. C. Stevens, and B. L. Roth, “How Ligands Illuminate GPCR Molecular

- Pharmacology,” *Cell*, vol. 170, no. 3, pp. 414–427, Jul. 2017, doi: 10.1016/j.cell.2017.07.009.
- [57] T. Kenakin, “Functional Selectivity through Protean and Biased Agonism: Who Steers the Ship?,” *Mol. Pharmacol.*, vol. 72, no. 6, pp. 1393–1401, Dec. 2007, doi: 10.1124/mol.107.040352.
- [58] Z. Rankovic, T. F. Brust, and L. M. Bohn, “Biased agonism: An emerging paradigm in GPCR drug discovery,” *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 26, no. 2, pp. 241–250, Jan. 2016, doi: 10.1016/j.bmcl.2015.12.024.
- [59] S. M. DeWire and J. D. Violin, “Biased Ligands for Better Cardiovascular Drugs,” *Circ. Res.*, vol. 109, no. 2, pp. 205–216, Jul. 2011, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.231308.
- [60] M. T. Drake, S. K. Shenoy, and R. J. Lefkowitz, “Trafficking of G Protein–Coupled Receptors,” *Circ. Res.*, vol. 99, no. 6, pp. 570–582, Sep. 2006, doi: 10.1161/01.RES.0000242563.47507.ce.
- [61] N. A. McDonald, C. M. Henstridge, C. N. Connolly, and A. J. Irving, “An Essential Role for Constitutive Endocytosis, but Not Activity, in the Axonal Targeting of the CB<sub>1</sub> Cannabinoid Receptor,” *Mol. Pharmacol.*, vol. 71, no. 4, pp. 976–984, Apr. 2007, doi: 10.1124/mol.106.029348.
- [62] J. A. Pitcher, N. J. Freedman, and R. J. Lefkowitz, “G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR KINASES,” 1998. [Online]. Available: [www.annualreviews.org](http://www.annualreviews.org).
- [63] A. B. Tobin, “G-protein-coupled receptor phosphorylation: where, when and by whom,” *Br. J. Pharmacol.*, vol. 153, no. S1, pp. S167–S176, Mar. 2008, doi: 10.1038/sj.bjp.0707662.
- [64] J. L. Benovic, F. Mayor, R. L. Somers, M. G. Caron, and R. J. Lefkowitz, “Light-dependent phosphorylation of rhodopsin by  $\beta$ -adrenergic receptor kinase,” *Nature*, vol. 321, no. 6073, pp. 869–872, Jun. 1986, doi: 10.1038/321869a0.
- [65] S. S. G. Ferguson, “Evolving Concepts in G Protein-Coupled Receptor Endocytosis: The Role in Receptor Desensitization and Signaling,” 2001. [Online]. Available: <http://pharmrev.aspetjournals.org>.
- [66] M. Bouvier *et al.*, “Removal of phosphorylation sites from the beta 2-adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization,” *Nat. Publ. Gr.*, 1988.
- [67] H. NAKATA, K. KAMEYAMA, K. HAGA, and T. HAGA, “Location of agonist-dependent-phosphorylation sites in the third intracellular loop of muscarinic acetylcholine receptors (m2 subtype),” *Eur. J. Biochem.*, vol. 220, no. 1, pp. 29–36, Feb. 1994, doi: 10.1111/j.1432-1033.1994.tb18595.x.
- [68] A. Mann *et al.*, “New phosphosite-specific antibodies to unravel the role of GRK phosphorylation in dopamine D2 receptor regulation and signaling,” *Sci. Rep.*, vol. 11, no. 1, p. 8288, Dec. 2021, doi: 10.1038/s41598-021-87417-2.
- [69] J. A. Pitcher *et al.*, “Role of  $\beta\gamma$  Subunits of G Proteins in Targeting the  $\beta$ -Adrenergic Receptor Kinase to Membrane-Bound Receptors,” *Science (80-. )*, vol. 257, no. 5074, pp. 1264–1267, Aug. 1992, doi: 10.1126/science.1325672.
- [70] STEPHEN S. G. FERGUSON, “Evolving Concepts in G Protein-Coupled Receptor Endocytosis: The Role in Receptor Desensitization and Signaling,” *Pharmacol. Rev.*, 2001.
- [71] N. Yuan, J. Friedman, B. S. Whaley, and R. B. Clark, “cAMP-dependent protein kinase and

- protein kinase C consensus site mutations of the beta-adrenergic receptor. Effect on desensitization and stimulation of adenylylcyclase.," *J. Biol. Chem.*, vol. 269, no. 37, pp. 23032–8, Sep. 1994.
- [72] T. M. Tran, J. Friedman, E. Qunaibi, F. Baameur, R. H. Moore, and R. B. Clark, "Characterization of Agonist Stimulation of cAMP-Dependent Protein Kinase and G Protein-Coupled Receptor Kinase Phosphorylation of the  $\beta_2$ -Adrenergic Receptor Using Phosphoserine-Specific Antibodies," *Mol. Pharmacol.*, vol. 65, no. 1, pp. 196–206, Jan. 2004, doi: 10.1124/mol.65.1.196.
- [73] E. Ungewickell and D. Branton, "Assembly units of clathrin coats," *Nature*, vol. 289, no. 5796, pp. 420–422, Jan. 1981, doi: 10.1038/289420a0.
- [74] C. J. Smith, "Clathrin coats at 21Å resolution: a cellular assembly designed to recycle multiple membrane receptors," *EMBO J.*, vol. 17, no. 17, pp. 4943–4953, Sep. 1998, doi: 10.1093/emboj/17.17.4943.
- [75] M. M. PERRY and A. B. GILBERT, "Electron microscopy imaging of clathrin endocytosis," *Cell Sci.*, 1979.
- [76] B. M. Collins, A. J. McCoy, H. M. Kent, P. R. Evans, and D. J. Owen, "Molecular Architecture and Functional Model of the Endocytic AP2 Complex," *Cell*, vol. 109, no. 4, pp. 523–535, May 2002, doi: 10.1016/S0092-8674(02)00735-3.
- [77] C. Rodemer and V. Haucke, "Clathrin/AP-2-Dependent Endocytosis: A Novel Playground for the Pharmacological Toolbox?," 2008, pp. 105–122.
- [78] E. M. Schmid *et al.*, "Role of the AP2  $\beta$ -Appendage Hub in Recruiting Partners for Clathrin-Coated Vesicle Assembly," *PLoS Biol.*, vol. 4, no. 9, p. e262, Aug. 2006, doi: 10.1371/journal.pbio.0040262.
- [79] B. Marks *et al.*, "GTPase activity of dynamin and resulting conformation change are essential for endocytosis," *Nature*, vol. 410, no. 6825, pp. 231–235, Mar. 2001, doi: 10.1038/35065645.
- [80] S. L. Schmid and V. A. Frolov, "Dynamin: Functional Design of a Membrane Fission Catalyst," *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 27, no. 1, pp. 79–105, Nov. 2011, doi: 10.1146/annurev-cellbio-100109-104016.
- [81] R. J. Lefkowitz, K. Rajagopal, and E. J. Whalen, "New Roles for  $\beta$ -Arrestins in Cell Signaling: Not Just for Seven-Transmembrane Receptors," *Mol. Cell*, vol. 24, no. 5, pp. 643–652, Dec. 2006, doi: 10.1016/j.molcel.2006.11.007.
- [82] D. S. Kang, R. C. Kern, M. A. Puthenveedu, M. von Zastrow, J. C. Williams, and J. L. Benovic, "Structure of an Arrestin2-Clathrin Complex Reveals a Novel Clathrin Binding Domain That Modulates Receptor Trafficking," *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 43, pp. 29860–29872, Oct. 2009, doi: 10.1074/jbc.M109.023366.
- [83] Y.-M. Kim and J. L. Benovic, "Differential Roles of Arrestin-2 Interaction with Clathrin and Adaptor Protein 2 in G Protein-coupled Receptor Trafficking," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 34, pp. 30760–30768, Aug. 2002, doi: 10.1074/jbc.M204528200.
- [84] J. G. Krupnick, F. Santini, A. W. Gagnon, J. H. Keen, and J. L. Benovic, "Modulation of the Arrestin-Clathrin Interaction in Cells," *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 51, pp. 32507–32512, Dec. 1997, doi: 10.1074/jbc.272.51.32507.
- [85] A. Burtey *et al.*, "The Conserved Isoleucine-Valine-Phenylalanine Motif Couples Activation



- State and Endocytic Functions of  $\beta$ -Arrestins,” *Traffic*, vol. 8, no. 7, pp. 914–931, Jul. 2007, doi: 10.1111/j.1600-0854.2007.00578.x.
- [86] C. L. Mayberry, A. N. Soucy, C. R. Lajoie, J. K. DuShane, and M. S. Maginnis, “JC Polyomavirus Entry by Clathrin-Mediated Endocytosis Is Driven by  $\beta$ -Arrestin,” *J. Virol.*, vol. 93, no. 8, Apr. 2019, doi: 10.1128/JVI.01948-18.
- [87] E. M. Smyth, S. C. Austin, M. P. Reilly, and G. A. FitzGerald, “Internalization and Sequestration of the Human Prostacyclin Receptor,” *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 41, pp. 32037–32045, Oct. 2000, doi: 10.1074/jbc.M003873200.
- [88] K. B. Lee, R. Pals-Rylaarsdam, J. L. Benovic, and M. M. Hosey, “Arrestin-independent Internalization of the m1, m3, and m4 Subtypes of Muscarinic Cholinergic Receptors,” *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 21, pp. 12967–12972, May 1998, doi: 10.1074/jbc.273.21.12967.
- [89] R. Pals-Rylaarsdam, V. V. Gurevich, K. B. Lee, J. A. Ptasienski, J. L. Benovic, and M. M. Hosey, “Internalization of the m2 Muscarinic Acetylcholine Receptor,” *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 38, pp. 23682–23689, Sep. 1997, doi: 10.1074/jbc.272.38.23682.
- [90] A. Bhatnagar, D. L. Willins, J. A. Gray, J. Woods, J. L. Benovic, and B. L. Roth, “The Dynamin-dependent, Arrestin-independent Internalization of 5-Hydroxytryptamine 2A (5-HT<sub>2A</sub>) Serotonin Receptors Reveals Differential Sorting of Arrestins and 5-HT<sub>2A</sub> Receptors during Endocytosis,” *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 11, pp. 8269–8277, Mar. 2001, doi: 10.1074/jbc.M006968200.
- [91] A. Fraile-Ramos, T. A. Kohout, M. Waldhoer, and M. Marsh, “Endocytosis of the Viral Chemokine Receptor US28 Does Not Require Beta-Arrestins But Is Dependent on the Clathrin-Mediated Pathway,” *Traffic*, vol. 4, no. 4, pp. 243–253, Apr. 2003, doi: 10.1034/j.1600-0854.2003.00079.x.
- [92] J. A. Gray, A. Bhatnagar, V. V. Gurevich, and B. L. Roth, “The Interaction of a Constitutively Active Arrestin with the Arrestin-Insensitive 5-HT<sub>2A</sub> Receptor Induces Agonist-Independent Internalization,” *Mol. Pharmacol.*, vol. 63, no. 5, pp. 961–972, May 2003, doi: 10.1124/mol.63.5.961.
- [93] J. K. L. Walker, R. T. Premont, L. S. Barak, M. G. Caron, and M. A. Shetzline, “Properties of Secretin Receptor Internalization Differ from Those of the  $\beta$ 2-Adrenergic Receptor,” *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 44, pp. 31515–31523, Oct. 1999, doi: 10.1074/jbc.274.44.31515.
- [94] I. Rapoport *et al.*, “Regulatory interactions in the recognition of endocytic sorting signals by AP-2 complexes,” *EMBO J.*, vol. 16, no. 9, pp. 2240–2250, May 1997, doi: 10.1093/emboj/16.9.2240.
- [95] B. Chini and M. Parenti, “G-protein coupled receptors in lipid rafts and caveolae: how, when and why do they go there?,” *J. Mol. Endocrinol.*, vol. 32, no. 2, pp. 325–338, Apr. 2004, doi: 10.1677/jme.0.0320325.
- [96] T. Okamoto, A. Schlegel, P. E. Scherer, and M. P. Lisanti, “Caveolins, a Family of Scaffolding Proteins for Organizing ‘Preassembled Signaling Complexes’ at the Plasma Membrane,” *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 10, pp. 5419–5422, Mar. 1998, doi: 10.1074/jbc.273.10.5419.
- [97] P. Candela *et al.*, “Physiological Pathway for Low-Density Lipoproteins across the Blood-Brain Barrier: Transcytosis through Brain Capillary Endothelial Cells In Vitro,” *Endothelium*, vol. 15, no. 5–6, pp. 254–264, Jan. 2008, doi: 10.1080/10623320802487759.
- [98] S. E. W. A. M. P. L. BABAK RAZANI, “Caveolae: From Cell Biology to Animal

Physiology,” *Pharmacol. Rev.*, 2002.

- [99] N. J. Freedman, A. S. Ament, M. Oppermann, R. H. Stoffel, S. T. Exum, and R. J. Lefkowitz, “Phosphorylation and Desensitization of Human Endothelin A and B Receptors,” *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 28, pp. 17734–17743, Jul. 1997, doi: 10.1074/jbc.272.28.17734.
- [100] M. Chun, U. K. Liyanage, M. P. Lisanti, and H. F. Lodish, “Signal transduction of a G protein-coupled receptor in caveolae: colocalization of endothelin and its receptor with caveolin,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 91, no. 24, pp. 11728–11732, Nov. 1994, doi: 10.1073/pnas.91.24.11728.
- [101] M. Scarselli and J. G. Donaldson, “Constitutive Internalization of G Protein-coupled Receptors and G Proteins via Clathrin-independent Endocytosis,” *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 6, pp. 3577–3585, Feb. 2009, doi: 10.1074/jbc.M806819200.
- [102] E. Kelly, C. P. Bailey, and G. Henderson, “Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization,” *Br. J. Pharmacol.*, vol. 153, no. S1, pp. S379–S388, Mar. 2008, doi: 10.1038/sj.bjp.0707604.
- [103] A. C. Magalhaes, H. Dunn, and S. S. Ferguson, “Regulation of GPCR activity, trafficking and localization by GPCR-interacting proteins,” *Br. J. Pharmacol.*, vol. 165, no. 6, pp. 1717–1736, Mar. 2012, doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01552.x.
- [104] C. Raiborg and H. Stenmark, “The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins,” *Nature*, vol. 458, no. 7237, pp. 445–452, Mar. 2009, doi: 10.1038/nature07961.
- [105] J. L. Whistler *et al.*, “Modulation of Postendocytic Sorting of G Protein-Coupled Receptors,” *Science (80-. )*, vol. 297, no. 5581, pp. 615–620, Jul. 2002, doi: 10.1126/science.1073308.
- [106] M. Tanowitz and M. von Zastrow, “Ubiquitination-independent Trafficking of G Protein-coupled Receptors to Lysosomes,” *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 52, pp. 50219–50222, Dec. 2002, doi: 10.1074/jbc.C200536200.
- [107] P. Temkin, B. Lauffer, S. Jäger, P. Cimermanic, N. J. Krogan, and M. von Zastrow, “SNX27 mediates retromer tubule entry and endosome-to-plasma membrane trafficking of signalling receptors,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 13, no. 6, pp. 715–721, Jun. 2011, doi: 10.1038/ncb2252.
- [108] M. von Zastrow, “Proteomic Approaches to Investigate Regulated Trafficking and Signaling of G Protein–Coupled Receptors,” *Mol. Pharmacol.*, vol. 99, no. 5, pp. 392–398, May 2021, doi: 10.1124/molpharm.120.000178.
- [109] R. M. Gage, E. A. Matveeva, S. W. Whiteheart, and M. von Zastrow, “Type I PDZ Ligands Are Sufficient to Promote Rapid Recycling of G Protein-coupled Receptors Independent of Binding to N-Ethylmaleimide-sensitive Factor,” *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 5, pp. 3305–3313, Feb. 2005, doi: 10.1074/jbc.M406934200.
- [110] K. A. MONTAGU, “Catechol Compounds in Rat Tissues and in Brains of Different Animals,” *Nature*, Aug. 1957.
- [111] J. D. Berke, “What does dopamine mean?,” *Nat. Neurosci.*, vol. 21, no. 6, pp. 787–793, Jun. 2018, doi: 10.1038/s41593-018-0152-y.
- [112] S. C. Daubner, T. Le, and S. Wang, “Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis,” *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 508, no. 1, pp. 1–12, Apr. 2011, doi:

10.1016/j.abb.2010.12.017.

- [113] W. J. van den Brink, S. Palic, I. Köhler, and E. C. M. de Lange, “Access to the CNS: Biomarker Strategies for Dopaminergic Treatments,” *Pharm. Res.*, vol. 35, no. 3, p. 64, Mar. 2018, doi: 10.1007/s11095-017-2333-x.
- [114] U. Ungerstedt, “Striatal Dopamine Release after Amphetamine or Nerve Degeneration Revealed by Rotational Behaviour,” *Acta Physiol. Scand.*, vol. 82, no. S367, pp. 49–68, Dec. 1971, doi: 10.1111/j.1365-201X.1971.tb10999.x.
- [115] J. W. Keabian, G. L. Petzold, and P. Greengard, “Dopamine-sensitive adenylate cyclase in caudate nucleus of rat brain, and its similarity to the ‘dopamine receptor,’” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 69, no. 8, pp. 2145–2149, Aug. 1972, doi: 10.1073/pnas.69.8.2145.
- [116] K. A. Neve, “Dopamine Receptors,” in *Encyclopedia of Biological Chemistry*, Elsevier, 2013, pp. 169–173.
- [117] Y. Wang, T. Sasaoka, and M. T. Dang, “A Molecular Genetic Approach to Uncovering the Differential Functions of Dopamine D2 Receptor Isoforms,” 2013, pp. 181–200.
- [118] J. Guiramand, J.-P. Montmayeur, J. Ceraline, M. Bhatia, and E. Borrelli, “Alternative Splicing of the Dopamine D2 Receptor Directs Specificity of Coupling to G-proteins,” *J. Biol. Chem.*, vol. 270, no. 13, pp. 7354–7358, Mar. 1995, doi: 10.1074/jbc.270.13.7354.
- [119] J. P. Montmayeur, J. Guiramand, and E. Borrelli, “Preferential coupling between dopamine D2 receptors and G-proteins.,” *Mol. Endocrinol.*, vol. 7, no. 2, pp. 161–170, Feb. 1993, doi: 10.1210/mend.7.2.7682286.
- [120] D. Radl, M. Chiacchiaretta, R. G. Lewis, K. Bami-Cherrier, L. Arcuri, and E. Borrelli, “Differential regulation of striatal motor behavior and related cellular responses by dopamine D2L and D2S isoforms,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 115, no. 1, pp. 198–203, Jan. 2018, doi: 10.1073/pnas.1717194115.
- [121] R. T. Kendall and S. E. Senogles, “Investigation of the alternatively spliced insert region of the D2L dopamine receptor by epitope substitution,” *Neurosci. Lett.*, vol. 393, no. 2–3, pp. 155–159, Jan. 2006, doi: 10.1016/j.neulet.2005.09.057.
- [122] D. K. Grandy *et al.*, “Cloning of the cDNA and gene for a human D2 dopamine receptor.,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 86, no. 24, pp. 9762–9766, Dec. 1989, doi: 10.1073/pnas.86.24.9762.
- [123] D. Im *et al.*, “Structure of the dopamine D2 receptor in complex with the antipsychotic drug spiperone,” *Nat. Commun.*, vol. 11, no. 1, p. 6442, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41467-020-20221-0.
- [124] L. Fan *et al.*, “Haloperidol bound D2 dopamine receptor structure inspired the discovery of subtype selective ligands,” *Nat. Commun.*, vol. 11, no. 1, p. 1074, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41467-020-14884-y.
- [125] J. Yin *et al.*, “Structure of a D2 dopamine receptor–G-protein complex in a lipid membrane,” *Nature*, 2020, doi: 10.1038/s41586-020-2379-5.
- [126] J. M. Beaulieu and R. R. Gainetdinov, “The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors,” *Pharmacological Reviews*, vol. 63, no. 1, pp. 182–217, Mar. 2011, doi: 10.1124/pr.110.002642.
- [127] K. Ito, T. Haga, J. Lamah, and W. S. Âe, “Sequestration of dopamine D2 receptors depends

on coexpression of G-protein-coupled receptor kinases 2 or 5,” 1999.

- [128] N. Ozaki, K. Moroi, T. Kadota, S. Suzuki, and K. Kadota, “Dopamine D1 and D2 Receptors and Their Signal System Present in Coated Vesicles Prepared from Bovine Striatal Tissue,” *J. Neurochem.*, vol. 62, no. 2, pp. 582–591, Nov. 2002, doi: 10.1046/j.1471-4159.1994.62020582.x.
- [129] M. Skinbjerg *et al.*, “Arrestin3 mediates D2 dopamine receptor internalization,” *Synapse*, vol. 63, no. 7, pp. 621–624, Jul. 2009, doi: 10.1002/syn.20636.
- [130] C. A. Marsden, “Dopamine: the rewarding years,” *Br. J. Pharmacol.*, vol. 147, no. S1, pp. S136–S144, Jan. 2006, doi: 10.1038/sj.bjp.0706473.
- [131] S. Moritz, B. C. Schneider, J. Peth, S. Arlt, and L. Jelinek, “Metacognitive Training for Depression (D-MCT) reduces false memories in depression. A randomized controlled trial,” *Eur. Psychiatry*, vol. 53, pp. 46–51, Sep. 2018, doi: 10.1016/j.eurpsy.2018.05.010.
- [132] N. M. Urs, S. M. Peterson, and M. G. Caron, “New Concepts in Dopamine D2 Receptor Biased Signaling and Implications for Schizophrenia Therapy,” *Biol. Psychiatry*, vol. 81, no. 1, pp. 78–85, Jan. 2017, doi: 10.1016/j.biopsych.2016.10.011.
- [133] A. H. Tran *et al.*, “Altered accumbens neural response to prediction of reward associated with place in dopamine D2 receptor knockout mice,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 99, no. 13, pp. 8986–8991, Jun. 2002, doi: 10.1073/pnas.132284599.
- [134] P. Trifilieff *et al.*, “Increasing dopamine D2 receptor expression in the adult nucleus accumbens enhances motivation,” *Mol. Psychiatry*, vol. 18, no. 9, pp. 1025–1033, Sep. 2013, doi: 10.1038/mp.2013.57.
- [135] E. Messamore and R. K. McNamara, “Detection and treatment of omega-3 fatty acid deficiency in psychiatric practice: Rationale and implementation,” *Lipids Health Dis.*, vol. 15, no. 1, pp. 1–13, 2016, doi: 10.1186/s12944-016-0196-5.
- [136] E. D. Korn, “Structure and Function of the Plasma Membrane,” *J. Gen. Physiol.*, vol. 52, no. 1, pp. 257–278, Jul. 1968, doi: 10.1085/jgp.52.1.257.
- [137] S. Vanni, L. Riccardi, G. Palermo, and M. De Vivo, “Structure and Dynamics of the Acyl Chains in the Membrane Trafficking and Enzymatic Processing of Lipids,” *Acc. Chem. Res.*, vol. 52, no. 11, pp. 3087–3096, Nov. 2019, doi: 10.1021/acs.accounts.9b00134.
- [138] S. Sonnino and A. Prinetti, “Membrane Domains and the Lipid Raft Concept,” *Curr. Med. Chem.*, vol. 20, no. 1, pp. 4–21, Dec. 2012, doi: 10.2174/0929867311302010004.
- [139] P. A. Janmey and P. K. J. Kinnunen, “Biophysical properties of lipids and dynamic membranes,” *Trends Cell Biol.*, vol. 16, no. 10, pp. 538–546, Oct. 2006, doi: 10.1016/j.tcb.2006.08.009.
- [140] B. Fadeel and D. Xue, “The ins and outs of phospholipid asymmetry in the plasma membrane: Roles in health and disease,” *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 44, no. 5, pp. 264–277, 2009, doi: 10.1080/10409230903193307.
- [141] J. H. Lorent *et al.*, “Plasma membranes are asymmetric in lipid unsaturation, packing and protein shape,” *Nat. Chem. Biol.*, vol. 16, no. 6, pp. 644–652, Jun. 2020, doi: 10.1038/s41589-020-0529-6.
- [142] S. Takamori *et al.*, “Molecular Anatomy of a Trafficking Organelle,” *Cell*, vol. 127, no. 4, pp. 831–846, Nov. 2006, doi: 10.1016/j.cell.2006.10.030.

- [143] R. P. Bazinet and S. Layé, “Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease,” *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 15, no. 12, pp. 771–785, Dec. 2014, doi: 10.1038/nrn3820.
- [144] S. A. Moore, “Polyunsaturated Fatty Acid Synthesis and Release,” *J. Mol. Neurosci.*, vol. 16, no. 2–3, pp. 195–200, 2001, doi: 10.1385/JMN:16:2-3:195.
- [145] R. K. Saini and Y.-S. Keum, “Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance — A review,” *Life Sci.*, vol. 203, pp. 255–267, Jun. 2018, doi: 10.1016/j.lfs.2018.04.049.
- [146] A. Yamashita *et al.*, “Acyltransferases and transacylases that determine the fatty acid composition of glycerolipids and the metabolism of bioactive lipid mediators in mammalian cells and model organisms,” *Prog. Lipid Res.*, vol. 53, pp. 18–81, Jan. 2014, doi: 10.1016/j.plipres.2013.10.001.
- [147] A. Yamashita *et al.*, “Glycerophosphate/Acylglycerophosphate Acyltransferases,” *Biology (Basel)*, vol. 3, no. 4, pp. 801–830, Nov. 2014, doi: 10.3390/biology3040801.
- [148] F. Elinder and S. I. Liin, “Actions and Mechanisms of Polyunsaturated Fatty Acids on Voltage-Gated Ion Channels,” *Front. Physiol.*, vol. 8, Feb. 2017, doi: 10.3389/fphys.2017.00043.
- [149] L. Wang *et al.*, “Metabolic Interactions between the Lands Cycle and the Kennedy Pathway of Glycerolipid Synthesis in *Arabidopsis* Developing Seeds,” *Plant Cell*, vol. 24, no. 11, pp. 4652–4669, Nov. 2012, doi: 10.1105/tpc.112.104604.
- [150] V. A. Bankaitis, “The Cirque du Soleil of Golgi membrane dynamics,” *J. Cell Biol.*, vol. 186, no. 2, pp. 169–171, Jul. 2009, doi: 10.1083/jcb.200907008.
- [151] D. A. Los and N. Murata, “Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals,” *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1666, no. 1–2, pp. 142–157, Nov. 2004, doi: 10.1016/j.bbamem.2004.08.002.
- [152] K. M. J. H. I. T. H. R. B. O. G. M. Jesper Lemmich, “The effect of cholesterol in small amounts on lipid-bilayer softness in the region of the main phase transition,” *Eur. Biophys. J.*, 1997.
- [153] V. A. M. Villar, S. Cuevas, X. Zheng, and P. A. Jose, “Localization and signaling of GPCRs in lipid rafts,” in *Methods Cell Biol*, 2016, pp. 3–23.
- [154] S. R. Wassall and W. Stillwell, “Docosahexaenoic acid domains: the ultimate non-raft membrane domain,” *Chem. Phys. Lipids*, vol. 153, no. 1, pp. 57–63, May 2008, doi: 10.1016/j.chemphyslip.2008.02.010.
- [155] S. R. Wassall and W. Stillwell, “Polyunsaturated fatty acid–cholesterol interactions: Domain formation in membranes,” *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1788, no. 1, pp. 24–32, Jan. 2009, doi: 10.1016/j.bbamem.2008.10.011.
- [156] K. R. Levental *et al.*, “Polyunsaturated Lipids Regulate Membrane Domain Stability by Tuning Membrane Order,” *Biophys. J.*, vol. 110, no. 8, pp. 1800–1810, Apr. 2016, doi: 10.1016/j.bpj.2016.03.012.
- [157] W. Stillwell *et al.*, “Docosahexaenoic acid affects cell signaling by altering lipid rafts,” *Reprod. Nutr. Dev.*, vol. 45, no. 5, pp. 559–579, 2005, doi: 10.1051/rnd:2005046i.
- [158] S. R. Shaikh, “Biophysical and biochemical mechanisms by which dietary N-3

- polyunsaturated fatty acids from fish oil disrupt membrane lipid rafts,” *J. Nutr. Biochem.*, vol. 23, no. 2, pp. 101–105, Feb. 2012, doi: 10.1016/j.jnutbio.2011.07.001.
- [159] G. R. Ravacci *et al.*, “Lipid raft disruption by docosahexaenoic acid induces apoptosis in transformed human mammary luminal epithelial cells harboring HER-2 overexpression,” *J. Nutr. Biochem.*, vol. 24, no. 3, pp. 505–515, Mar. 2013, doi: 10.1016/j.jnutbio.2012.02.001.
- [160] M. Pinot *et al.*, “Polyunsaturated phospholipids facilitate membrane deformation and fission by endocytic proteins,” *Science (80-. )*, vol. 345, no. 6197, pp. 693–697, Aug. 2014, doi: 10.1126/science.1255288.
- [161] M. M. Manni, M. L. Tiberti, S. Pagnotta, H. Lè Ne Barelli, R. Gautier, and B. Antonny, “Acyl chain asymmetry and polyunsaturation of brain phospholipids facilitate membrane vesiculation without leakage,” doi: 10.7554/eLife.34394.001.
- [162] M. L. Tiberti, B. Antonny, and R. Gautier, “The transbilayer distribution of polyunsaturated phospholipids determines their facilitating effect on membrane deformation,” *Soft Matter*, vol. 16, no. 7, pp. 1722–1730, Feb. 2020, doi: 10.1039/c9sm02107h.
- [163] P. S. Sastry, “Lipids of nervous tissue: Composition and metabolism,” *Prog. Lipid Res.*, vol. 24, no. 2, pp. 69–176, Jan. 1985, doi: 10.1016/0163-7827(85)90011-6.
- [164] R. K. McNamara and S. E. Carlson, “Role of omega-3 fatty acids in brain development and function: Potential implications for the pathogenesis and prevention of psychopathology,” *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fat. Acids*, vol. 75, no. 4–5, pp. 329–349, Oct. 2006, doi: 10.1016/j.plefa.2006.07.010.
- [165] C. Joffre, “Polyunsaturated Fatty Acid Metabolism in the Brain and Brain Cells,” in *Feed Your Mind - How Does Nutrition Modulate Brain Function throughout Life?*, IntechOpen, 2019.
- [166] D. Ma *et al.*, “Cellular localization of epidermal-type and brain-type fatty acid-binding proteins in adult hippocampus and their response to cerebral ischemia,” *Hippocampus*, p. NA-NA, 2009, doi: 10.1002/hipo.20682.
- [167] J. Edmond, “Essential Polyunsaturated Fatty Acids and the Barrier to the Brain: The Components of a Model for Transport,” *J. Mol. Neurosci.*, vol. 16, no. 2–3, pp. 181–194, 2001, doi: 10.1385/JMN:16:2-3:181.
- [168] J. A. Hamilton and K. Brunaldi, “A Model for Fatty Acid Transport into the Brain,” *J. Mol. Neurosci.*, vol. 33, no. 1, pp. 12–17, Sep. 2007, doi: 10.1007/s12031-007-0050-3.
- [169] M. Montecillo-Aguado *et al.*, “Importance of the Role of  $\omega$ -3 and  $\omega$ -6 Polyunsaturated Fatty Acids in the Progression of Brain Cancer,” *Brain Sci.*, vol. 10, no. 6, p. 381, Jun. 2020, doi: 10.3390/brainsci10060381.
- [170] M. Huan *et al.*, “Suicide attempt and n-3 fatty acid levels in red blood cells: A case control study in china,” *Biol. Psychiatry*, vol. 56, no. 7, pp. 490–496, Oct. 2004, doi: 10.1016/j.biopsych.2004.06.028.
- [171] M. R. Garland *et al.*, “Lipids and essential fatty acids in patients presenting with self-harm,” *Br. J. Psychiatry*, vol. 190, no. 2, pp. 112–117, Feb. 2007, doi: 10.1192/bjp.bp.105.019562.
- [172] R. K. McNamara *et al.*, “Abnormalities in the fatty acid composition of the postmortem orbitofrontal cortex of schizophrenic patients: Gender differences and partial normalization with antipsychotic medications,” *Schizophr. Res.*, vol. 91, no. 1–3, pp. 37–50, Mar. 2007, doi: 10.1016/j.schres.2006.11.027.

- [173] R. K. McNamara *et al.*, “Deficits in docosahexaenoic acid and associated elevations in the metabolism of arachidonic acid and saturated fatty acids in the postmortem orbitofrontal cortex of patients with bipolar disorder,” *Psychiatry Res.*, vol. 160, no. 3, pp. 285–299, Sep. 2008, doi: 10.1016/j.psychres.2007.08.021.
- [174] R. K. McNamara *et al.*, “Selective Deficits in the Omega-3 Fatty Acid Docosahexaenoic Acid in the Postmortem Orbitofrontal Cortex of Patients with Major Depressive Disorder,” *Biol. Psychiatry*, vol. 62, no. 1, pp. 17–24, Jul. 2007, doi: 10.1016/j.biopsych.2006.08.026.
- [175] S.-W. Kim *et al.*, “Relationship between Erythrocyte Fatty Acid Composition and Psychopathology in the Vienna Omega-3 Study,” *PLoS One*, vol. 11, no. 3, p. e0151417, Mar. 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0151417.
- [176] M. P. Freeman and M. H. Rapaport, “Omega-3 Fatty Acids and Depression: From Cellular Mechanisms to Clinical Care,” *J. Clin. Psychiatry*, vol. 72, no. 02, pp. 258–259, Feb. 2011, doi: 10.4088/JCP.11ac06830.
- [177] H. Braarud *et al.*, “Maternal DHA Status during Pregnancy Has a Positive Impact on Infant Problem Solving: A Norwegian Prospective Observation Study,” *Nutrients*, vol. 10, no. 5, p. 529, Apr. 2018, doi: 10.3390/nu10050529.
- [178] E. M. Loomans, B. R. H. Van den Bergh, M. Schelling, T. G. M. Vrijkotte, and M. van Eijsden, “Maternal Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acid Status during Early Pregnancy and Children’s Risk of Problem Behavior at Age 5-6 Years,” *J. Pediatr.*, vol. 164, no. 4, pp. 762–768, Apr. 2014, doi: 10.1016/j.jpeds.2013.11.069.
- [179] I. Fedorova and N. Salem, “Omega-3 fatty acids and rodent behavior,” *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fat. Acids*, vol. 75, no. 4–5, pp. 271–289, Oct. 2006, doi: 10.1016/j.plefa.2006.07.006.
- [180] S.-Y. Lim, J. Hoshiba, T. Moriguchi, and N. Salem, “N-3 Fatty Acid Deficiency Induced by a Modified Artificial Rearing Method Leads to Poorer Performance in Spatial Learning Tasks,” *Pediatr. Res.*, vol. 58, no. 4, pp. 741–748, Oct. 2005, doi: 10.1203/01.PDR.0000180547.46725.CC.
- [181] F. Ducrocq *et al.*, “Causal Link between n-3 Polyunsaturated Fatty Acid Deficiency and Motivation Deficits,” *Cell Metab.*, Mar. 2020, doi: 10.1016/j.cmet.2020.02.012.
- [182] J. E. Mellor, J. D. E. Laugharne, and M. Peet, “Schizophrenic symptoms and dietary intake of n-3 fatty acids,” *Schizophr. Res.*, vol. 18, no. 1, pp. 85–86, Dec. 1995, doi: 10.1016/0920-9964(95)00084-4.
- [183] G. P. Amminger *et al.*, “Long-Chain  $\omega$ -3 Fatty Acids for Indicated Prevention of Psychotic Disorders,” *Arch. Gen. Psychiatry*, vol. 67, no. 2, p. 146, Feb. 2010, doi: 10.1001/archgenpsychiatry.2009.192.
- [184] A. T. Chen, J. T. Chibnall, and H. A. Nasrallah, “A meta-analysis of placebo-controlled trials of omega-3 fatty acid augmentation in schizophrenia: Possible stage-specific effects,” *Ann. Clin. Psychiatry*, vol. 27, no. 4, pp. 289–96, Nov. 2015.
- [185] M. E. Sublette, S. P. Ellis, A. L. Geant, and J. J. Mann, “Meta-Analysis of the Effects of Eicosapentaenoic Acid (EPA) in Clinical Trials in Depression,” *J. Clin. Psychiatry*, vol. 72, no. 12, pp. 1577–1584, Dec. 2011, doi: 10.4088/JCP.10m06634.
- [186] G. Grosso *et al.*, “Role of Omega-3 Fatty Acids in the Treatment of Depressive Disorders: A Comprehensive Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials,” *PLoS One*, vol. 9, no. 5, p. e96905, May 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0096905.

- [187] S. Jazayeri *et al.*, “Comparison of Therapeutic Effects of Omega-3 Fatty Acid Eicosapentaenoic Acid and Fluoxetine, Separately and in Combination, in Major Depressive Disorder,” *Aust. New Zeal. J. Psychiatry*, vol. 42, no. 3, pp. 192–198, Mar. 2008, doi: 10.1080/00048670701827275.
- [188] L. Gertsik, R. E. Poland, C. Bresee, and M. H. Rapaport, “Omega-3 Fatty Acid Augmentation of Citalopram Treatment for Patients With Major Depressive Disorder,” *J. Clin. Psychopharmacol.*, vol. 32, no. 1, pp. 61–64, Feb. 2012, doi: 10.1097/JCP.0b013e31823f3b5f.
- [189] D. C. Mitchell, S. L. Niu, and B. J. Litman, “DHA-rich phospholipids optimize G-protein-coupled signaling,” in *Journal of Pediatrics*, 2003, vol. 143, no. 4 SUPPL., doi: 10.1067/s0022-3476(03)00405-0.
- [190] D. C. Mitchell, S.-L. Niu, and B. J. Litman, “Enhancement of G Protein-Coupled Signaling by DHA Phospholipids,” 2003.
- [191] B. J. Litman, S. L. Niu, A. Polozova, and D. C. Mitchell, “The role of docosahexaenoic acid containing phospholipids in modulating G protein-coupled signaling pathways: Visual transduction,” *J. Mol. Neurosci.*, vol. 16, no. 2–3, pp. 237–242, 2001, doi: 10.1385/JMN:16:2-3:237.
- [192] D. C. Mitchell, S. L. Niu, and B. J. Litman, “Quantifying the differential effects of DHA and DPA on the early events in visual signal transduction,” in *Chemistry and Physics of Lipids*, May 2012, vol. 165, no. 4, pp. 393–400, doi: 10.1016/j.chemphyslip.2012.02.008.
- [193] D. C. Mitchell, M. Straume, and B. J. Litman, “Role of sn-1-Saturated,sn-2-Polyunsaturated Phospholipids in Control of Membrane Receptor Conformational Equilibrium: Effects of Cholesterol and Acyl Chain Unsaturation on the Metarhodopsin I-Metarhodopsin II Equilibrium,” 1992. [Online]. Available: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>.
- [194] B. J. Litman and D. C. Mitchell, “A role for phospholipid polyunsaturation in modulating membrane protein function,” *Lipids*, vol. 31, no. 3 SUPPL., 1996, doi: 10.1007/bf02637075.
- [195] S. L. Niu *et al.*, “Reduced G protein-coupled signaling efficiency in retinal rod outer segments in response to n-3 fatty acid deficiency,” *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 30, pp. 31098–31104, Jul. 2004, doi: 10.1074/jbc.M404376200.
- [196] B. Jastrzebska, A. Debinski, S. Filipek, and K. Palczewski, “Role of membrane integrity on G protein-coupled receptors: Rhodopsin stability and function,” *Progress in Lipid Research*, vol. 50, no. 3, pp. 267–277, Jul. 2011, doi: 10.1016/j.plipres.2011.03.002.
- [197] A. Grossfield, S. E. Feller, and M. C. Pitman, “A role for direct interactions in the modulation of rhodopsin by-3 polyunsaturated lipids,” 2006. [Online]. Available: [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0508352103](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0508352103).
- [198] J. N. Horn, T.-C. Kao, and A. Grossfield, “Coarse-Grained Molecular Dynamics Provides Insight into the Interactions of Lipids and Cholesterol with Rhodopsin,” 2014, pp. 75–94.
- [199] O. Soubias, W. E. Teague, and K. Gawrisch, “Evidence for specificity in lipid-rhodopsin interactions,” *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 44, pp. 33233–33241, Nov. 2006, doi: 10.1074/jbc.M603059200.
- [200] M. Lafourcade *et al.*, “Nutritional Omega-3 deficiency abolishes endocannabinoid mediated neuronal functions,” *Nat. Neurosci.*, vol. 14, no. 3, 2011, doi: 10.1038/nn.2736i.



- [201] S. S. Naughton, M. L. Mathai, D. H. Hryciw, and A. J. McAinch, “Fatty acid modulation of the endocannabinoid system and the effect on food intake and metabolism,” *International Journal of Endocrinology*, vol. 2013. 2013, doi: 10.1155/2013/361895.
- [202] R. Guixà-González *et al.*, “Membrane omega-3 fatty acids modulate the oligomerisation kinetics of adenosine A2A and dopamine D2 receptors,” *Sci. Rep.*, vol. 6, Jan. 2016, doi: 10.1038/srep19839.
- [203] T. Mizumura *et al.*, “Activation of adenosine A 2A receptor by lipids from docosahexaenoic acid revealed by NMR,” 2020. [Online]. Available: <https://www.science.org>.
- [204] F. S. G. Silva, I. G. Starostina, V. V. Ivanova, A. A. Rizvanov, P. J. Oliveira, and S. P. Pereira, “Determination of metabolic viability and cell mass using a tandem resazurin/sulforhodamine B assay,” *Curr. Protoc. Toxicol.*, vol. 2016, pp. 1–15, May 2016, doi: 10.1002/cptx.1.
- [205] Y. Tang *et al.*, “Identification of the endophilins (SH3p4p8p13) as novel binding partners for the 1-adrenergic receptor.” [Online]. Available: [www.pnas.org](http://www.pnas.org).
- [206] S. Sposini and A. C. Hanyaloglu, “Spatial encryption of G protein-coupled receptor signaling in endosomes; Mechanisms and applications,” *Biochemical Pharmacology*, vol. 143. Elsevier Inc., pp. 1–9, Nov. 01, 2017, doi: 10.1016/j.bcp.2017.04.028.
- [207] V. A. JabtoJiski in Warschau, “~er den Mechanismus der Photolumineszenz von Farbstoffphosphoren.”
- [208] C. Hoffmann, A. Zürn, M. Bünemann, and M. J. Lohse, “Conformational changes in G-protein-coupled receptors - The quest for functionally selective conformations is open,” in *British Journal of Pharmacology*, Mar. 2008, vol. 153, no. SUPPL. 1, doi: 10.1038/sj.bjp.0707615.
- [209] M. J. Lohse, V. O. Nikolaev, P. Hein, C. Hoffmann, J. P. Vilardaga, and M. Bünemann, “Optical techniques to analyze real-time activation and signaling of G-protein-coupled receptors,” *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 29, no. 3. Elsevier Ltd, pp. 159–165, 2008, doi: 10.1016/j.tips.2007.12.002.
- [210] M. J. Lohse, S. Nuber, and C. Hoffmann, “Fluorescence/bioluminescence resonance energy transfer techniques to study g-protein-coupled receptor activation and signaling,” *Pharmacological Reviews*, vol. 64, no. 2. pp. 299–336, Apr. 2012, doi: 10.1124/pr.110.004309.
- [211] S. Angers *et al.*, “Detection of 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET),” *PNAS*, 2000. [Online]. Available: [www.pnas.org](http://www.pnas.org) doi:10.1073/pnas.060590697.
- [212] L. Stryer, “FLUORESCENCE ENERGY TRANSFER AS A SPECTROSCOPIC RULER.” [Online]. Available: [www.annualreviews.org](http://www.annualreviews.org).
- [213] A. Kaur, P. Kaur, and S. Ahuja, “Förster resonance energy transfer (FRET) and applications thereof,” *Analytical Methods*, vol. 12, no. 46. Royal Society of Chemistry, pp. 5532–5550, Dec. 14, 2020, doi: 10.1039/d0ay01961e.
- [214] M. Cottet *et al.*, “BRET and time-resolved FRET strategy to study GPCR oligomerization: From cell lines toward native tissues,” *Frontiers in Endocrinology*, vol. 3, no. JUL. 2012, doi: 10.3389/fendo.2012.00092.
- [215] A. Keppler, S. Gendreizig, T. Gronemeyer, H. Pick, H. Vogel, and K. Johnsson, “A general

- method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules in vivo,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 21, no. 1, pp. 86–89, Jan. 2003, doi: 10.1038/nbt765.
- [216] A. Levoye *et al.*, “A broad G protein-coupled receptor internalization assay that combines SNAP-tag labeling, diffusion-enhanced resonance energy transfer, and a highly emissive terbium cryptate,” *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, vol. 6, no. NOV, 2015, doi: 10.3389/fendo.2015.00167.
- [217] Marvin Minsky, “Microscopy apparatus,” *US Pat.*, 1957.
- [218] W. B. Amos, J. G. White, and M. Fordham, “Use of confocal imaging in the study of biological structures,” 1987.
- [219] J. Oreopoulos, R. Berman, and M. Browne, “Spinning-disk confocal microscopy. present technology and future trends,” in *Methods in Cell Biology*, vol. 123, Academic Press Inc., 2014, pp. 153–175.
- [220] K. N. Fish, “Total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy,” *Current Protocols in Cytometry*, no. SUPPL.50. John Wiley and Sons Inc., 2009, doi: 10.1002/0471142956.cy1218s50.
- [221] A. L. Mattheyses, S. M. Simon, and J. Z. Rappoport, “Imaging with total internal reflection fluorescence microscopy for the cell biologist,” *Journal of Cell Science*, vol. 123, no. 21. pp. 3621–3628, Nov. 01, 2010, doi: 10.1242/jcs.056218.
- [222] S. Sposini, M. Rosendale, L. Claverie, T. N. N. Van, D. Jullié, and D. Perrais, “Imaging endocytic vesicle formation at high spatial and temporal resolutions with the pulsed-pH protocol,” *Nat. Protoc.*, vol. 15, no. 9, pp. 3088–3104, Sep. 2020, doi: 10.1038/s41596-020-0371-z.
- [223] T. J. Crites, L. Chen, and R. Varma, “A TIRF microscopy technique for real-time, simultaneous imaging of the TCR and its associated signaling proteins,” *J. Vis. Exp.*, no. 61, 2012, doi: 10.3791/3892.
- [224] Joseph R Lakowicz, “Principles of Fluorescence Spectroscopy,” *springer Sci.*, 2006.
- [225] Y. Verwey, J. G. Th. T. of, G. Weber, and F. J. Farris, “Nature (London) 190, 779,” Wiley, 1976. [Online]. Available: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>.
- [226] K. Scheinpflug, O. Krylova, and H. Strahl, “Measurement of cell membrane fluidity by Laurdan GP: Fluorescence spectroscopy and microscopy,” in *Methods in Molecular Biology*, vol. 1520, Humana Press Inc., 2017, pp. 159–174.
- [227] S. Hofstetter, C. Denter, R. Winter, L. M. McMullen, and M. G. Gänzle, “Use of the fluorescent probe LAURDAN to label and measure inner membrane fluidity of endospores of *Clostridium* spp.,” *J. Microbiol. Methods*, vol. 91, no. 1, pp. 93–100, Oct. 2012, doi: 10.1016/j.mimet.2012.07.023.
- [228] M. Wenzel, N. Vischer, H. Strahl, and L. Hamoen, “Assessing Membrane Fluidity and Visualizing Fluid Membrane Domains in Bacteria Using Fluorescent Membrane Dyes,” *BIO-PROTOCOL*, vol. 8, no. 20, 2018, doi: 10.21769/bioprotoc.3063.
- [229] Banwell CN, “Fundamentals of Molecular Spectroscopy: McGraw-Hill Book company(UK) limited; 1972.”
- [230] M. Scherman, J. Barros, R. Santagata, A. Bresson, and B. Attal-Tretout, “Thermométrie Raman cohérente pour l’étude de la combustion,” *Photoniques*, no. 96, pp. 23–29, May

2019, doi: 10.1051/photon/20199623.

- [231] A. C. S. Talari, Z. Movasaghi, S. Rehman, and I. U. Rehman, "Raman spectroscopy of biological tissues," *Applied Spectroscopy Reviews*, vol. 50, no. 1. Taylor and Francis Inc., pp. 46–111, Jan. 02, 2015, doi: 10.1080/05704928.2014.923902.
- [232] L. Wei *et al.*, "Live-cell imaging of alkyne-tagged small biomolecules by stimulated Raman scattering," *Nat. Methods*, vol. 11, no. 4, pp. 410–412, 2014, doi: 10.1038/nmeth.2878.
- [233] R. Mendelsohn and C. C. Koch, "Deuterated phospholipids as Raman spectroscopic probes of membrane structure phase diagrams for the dipalmitoyl phosphatidylcholine (and its d62 derivative)-dipalmitoyl phosphatidylethanolamine system," 1980.
- [234] H. Wu, J. V. Volponi, A. E. Oliver, A. N. Parikh, B. A. Simmons, and S. Singh, "In vivo lipidomics using single-cell Raman spectroscopy," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, no. 9, pp. 3809–3814, Mar. 2011, doi: 10.1073/pnas.1009043108.
- [235] V. De Smedt-Peyrusse, F. Sargueil, A. Moranis, H. Harizi, S. Mongrand, and S. Layé, "Docosahexaenoic acid prevents lipopolysaccharide-induced cytokine production in microglial cells by inhibiting lipopolysaccharide receptor presentation but not its membrane subdomain localization," *J. Neurochem.*, vol. 105, no. 2, pp. 296–307, 2008, doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.05129.x.
- [236] N. G. Bazan and B. L. Scott, "Dietary omega-3 fatty acids and accumulation of docosahexaenoic acid in rod photoreceptor cells of the retina and at synapses," *Ups. J. Med. Sci. Suppl.*, vol. 48, p. 97–107, 1990, [Online]. Available: <http://europepmc.org/abstract/MED/2150242>.
- [237] M. Martínez and I. Mougán, "Fatty Acid Composition of Human Brain Phospholipids During Normal Development," *J. Neurochem.*, vol. 71, no. 6, pp. 2528–2533, Nov. 2002, doi: 10.1046/j.1471-4159.1998.71062528.x.
- [238] F. M. Harris, K. B. Best, and J. D. Bell, "Use of laurdan fluorescence intensity and polarization to distinguish between changes in membrane fluidity and phospholipid order," 2002. [Online]. Available: [www.bba-direct.com](http://www.bba-direct.com).
- [239] T. Parasassi, E. K. Krasnowska, L. Bagatolli, and E. Gratton, "Laurdan and Prodan as Polarity-Sensitive Fluorescent Membrane Probes," *J. Fluoresc.*, vol. 8, no. 4, pp. 365–373, 1998, doi: 10.1023/A:1020528716621.
- [240] V. Baeten, P. Hourant, M. T. Morales, and R. Aparicio, "Oil and Fat Classification by FT-Raman Spectroscopy," 1998. [Online]. Available: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>.
- [241] K. Majzner, S. Tott, L. Roussille, V. Deckert, S. Chlopicki, and M. Baranska, "Uptake of fatty acids by a single endothelial cell investigated by Raman spectroscopy supported by AFM," *Analyst*, vol. 143, no. 4, pp. 970–980, Feb. 2018, doi: 10.1039/c7an01043e.
- [242] O. Samek *et al.*, "Raman microspectroscopy of individual algal cells: Sensing unsaturation of storage lipids in vivo," *Sensors*, vol. 10, no. 9, pp. 8635–8651, Sep. 2010, doi: 10.3390/s100908635.
- [243] H. Rosales-Solano, V. Galievsky, K. Murtada, P. V. Radovanovic, and J. Pawliszyn, "Profiling of Unsaturated Lipids by Raman Spectroscopy Directly on Solid-Phase Microextraction Probes," *Anal. Chem.*, vol. 94, no. 2, pp. 606–611, Jan. 2022, doi: 10.1021/acs.analchem.1c04054.
- [244] M. Amaro, F. Reina, M. Hof, C. Eggeling, and E. Sezgin, "Laurdan and Di-4-ANEPPDHQ

- probe different properties of the membrane,” *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 50, no. 13, Mar. 2017, doi: 10.1088/1361-6463/aa5dbc.
- [245] W. Yu, P. T. So, T. French, and E. Gratton, “Fluorescence generalized polarization of cell membranes: a two-photon scanning microscopy approach,” *Biophys. J.*, vol. 70, no. 2, pp. 626–36, Feb. 1996, doi: 10.1016/S0006-3495(96)79646-7.
- [246] X. Yang, W. Sheng, G. Y. Sun, and J. C. M. Lee, “Effects of fatty acid unsaturation numbers on membrane fluidity and  $\alpha$ -secretase-dependent amyloid precursor protein processing,” *Neurochem. Int.*, vol. 58, no. 3, pp. 321–329, Feb. 2011, doi: 10.1016/j.neuint.2010.12.004.
- [247] J. E. Vance, “Phospholipid Synthesis and Transport in Mammalian Cells,” *Traffic*, vol. 16, no. 1. Blackwell Munksgaard, pp. 1–18, Jan. 01, 2015, doi: 10.1111/tra.12230.
- [248] J. I. S. MacDonald and H. Sprecher, “Phospholipid fatty acid remodeling in mammalian cells,” *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.*, vol. 1084, no. 2, pp. 105–121, Jul. 1991, doi: 10.1016/0005-2760(91)90209-Z.
- [249] E. Soupene, H. Fyrst, and F. A. Kuypers, “Mammalian acyl-CoA:lysophosphatidylcholine acyltransferase enzymes,” 2007. [Online]. Available: [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0709737104](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0709737104).
- [250] M. Eto, H. Shindou, S. Yamamoto, M. Tamura-Nakano, and T. Shimizu, “Lysophosphatidylethanolamine acyltransferase 2 (LPEAT2) incorporates DHA into phospholipids and has possible functions for fatty acid-induced cell death,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 526, no. 1, pp. 246–252, May 2020, doi: 10.1016/j.bbrc.2020.03.074.
- [251] J. Cao *et al.*, “Molecular identification of a novel mammalian brain isoform of acyl-CoA:Lysophospholipid acyltransferase with prominent ethanolamine lysophospholipid acylating activity, LPEAT2,” *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 27, pp. 19049–19057, Jul. 2008, doi: 10.1074/jbc.M800364200.
- [252] D. Hishikawa, H. Shindou, S. Kobayashi, H. Nakanishi, R. Taguchi, and T. Shimizu, “Discovery of a lysophospholipid acyltransferase family essential for membrane asymmetry and diversity,” 2008. [Online]. Available: [www.pnas.org/cgi/content/full/](http://www.pnas.org/cgi/content/full/).
- [253] Jos A. F. Op Den Kamp, “LIPID ASYMMETRY IN MEMBRANES,” *Annu. Rev. Biochem.*, 1979.
- [254] Y. Posor, M. Eichhorn-Grünig, and V. Haucke, “Phosphoinositides in endocytosis,” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, vol. 1851, no. 6. Elsevier B.V., pp. 794–804, 2015, doi: 10.1016/j.bbalip.2014.09.014.
- [255] B. L. Wolfe and J. A. Trejo, “Clathrin-dependent mechanisms of G protein-coupled receptor endocytosis,” *Traffic*, vol. 8, no. 5. pp. 462–470, May 2007, doi: 10.1111/j.1600-0854.2007.00551.x.
- [256] P. J. Bosch *et al.*, “Evaluation of fluorophores to label SNAP-Tag fused proteins for multicolor single-molecule tracking microscopy in live cells,” *Biophys. J.*, vol. 107, no. 4, pp. 803–814, Aug. 2014, doi: 10.1016/j.bpj.2014.06.040.
- [257] K. M. Kim, K. J. Valenzano, S. R. Robinson, W. D. Yao, L. S. Barak, and M. G. Caron, “Differential Regulation of the Dopamine D2 and D3 Receptors by G Protein-coupled Receptor Kinases and  $\beta$ -Arrestins,” *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 40, pp. 37409–37414, Oct. 2001, doi: 10.1074/jbc.M106728200.

- [258] P. Heusler, A. Newman-Tancredi, T. Looock, and D. Cussac, "Antipsychotics differ in their ability to internalise human dopamine D2S and human serotonin 5-HT1A receptors in HEK293 cells," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 581, no. 1–2, pp. 37–46, Feb. 2008, doi: 10.1016/j.ejphar.2007.11.046.
- [259] R. H. Oakley, S. A. Laporte, J. A. Holt, M. G. Caron, and L. S. Barak, "Differential affinities of visual arrestin,  $\beta$ arrestin1, and  $\beta$ arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 22, pp. 17201–17210, Jun. 2000, doi: 10.1074/jbc.M910348199.
- [260] J. L. Goggi, A. Sardini, A. Egerton, P. G. Strange, and P. M. Grasby, "Agonist-dependent internalization of D2 receptors: Imaging quantification by confocal microscopy," *Synapse*, vol. 61, no. 4, pp. 231–241, Apr. 2007, doi: 10.1002/syn.20360.
- [261] L. de Vries, F. Finana, C. Cathala, B. Ronsin, and D. Cussac, "Innovative bioluminescence resonance energy transfer assay reveals differential agonist-induced D2 receptor intracellular trafficking and arrestin-3 recruitment," *Mol. Pharmacol.*, vol. 96, no. 3, pp. 308–319, Sep. 2019, doi: 10.1124/mol.119.115998.
- [262] J. D. Urban, G. A. Vargas, M. Von Zastrow, and R. B. Mailman, "Aripiprazole has functionally selective actions at dopamine D2 receptor-mediated signaling pathways," *Neuropsychopharmacology*, vol. 32, no. 1, pp. 67–77, Jan. 2007, doi: 10.1038/sj.npp.1301071.
- [263] E. W. Tuplin and M. R. Holahan, "Aripiprazole, A Drug that Displays Partial Agonism and Functional Selectivity," *Curr. Neuropharmacol.*, vol. 15, no. 8, Apr. 2017, doi: 10.2174/1570159x15666170413115754.
- [264] B. Masri *et al.*, "Antagonism of dopamine D2 receptor/ $\beta$ -arrestin 2 interaction is a common property of clinically effective antipsychotics," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 36, pp. 13656–13661, Sep. 2008, doi: 10.1073/pnas.0803522105.
- [265] S. N. Roed *et al.*, "Real-time trafficking and signaling of the glucagon-like peptide-1 receptor," *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 382, no. 2, pp. 938–949, 2014, doi: 10.1016/j.mce.2013.11.010.
- [266] D. Thompson and J. L. Whistler, "Dopamine D3 receptors are down-regulated following heterologous endocytosis by a specific interaction with G protein-coupled receptor-associated sorting protein-1," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 2, pp. 1598–1608, Jan. 2011, doi: 10.1074/jbc.M110.158345.
- [267] S. Aringhieri *et al.*, "Molecular targets of atypical antipsychotics: From mechanism of action to clinical differences," *Pharmacology and Therapeutics*, vol. 192. Elsevier Inc., pp. 20–41, Dec. 01, 2018, doi: 10.1016/j.pharmthera.2018.06.012.
- [268] J. A. Allen *et al.*, "Discovery of  $\beta$ -arrestin-biased dopamine D 2 ligands for probing signal transduction pathways essential for antipsychotic efficacy," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, no. 45, pp. 18488–18493, Nov. 2011, doi: 10.1073/pnas.1104807108.
- [269] M. Johnson, "Beta2 -adrenoceptors: Mechanisms of action of beta2-agonists," *Paediatr. Respir. Rev.*, vol. 2, no. 1, pp. 57–62, 2001, doi: 10.1053/prrv.2000.0102.
- [270] L. Hertz, D. Lovatt, S. A. Goldman, and M. Nedergaard, "Adrenoceptors in brain: Cellular gene expression and effects on astrocytic metabolism and  $[Ca^{2+}]_i$ ," *Neurochem. Int.*, vol. 57, no. 4, pp. 411–420, Nov. 2010, doi: 10.1016/j.neuint.2010.03.019.
- [271] O. BRODDEt Biochemisches Forschungslobor, "Beta 1- and beta 2-adrenoceptors in the

human heart: properties, function, and alterations in chronic heart failure.”

- [272] W. P. Hausdorffs, M. Bouvier, B. F. O’ Dowd, G. P. Irons, M. G. Caron, and R. J. Lefkowitz, “Phosphorylation Sites on Two Domains of the  $\beta$ -Adrenergic Receptor Are Involved in Distinct Pathways of Receptor Desensitization,” 1989.
- [273] A. Ruiz-Gómez and F. Mayor, “Adrenergic Receptor Kinase (GRK2) Colocalizes with-Adrenergic Receptors during Agonist-induced Receptor Internalization\*,” 1997. [Online]. Available: <http://www-jbc.stanford.edu/jbc/>.
- [274] A. Jie Zhang, Larry S. Barak, Pieter H. Anborgh, Stephane A. Laporte, Marc G. Caron and S. S. G. Ferguson, “Cellular trafficking of G protein-coupled receptor beta-arrestin endocytic complexes.”
- [275] O. B. Goodman *et al.*, “ $\beta$ -Arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the  $\beta$ 2-adrenergic receptor,” *Nature*, vol. 383, no. 6599, pp. 447–450, Oct. 1996, doi: 10.1038/383447a0.
- [276] E. Toraih, M. H. Hussein, and A. El-Serafi, “Beta2-Adrenergic Receptor Gene Haplotypes in Chronic Obstructive Pulmonary Disease,” 2015. [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/302549208>.
- [277] M. Bouvier, “The  $\beta$ 2-adrenergic receptor a model for studying the molecular mechanisms of GPCRs desensitization,” *Med. Sci.*, 1995.
- [278] J. Shonberg, R. C. Kling, P. Gmeiner, and S. Löber, “GPCR crystal structures: Medicinal chemistry in the pocket,” *Bioorganic Med. Chem.*, vol. 23, no. 14, pp. 3880–3906, Jun. 2015, doi: 10.1016/j.bmc.2014.12.034.
- [279] R. Dawaliby *et al.*, “Allosteric regulation of G protein-coupled receptor activity by phospholipids,” *Nat. Chem. Biol.*, vol. 12, no. 1, pp. 35–39, Jan. 2016, doi: 10.1038/nchembio.1960.
- [280] M. Manna *et al.*, “Mechanism of allosteric regulation of  $\beta$ 2-adrenergic receptor by cholesterol,” *Elife*, vol. 5, no. NOVEMBER2016, Nov. 2016, doi: 10.7554/eLife.18432.001.
- [281] H. Ta *et al.*, “Mapping molecules in scanning far-field fluorescence nanoscopy,” *Nat. Commun.*, vol. 6, Aug. 2015, doi: 10.1038/ncomms8977.
- [282] C. L. Hershberger *et al.*, “A Cloned Gene for Human Transferrin,” *Ann N Y Acad Sci*, 1996.
- [283] K. M. Mayle, A. M. Le, and D. T. Kamei, “The intracellular trafficking pathway of transferrin,” *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, vol. 1820, no. 3, pp. 264–281, Mar. 2012, doi: 10.1016/j.bbagen.2011.09.009.
- [284] R. M. Graham *et al.*, “Liver iron transport,” *World J Gastroenterol*, vol. 13, no. 35, pp. 4725–4736, 2007, [Online]. Available: [www.wjgnet.com/http://www.wjgnet.com/1007-9327/13/4725.asp](http://www.wjgnet.com/http://www.wjgnet.com/1007-9327/13/4725.asp).
- [285] Y. Cheng, O. Zak, P. Aisen, S. C. Harrison, and T. Walz, “Structure of the Human Transferrin Receptor-Transferrin Complex and distributing iron. In vertebrates, iron is transported in the serum bound to transferrin (Tf), which also delivers it to cells using an endocytotic pathway involving the,” 2004. [Online]. Available: [www.cell.com/cgi/content/full/116/4/565/DC1](http://www.cell.com/cgi/content/full/116/4/565/DC1).
- [286] E. Gammella, P. Buratti, G. Cairo, and S. Recalcati, “The transferrin receptor: The cellular iron gate,” *Metallomics*, vol. 9, no. 10. Royal Society of Chemistry, pp. 1367–1375, Oct. 01,

2017, doi: 10.1039/c7mt00143f.

- [287] S. L. Niu *et al.*, “Reduced G protein-coupled signaling efficiency in retinal rod outer segments in response to n-3 fatty acid deficiency,” *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 30, pp. 31098–31104, Jul. 2004, doi: 10.1074/jbc.M404376200.
- [288] K. A. N. Wang, “Contribution of Serine Residues to Constitutive and Agonist-Induced Signaling via the D 2S Dopamine Receptor: Evidence for Multiple, Agonist-Specific Active Conformations,” Hwa and Perez, 1989. [Online]. Available: <http://www.molpharm.org>.
- [289] P. Ghanouni *et al.*, “Functionally Different Agonists Induce Distinct Conformations in the G Protein Coupling Domain of the  $\beta_2$  Adrenergic Receptor,” *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 27, pp. 24433–24436, Jul. 2001, doi: 10.1074/jbc.C100162200.
- [290] G. Swaminath, Y. Xiang, T. W. Lee, J. Steenhuis, C. Parnot, and B. K. Kobilka, “Sequential binding of agonists to the  $\beta_2$  adrenoceptor. Kinetic evidence for intermediate conformational states,” *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 1, pp. 686–691, Jan. 2004, doi: 10.1074/jbc.M310888200.
- [291] A. Beghin *et al.*, “Localization-based super-resolution imaging meets high-content screening,” *Nat. Methods*, vol. 14, no. 12, pp. 1184–1190, Dec. 2017, doi: 10.1038/nmeth.4486.
- [292] S. Granier *et al.*, “Structure and conformational changes in the C-terminal domain of the  $\beta_2$ -adrenoceptor: Insights from fluorescence resonance energy transfer studies,” *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 18, pp. 13895–13905, May 2007, doi: 10.1074/jbc.M611904200.
- [293] S. Granier, S. Kim, J. J. Fung, M. P. Bokoch, and C. Parnot, “FRET-based measurement of GPCR conformational changes,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 552, pp. 253–268, 2009, doi: 10.1007/978-1-60327-317-6\_18.
- [294] R. H. Oakley, S. A. Laporte, J. A. Holt, M. G. Caron, and L. S. Barak, “Differential affinities of visual arrestin,  $\beta$ arrestin1, and  $\beta$ arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors,” *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 22, pp. 17201–17210, Jun. 2000, doi: 10.1074/jbc.M910348199.
- [295] N. R. Orem, L. Xia, and P. J. Dolph, “An essential role for endocytosis of rhodopsin through interaction of visual arrestin with the AP-2 adaptor,” *J. Cell Sci.*, vol. 119, no. 15, pp. 3141–3148, Aug. 2006, doi: 10.1242/jcs.03052.
- [296] D. S. Kang, X. Tian, and J. L. Benovic, “Role of  $\beta$ -arrestins and arrestin domain-containing proteins in G protein-coupled receptor trafficking,” *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 27, no. 1, pp. 63–71, Apr. 2014, doi: 10.1016/j.ceb.2013.11.005.
- [297] H. Lan, Y. Liu, M. I. Bell, V. V. Gurevich, and K. A. Neve, “A dopamine D 2 receptor mutant capable of G protein-mediated signaling but deficient in arrestin binding,” *Mol. Pharmacol.*, vol. 75, no. 1, pp. 113–123, Jan. 2009, doi: 10.1124/mol.108.050534.
- [298] C. C. Clayton, P. Donthamsetti, N. A. Lambert, J. A. Javitch, and K. A. Neve, “Mutation of three residues in the third intracellular loop of the dopamine D2 receptor creates an internalization-defective receptor,” *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 48, pp. 33663–33675, Nov. 2014, doi: 10.1074/jbc.M114.605378.
- [299] S. A. Laporte, R. H. Oakley, J. A. Holt, L. S. Barak, and M. G. Caron, “The interaction of  $\beta$ -arrestin with the AP-2 adaptor is required for the clustering of  $\beta_2$ -adrenergic receptor into clathrin-coated pits,” *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 30, pp. 23120–23126, Jul. 2000, doi: 10.1074/jbc.M002581200.

- [300] M. G. H. Scott, A. Benmerah, O. Muntaner, and S. Marullo, "Recruitment of activated G protein-coupled receptors to pre-existing clathrin-coated pits in living cells," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 5, pp. 3552–3559, Feb. 2002, doi: 10.1074/jbc.M106586200.
- [301] F. Santini, I. Gaidarov, and J. H. Keen, "G protein-coupled receptor/arrestin3 modulation of the endocytic machinery," *J. Cell Biol.*, vol. 156, no. 4, pp. 665–676, Feb. 2002, doi: 10.1083/jcb.200110132.
- [302] C. C. M. Lally, B. Bauer, J. Selent, and M. E. Sommer, "C-edge loops of arrestin function as a membrane anchor," *Nat. Commun.*, vol. 8, Feb. 2017, doi: 10.1038/ncomms14258.
- [303] I. V. Klewe *et al.*, "Recruitment of  $\beta$ -arrestin2 to the dopamine D2 receptor: Insights into anti-psychotic and anti-parkinsonian drug receptor signaling," *Neuropharmacology*, vol. 54, no. 8, pp. 1215–1222, Jun. 2008, doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.03.015.
- [304] M. Scarselli, P. Annibale, and A. Radenovic, "Cell type-specific  $\beta$ 2-adrenergic receptor clusters identified using photoactivated localization microscopy are not lipid raft related, but depend on actin cytoskeleton integrity," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 20, pp. 16768–16780, May 2012, doi: 10.1074/jbc.M111.329912.
- [305] V. V. Gurevich and J. L. Benovic, "Visual Arrestin Binding to Rhodopsin," *J. Biol. Chem.*, vol. 270, no. 11, pp. 6010–6016, Mar. 1995, doi: 10.1074/jbc.270.11.6010.
- [306] M. Kamal, M. Marquez, V. Vauthier, A. Leloire, P. Froguel, and R. Jockers, "Improved donor/acceptor BRET couples for monitoring  $\beta$ -arrestin recruitment to G protein-coupled receptors," *Biotechnol. J.*, vol. 4, no. 9, pp. 1337–1344, 2009, doi: 10.1002/biot.200900016.
- [307] M. Kocan and K. D. G. Pflieger, "Detection of GPCR/beta-arrestin interactions in live cells using bioluminescence resonance energy transfer technology.," *Methods Mol. Biol.*, vol. 552, pp. 305–317, 2009, doi: 10.1007/978-1-60327-317-6\_22.
- [308] I. Gaidarov, J. G. Krupnick, J. R. Falck, J. L. Benovic, and J. H. Keen, "Arrestin function in G protein-coupled receptor endocytosis requires phosphoinositide binding," *EMBO J.*, vol. 18, no. 4, pp. 871–881, Feb. 1999, doi: 10.1093/emboj/18.4.871.
- [309] J. Janetzko, R. Kise, B. Barsi-ryne, and D. H. Siepe, "Membrane phosphoinositides stabilize GPCR-arrestin complexes and offer temporal control of complex assembly and dynamic," *bioXiv*, 2021.
- [310] J. Rohrbough and K. Broadie, "Lipid regulation of the synaptic vesicle cycle," *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 6, no. 2. Nature Publishing Group, pp. 139–150, Feb. 2005, doi: 10.1038/nrn1608.
- [311] M. J. Gandal *et al.*, "Transcriptome-wide isoform-level dysregulation in ASD, schizophrenia, and bipolar disorder," *Science (80- )*, vol. 362, no. 1265, Dec. 2018, doi: 10.1126/science.aat8127.
- [312] S. H. Witt *et al.*, "Genome-wide association study of borderline personality disorder reveals genetic overlap with bipolar disorder, major depression and schizophrenia," *Transl. Psychiatry*, vol. 7, no. 6, p. e1155, Jun. 2017, doi: 10.1038/tp.2017.115.
- [313] B. S. Beltz, M. F. Tlusty, J. L. Benton, and D. C. Sandeman, "Omega-3 fatty acids upregulate adult neurogenesis," *Neurosci. Lett.*, vol. 415, no. 2, pp. 154–158, Mar. 2007, doi: 10.1016/J.NEULET.2007.01.010.
- [314] F. Calderon and H. Y. Kim, "Docosahexaenoic acid promotes neurite growth in hippocampal neurons," *J. Neurochem.*, vol. 90, no. 4, pp. 979–988, Aug. 2004, doi:



10.1111/J.1471-4159.2004.02520.X.

- [315] T. Harayama and H. Riezman, "Understanding the diversity of membrane lipid composition," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 19, no. 5, pp. 281–296, 2018, doi: 10.1038/nrm.2017.138.
- [316] A. L. Duncan, W. Song, and M. S. P. Sansom, "Lipid-dependent regulation of ion channels and G protein-coupled receptors: Insights from structures and simulations," *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, vol. 60. Annual Reviews, pp. 31–50, Jan. 2020, doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010919-023411.
- [317] A. E. Whitton, M. T. Treadway, and D. A. Pizzagalli, "Reward processing dysfunction in major depression, bipolar disorder and schizophrenia," *Curr. Opin. Psychiatry*, vol. 28, no. 1, pp. 7–12, 2015, doi: 10.1097/YCO.0000000000000122.
- [318] C. O. Bondi *et al.*, "Adolescent behavior and dopamine availability are uniquely sensitive to dietary omega-3 fatty acid deficiency," *Biol. Psychiatry*, vol. 75, no. 1, pp. 38–46, 2014, doi: 10.1016/j.biopsych.2013.06.007.
- [319] S. Chalon, "Omega-3 fatty acids and monoamine neurotransmission," *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids*, vol. 75, no. 4–5, pp. 259–269, 2006, doi: 10.1016/j.plefa.2006.07.005.
- [320] D. C. Mitchell, S. L. Niu, and B. J. Litman, "Enhancement of G protein-coupled signaling by DHA phospholipids," *Lipids*, vol. 38, no. 4, pp. 437–443, 2003, doi: 10.1007/s11745-003-1081-1.
- [321] N. Salem, B. Litman, H. Kim, and K. Gawrisch, "Mechanisms of Action of Docosahexaenoic Acid in the Nervous System," *Lipids*, vol. 36, no. 9, pp. 945–959, 2001.
- [322] S. E. Feller, K. Gawrisch, and T. B. Woolf, "Rhodopsin exhibits a preference for solvation by polyunsaturated docosahexaenoic acid," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 125, no. 15, pp. 4434–4435, 2003, doi: 10.1021/ja0345874.
- [323] M. C. Pitman, A. Grossfield, F. Suits, and S. E. Feller, "Role of cholesterol and polyunsaturated chains in lipid-protein interactions: Molecular dynamics simulation of rhodopsin in a realistic membrane environment," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, no. 13, pp. 4576–4577, 2005, doi: 10.1021/ja042715y.
- [324] M. Javanainen *et al.*, "Reduced level of docosahexaenoic acid shifts GPCR neuroreceptors to less ordered membrane regions," *PLoS Comput. Biol.*, vol. 15, no. 5, May 2019, doi: 10.1371/journal.pcbi.1007033.
- [325] A. Polozova and B. J. Litman, "Cholesterol dependent recruitment of di22:6-PC by a G protein-coupled receptor into lateral domains," *Biophys. J.*, vol. 79, no. 5, pp. 2632–2643, 2000, doi: 10.1016/S0006-3495(00)76502-7.
- [326] W. Stillwell and S. R. Wassall, "Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid," *Chem. Phys. Lipids*, vol. 126, pp. 1–27, 2003.
- [327] I. Alves, C. Park, and V. Hruby, "Plasmon Resonance Methods in GPCR Signaling and Other Membrane Events," *Curr. Protein Pept. Sci.*, vol. 6, no. 4, pp. 293–312, 2005, doi: 10.2174/1389203054546352.
- [328] E. Harté *et al.*, "Probing the kinetics of lipid membrane formation and the interaction of a nontoxic and a toxic amyloid with plasmon waveguide resonance," *Chem. Commun.*, vol. 50, no. 32, pp. 4168–4171, 2014, doi: 10.1039/c4cc00571f.

- [329] L. A. A. De Jong, S. Grünewald, J. P. Franke, D. R. A. Uges, and R. Bischoff, “Purification and characterization of the recombinant human dopamine D2S receptor from *Pichia pastoris*,” *Protein Expr. Purif.*, vol. 33, no. 2, pp. 176–184, 2004, doi: 10.1016/j.pep.2003.08.018.
- [330] A. Malmberg and N. Mohell, “Characterization of [3H]quinpirole binding to human dopamine D(2A) and D3 receptors: Effects of ions and guanine nucleotides,” *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 274, no. 2, pp. 790–797, 1995.
- [331] L. Albizu *et al.*, “Time-resolved FRET between GPCR ligands reveals oligomers in native tissues,” *Nat. Chem. Biol.*, vol. 6, no. 8, pp. 587–594, 2010, doi: 10.1038/nchembio.396.
- [332] D. Maurel *et al.*, “Cell-surface protein-protein interaction analysis with time-resolved FRET and snap-tag technologies: Application to GPCR oligomerization,” *Nat. Methods*, vol. 5, no. 6, pp. 561–567, Jun. 2008, doi: 10.1038/nmeth.1213.
- [333] I. D. Alves and S. Lecomte, “Study of G-Protein Coupled Receptor Signaling in Membrane Environment by Plasmon Waveguide Resonance,” *Acc. Chem. Res.*, vol. 52, no. 4, pp. 1059–1067, 2019, doi: 10.1021/acs.accounts.9b00007.
- [334] I. D. Alves, S. M. Cowell, Z. Salamon, S. Devanathan, G. Tollin, and V. J. Hruby, “Different structural states of the proteolipid membrane are produced by ligand binding to the human  $\delta$ -opioid receptor as shown by plasmon-waveguide resonance spectroscopy,” *Mol. Pharmacol.*, vol. 69, no. 1, p. 406, 2004, doi: 10.1124/mol.69.1.406.
- [335] I. D. Alves *et al.*, “The two NK-1 binding sites correspond to distinct, independent, and non-interconvertible receptor conformational states as confirmed by plasmon-waveguide resonance spectroscopy,” *Biochemistry*, vol. 45, no. 16, pp. 5309–5318, Apr. 2006, doi: 10.1021/bi052586d.
- [336] K. Boyé *et al.*, “The role of CXCR3/LRP1 cross-talk in the invasion of primary brain tumors,” *Nat. Commun.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–20, Nov. 2017, doi: 10.1038/s41467-017-01686-y.
- [337] K. Boyé, C. Billottet, N. Pujol, I. D. Alves, and A. Bikfalvi, “Ligand activation induces different conformational changes in CXCR3 receptor isoforms as evidenced by plasmon waveguide resonance (PWR),” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–11, Sep. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-11151-x.
- [338] R. Guixà-González *et al.*, “Membrane cholesterol access into a G-protein-coupled receptor,” *Nat. Commun.* 2017 81, vol. 8, no. 1, pp. 1–12, Feb. 2017, doi: 10.1038/ncomms14505.
- [339] J. M. Beaulieu, R. R. Gainetdinov, and M. G. Caron, “The Akt-GSK-3 signaling cascade in the actions of dopamine,” *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 28, no. 4, pp. 166–172, 2007, doi: 10.1016/j.tips.2007.02.006.
- [340] M. Lafourcade *et al.*, “Nutritional omega-3 deficiency abolishes endocannabinoid-mediated neuronal functions,” *Nat. Neurosci.*, vol. 14, no. 3, pp. 345–350, Jan. 2011, doi: 10.1038/nn.2736.
- [341] T. Mizumura *et al.*, “Activation of adenosine A2A receptor by lipids from docosahexaenoic acid revealed by NMR,” *Sci. Adv.*, vol. 6, no. 12, pp. 8544–8562, 2020, doi: 10.1126/SCIADV.AAY8544.
- [342] M. Carrillo-Tripp and S. E. Feller, “Evidence for a mechanism by which  $\omega$ -3 polyunsaturated lipids may affect membrane protein function,” *Biochemistry*, vol. 44, no. 30, pp. 10164–10169, 2005, doi: 10.1021/bi050822e.

- [343] M. J. Bruno, R. E. Koeppe, and O. S. Andersen, "Docosahexaenoic acid alters bilayer elastic properties," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 23, pp. 9638–9643, 2007, doi: 10.1073/pnas.0701015104.
- [344] R. Caires *et al.*, "Omega-3 Fatty Acids Modulate TRPV4 Function through Plasma Membrane Remodeling," *Cell Rep.*, vol. 21, no. 1, pp. 246–258, Oct. 2017, doi: 10.1016/j.celrep.2017.09.029.
- [345] B. Antonny, S. Vanni, H. Shindou, and T. Ferreira, "From zero to six double bonds: Phospholipid unsaturation and organelle function," *Trends in Cell Biology*, vol. 25, no. 7. Elsevier Ltd, pp. 427–436, Jul. 01, 2015, doi: 10.1016/j.tcb.2015.03.004.
- [346] K. Gawrisch, N. V. Eldho, and L. L. Holte, "The structure of DHA in phospholipid membranes," *Lipids*, vol. 38, no. 4, pp. 445–452, 2003, doi: 10.1007/s11745-003-1082-0.
- [347] M. L. Jacobs, H. A. Faizi, J. A. Peruzzi, P. M. Vlahovska, and N. P. Kamat, "EPA and DHA differentially modulate membrane elasticity in the presence of cholesterol," *Biophys. J.*, vol. 120, no. 11, pp. 2317–2329, Jun. 2021, doi: 10.1016/J.BPJ.2021.04.009.
- [348] I. Alves, G. Staneva, C. Tessier, G. F. Salgado, and P. Nuss, "The interaction of antipsychotic drugs with lipids and subsequent lipid reorganization investigated using biophysical methods," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1808, no. 8, pp. 2009–2018, Aug. 2011, doi: 10.1016/j.bbamem.2011.02.021.
- [349] C. Tessier, P. Nuss, G. Staneva, and C. Wolf, "Modification of membrane heterogeneity by antipsychotic drugs: An X-ray diffraction comparative study," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 320, no. 2, pp. 469–475, Apr. 2008, doi: 10.1016/j.jcis.2008.01.034.
- [350] F. Lolicato *et al.*, "Membrane-Dependent Binding and Entry Mechanism of Dopamine into Its Receptor," *ACS Chem. Neurosci.*, vol. 11, no. 13, pp. 1914–1924, Jul. 2020, doi: 10.1021/acchemneuro.9b00656.
- [351] A. Grossfield, S. E. Feller, and M. C. Pitman, "A role for interactions in the modulation of rhodopsin by  $\omega$ -3 polyunsaturated lipids," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 13, pp. 4888–4893, 2006, doi: 10.1073/pnas.0508352103.
- [352] L. Lemel *et al.*, "The ligand-bound state of a G protein-coupled receptor stabilizes the interaction of functional cholesterol molecules," *J. Lipid Res.*, vol. 62, p. 100059, Jan. 2021, doi: 10.1016/J.JLR.2021.100059.
- [353] A. Malnoe, H. Milon, and C. Reme, "Effect of In Vivo Modulation of Membrane Docosahexaenoic Acid Levels on the Dopamine-Dependent Adenylate Cyclase Activity in the Rat Retina," *J. Neurochem.*, vol. 55, no. 5, pp. 1480–1485, Nov. 1990, doi: 10.1111/j.1471-4159.1990.tb04929.x.
- [354] M. G. Murphy, "Effects of exogenous linoleic acid on fatty acid composition, receptor-mediated cAMP formation, and transport functions in rat astrocytes in primary culture," *Neurochem. Res.*, vol. 20, no. 11, pp. 1365–1375, 1995, doi: 10.1007/BF00992513.
- [355] J. Z. Yu, J. Wang, S. D. Sheridan, R. H. Perlis, and M. M. Rasenick, "N-3 polyunsaturated fatty acids promote astrocyte differentiation and neurotrophin production independent of cAMP in patient-derived neural stem cells," *Mol. Psychiatry*, 2020, doi: 10.1038/s41380-020-0786-5.
- [356] R. S. Chapkin, N. Wang, Y. Y. Fan, J. R. Lupton, and I. A. Prior, "Docosahexaenoic acid alters the size and distribution of cell surface microdomains," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1778, no. 2, pp. 466–471, Feb. 2008, doi:

10.1016/J.BBAMEM.2007.11.003.

- [357] K. R. Levental *et al.*, “Polyunsaturated Lipids Regulate Membrane Domain Stability by Tuning Membrane Order,” *Biophys. J.*, vol. 110, no. 8, pp. 1800–1810, Apr. 2016, doi: 10.1016/J.BPJ.2016.03.012.
- [358] W. Stillwell, S. R. Shaikh, M. Zerouga, R. Siddiqui, and S. R. Wassall, “Docosahexaenoic acid affects cell signaling by altering lipid rafts,” *Reprod. Nutr. Dev.*, vol. 45, no. 5, pp. 559–579, Sep. 2005, doi: 10.1051/RND:2005046.
- [359] P. G. Charest and M. Bouvier, “Palmitoylation of the V2 Vasopressin Receptor Carboxyl Tail Enhances  $\beta$ -Arrestin Recruitment Leading to Efficient Receptor Endocytosis and ERK1/2 Activation,” *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 42, pp. 41541–41551, Oct. 2003, doi: 10.1074/JBC.M306589200.
- [360] S. R. Hawtin, A. B. Tobin, S. Patel, and M. Wheatley, “Palmitoylation of the Vasopressin V1a Receptor Reveals Different Conformational Requirements for Signaling, Agonist-induced Receptor Phosphorylation, and Sequestration,” *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 41, pp. 38139–38146, Oct. 2001, doi: 10.1074/jbc.m106142200.
- [361] S. S. Karnik, K. D. Ridge, S. Bhattacharya, and H. G. Khorana, “Palmitoylation of bovine opsin and its cysteine mutants in COS cells (fatty acylation/visual pigment/transducin/site-directed mutagenesis/structure-function relationships),” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 90, pp. 40–44, 1993.
- [362] S. Moffett, B. Mouillac, H. Bonin, and M. Bouvier, “Altered phosphorylation and desensitization patterns of a human  $\beta$ 2-adrenergic receptor lacking the palmitoylated Cys341,” *EMBO J.*, vol. 12, no. 1, pp. 349–356, Jan. 1993, doi: 10.1002/j.1460-2075.1993.tb05663.x.
- [363] T. M. Palmer and G. L. Stiles, “Identification of threonine residues controlling the agonist-dependent phosphorylation and desensitization of the rat A3 adenosine receptor,” *Mol. Pharmacol.*, vol. 57, no. 3, pp. 539–545, 2000, doi: 10.1124/mol.57.3.539.
- [364] D. S. Pickering, F. A. Taverna, M. W. Saltert, and D. R. Hampson, “Palmitoylation of the GluR6 kainate receptor,” *Neurobiology*, vol. 92, pp. 12090–12094, 1995.
- [365] P. Donthamsetti *et al.*, “Arrestin recruitment to dopamine D2 receptor mediates locomotion but not incentive motivation,” *Mol. Psychiatry*, vol. 25, no. 9, pp. 2086–2100, 2020, doi: 10.1038/s41380-018-0212-4.
- [366] E. F. Gallo *et al.*, “Accumbens dopamine D2 receptors increase motivation by decreasing inhibitory transmission to the ventral pallidum,” *Nat. Commun. 2018 91*, vol. 9, no. 1, pp. 1–13, Mar. 2018, doi: 10.1038/S41467-018-03272-2.
- [367] G. E. Berger *et al.*, “Ethyl-Eicosapentaenoic Acid in First-Episode Psychosis: A Randomized, Placebo-Controlled Trial,” *J. Clin. Psychiatry*, vol. 68, no. 12, pp. 1867–75, Dec. 2007.
- [368] D. G. Robinson *et al.*, “A potential role for adjunctive omega-3 polyunsaturated fatty acids for depression and anxiety symptoms in recent onset psychosis: Results from a 16 week randomized placebo-controlled trial for participants concurrently treated with risperidone,” *Schizophr. Res.*, vol. 204, pp. 295–303, Feb. 2019, doi: 10.1016/j.schres.2018.09.006.
- [369] G. P. Amminger, M. R. Schäfer, M. Schlögelhofer, C. M. Klier, and P. D. McGorry, “Longer-term outcome in the prevention of psychotic disorders by the Vienna omega-3 study,” *Nat. Commun. 2015 61*, vol. 6, no. 1, pp. 1–7, Aug. 2015, doi:

10.1038/ncomms8934.

- [370] Z. Salamon, H. A. Macleod, and G. Tollin, “Coupled plasmon-waveguide resonators: A new spectroscopic tool for probing proteolipid film structure and properties,” *Biophys. J.*, vol. 73, no. 5, pp. 2791–2797, 1997, doi: 10.1016/S0006-3495(97)78308-5.
- [371] P. Mueller and D. O. Rudin, “Resting and action potentials in experimental bimolecular lipid membranes,” *J. Theor. Biol.*, vol. 18, no. 2, pp. 222–258, Feb. 1968, doi: 10.1016/0022-5193(68)90163-x.
- [372] J. B. Perez, J. M. Segura, D. Abankwa, J. Piguet, K. L. Martinez, and H. Vogel, “Monitoring the Diffusion of Single Heterotrimeric G Proteins in Supported Cell-membrane Sheets Reveals their Partitioning into Microdomains,” *J. Mol. Biol.*, vol. 363, no. 5, pp. 918–930, 2006, doi: 10.1016/j.jmb.2006.08.036.
- [373] R. Fernández *et al.*, “Microarray and Mass Spectrometry-Based Methodology for Lipid Profiling of Tissues and Cell Cultures,” *Anal. Chem.*, vol. 91, no. 24, pp. 15967–15973, 2019, doi: 10.1021/acs.analchem.9b04529.
- [374] C. Joffre *et al.*, “Modulation of brain PUFA content in different experimental models of mice,” *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids*, vol. 114, pp. 1–10, Nov. 2016, doi: 10.1016/j.plefa.2016.09.003.
- [375] J. Folch, M. Lees, and G. H. Sloane Stanley, “A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 226, no. 1, pp. 497–509, 1957, doi: 10.1016/s0021-9258(18)64849-5.
- [376] W. R. Morrison and L. M. Smith, “Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids,” *J. Lipid Res.*, vol. 5, pp. 600–608, 1964, doi: 10.1016/S0022-2275(20)40190-7.
- [377] W. Humphrey, A. Dalke, and K. Schulten, “VMD: Visual molecular dynamics,” *J. Mol. Graph.*, vol. 14, no. 1, pp. 33–38, Feb. 1996, doi: 10.1016/0263-7855(96)00018-5.
- [378] B. Webb and A. Sali, “Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER,” *Curr. Protoc. Bioinforma.*, vol. 54, no. 1, pp. 5.6.1-5.6.37, Jun. 2016, doi: 10.1002/CPBI.3.
- [379] E. Mayol *et al.*, “Homolwat: A web server tool to incorporate ‘homologous’ water molecules into gpcr structures,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 48, no. W1, pp. W54–W59, Jul. 2020, doi: 10.1093/NAR/GKAA440.
- [380] O. Trott and A. J. Olson, “AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading,” *J. Comput. Chem.*, vol. 31, no. 2, Jan. 2009, doi: 10.1002/jcc.21334.
- [381] S. Jo, T. Kim, and W. Im, “Automated builder and database of protein/membrane complexes for molecular dynamics simulations,” *PLoS One*, vol. 2, no. 9, p. e880, Sep. 2007, doi: 10.1371/journal.pone.0000880.
- [382] E. L. Wu *et al.*, “CHARMM-GUI membrane builder toward realistic biological membrane simulations,” *Journal of Computational Chemistry*, vol. 35, no. 27. John Wiley and Sons Inc., pp. 1997–2004, Oct. 2014, doi: 10.1002/jcc.23702.
- [383] M. J. Harvey, G. Giupponi, and G. De Fabritiis, “ACEMD: Accelerating biomolecular dynamics in the microsecond time scale,” *J. Chem. Theory Comput.*, vol. 5, no. 6, pp. 1632–1639, Jun. 2009, doi: 10.1021/ct9000685.

- [384] J. Huang *et al.*, “CHARMM36m: An improved force field for folded and intrinsically disordered proteins,” *Nat. Methods*, vol. 14, no. 1, pp. 71–73, Dec. 2016, doi: 10.1038/nmeth.4067.
- [385] S. Doerr, M. J. Harvey, F. Noé, and G. De Fabritiis, “HTMD: High-Throughput Molecular Dynamics for Molecular Discovery,” *J. Chem. Theory Comput.*, vol. 12, no. 4, pp. 1845–1852, Apr. 2016, doi: 10.1021/acs.jctc.6b00049.
- [386] J. E. Stone, K. L. Vandivort, and K. Schulten, “GPU-accelerated molecular visualization on petascale supercomputing platforms,” in *Proc. of UltraVis 2013: 8th Int. Workshop on Ultrascale Visualization - Held in Conjunction with SC 2013: The Int. Conference for High Performance Computing, Networking, Storage and Analysis*, 2013, doi: 10.1145/2535571.2535595.
- [387] H. Wickham, “Ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis,” in *Springer*, 2016.

## Annexe 3

### **Impact of membrane lipid polyunsaturation on dopamine D2 receptor ligand binding and signaling**

Marie-Lise Jobin<sup>1\*</sup>, Véronique De Smedt-Peyrusse<sup>1\*</sup>, Fabien Ducrocq<sup>1</sup>, Asma Oummadi<sup>1</sup>, Rim Baccouch<sup>2</sup>, Maria Hauge Pedersen<sup>3,4</sup>, Brian Medel-Lacruz<sup>5</sup>, Sébastien Mongrand<sup>6</sup>, Jana Selent<sup>5</sup>, Tarson Tolentino-Cortez<sup>7</sup>, Gabriel Barreda-Gómez<sup>7</sup>, Stéphane Grégoire<sup>8</sup>, Elodie Masson<sup>8</sup>, Thierry Durroux<sup>9</sup>, Jonathan A. Javitch<sup>3,4,10</sup>, Ramon Guixà-González<sup>11,12\*</sup>, Isabel D. Alves<sup>2\*</sup>, Pierre Trifilieff<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Université de Bordeaux, INRAE, Bordeaux INP, NutriNeuro, 33000, Bordeaux, France

<sup>2</sup> Institute of Chemistry & Biology of Membranes & Nanoobjects, CNRS UMR 5248, Université de Bordeaux, Bordeaux INP, 33600 Pessac, France

- <sup>3</sup> Department of Psychiatry, Columbia University Vagelos College of Physicians and Surgeons, New York, NY 10032
- <sup>4</sup> Division of Molecular Therapeutics, New York State Psychiatric Institute, New York, NY 10032
- <sup>5</sup> Research Programme on Biomedical Informatics (GRIB), Hospital del Mar Medical Research Institute (IMIM)—Department of Experimental and Health Sciences, Pompeu Fabra University (UPF), 08003 Barcelona, Spain
- <sup>6</sup> Laboratory of Membrane Biogenesis (LBM), Research Mix Unity (UMR) 5200, National Scientific Research Center (CNRS), University of Bordeaux, Bordeaux, France
- <sup>7</sup> Research Department, IMG Pharma Biotech S.L., BIC Bizkaia (612), 48160 Derio, Spain
- <sup>8</sup> Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, AgroSup Dijon, CNRS, INRAE, Université Bourgogne Franche-Comté, 21000 Dijon, France
- <sup>9</sup> Institut de Génomique Fonctionnelle, CNRS, INSERM, Université de Montpellier, Montpellier, France
- <sup>10</sup> Department of Molecular Pharmacology and Therapeutics, Columbia University Vagelos College of Physicians and Surgeons, New York, NY 10032
- <sup>11</sup> Laboratory of Biomolecular Research, Paul Scherrer Institute (PSI), 5232 Villigen PSI, Switzerland
- <sup>12</sup> Condensed Matter Theory Group, PSI, 5232 Villigen PSI, Switzerland

## **Abstract**

Increasing evidence support a relationship between lipid metabolism and mental health. In particular, the status of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) correlates with the symptomatology of various psychiatric disorders as well as the efficacy of pharmacological treatments, especially antipsychotics. Recent findings highlight a direct association between brain PUFA levels and dopamine transmission, a main neuromodulatory system implicated in the aetiology of psychiatric symptoms and targeted by classical pharmacological treatments. However, the molecular mechanism underlying the relationship between PUFA biostatus and dopamine transmission is still unknown. Here we demonstrate that membrane enrichment in n-3 PUFA, but not n-6 PUFA, potentiates ligand binding of the dopamine D2 receptor (D2R) for both agonists and antagonists. Moreover, molecular dynamics (MD) simulations show that the D2R preferentially interacts with n-3 PUFAs over n-6 PUFAs. Furthermore, even though manipulations of PUFA levels in heterologous

systems only mildly affect downstream signaling, *in vivo* n-3 PUFA deficiency results in decreased ligand-induced D2R activity. Overall, these results suggest that n-3 PUFAs act as allosteric modulators of the D2R and provide a putative mechanism for their potentiating effect on antipsychotic efficacy.



## Introduction

Biological membranes are not homogeneous bilayers but rather composed of different lipid species with various chemical and biophysical properties that actively modulate protein localization and function, signaling or vesicular trafficking [310]. However, several aspects of membrane complexity including the impact of lipid heterogeneity across tissues, cells, and subcellular compartments on cell signaling and physiology are only starting to emerge.

This is particularly true for neuronal function for which the impact of membrane lipid composition has been largely overlooked, despite that the brain has the second highest lipid content after adipose tissue [143]. Yet, convergent findings support some links between lipid biostatus and mental health. For instance, a decrease in the levels of n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs)-containing phospholipids has been consistently described in a subset of patients suffering from neurodevelopmental psychiatric diseases [135]. Likewise, recent transcriptomic profiling studies revealed a common pattern in fatty acid metabolic pathways in several psychiatric disorders [311], [312]. Moreover, n-3 PUFA deficiency in rodent models has been associated with putative pathophysiological mechanisms involving alteration in neurogenesis, neuronal migration, neuromodulation, and neuroinflammatory processes in various brain regions [143], [313], [314]. These findings remain largely correlative and the precise mechanisms by which PUFA biostatus directly or indirectly accounts for changes in neuronal function remain largely unknown. Nevertheless, several studies have demonstrated that membrane lipids regulate the function of key transmembrane proteins [315] including ion channels and GPCRs [279], [316].

The activity of the dopamine D2 receptor (D2R) is particularly relevant in this context. Various psychiatric disorders, including those where levels of brain n-3 PUFAs are low [317], display altered patterns of D2R-dependent signaling, and this GPCR is, therefore, a key target in several pharmacological treatments. Similarly, different studies in rodent models show that n-3 PUFA deficiency affects dopamine transmission and related behaviors [318], [319]. In line with this evidence, we recently reported a unique vulnerability of D2R-expressing neurons to PUFA biostatus that directly accounts for the motivational deficits induced by n-3 PUFA deficiency [181]. Early experimental studies have reported that n-3 PUFAs, namely docosahexaenoic acid (DHA, 22:6), enhance the function of the prototypical A GPCR rhodopsin [194], [320], [321]. Subsequent studies showed that DHA-containing phospholipids preferentially solvate rhodopsin [322], [323], which could impact receptor function.

In addition, recent *in silico* studies [202], [324] demonstrate that the D2R also displays a preference for DHA interaction that could modulate receptor partitioning into specific membrane signaling platforms, as shown by early experiments [325]. While these findings suggest that membrane PUFA composition could influence the activity of the D2R, there is still no direct evidence of such an effect.

In this work, using both cell membrane extracts and model membranes, we found that DHA, but not n-6 PUFA docosapentaenoic acid (DPA, 22:5), enhances D2R ligand binding affinity. Strikingly, while DPA and DHA only differ in one double bond, molecular dynamics (MD) simulations show that they have a completely different propensity for interaction with the D2R. Interestingly, membrane enrichment in either DHA or DPA have no effect on agonist-induced,  $G_{i/o}$  protein-dependent inhibition of cAMP production. However, both DHA and DPA similarly enhance the maximal efficacy of the D2R to recruit  $\beta$ -arrestin2 upon agonist stimulation. Finally, we provide *in vivo* evidence that DHA deficiency blunts the behavioral effects of D2R ligands. Altogether, these data highlight the impact of membrane PUFA composition on D2R activity and suggest that DHA acts as an allosteric modulator of the receptor.

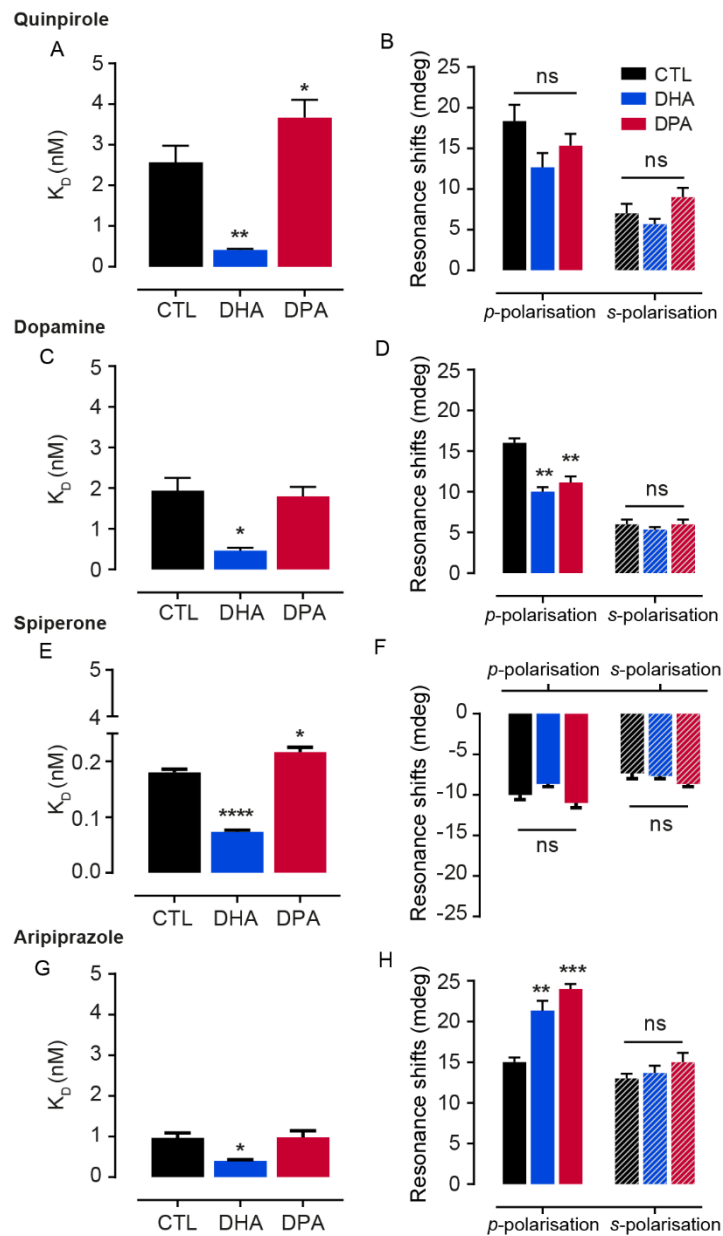
## Results

### 1. Membrane n-3 PUFAs, but not n-6 PUFAs, modulate the binding affinity of D2R ligands

To determine the impact of membrane lipid unsaturation on D2R ligand binding, HEK cells were incubated with PUFAs, which is known to result in their esterification in *sn*-2 position of phospholipids [326]. We used two different PUFAs, the n-3 PUFA DHA (C22:6) and the n-6 PUFA DPA (C22:5), which display the same carbon chain length, but differ in one double bond. A lipid analysis confirmed the enrichment of phospholipids in DHA or DPA and monitored its efficient incorporation in cell membranes, leading to comparable proportion of either PUFA after treatment (increase of 19% for DHA and 20% for DPA) (Fig. S1). We measured the binding affinity of D2R ligands on supported cell membranes expressing the D2R using plasmon waveguide resonance (PWR) spectroscopy [327]. The resonance position shifts were followed in *p*- (perpendicular to the sensor surface) and *s*-polarisation (parallel to the sensor surface) upon poly-L-Lysine (PLL) coating of the PWR sensor and subsequent cell membrane adhesion and detachment (Fig. S2A and B). The cell membrane fragment deposition led to positive shifts similar to those observed for synthetic lipid bilayer formation [328]. We measured the resonance shifts upon incremental addition of ligand when the time curve reached a plateau (Fig. S2C and D) and led to shifts in the minimum resonance. These cumulative shifts were plotted as a binding curve which allowed calculating a dissociation constant ( $K_D$ ) and measuring a plateau of the resonance shifts (Fig. S3). The  $K_D$  calculated for the agonist quinpirole and the antagonist spiperone were comparable to the ones reported in the literature, validating our system and confirming that the receptor maintains functionality in these conditions (Fig. S3C) [329], [330]. The results from these experiments show that membrane DHA enrichment enhances ligand binding affinities for agonists (quinpirole and dopamine), antagonist

(spiperone), and partial agonist (aripiprazole) (Fig. 1). However, DPA slightly decreased D2R binding affinity for quinpirole and spiperone (Fig. 1A and E) and had no effect for dopamine and aripiprazole (Fig. 1C and G). We further confirmed the potentiating effect of membrane DHA enrichment on D2R ligand binding affinity for the spiperone-derived fluorescent ligand NAPS-d2 through fluorescence anisotropy [331], [332] (Fig. S4) and in partially purified D2R reconstituted in model membranes (Fig. S5).

To study ligand-induced receptor conformational changes, we quantified the direction and magnitude of minimum resonance in *p*- and *s*-polarizations, which account for changes along the receptor long and short axis, respectively. Resonance shifts obtained upon ligand addition were positive in both polarisations for agonists (quinpirole, dopamine) and partial agonist (aripiprazole), and negative for the antagonist spiperone (Fig. 1F). These results show that different classes of ligands induce distinct conformational changes upon binding to the D2R, as previously reported for other GPCRs [333]–[337]. While the presence of membrane PUFAs did not significantly influence the changes in conformation induced by quinpirole and spiperone (Fig. 1B and F), they impacted the conformation of dopamine- and aripiprazole-bound D2Rs regarding the anisotropy of the conformational state that became less anisotropic for dopamine and more anisotropic for aripiprazole (as shown by the respective decrease and increase in *p*-polarization shifts; Figs. 1D and 1H).



**Figure 1. D2R binding affinity in PUFA-enriched cell membranes shown by PWR.** PUFA effect on binding affinity and receptor conformational changes, respectively, for quinpirole (A and B), dopamine (C and D), spiperone (E and F) and aripiprazole (G and H). Data are mean  $\pm$  SEM values from 3 independent experiments with \*\*\*\*  $p < 0.0001$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$  by two-tailed unpaired t-test.

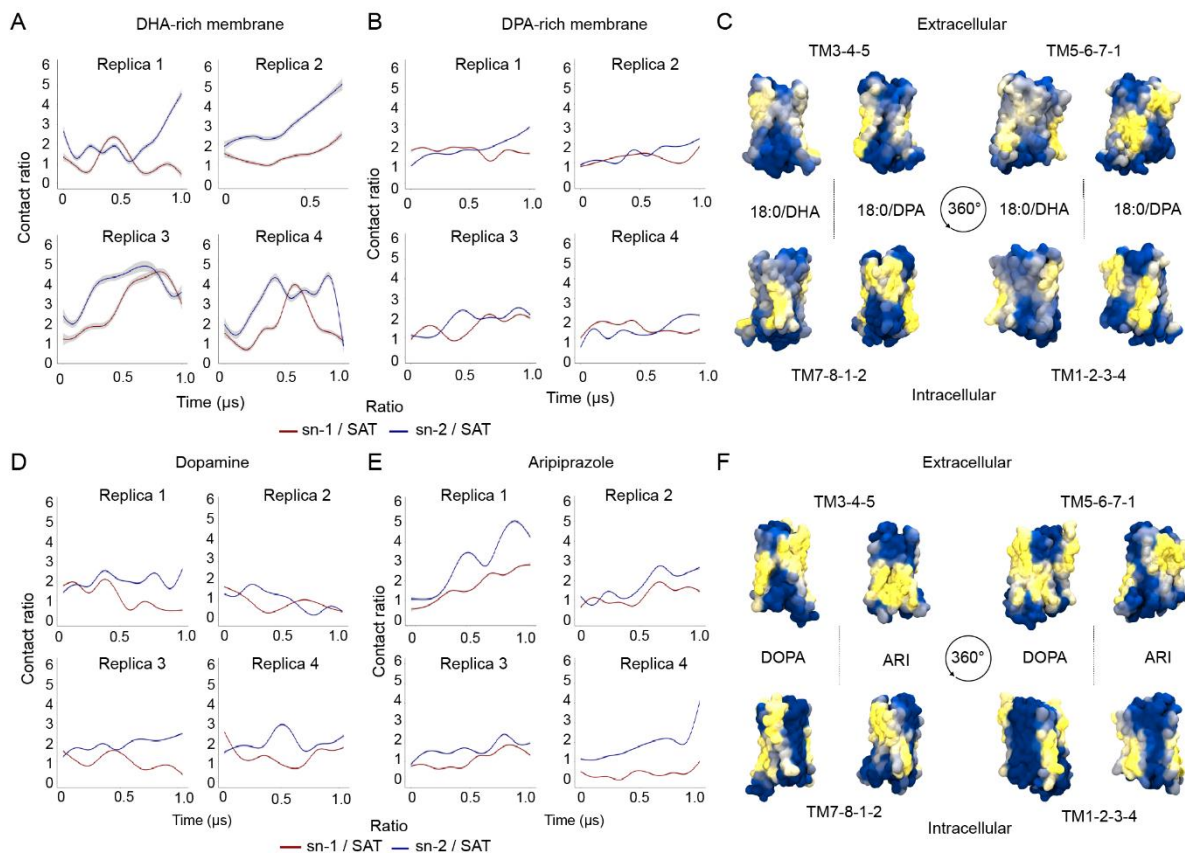
## 2. MD simulations reveal that n-3 and n-6 PUFAs differentially interact with the D2R

With the aim of gaining structural insights into the differential modulation exerted by DPA and DHA in PUFA-enriched cell membranes, we used MD simulations to study the interaction between the D2R and membranes enriched in either DHA or DPA. We first simulated four replicas of the D2R embedded in a multicomponent membrane (see Methods) enriched in either DHA-containing phospholipids (1-stearoyl-2-docosahexaenoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, SD(h)PC) or DPA-containing phospholipids (1-stearoyl-2-docosa(p)entaenoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, SD(p)PC). In line with previous reports, [202], [324], SD(h)PC tends to displace saturated phospholipids from the membrane “solvation” shell that surrounds the D2R, due to the much higher propensity of DHA tails for the interaction with the receptor (Fig. 2A). Strikingly, the loss of just one double bond (i.e. replacing DHA by DPA) is enough to abolish this propensity, as shown by the much lower interaction ratio of SD(p)PC molecules with the receptor during the simulation (Fig. 2B). Specifically, the propensity for the interaction with the D2R is three-fold higher for DHA tails (Table 1).

Ratio	0 - 250 ns	250 - 500 ns	500 – 750 ns	750 ns - 1 $\mu$ s
SD(h)PC <sub>sn-1</sub>	0.97	1.69	2.95	2.42
<b>SD(h)PC<sub>sn-2</sub> (DHA)</b>	2.01	3.05	4.61	4.08
SD(p)PC <sub>sn-1</sub>	1.49	1.48	1.48	1.63
<b>SD(p)PC<sub>sn-2</sub> (DPA)</b>	1.47	1.95	2.28	2.33

**Table 1. Evolution of lipid-protein contacts during MD simulations.** The table shows the average relative proportion of lipid-protein contacts at four stages of the simulation. Contact ratios represent the number of atomic contacts between each SD(h)PC or SD(p)PC chain (i.e. sn-1 or sn-2) and the D2R, with respect to the number of contacts between saturated phospholipids (i.e. DPPC, DSPC, and PSM) and the protein (see Methods for more details).

From these results, it is reasonable to speculate that the more flexible lipid corona built around the D2R in DHA-rich membranes could allow for greater dynamics within the receptor, which could potentially enhance protein conformational selection during the ligand binding process. This scenario would accord with our ligand binding experiments, where DHA-rich membranes consistently induced lower  $K_{Ds}$ , i.e. higher binding affinities, than DPA-rich membranes (Fig. 1). Moreover, our simulations show that despite DHA and DPA only differing in one double bond, they display a different pattern of interaction with the receptor (Fig. 2C). Some of these differences could also impact ligand binding affinity at the D2R. For example, SD(p)PC lipid molecules display a clear preference over SD(h)PC for interaction with the extracellular segments of transmembrane helix (TM) 1, TM2, and TM7, which are known to define entry crevices for water and phospholipid headgroups into the binding pocket [338] (Fig. 2C, bottom left).



**Figure 2. Lipid-protein contacts during MD simulations.** (A, B, D, E) Relative proportion of atomic lipid-protein contacts (y-axis) over time (x-axis) for the simulations of the apo state of the D2R embedded in DHA- (A) versus DPA-rich (B) membranes, and the simulations of dopamine- (D) versus aripiprazole-bound D2R (E) embedded in DHA-rich membranes. Specifically, figures depict the contact ratio of each SD(h)PC or SD(p)PC chain versus all saturated lipids (i.e. DPPC, DSPC, and PSM) in the system (i.e. sn-1 / SAT and sn-2 / SAT) is depicted (see Methods for a detail description of these ratios). (C, F) Average lipid occupancy map for the simulations of the apo state of the D2R embedded in DPA- versus DHA-containing phospholipids (C), and the simulations of dopamine- (DOPA) versus aripiprazole (ARI)-bound D2R embedded in DHA-rich membranes (F). The percentage of frames where SD(h)PC or SD(p)PC lipid molecules contacted the D2R is depicted in a blue (low) to yellow (high) color gradient mapped to the surface of the receptor.

We also simulated the D2R bound to dopamine or aripiprazole molecules, and embedded into a multicomponent membrane enriched in SD(h)PC (see Methods). Interestingly, while the aripiprazole-bound D2R simulations also showed an increased level of DHA around the receptor (Fig. 2E), the DHA solvation effect was absent or even diminished in dopamine-bound D2R simulations (Fig. 2D). Specifically, the propensity for the interaction between DHA tails and the protein was approximately two-fold higher in the aripiprazole-bound D2R simulations (Table 2).

	Ratio	0 - 250 ns	250 - 500 ns	500 - 750 ns	750 ns - 1 $\mu$ s
DOPA	SD(h)PC <sub>sn-1</sub>	1.16	0.98	1.00	0.81
	<b>SD(h)PC<sub>sn-2</sub> (DHA)</b>	<b>1.78</b>	<b>1.63</b>	<b>1.62</b>	<b>1.73</b>
ARI	SD(p)PC <sub>sn-1</sub>	0.97	1.46	1.65	1.67
	<b>SD(p)PC<sub>sn-2</sub> (DHA)</b>	<b>1.75</b>	<b>2.87</b>	<b>3.12</b>	<b>3.07</b>

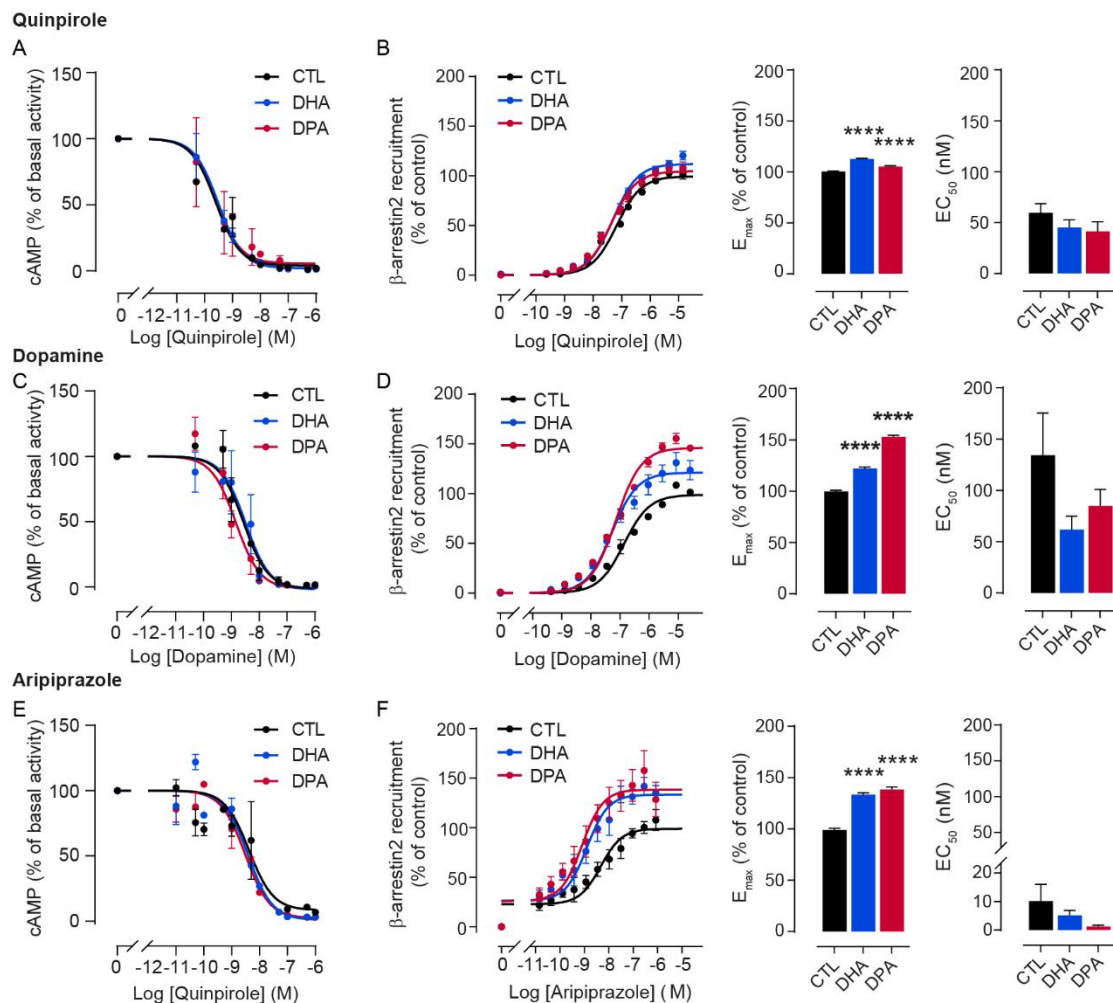
**Table 2. Evolution of lipid-protein contacts during ligand-bound D2R simulations.** The table shows the average relative proportion of lipid-protein contacts at four stages of the simulation. Contact ratios represent the number of atomic contacts between each SD(h)PC chain (i.e. sn-1 or sn-2) and the dopamine (DOPA)- or aripiprazole (ARI)-bound D2R, with respect to all saturated lipids (i.e. DPPC, DSPC and PSM) (see Methods for exact membrane composition and details on the calculation of these ratios).

Furthermore, as shown in Fig. 2F, the presence of the ligand in the binding pocket induced a different pattern of interactions between SD(h)PC and the D2R, including a different interaction signature at the extracellular segment of the receptor where ligand binds (Fig. 2F, upper left and right panels)

### 3. n-3 and n-6 PUFAs do not influence the D<sub>2</sub>R G<sub>αi/o</sub>-mediated signaling pathway but enhance maximal recruitment of $\beta$ -arrestin2

In order to evaluate the downstream effect of PUFAs, we performed dose-response experiments where we probed the signaling efficacy of the D2R in the presence and absence of PUFAs. First, we treated cells with 10  $\mu$ M PUFAs (Fig. S6) and measured the inhibition of forskolin-induced cAMP production upon quinpirole, dopamine and aripiprazole binding as a proxy for G<sub>i/o</sub> protein signaling. As shown in Fig. S7A and Table S1, both control and PUFA-rich cells display a similar agonist-dependent decrease in cAMP production, which suggests that PUFAs do not modulate the G<sub>i/o</sub> protein signaling pathway. Next, we used the same experimental conditions to study the G<sub>i/o</sub> protein-independent signaling pathway by measuring  $\beta$ -arrestin2 recruitment. In these experiments, while PUFAs did not affect the potency of  $\beta$ -arrestin2 recruitment (i.e. EC<sub>50</sub>), they either substantially (aripiprazole) or slightly (quinpirole and dopamine) affected its efficacy (i.e. E<sub>max</sub>) (Fig. S7C, S7D, S7E). To confirm this trend, we treated cells with a higher amount of PUFAs (i.e. 30  $\mu$ M) (Fig. S6) and we did not observe any impact of PUFAs enrichment on basal cAMP production (Fig. S7B). We then performed dose-response experiments upon ligand stimulation. Higher PUFA manipulations did not influence cAMP production or the EC<sub>50</sub> for  $\beta$ -arrestin2 recruitment (Figs. 3A, 3C, and 3E), but significantly increased the E<sub>max</sub> of  $\beta$ -arrestin2 recruitment for all ligands in both DHA- and DPA-rich cells (Figs. 3B, 3D, and 3F).

Altogether, our data reveal that both DPA and DHA exert a similar effect on downstream signaling, namely they do not affect G<sub>i/o</sub> protein activation but they are able to enhance  $\beta$ -arrestin2 recruitment efficacy.



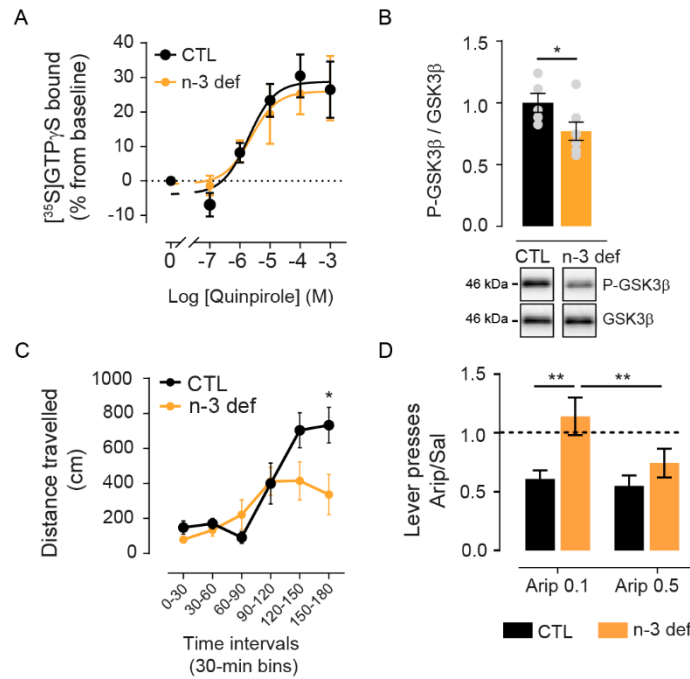
**Figure 3. Forskolin-stimulated cAMP production and  $\beta$ -arrestin2 recruitment upon ligand stimulation and with different membrane PUFAs enrichment. (A, C, E)** Dose-response experiments of cAMP production with the D2R ligands quinpirole (A), dopamine (C) and aripiprazole (E), on forskolin-stimulated cells incubated in the presence of 0.03% ethanol as control, 30  $\mu$ M DHA and 30  $\mu$ M DPA n-6. Values are expressed as the percentage of cAMP in the absence of agonist in n=3 independent experiments. **(B, D, F)** Quinpirole (B), Dopamine (D) and aripiprazole (F) activity on D2R mediated  $\beta$ -arrestin2 assay in CHO-K1 cells expressing the DRD2L (left panel), and associated  $E_{max}$  (middle) and  $EC_{50}$  (right panel) under 30  $\mu$ M PUFAs enrichment. Data are mean  $\pm$  SEM values from three independent experiments with \*\*\*\* p<0.0001, \*\*\* p<0.001, \* p<0.05 by two-tailed unpaired t-test.

#### 4. n-3 PUFA deficiency alters D2R ligand-induced alterations in locomotion and motivation

To translate our *in vitro* findings to *in vivo* settings, we used a validated model of n-3 PUFA deficiency in mice. Using such an approach, we previously demonstrated that i) n-3 PUFA deficiency leads to decreased and increased levels of DHA and DPA in membrane phospholipids, respectively and ii) n-3 PUFA deficient animals display motivational deficits that are due to impaired functionality of D2R-expressing neurons [181]. Herein, using striatal extracts – in which D2R is highly expressed – we found that i) Gi protein recruitment at the receptor under quinpirole application is unaffected (Fig.



4A) and ii) phosphorylation of the glycogen synthase kinase  $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), a key signaling enzyme downstream of  $\beta$ -arrestin2 [339], is decreased at basal states in n-3 PUFA deficient animals (Fig. 4B and S8). These latter findings are consistent with our in vitro data showing that membrane PUFA enrichment potentiates the recruitment of  $\beta$ -arrestin2 at the D2R. Next, we used n-3 PUFA deficient animals to study behavioral responses to D2R ligands. Our results show that n-3 PUFA deficient animals display decreased locomotor response under quinpirole administration (Fig. 4C). Finally, we found that peripheral administration of aripiprazole blunted performance in an operant conditioning-based motivational task in control animals, while n-3 PUFA deficient mice were partially insensitive to aripiprazole (Fig. 4D).



**Figure 4.** Effect of n-3 PUFA deficiency on D2R signalling and associated behaviors. **(A)** [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S assay on nucleus *accumbens* extracts upon increasing concentrations of quinpirole from control (CTL) or n-3 PUFA deficient animals (n-3 def). CTL : logEC50 = -5.22  $\pm$  0.28 %, Emax = 30.06  $\pm$  3.47 % ; n-3 def : logEC50 = -5.06  $\pm$  0.29; Emax = 28.15  $\pm$  3.51 % **(B)** Western blots measuring the phosphorylation of GSK3 $\beta$  (P-GSK3 $\beta$ ) relative to GSK3- $\beta$ . Bars represent the mean of 5 and 7 subjects for CTL and n-3 def respectively and error bars the SEM. \*p<0.05 by Mann Whitney test. **(C)** Locomotor response to 1 mg/kg quinpirole administration is represented as the distance travelled in cm divided in 30 min intervals in control (CTL, n=10) or n-3 def (n=10) animals. **(D)** Ratio of lever presses performed by animals under aripiprazole (0.1 or 0.5 mg/kg) over saline administration in a progressive ratio task in CTL (n=11) or n-3 def (n=10) animals. Data are mean  $\pm$  SEM values. \*\* p< 0.01, \* p<0.05 by two-way (RM) ANOVA test with a post-hoc Bonferroni test.

## Discussion

While most early reports on the preferential interaction between PUFAs and GPCRs involved n-3 PUFAs (i.e. DHA) and rhodopsin [194], [320]–[323], recent studies have confirmed that DHA can also modulate the activity and function of other GPCRs including the cannabinoid CB1 receptor [340], the D2R [202], [324] and the adenosine A2A receptor [202], [324], [341]. Here, we focus on D2R interplay with PUFAs and show that (a) DHA- but not DPA-rich phospholipids potentiate the binding affinity of both agonists and antagonists for the D2R; (b) both DPA and DHA enhance  $\beta$ -arrestin2 recruitment efficacy without affecting  $G_{i/o}$  protein activity; and (c) n-3 deficient animal models display altered behavioral responses upon treatment with D2R ligands.

PUFA-containing phospholipids can have a strong influence on the physical and mechanical properties of biological membranes including thickness, bending or rigidity [342] and, hence, subtle changes in these properties can indirectly modulate the function of transmembrane proteins [342]–[344]. Therefore, PUFA-rich membranes could potentially favor specific conformations of the D2R to modulate its ligand binding affinity. In particular, n-3 PUFAs provide transmembrane proteins with a uniquely flexible environment that enables such modulation [344]–[346]. Interestingly, despite differing in just one double bond, n-6 PUFAs do not seem to increase membrane elasticity to the same extent [347]. Furthermore, by increasing membrane fluidity and/or packing defects [315], PUFAs could change D2R accessibility for ligands thus modulating their affinity. In fact, most antipsychotics (i.e. D2R ligands) display high membrane partitioning properties [348], [349]. Of note, Lolicato et al. have recently shown that the entry pathway of dopamine into the D2R likely requires this neurotransmitter to first partition into the membrane [350].

On the other hand, different studies demonstrate that PUFAs tend to preferentially interact with GPCRs [199], [322], [323], [351]; thus, changes in ligand binding affinity could also be the result of direct interactions between PUFAs and the D2R. In the current study, MD simulations confirm that DHA tails preferentially interact with the D2R when compared to saturated ones, as previously reported [202], [324]. Intriguingly, our simulations show that this preferential interaction is lower or completely absent in the presence of aripiprazole or dopamine in the D2R binding pocket, respectively. This result suggests a more complex scenario where the conformational state induced by the ligand could also modulate the interaction propensity between the membrane and the receptor, as recently suggested for cholesterol and the oxytocin receptor [352]. Interestingly, our simulations also show that n-6 PUFAs (i.e. DPA) have a much lower tendency to interact with the receptor, despite DHA and DPA only differing in one double bond. While further work is needed to unravel the precise molecular mechanisms behind the effect of DHA on ligand binding affinity, our work suggests that DHA can act as an allosteric modulator of the D2R, both by influencing the bulk membrane properties and by establishing direct interactions with the receptor.

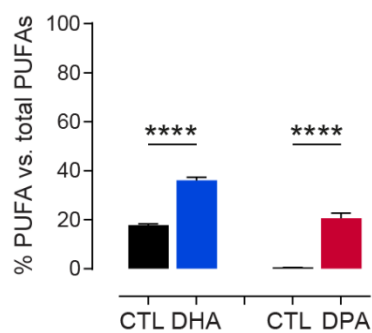
However, our dose-response experiments in cells show that the enhancing effect of PUFAs on D2R ligand binding affinity does not correlate with an increased signal of relevant downstream protein effectors. On the one hand, enriching membranes with PUFAs did not alter cAMP production (i.e.  $G_{i/o}$  protein signaling). This result is in line with different early [353], [354] and more recent reports [355]. On the other hand, PUFA-rich membranes do enhance the maximal efficacy of  $\beta$ -arrestin2 recruitment, which seems to support a mechanism in which these lipids modulate specific protein effectors. This is compatible with the fact that PUFAs can alter the lateral organization of membranes [326], [356]–[358] or change the domain partitioning properties of GPCRs including the D2R [202], [324]. Changes in the properties of membrane microdomains could also affect the affinity of palmitoyl moieties for these domains, which could in turn affect receptor partitioning. As previously suggested [359]–[364], altering receptor partitioning could indirectly modulate receptor phosphorylation and, hence, influence  $\beta$ -arrestin coupling. It is also worth speculating that PUFA-induced membrane packing defects [315] could alter  $\beta$ -arrestin recruitment by modulating the membrane anchoring of C-edge loops [302]. Therefore, one plausible albeit speculative hypothesis is that PUFAs could selectively modulate D2R signaling properties by altering membrane lateral organization and/or influencing  $\beta$ -arrestin anchoring to the membrane. It is worth noting that (a) the potency ( $EC_{50}$ ) of  $\beta$ -arrestin recruitment does not change, and (b) both DPA and DHA exert comparable effects on protein signaling whereas only DHA is capable of enhancing ligand binding. Altogether, these data suggest that the effects of PUFAs on D2R signaling are at least partially uncoupled from the changes in receptor binding properties. However, it should be noted that the relatively small changes in ligand binding affinity induced by PUFAs on ligand binding affinity might be difficult to detect using signalling assays in heterologous system. Nonetheless, such subtle modifications might have important physiological impact in the context of chronic alterations in PUFA levels, in particular when occurring during brain development.

This hypothesis is supported by our *in vivo* findings in a model of chronic deficiency in n-3 PUFAs [181]. In fact, in accordance with our *in vitro* results, while n-3 PUFA deficiency does not seem to affect D2R binding of the  $G_{i/o}$  protein in the striatum, the decrease in phospho-GSK3 expression is consistent with an impairment of  $\beta$ -arrestin2-dependent signaling, since GSK3 phosphorylation depends on  $\beta$ -arrestin2 recruitment at the D2R [339]. Notably, D2R-mediated locomotor response has recently been shown to also depend on  $\beta$ -arrestin2-, but not  $G_{i/o}$  protein-, mediated signalling [365]. In line with this, we find that D2R agonist (quinpirole)-induced increase in locomotion is blunted in n-3 PUFA deficient animals, consistent with an impairment in  $\beta$ -arrestin2 recruitment and downstream signalling. Yet, however, we find that aripiprazole-induced decrease in motivation – which might result from an antagonistic activity of aripiprazole at the D2R is also blunted in n-3 PUFA deficient animals. D2R-mediated modulation of motivation has been shown to be independent of  $\beta$ -arrestin2-dependent signalling [365], but rather to rely on  $G_{i/o}$  protein-mediated transmission at

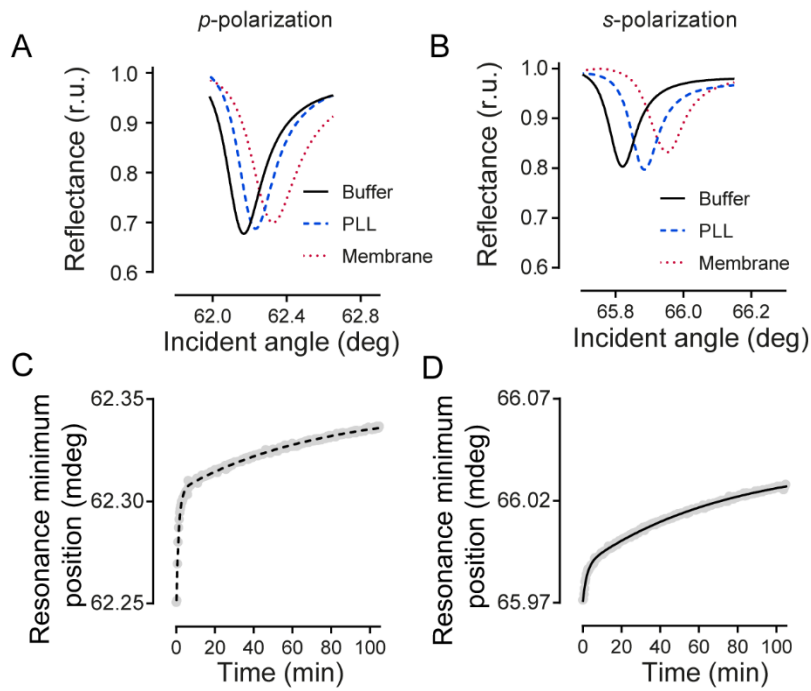
synaptic terminals in the ventral pallidum [366]. This raises the intriguing hypothesis that membrane PUFAs could differentially modulate D2R signalling activity depending on neuronal subcompartments. Even though further work will be needed to disentangle the precise mechanisms by which PUFAs modulate D2R activity *in vivo*, these latter data are in line with the recent demonstration that motivational deficits in n-3 PUFA deficient animals directly relates to a dysfunction of D2R-expressing neurons [181].

Unveiling the precise mechanisms by which brain PUFA biostatus impacts D2R-dependent signaling and downstream-related behaviors will require further work. Nonetheless, taken together, our results show that n-3 PUFAs could act as allosteric modulators of the D2R and potentiate its signalling activity, in particular the  $\beta$ -arrestin2 component. This raises the intriguing hypothesis that n-3 PUFA supplementation could allow potentiating the efficacy of D2R ligands, several of them being antipsychotics. In accordance with this idea, several clinical trials have shown that n-3 PUFA supplementation accelerates treatment response, improves the tolerability of antipsychotics in first-episode psychoses [367], [368], and reduces prescription rate of antipsychotics [369]. Our data suggest that direct action of PUFA membrane composition on D2R activity could mediate such alleviating effects.

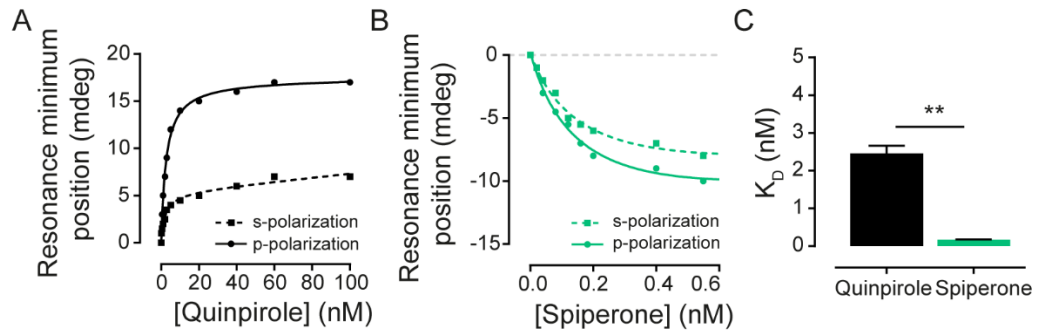
## Supplementary figures



**Figure S1. PUFAs enrichment in HEK cells.** HEK cells were incubated with DHA or DPA at 10  $\mu$ M concentration. Each PUFA enrichment is compared to control cells incubated with vehicle only (0.03 % ethanol). Bars represent the mean average of three independent experiments and error bars represent the standard error of the mean (SEM). \*\*\*\*  $p < 0.0001$  by two-tailed unpaired t-test.

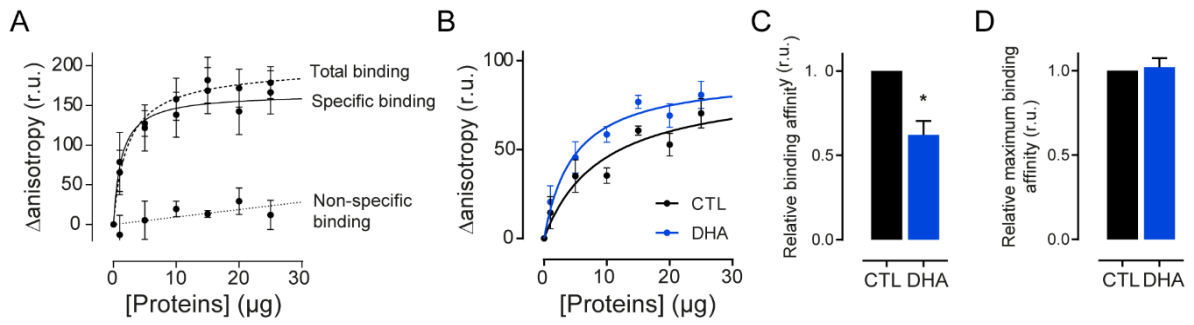


**Figure S2. Capture of cell membrane fragments on the PWR sensor and reconstitution of detergent-solubilised D2R in a lipid model membrane.** Capture of cell membrane fragments containing the D2R following PLL treatment of the PWR sensor followed by PWR using  $p$ - and  $s$ -polarization. (**A and B**) Representative PWR spectra following sensor coating with polylysine (PLL; blue) and cell membrane fragment capture (red) obtained with  $p$ - (A) and  $s$ - (B) polarized light, respectively. (**C and D**) Kinetics of D2R reconstitution in a POPC lipid membrane observed for  $p$ - (C) and  $s$ -polarizations (D). Kinetics were fitted to a two-phase exponential growth.

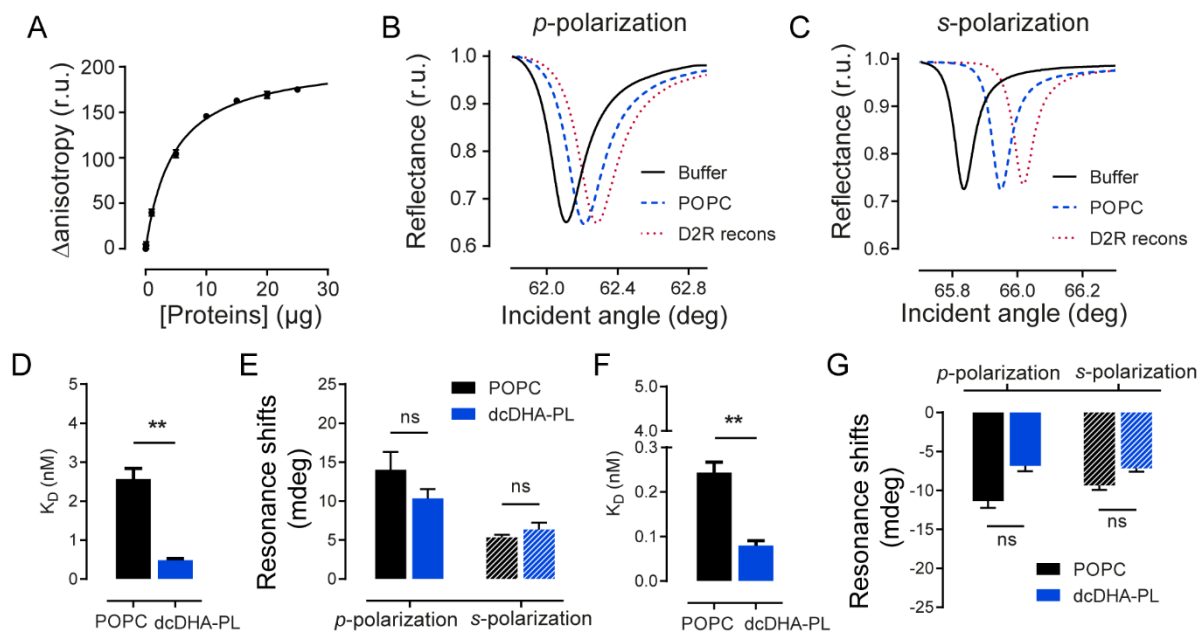


**Figure S3. Agonist and antagonist binding with D2R present in cell membranes monitored by PWR.** Quinpirole (**A**) and spiperone (**B**) were incrementally added to the proteolipid membrane and the shifts in the resonance minimum position followed. The data were fitted with a hyperbolic binding equation that describes total binding to a single site in the receptor (more details in Materials and Methods). (**C**) Affinity binding of quinpirole and spiperone calculated from (**A**) and (**B**) respectively. \*\*  $p < 0.01$  by two-tailed unpaired t-test.

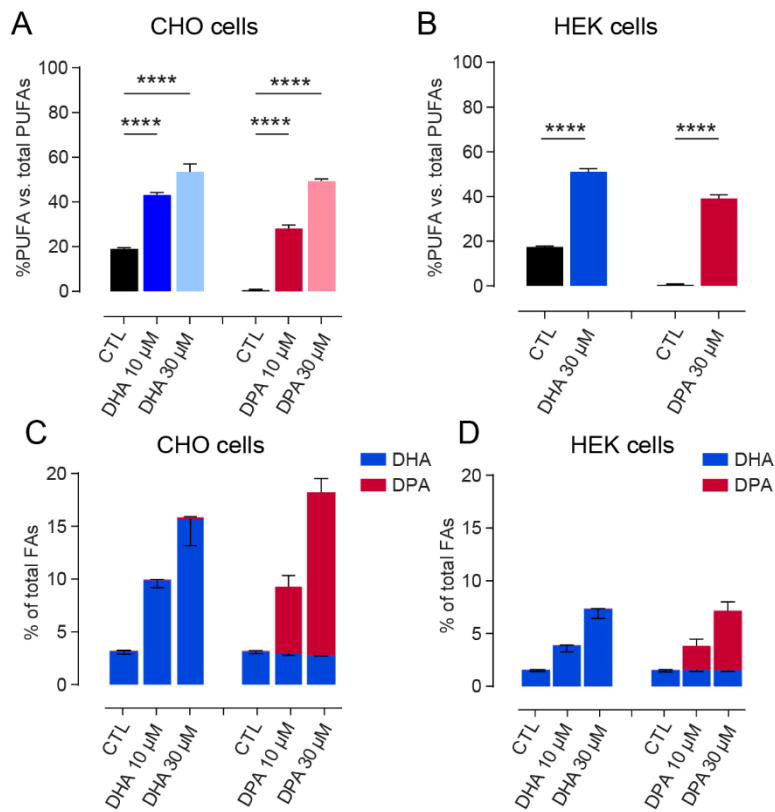




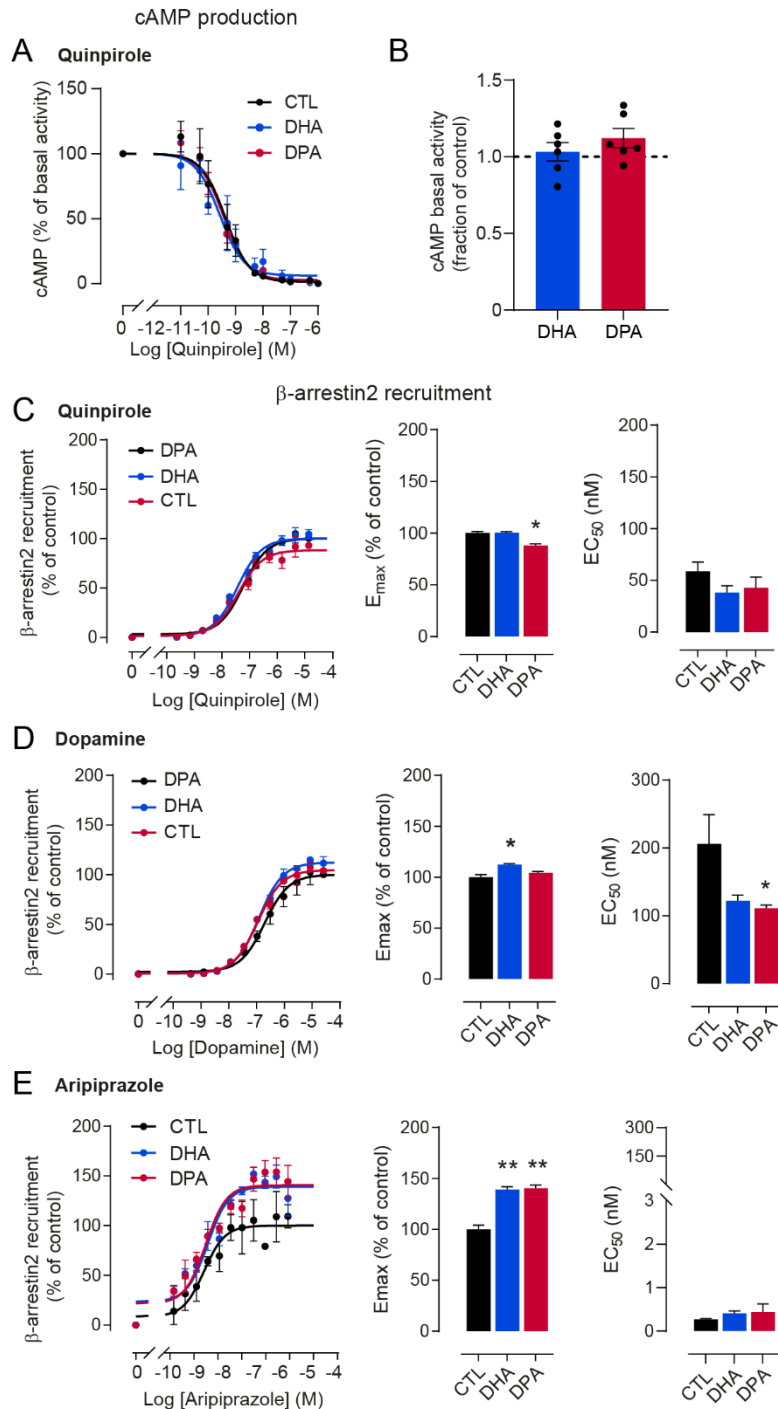
**Figure S4. Impact of membrane DHA on D2R ligand binding measured by fluorescence anisotropy. (A)** Fluorescence anisotropy measurement of NAPS-d2 binding on D2R-expressing membranes (total binding) or non-expressing membranes (non-specific binding). **(B)** Antagonist (NAPS-d2) binding to control and DHA-enriched membranes. **(C)** Fold change of ligand affinity to D2R in DHA-enriched membranes compared to control membranes. **(D)** Maximum relative binding affinity to D2R in DHA-enriched membranes. Data are mean  $\pm$  SEM from three independent experiments with \*  $p < 0.05$  by two-tailed unpaired t-test.



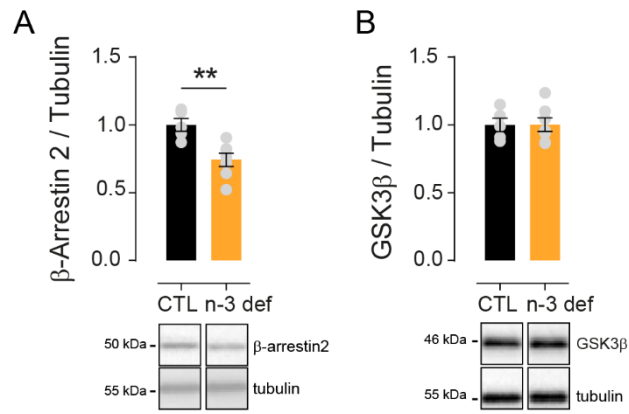
**Figure S5. Impact of DHA on ligand binding to D2R partially purified and reconstituted in model membranes shown by PWR.** (A) Fluorescence anisotropy measurement of NAPS-d2 binding to partially purified D2R (total binding). (B and C) Representative PWR spectra following supported POPC lipid membrane formation (blue) and D2R membrane reconstitution (red) for *p*- (B) and *s*-polarized (C) light, respectively. (D and E) Effect of DHA on quinpirole affinity to D2R (D) and quinpirole-induced receptor conformational changes (E) in reconstituted lipid model systems. (F and G) Effect of DHA on spiperone affinity to D2R (F) and spiperone-induced receptor conformational changes (G) in reconstituted lipid model systems. Data are mean  $\pm$  SEM values from at least three independent experiments with \*\*  $p < 0.01$  by two-tailed unpaired t-test.



**Figure S6. PUFAs enrichment in CHO and HEK cells.** (A) DHA and DPA incorporation in CHO cells through incubations at 10 $\mu$ M or 30 $\mu$ M. (B) DHA incorporation in HEK cells through incubations at 30 $\mu$ M. (C) Cumulative PUFA incorporation in CHO cells through incubations at 10 $\mu$ M or 30 $\mu$ M. (D) Cumulative PUFA incorporation in HEK cells through incubations at 10 $\mu$ M or 30 $\mu$ M. Bars represent the mean average of three independent experiments and error bars represent the standard error of the mean (SEM). \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$  by two-tailed unpaired t-test.



**Figure S7.  $\beta$ -arrestin2 recruitment of D2R upon stimulation by different ligands in cells incubated in the presence of vehicle, 10  $\mu$ M DHA or 10  $\mu$ M DPA. (A) Dose-response experiments of cAMP production with the D2R ligand quinpirole on forskolin-stimulated HEK cells incubated in the presence of 0.03% ethanol as control, 10  $\mu$ M DHA and 10  $\mu$ M DPA n-6. (B) Effect of 30  $\mu$ M PUFA enrichment on basal forskolin-induced cAMP production. (C) Quinpirole activity on  $\beta$ -arrestin2 recruitment at the D2R in CHO-K1 cells expressing the DRD2L (left), and associated  $E_{max}$  (middle) and  $EC_{50}$  (right). (D) Dopamine activity on  $\beta$ -arrestin2 recruitment at the D2R in CHO-K1 cells expressing the DRD2L (left), and associated  $E_{max}$  (middle) and  $EC_{50}$  (right). (E) Aripiprazole activity on D2R mediated  $\beta$ -arrestin2 assay in CHO-K1 cells expressing the DRD2L (left), and associated  $E_{max}$  (middle) and  $EC_{50}$  (right). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  by two-tailed unpaired t-test.**



**Figure S8. Expression of βarrestin-2 and GSK3β in n-3 deficient mice (n-3 def). (A) and (B)** Expression of βarrestin2 (A) and GSK3β (B) by western blot normalized to the intensity of tubulin expression. Bars represent the mean of five and seven subjects for CTL and n-3 def respectively and error bars the SEM. \*\*p<0.01 by Mann Whitney test.

	<b>CTL</b>	<b>DHA 10<math>\mu</math>M</b>	<b>DPA 10<math>\mu</math>M</b>	<b>CTL</b>	<b>DHA 30<math>\mu</math>M</b>	<b>DPA 30<math>\mu</math>M</b>
<b>Quinpirole</b>	9.50 $\pm$ 0.12	9.39 $\pm$ 0.25	9.48 $\pm$ 0.20	9.40 $\pm$ 0.18	9.51 $\pm$ 0.08	9.62 $\pm$ 0.20
<b>Dopamine</b>	-	-	-	8.70 $\pm$ 0.12	8.54 $\pm$ 0.20	8.85 $\pm$ 0.21
<b>Aripiprazole</b>	-	-	-	8.08 $\pm$ 0.25	8.36 $\pm$ 0.16	8.46 $\pm$ 0.10

**Table S1.** pIC<sub>50</sub> values (as mean  $\pm$  SEM) from dose-response experiments of cAMP production on forskolin-stimulated cells incubated in the presence of 0.03% ethanol as control (CTL), 10  $\mu$ M DHA and 10  $\mu$ M DPA or 30  $\mu$ M DHA and 30  $\mu$ M DPA upon quinpirole, dopamine and aripiprazole stimulation of the D2R.

**Percentage (%)**

<b>Model membrane</b>	CHL1	DPPC (diC16:0)	DSPC (diC18:0)	DOPC (diC18:1)	SD(h)PC (C18:0 / C22:6)	SD(p)PC (C18:0 / C22:5)	PSM (C18:1 / C16:0)
<b>DHA-rich</b>	33	14	5	11	13	0	24
<b>DPA-rich</b>	33	14	5	11	0	13	24

**Table S2. Lipid composition of the model membranes used in MD simulations.**

CHL1: cholesterol, DPPC: 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DSPC: 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DOPC: 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, SD(h)PC: 1-stearoyl-2-docosahexaenoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, SD(p)PC: 1-stearoyl-2-docosa(p)entaenoyl -sn-glycero-3-phosphocholine, PSM: sphingomyelin.

## **Material and Methods**

### **Chemicals and antibodies**

Reagents, unless otherwise specified, were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) PUFAs (Cis-4,7,10,13,16,19-DHA (DocosaHexaenoic Acid, ref D2534), DPA n-6 (DocosaPentanoic Acid, ref 18566) stock solutions (30mM) were prepared in absolute ethanol under N<sub>2</sub> (De Smedt-Peyrusse et al., 2008). For anisotropy assays, LigandTag Lite D2 (L0002RED) receptor red antagonist was purchased from Cisbio Bioassays. Quinpirole (ref 1061) and Forskolin (ref 1099) was from Tocris.

### **Cell culture and treatment**

HEK 293 stably expressing the human D2R (Flp-in T-rex 293 SF-D2sWT/FRTTO 293) were used. Cells were maintained at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> in the following culture medium: DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) Glutamax (InvitroGen) containing 10% of heat inactivated fetal bovine serum, 100UI/ml penicillin and 0.1mg/ml streptomycin and supplemented with 100µg/ml Hygromycin (Invitrogen), 15µg/ml Blastidin (Cayla Invivogen) and 1µg/ml Tetracycline (Sigma Aldrich). Upon reaching 80-90% confluence, in the same culture medium, cells were treated with 10µM and 30 µM DHA or DPA or 0.03% and 0.01% ethanol (vehicle) respectively as control for 24h. After treatment, cells were dissociated by using an Enzyme-Free Cell Dissociation Solution (S-014-B, Merck Millipore) and washed twice in wash buffer (50mM Tris-HCl, 50mM NaCl, 2mM EDTA, pH 7.5 at 20°C) by centrifugation at 500 × g for 8 min at 20°C. Cell pellets were used either for Western blot analyses or for membrane preparation.

### **Membrane preparation**

The cell pellets of HEK cells were resuspended in 10 ml of lysis buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5 at 4°C) supplemented with anti-protease inhibitor cocktail (PIC) (P8340, Sigma Aldrich) and incubated for 30 min in ice. The cell lysate was homogenized using a 10 ml glass-Teflon homogenizer with 30 gentle strokes. The resulting suspension was centrifuged at 183 × g for 10 min at 4°C. The supernatant was collected and the residual pellet was washed twice by centrifugation in successively in 5 and 2.5ml of lysis buffer. The resulting supernatants were pooled and centrifuged at 48000 × g for 30 min at 4°C. The pellet containing the membrane proteins was resuspended in binding buffer (50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.5 at 4°C) supplemented with PIC. Protein concentration was determined by using Bicinchoninic Acid (BCA) protein assay (Uptima, Montluçon, France) and membranes were diluted to 1µg/µl in the binding buffer.

## **Plasmon waveguide resonance (PWR)**

PWR experiments were performed with a homemade instrument equipped with a He-Ne laser at 632 nm whose light is linearly polarized at 45°, allowing acquisition of both *p*- (light that is parallel to the incident light) and *s*-polarization (light that is perpendicular to the incident light) data within a single angular scan. The technique has been described previously [333], [370]. Experiments were carried out at controlled room temperature, e.g. 23°C. The sensor consists in a 90° angle prism whose hypotenuse is coated with a silver layer (50 nm) and overcoated with silica (460 nm) and is in contact with the cell sample Teflon block, with an aperture of approximately 3 mm diameter through which the lipid bilayer is formed. This is placed on a rotating table mounted on a corresponding motion controller (Newport, Motion controller XPS; ≤ 1 mdeg resolution).

## **Formation of a planar lipid bilayer on the PWR sensor**

The method used to prepare the lipid bilayer is based on the procedure by Mueller and Rudin [371] to make black lipid membranes. The planar lipid bilayer is formed across the small aperture (~ 3 mm) in the Teflon PWR cell by fusing freshly sonicated small unilamellar vesicles (SUV, 3mg/ml) with the silica surface. SUVs were prepared by initially dissolving the appropriate amount of phospholipids in chloroform, to obtain the desired final concentration. A lipid film was then formed by removing the solvent using a stream of N<sub>2</sub> (g) followed by 3h vacuum. The lipid film was dispersed in PBS and thoroughly vortexed to form multi-lamellar vesicles (MLVs). To form SUVs, the MLVs dispersion was sonicated 5 times during 10 minutes at 40Hz frequency just before use. To ensure that a proper solid-supported lipid bilayer is formed, the changes in the resonance minimum position (resulting from changes in mass density, anisotropy and thickness following film deposition) for both polarizations are measured and compared to values previously established to correspond to a lipid bilayer [328].

## **Immobilisation of cell fragments on the PWR sensor**

The protocol for adhesion of cell fragments on silica (glass slides or PWR sensor) was adapted from reported work from Perez and collaborators [372]. Briefly, the silica surface was washed with ethanol, cleaned and activated by Plasma cleaner for 2 min (Diener, Bielefeld, Germany). The silica surfaces were then incubated with a solution of poly-L-lysine (PLL, 0.1 mg/mL) for 40 minutes following wash with PBS buffer. Cells grown to less than 50% confluence were washed with PBS and covered with water to induce osmotic swelling of the cells. Immediately, the glass coverslip of the sensor was placed directly on top of cells. Pressure was applied for about 2 min on the glass slide or prism to induce cell rupture and caption of cell fragments. Then they were removed ripping off cell fragments containing specially the upper membrane. The glass slide or sensor was washed



with PBS to remove cell debris and kept with buffer to prevent drying and loss of membrane protein activity. PWR measurements were performed right away. The PWR cell sample (volume capacity of 250  $\mu\text{L}$ ) was placed in contact with the prism and filled with PBS.

### **Reconstitution of the dopamine D2 receptor in the lipid bilayer**

After lipid bilayer formation, detergent-solubilized D2 receptor was reconstituted in the lipid bilayer by the detergent-dilution method. Briefly, the receptor was purified in a mixture of dodecylmaltoside and cholesteryl hemisuccinate (DDM/CHS) at concentrations that are about 10 fold over the critical micelle concentration (cmc) of DDM. Part of the detergent was then removed from the sample by use of centricons (Merck Millipore) with a cutoff of 50 KDa. This consisted in concentrating and reducing the initial volume of the solubilized protein by a factor of 5. The insertion of a small volume (about 20  $\mu\text{L}$ ) of DDM/CHS/OG solubilized protein into the PWR chamber, leads to drastic and quick drop in the detergent concentration. If the detergent concentration drops below the cmc during this step, this results in immediate positive PWR shifts for both  $p$ - and  $s$ -polarisations with small changes in the TIR angle. In order to compare data among different experiments, data were normalized relative to the amount of reconstituted protein in the membrane.

### **Ligand-induced receptor response**

Both systems (cell fragments and reconstituted protein in lipid model systems) were tested for their capacity to respond to ligand to check if the dopamine D2 receptor is active after cell fragment immobilisation or reconstitution process and if it was properly reconstituted in the lipid membrane. Briefly, the method consisted in incrementally adding a specific dopamine D2 ligand to the cell and monitor the PWR spectral changes. The first concentration point was chosen to be approximately 1 order of magnitude lower than the published dissociation constant ( $K_D$ ) value for that ligand. Before each incremental concentration of ligand added, the system was left to equilibrate.  $K_D$  values were obtained from plotting the resonance minimum position of the PWR spectra (this reflects the receptor-ligand complex) as a function of total ligand concentration and fitting to the hyperbolic function that describes the 1:1 binding of a ligand to a receptor using GraphPad Prism (GraphPad Software).

A control experiment was performed that consisted in adding the same ligand concentrations to a lipid bilayer with no receptor reconstituted. This measured non-specific binding of ligand to lipids alone (data not shown).

### **Fluorescence anisotropy assay**

Fluorescence anisotropy (FA) was used to measure receptor-ligand binding reaction into individual wells of black, 96-well Greiner Bio-One microplates in a final volume of 100 $\mu$ l. To establish a saturation binding curve, the range of protein membrane concentration used was from 1 to 25 $\mu$ g in the presence of 10nM of the antagonist NAPS-d2 ligand (L0002 red, Cisbio Bioassays). The FA was measured on a Tecan Infinite M1000 Pro microplate reader (Männedorf, Switzerland). Excitation was set at 590  $\pm$  5 nm and emission was collected at 665  $\pm$  5 nm bandpass filters for the Texas Red. The non-specific binding was obtained from membranes that did not express the receptor and the total binding was measured with D2R-expressing membranes. The non-specific binding curve was fitted with a Simple-linear regression in GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA), the total binding curve was fitted with a One site – total binding curve in GraphPad Prism. The specific binding was determined by subtracting the non-specific curve to the total binding curve and the final specific binding curve was fitted with a One site – specific binding model in GraphPad Prism. The latter was used to determine relative  $K_D$  values via separated saturation binding curves in at least three independent experiments and are reported as mean  $\pm$  SEM.

### **cAMP accumulation assays**

D2R stably expressing HEK 293 cells were grown on PLL treated 12-well plates as described above. Upon reaching 80-90% confluence, cells were treated with 10  $\mu$ M or 30  $\mu$ M DHA or DPA n-6 or 0.03 % to 0.1 % ethanol (vehicle) as control for 24 h in the culture medium. The medium was removed and cells were rinsed in DMEM before pretreatment with 1mM IsoButylMethylXanthine (IBMX, Sigma I5879) for 15min. Cells were then stimulated for 30min with the indicated concentrations of agonists Quinpirole (Tocris 1061), Dopamine (Sigma H8502) and Aripiprazole (Sigma SML0935) in the presence of 1mM IBMX and 10 $\mu$ M Forskolin (Tocris 1099). Endogenous phosphodiesterase activity was stopped by removing the medium and the addition of 0.1M HCL (300 $\mu$ l/well). After centrifugation at 600g during 10min, protein concentration of supernatants was quantified by BCA. Cyclic AMP levels were determined in samples containing 10 $\mu$ g of protein. The production of cAMP was measured by using a cAMP Enzyme Immunoassay kit (Sigma, CA200) as described by the manufacturer using Victor3 (Perkin Elmer) plate reader. The curve fit was obtained by GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc.).

### **$\beta$ -Arrestin2 recruitment assay**

$\beta$ -arrestin2 recruitment was assessed using the PathHunter<sup>®</sup> express DRD2L CHO-K1 Beta arrestin GCPR Assay (DiscoverX, Fremont, CA). In brief, cells were plated into 96-well white-walled assay plates in a volume of 90 $\mu$ l of Cell Plating Reagent (DiscoverX). They were incubated 24 h at 37  $^{\circ}$ C, 5 % CO<sub>2</sub>. The next day, PUFAs (Ethanol 0.01% as control vehicle, DHA, and DPA n-6) were prepared at 10X concentration (300 $\mu$ M) in Cell Plating Reagent and 10  $\mu$ L was added to the cells

for 24h at 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>. Serial dilutions (11x) ranging from 154 to 0.0026 μM, 281 to 0.0046 μM and 9.35 to 0.000157 μM, of Quinpirole, Dopamine and Aripiprazole respectively, were prepared and 10 μl of each concentration was added for 90 minutes. Luminescence was measured at 1 h post PathHunter<sup>®</sup> detection reagent addition using Victor3 plate reader (Perkin Elmer 0.5-s/well integration time). Data were normalized to control treated with the highest concentration of ligand (100%). This control value corresponds to Top best fit value determined by non-linear fit of standard slope. Data were fitted to a three-parameter logistic curve to generate EC<sub>50</sub> and E<sub>max</sub> values (Prism, version 5.0, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). EC<sub>50</sub> and % E<sub>max</sub> values are the result of three independent experiments performed in duplicate.

### **Animals and experimental model**

Mice were housed in groups of 5-10 animals in standard polypropylene cages and maintained in a temperature and humidity-controlled facility under a 12:12 light-dark cycle (8:00 on) with ad libitum access to water and food. All animal care and experimental procedures were in accordance with the INRA Quality Reference System and to french legislations (Directive 87/148, Ministère de l'Agriculture et de la Pêche) and European (Directive 86/609/EEC). They followed ethical protocols approved by the Region Aquitaine Veterinary Services (Direction Départementale de la Protection des Animaux, approval ID: B33-063-920) and by the animal ethic committee of Bordeaux CEEA50. Every effort was made to minimize suffering and reduce the number of animals used. C57BL/6J mouse lines from Janvier Laboratories (Robert Janvier, Le Genest St-Isle France) were used in this study. Female C57BL6/J mice were fed with isocaloric diets containing 5% fat with a high (n-3 def diet) or low LA/ALA ratio (Ctrl diet) across gestation and lactation and offspring were maintained under the same diet after weaning as previously done (see details in [181]). All experiments were performed at adulthood.

### **Operant conditioning**

The apparatus used for these experiments was previously described [181]. Animals were food-restricted in order to maintain them at 85-90% of their ad libitum weight and exposed to one session (1 hour) each day, 5-7 days per week. A pavlovian training followed by fixed and random ratio training were performed in order to make the animals reach an acquisition criterion (i.e. the number of lever presses and rewards earned) before performing the motivational task per se as previously described [181]. In the motivational task, namely the progressive ratio times 2 (PRx2) schedule, the number of lever presses required to earn a reward was doubled respective to the previous one obtained. Mice were tested multiple times in PRx2 with RR20 sessions intercalated between each PR tasks. Aripiprazole (Arip; 7-[4-[4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl]butoxy]-3,4-dihydro-1H-quinolin-2-one; Merck®, Darmstadt, Germany) was dissolved in a mixture of saline (NaCl 0.9%) and

cremiphore (2% of cremiphore in saline) at the doses of 0.1 and 0.5 mg/kg and administered intraperitoneally 10 min before the beginning of the PRx2 test sessions as previously done (Ducrocq et al., in prep.). The ratio of lever presses under drugs over lever presses after vehicle injection were measured for each animal and averaged in order to evaluate the effect of the drugs on operant responding.

### **Spontaneous locomotion**

Animals were transferred individually to small Plexiglas cages (10 cm wide, 20 cm deep, 12 cm tall) equipped with a video tracking system (Smart, Panlab, Barcelona, Spain) allowing the recording of total distance travelled (cm) as a measure of spontaneous locomotor activity in basal condition for one hour. Quinpirole-induced locomotor response was evaluated as described previously (Akhisaroglu et al., 2005). Briefly, animals received 7 intraperitoneal injection of 1mg/kg quinpirole (Quin ; Tocris) dissolved in 0.9% saline every 72 hours. Locomotion was immediately measured for 3 hours after the 8th injection of 0.5mg/kg Quin.

### **Western blot**

Mice were dislocated and the brains were quickly removed, snap-frozen on dry ice and stored. Nucleus accumbens samples were punched (No.18035-01, Fine Science Tools) from 200 µm frozen slices in a cryostat. Samples were homogenized and denatured and western blot were performed as previously described [181]. Briefly, equal quantities of proteins (10µg/well) were separated by electrophoresis. Membranes were saturated and blots were probed with the following primary antibodies: 1:700 rabbit anti-βArr2 (Cell signaling Cat. No. 3857); 1:1000 rabbit anti-GSK3β (Cell signaling Cat. No. 12456); 1:1000 rabbit anti-P-GSK3β (Cell signaling Cat. No. 5558); 1:10000 mouse anti-tubulin (Merck Cat. No. T5168). Then, membranes were incubated with the secondary antibody coupled to Horse Radish Peroxidase (HRP, 1/5000, Jackson ImmunoResearch). After revelation, optical density capture of the signal was performed with the ChemidocMP imaging system (BioRad) and intensity of the signal was quantified using the Image Lab software (BioRad).

### **Cell Membrane Microarray and [<sup>35</sup>S]GTPγS autoradiography**

Microarrays were composed of a collection of membrane homogenates isolated from the NAc of adult mice exposed to Ctrl diet (n=17) or n-3 def diet (n=17) and from rat cerebral cortex as positive control. Briefly, tissue samples were homogenized using a Teflon-glass grinder (Heidolph RZR 2020) and a disperser (Ultra-Turrax® T10 basic, IKA) in 20 volumes of homogenized buffer (1 mM EGTA, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, and 50 mM Tris-HCl, pH 7.4) supplemented with 250 mM sucrose. The crude homogenate was subjected to a 3,000 rpm centrifugation (Allegra™ X 22R centrifuge, Beckman Coulter) for 5 min at 4°C, and the resultant supernatant was centrifuged at 14,000 rpm (Microfuge®

22R centrifuge, Beckman Coulter) for 15 min (4 °C). The pellet was washed in 20 volumes of homogenized buffer and re-centrifuged under the same conditions. The homogenate aliquots were stored at -80 °C until they were used. Protein concentration was measured by the Bradford method and adjusted to the required concentrations. Microarrays were fabricated by a non-contact microarrayer (Nano\_plotter NP2.1) placing the cell membrane homogenates (20 drops/spot) into microscope glass slides treated using a proprietary technology, which enables the immobilization of cell membranes to supports preserving the structure and functionality of their proteins [373].

[<sup>35</sup>S]GTPγS binding studies were carried out using Cell Membrane Microarrays according to the following protocol. Briefly, Cell Membrane Microarrays were dried 20 min at room temperature (r.t.), then they were incubated in assay buffer (50 mM Tris-Cl; 1 mM EGTA; 3 mM MgCl<sub>2</sub>; 100 mM NaCl; 0,5% BSA; pH 7,4) in the presence or absence of 50 μM GDP and/or 100 μM quinpirole for 15 min at r.t. Microarrays were transferred into assay buffer containing 50 μM GDP and 0.1 nM [<sup>35</sup>S]GTPγS, with and without the dopamine D2 agonist, quinpirole, at 100 μM and incubated at 30°C for 30 min. Non-specific binding was determined with GTPγS (10 μM). Finally, microarrays, together with [<sup>35</sup>S]-standards, were exposed to films, developed, scanned and quantified using the Mapix software.

### **Lipid analyses**

Cells submitted to different treatments were randomly analyzed according to Joffre et al. [374]. Total lipids were extracted according to the method developed by Folch et al. [375] and were submitted to fatty acid methylation using 7% boron trifluoride in methanol following Morrison and Smith protocol [376]. Gas chromatography on a HewlettPackard Model 5890 gas chromatograph (Palo Alto, CA, USA) was employed to analyze fatty acid methylesters (FAMES) using aCPSIL-88 column (100 m×0.25 mm internal diameter; film thickness,0.20 μm; Varian, Les Ulis, France). Hydrogen was used as a carrier gas (inlet pressure, 210 kPa). The oven temperature was maintained at 60 °C for 5 min, then increased to 165 °C at 15 °C/min and held for 1 min, and then to 225 °C at 2 °C/min and finally held at 225 °C for 17 min. The injector and the detector were maintained at 250 °C and 280 °C, respectively. FAMES were identified by comparison with commercial and synthetic standards and the data were computed using the Galaxie software (Varian). The proportion of each fatty acid was expressed as a percentage of total fatty acids to allow the comparison of lipid composition in different cell culture conditions.

### **MD simulations**

VMD1.9.4 [377] was used to preprocess both inactive crystal (PDB ID: 6CM4) and active cryoEM structures (PDB ID: 6VMS) of the dopamine D2 to set up the simulations of the apo and holo states, respectively. Any co-crystallization atoms different than water molecules closer than 5 Å to the protein were removed. MODELLER [378] was used to: (a) mutate back to the native sequence any mutation present in the structure, namely A122I, A375L, and A379L in PDB ID: 6CM4, and I205T, L222R, L374M, Y378V, L381V, and I421V in PDB ID: 6VMS, and (b) model residue CYS443, which is missing in the 6CM4 structure, to have the D2R palmitoylation site available. The HomolWat server [379] was used to place internal water molecules not present in the initial structure, and the sodium ion in the case of apo structures. An inactive apo structure was then generated by simply removing the risperidone ligand bound to PDB ID: 6CM4. Likewise, an active apo structure was generated by removing the ligand bromoergocryptine from PDB ID: 6VMS. This second apo structure was used to dock one molecule of either dopamine or aripiprazole into the orthosteric binding pocket of the receptor using AutoDock Vina [380].

The CHARMM-GUI builder [381], [382] was used to embed each refined structure were into a 90 x 90 Å<sup>2</sup> multicomponent membrane rich in either DHA or DPA, using a specific and realistic lipid composition [202], which is detailed in Table S2.

Each protein-membrane system was placed into a water box made of explicit water molecules, their charge was neutralized, and the ionic strength of the system adjusted, throughout CHARMM-GUI builder's pipeline. All titratable residues of the protein were left in their dominant protonation state at pH 7.0, except for Asp80. Disulfide bridges were inserted between Cys107-Cys182, and Cys399-Cys401, and a palmitoyl moiety was covalently linked to Cys443. Systems were first energy minimized and then equilibrated for 50 ns at constant pressure (NPT ensemble). The harmonic positional restraints initially applied to all C $\alpha$  atoms of the protein were gradually released throughout the equilibration phase. Production simulations for each replica were run for 1  $\mu$ s each, at constant volume (NVT ensemble), 1,013 bar and 310 K. The production simulations of this study yielded an aggregated time of 16  $\mu$ s (4 systems x 4 replicas x 1  $\mu$ s). All simulations were run using ACEMD [383] in combination with the CHARMM36m force field [384]. Dopamine and aripiprazole ligand charges were optimized in the ANI-2x mode using the parameterize module of HTMD [385]. Figures from simulations were rendered using the Tachyon renderer [386] and the R ggplot2 library [387].

Lipid-protein contact ratios between lipid species were calculated by dividing the number of contacts per atom of one lipid group over the other. Atoms closer than 4.2 Å to the centre of mass of the protein were considered in contact. Only lipid tail atoms were used in these calculations. Each contact value was previously normalized by the total number of atoms in that particular selection.

For example, sn-1 SDP(d)C / SAT ratios were calculated as the number of atoms of DHA < 4.2 Å of protein's centre of mass divided by the total number of SDP(d)C chain atoms in the system. Likewise, SAT is calculated in the former ratio as the number of atoms of any DPPC, DSPC, or PSM chain closer than 4.2 Å of protein's centre of mass divided by the total number atoms of these tails.

The average lipid occupancy across the simulations was computed using the Python package PyLipID (Song et al, 2021, bioRxiv).

### **Statistical analyses**

Data are reported as mean ± SEM. Statistical analyses were conducted using Prism 6 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Two-tailed unpaired Student's t-test or Mann Whitney test were used to assess differences between two groups. Two-way RM ANOVA followed by post-hoc Bonferroni tests were used for repeated measures. Differences were considered significant for  $p < 0.05$ .

## References

- [1] D. M. Perez, "The Evolutionarily Triumphant G-Protein-Coupled Receptor," *Mol. Pharmacol.*, vol. 63, no. 6, pp. 1202–1205, Jun. 2003, doi: 10.1124/mol.63.6.1202.
- [2] J. Bockaert, "Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success," *EMBO J.*, vol. 18, no. 7, pp. 1723–1729, Apr. 1999, doi: 10.1093/emboj/18.7.1723.
- [3] R. Fredriksson and H. B. Schiöth, "The Repertoire of G-Protein–Coupled Receptors in Fully Sequenced Genomes," *Mol. Pharmacol.*, vol. 67, no. 5, pp. 1414–1425, May 2005, doi: 10.1124/mol.104.009001.
- [4] S. Takeda, S. Kadowaki, T. Haga, H. Takaesu, and S. Mitaku, "Identification of G protein-coupled receptor genes from the human genome sequence," *FEBS Lett.*, vol. 520, no. 1–3, pp. 97–101, Jun. 2002, doi: 10.1016/S0014-5793(02)02775-8.
- [5] D. K. Vassilatis *et al.*, "The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 100, no. 8, pp. 4903–4908, Apr. 2003, doi: 10.1073/pnas.0230374100.
- [6] M. G. Caron, Y. Srinivasan, J. Pitha, K. Kocielek, and R. J. Lefkowitz, "Affinity chromatography of the beta-adrenergic receptor.," *J. Biol. Chem.*, vol. 254, no. 8, pp. 2923–7, Apr. 1979.
- [7] A. Wise, K. Gearing, and S. Rees, "Target validation of G-protein coupled receptors," *Drug Discov. Today*, vol. 7, no. 4, pp. 235–246, Feb. 2002, doi: 10.1016/S1359-6446(01)02131-6.
- [8] R. R. Ania de la Nuez Veulens, "G Protein-coupled receptors as targets for drug design," *Biotechnol. Appl.*, pp. 26:24-33, 2009.
- [9] C. V. R. H. Gebhard F. X. Schertler, "Projection structure of rhodopsin ," *Nature*, 1993.
- [10] K. Palczewski *et al.*, "Crystal Structure of Rhodopsin: A G Protein-Coupled Receptor," *Science (80- )*, vol. 289, no. 5480, pp. 739–745, Aug. 2000, doi: 10.1126/science.289.5480.739.
- [11] S. G. F. Rasmussen *et al.*, "Crystal structure of the  $\beta$  2 adrenergic receptor-Gs protein complex," *Nature*, vol. 477, no. 7366, pp. 549–557, Sep. 2011, doi: 10.1038/nature10361.
- [12] T. Warne *et al.*, "Structure of a  $\beta$ 1-adrenergic G-protein-coupled receptor," *Nature*, vol. 454, no. 7203, pp. 486–491, Jul. 2008, doi: 10.1038/nature07101.
- [13] V.-P. Jaakola *et al.*, "The 2.6 Angstrom Crystal Structure of a Human A<sub>2A</sub> Adenosine Receptor Bound to an Antagonist," *Science (80- )*, vol. 322, no. 5905, pp. 1211–1217, Nov. 2008, doi: 10.1126/science.1164772.
- [14] E. Y. T. Chien *et al.*, "Structure of the Human Dopamine D3 Receptor in Complex with a D2/D3 Selective Antagonist," *Science (80- )*, vol. 330, no. 6007, pp. 1091–1095, Nov. 2010, doi: 10.1126/science.1197410.
- [15] S. Wang, T. Che, A. Levit, B. K. Shoichet, D. Wacker, and B. L. Roth, "Structure of the D2



- dopamine receptor bound to the atypical antipsychotic drug risperidone,” *Nature*, vol. 555, no. 7695, pp. 269–273, Mar. 2018, doi: 10.1038/nature25758.
- [16] L. F. Kolakowski, “GCRDb: a G-protein-coupled receptor database.,” *Receptors Channels*, vol. 2, no. 1, pp. 1–7, 1994.
- [17] R. Fredriksson, M. C. Lagerström, L.-G. Lundin, and H. B. Schiöth, “The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogon Groups, and Fingerprints,” *Mol. Pharmacol.*, vol. 63, no. 6, pp. 1256–1272, Jun. 2003, doi: 10.1124/mol.63.6.1256.
- [18] B. P. Ceresa and L. E. Limbird, “Mutation of an aspartate residue highly conserved among G-protein-coupled receptors results in nonreciprocal disruption of alpha 2-adrenergic receptor-G-protein interactions. A negative charge at amino acid residue 79 forecasts alpha 2A-adrenergic receptor sensitivity to allosteric modulation by monovalent cations and fully effective receptor/G-protein coupling.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 269, no. 47, pp. 29557–64, Nov. 1994.
- [19] G. E. Rovati, V. Capra, and R. R. Neubig, “The Highly Conserved DRY Motif of Class A G Protein-Coupled Receptors: Beyond the Ground State,” *Mol. Pharmacol.*, vol. 71, no. 4, pp. 959–964, Apr. 2007, doi: 10.1124/mol.106.029470.
- [20] R. He, D. D. Browning, and R. D. Ye, “Differential Roles of the NPXXY Motif in Formyl Peptide Receptor Signaling,” *J. Immunol.*, vol. 166, no. 6, pp. 4099–4105, Mar. 2001, doi: 10.4049/jimmunol.166.6.4099.
- [21] L. J. Miller, M. Dong, and K. G. Harikumar, “Ligand binding and activation of the secretin receptor, a prototypic family B G protein-coupled receptor,” *Br. J. Pharmacol.*, vol. 166, no. 1, pp. 18–26, May 2012, doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01463.x.
- [22] H. Wu *et al.*, “Structure of a Class C GPCR Metabotropic Glutamate Receptor 1 Bound to an Allosteric Modulator,” *Science (80-. )*, vol. 344, no. 6179, pp. 58–64, Apr. 2014, doi: 10.1126/science.1249489.
- [23] E. J. Neer, “Heterotrimeric C proteins: Organizers of transmembrane signals,” *Cell*, vol. 80, no. 2, pp. 249–257, Jan. 1995, doi: 10.1016/0092-8674(95)90407-7.
- [24] S. Pandey, “Heterotrimeric G-Protein Signaling in Plants,” in *Sensory Biology of Plants*, Singapore: Springer Singapore, 2019, pp. 189–226.
- [25] G. Milligan and E. Kostenis, “Heterotrimeric G-proteins: a short history,” *Br. J. Pharmacol.*, vol. 147, no. S1, pp. S46–S55, Jan. 2006, doi: 10.1038/sj.bjp.0706405.
- [26] D. J. Spring and E. J. Neer, “A 14-amino acid region of the G protein gamma subunit is sufficient to confer selectivity of gamma binding to the beta subunit.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 269, no. 36, pp. 22882–22886, Sep. 1994, doi: 10.1016/S0021-9258(17)31727-1.
- [27] E. Hermans, “Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors,” *Pharmacol. Ther.*, vol. 99, no. 1, pp. 25–44, Jul. 2003, doi:

- 10.1016/S0163-7258(03)00051-2.
- [28] D. K. Grammatopoulos, H. S. Randeva, M. A. Levine, K. A. Kanellopoulou, and E. W. Hillhouse, "Rat cerebral cortex corticotropin-releasing hormone receptors: evidence for receptor coupling to multiple G-proteins," *J. Neurochem.*, vol. 76, no. 2, pp. 509–519, Jan. 2001, doi: 10.1046/j.1471-4159.2001.00067.x.
- [29] A. Ulloa-Aguirre, D. Stanislaus, J. A. Janovick, and P. M. Conn, "Structure-Activity Relationships of G Protein-Coupled Receptors," *Arch. Med. Res.*, vol. 30, no. 6, pp. 420–435, Nov. 1999, doi: 10.1016/S0188-0128(99)00041-X.
- [30] J. Wess, "Molecular Basis of Receptor/G-Protein-Coupling Selectivity," *Pharmacol. Ther.*, vol. 80, no. 3, pp. 231–264, Dec. 1998, doi: 10.1016/S0163-7258(98)00030-8.
- [31] J. Wess, T. I. Bonner, F. Dörje, and M. R. Brann, "Delineation of muscarinic receptor domains conferring selectivity of coupling to guanine nucleotide-binding proteins and second messengers.," *Mol. Pharmacol.*, vol. 38, no. 4, pp. 517–23, Oct. 1990.
- [32] T. M. Cabrera-Vera *et al.*, "Insights into G Protein Structure, Function, and Regulation," *Endocr. Rev.*, vol. 24, no. 6, pp. 765–781, Dec. 2003, doi: 10.1210/er.2000-0026.
- [33] R. Taussig and G. Zimmermann, "Type-specific regulation of mammalian adenylyl cyclases by G protein pathways," 1997, pp. 81–98.
- [34] D. E. Logothetis, Y. Kurachi, J. Galper, E. J. Neer, and D. E. Clapham, "The  $\beta\gamma$  subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K<sup>+</sup> channel in heart," *Nature*, vol. 325, no. 6102, pp. 321–326, Jan. 1987, doi: 10.1038/325321a0.
- [35] C. Knall and G. L. Johnson, "G-Protein Regulatory Pathways: Rocketing into the Twenty-first Century," 1998.
- [36] R. J. Lefkowitz and S. K. Shenoy, "Transduction of Receptor Signals by  $\beta$ -Arrestins," *Science (80- )*, vol. 308, no. 5721, pp. 512–517, Apr. 2005, doi: 10.1126/science.11109237.
- [37] L. M. Luttrell *et al.*, " $\beta$ -Arrestin-Dependent Formation of  $\beta_2$  Adrenergic Receptor-Src Protein Kinase Complexes," *Science (80- )*, vol. 283, no. 5402, pp. 655–661, Jan. 1999, doi: 10.1126/science.283.5402.655.
- [38] C. Pfister *et al.*, "Retinal S Antigen Identified as the 48K Protein Regulating Light-Dependent Phosphodiesterase in Rods," *Science (80- )*, vol. 228, no. 4701, pp. 891–893, May 1985, doi: 10.1126/science.2988124.
- [39] C. M. Craft, D. H. Whitmore, and A. F. Wiechmann, "Cone arrestin identified by targeting expression of a functional family.," *J. Biol. Chem.*, vol. 269, no. 6, pp. 4613–4619, Feb. 1994, doi: 10.1016/S0021-9258(17)41820-5.
- [40] M. J. Lohse, J. L. Benovic, J. Codina, M. G. Caron, and R. J. Lefkowitz, " $\beta$ -Arrestin: a Protein that Regulates  $\beta$ -adrenergic Receptor Function," *Science (80- )*, vol. 248, no. 4962, pp. 1547–1550, Jun. 1990, doi: 10.1126/science.2163110.
- [41] H. Attramadal *et al.*, "Beta-arrestin2, a novel member of the arrestin/beta-arrestin gene

- family.," *J. Biol. Chem.*, vol. 267, no. 25, pp. 17882–90, Sep. 1992.
- [42] M. Nakagawa *et al.*, "Ascidian arrestin (Ci-arr), the origin of the visual and nonvisual arrestins of vertebrate," *Eur. J. Biochem.*, vol. 269, no. 21, pp. 5112–5118, Nov. 2002, doi: 10.1046/j.1432-1033.2002.03240.x.
- [43] S. K. Milano, H. C. Pace, Y.-M. Kim, C. Brenner, and J. L. Benovic, "Scaffolding Functions of Arrestin-2 Revealed by Crystal Structure and Mutagenesis ." *Biochemistry*, vol. 41, no. 10, pp. 3321–3328, Mar. 2002, doi: 10.1021/bi015905j.
- [44] J. Granzin, U. Wilden, H.-W. Choe, J. Labahn, B. Krafft, and G. Büldt, "X-ray crystal structure of arrestin from bovine rod outer segments," *Nature*, vol. 391, no. 6670, pp. 918–921, Feb. 1998, doi: 10.1038/36147.
- [45] V. V. Gurevich and E. V. Gurevich, "The structural basis of arrestin-mediated regulation of G-protein-coupled receptors," *Pharmacol. Ther.*, vol. 110, no. 3, pp. 465–502, Jun. 2006, doi: 10.1016/j.pharmthera.2005.09.008.
- [46] K. Min *et al.*, "Crystal Structure of  $\beta$ -Arrestin 2 in Complex with CXCR7 Phosphopeptide," *Structure*, vol. 28, no. 9, pp. 1014-1023.e4, Sep. 2020, doi: 10.1016/j.str.2020.06.002.
- [47] M. Han, V. V Gurevich, S. A. Vishnivetskiy, P. B. Sigler, and C. Schubert, "Crystal Structure of  $\beta$ -Arrestin at 1.9 Å," *Structure*, vol. 9, no. 9, pp. 869–880, Sep. 2001, doi: 10.1016/S0969-2126(01)00644-X.
- [48] X. E. Zhou *et al.*, "Identification of Phosphorylation Codes for Arrestin Recruitment by G Protein-Coupled Receptors," *Cell*, vol. 170, no. 3, pp. 457-469.e13, Jul. 2017, doi: 10.1016/j.cell.2017.07.002.
- [49] V. V Gurevich and E. V Gurevich, "The molecular acrobatics of arrestin activation," *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 25, no. 2, pp. 105–111, Feb. 2004, doi: 10.1016/j.tips.2003.12.008.
- [50] X. Song, S. Coffa, H. Fu, and V. V Gurevich, "How does arrestin assemble MAPKs into a signaling complex?," *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 1, pp. 685–695, Jan. 2009, doi: 10.1074/jbc.M806124200.
- [51] X. Deupi and B. Kobilka, "Activation of G Protein–Coupled Receptors," 2007, pp. 137–166.
- [52] I. D. Alves *et al.*, "Selectivity, Cooperativity, and Reciprocity in the Interactions between the  $\delta$ -Opioid Receptor, Its Ligands, and G-proteins," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 43, pp. 44673–44682, Oct. 2004, doi: 10.1074/jbc.M404713200.
- [53] P. Ghanouni *et al.*, "Functionally Different Agonists Induce Distinct Conformations in the G Protein Coupling Domain of the  $\beta$ 2Adrenergic Receptor," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 27, pp. 24433–24436, Jan. 2001, doi: 10.1074/jbc.C100162200.
- [54] P. R. Robinson, G. B. Cohen, E. A. Zhukovsky, and D. D. Oprian, "Constitutively active mutants of rhodopsin," *Neuron*, vol. 9, no. 4, pp. 719–725, Oct. 1992, doi: 10.1016/0896-6273(92)90034-B.
- [55] R. A. Bond and A. P. IJzerman, "Recent developments in constitutive receptor activity and

- inverse agonism, and their potential for GPCR drug discovery,” *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 27, no. 2, pp. 92–96, Feb. 2006, doi: 10.1016/j.tips.2005.12.007.
- [56] D. Wacker, R. C. Stevens, and B. L. Roth, “How Ligands Illuminate GPCR Molecular Pharmacology,” *Cell*, vol. 170, no. 3, pp. 414–427, Jul. 2017, doi: 10.1016/j.cell.2017.07.009.
- [57] T. Kenakin, “Functional Selectivity through Protean and Biased Agonism: Who Steers the Ship?,” *Mol. Pharmacol.*, vol. 72, no. 6, pp. 1393–1401, Dec. 2007, doi: 10.1124/mol.107.040352.
- [58] Z. Rankovic, T. F. Brust, and L. M. Bohn, “Biased agonism: An emerging paradigm in GPCR drug discovery,” *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 26, no. 2, pp. 241–250, Jan. 2016, doi: 10.1016/j.bmcl.2015.12.024.
- [59] S. M. DeWire and J. D. Violin, “Biased Ligands for Better Cardiovascular Drugs,” *Circ. Res.*, vol. 109, no. 2, pp. 205–216, Jul. 2011, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.231308.
- [60] M. T. Drake, S. K. Shenoy, and R. J. Lefkowitz, “Trafficking of G Protein–Coupled Receptors,” *Circ. Res.*, vol. 99, no. 6, pp. 570–582, Sep. 2006, doi: 10.1161/01.RES.0000242563.47507.ce.
- [61] N. A. McDonald, C. M. Henstridge, C. N. Connolly, and A. J. Irving, “An Essential Role for Constitutive Endocytosis, but Not Activity, in the Axonal Targeting of the CB<sub>1</sub> Cannabinoid Receptor,” *Mol. Pharmacol.*, vol. 71, no. 4, pp. 976–984, Apr. 2007, doi: 10.1124/mol.106.029348.
- [62] J. A. Pitcher, N. J. Freedman, and R. J. Lefkowitz, “G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR KINASES,” 1998. [Online]. Available: [www.annualreviews.org](http://www.annualreviews.org).
- [63] A. B. Tobin, “G-protein-coupled receptor phosphorylation: where, when and by whom,” *Br. J. Pharmacol.*, vol. 153, no. S1, pp. S167–S176, Mar. 2008, doi: 10.1038/sj.bjp.0707662.
- [64] J. L. Benovic, F. Mayor, R. L. Somers, M. G. Caron, and R. J. Lefkowitz, “Light-dependent phosphorylation of rhodopsin by  $\beta$ -adrenergic receptor kinase,” *Nature*, vol. 321, no. 6073, pp. 869–872, Jun. 1986, doi: 10.1038/321869a0.
- [65] S. S. G. Ferguson, “Evolving Concepts in G Protein-Coupled Receptor Endocytosis: The Role in Receptor Desensitization and Signaling,” 2001. [Online]. Available: <http://pharmrev.aspetjournals.org>.
- [66] M. Bouvier *et al.*, “Removal of phosphorylation sites from the beta 2-adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization,” *Nat. Publ. Gr.*, 1988.
- [67] H. NAKATA, K. KAMEYAMA, K. HAGA, and T. HAGA, “Location of agonist-dependent-phosphorylation sites in the third intracellular loop of muscarinic acetylcholine receptors (m2 subtype),” *Eur. J. Biochem.*, vol. 220, no. 1, pp. 29–36, Feb. 1994, doi: 10.1111/j.1432-1033.1994.tb18595.x.
- [68] A. Mann *et al.*, “New phosphosite-specific antibodies to unravel the role of GRK

- phosphorylation in dopamine D2 receptor regulation and signaling,” *Sci. Rep.*, vol. 11, no. 1, p. 8288, Dec. 2021, doi: 10.1038/s41598-021-87417-2.
- [69] J. A. Pitcher *et al.*, “Role of  $\beta\gamma$  Subunits of G Proteins in Targeting the  $\beta$ -Adrenergic Receptor Kinase to Membrane-Bound Receptors,” *Science (80-. )*, vol. 257, no. 5074, pp. 1264–1267, Aug. 1992, doi: 10.1126/science.1325672.
- [70] STEPHEN S. G. FERGUSON, “Evolving Concepts in G Protein-Coupled Receptor Endocytosis: The Role in Receptor Desensitization and Signaling,” *Pharmacol. Rev.*, 2001.
- [71] N. Yuan, J. Friedman, B. S. Whaley, and R. B. Clark, “cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C consensus site mutations of the beta-adrenergic receptor. Effect on desensitization and stimulation of adenylylcyclase.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 269, no. 37, pp. 23032–8, Sep. 1994.
- [72] T. M. Tran, J. Friedman, E. Qunaibi, F. Baameur, R. H. Moore, and R. B. Clark, “Characterization of Agonist Stimulation of cAMP-Dependent Protein Kinase and G Protein-Coupled Receptor Kinase Phosphorylation of the  $\beta_2$ -Adrenergic Receptor Using Phosphoserine-Specific Antibodies,” *Mol. Pharmacol.*, vol. 65, no. 1, pp. 196–206, Jan. 2004, doi: 10.1124/mol.65.1.196.
- [73] E. Ungewickell and D. Branton, “Assembly units of clathrin coats,” *Nature*, vol. 289, no. 5796, pp. 420–422, Jan. 1981, doi: 10.1038/289420a0.
- [74] C. J. Smith, “Clathrin coats at 21Å resolution: a cellular assembly designed to recycle multiple membrane receptors,” *EMBO J.*, vol. 17, no. 17, pp. 4943–4953, Sep. 1998, doi: 10.1093/emboj/17.17.4943.
- [75] M. M. PERRY and A. B. GILBERT, “Electron microscopy imaging of clathrin endocytosis,” *Cell Sci.*, 1979.
- [76] B. M. Collins, A. J. McCoy, H. M. Kent, P. R. Evans, and D. J. Owen, “Molecular Architecture and Functional Model of the Endocytic AP2 Complex,” *Cell*, vol. 109, no. 4, pp. 523–535, May 2002, doi: 10.1016/S0092-8674(02)00735-3.
- [77] C. Rodemer and V. Haucke, “Clathrin/AP-2-Dependent Endocytosis: A Novel Playground for the Pharmacological Toolbox?,” 2008, pp. 105–122.
- [78] E. M. Schmid *et al.*, “Role of the AP2  $\beta$ -Appendage Hub in Recruiting Partners for Clathrin-Coated Vesicle Assembly,” *PLoS Biol.*, vol. 4, no. 9, p. e262, Aug. 2006, doi: 10.1371/journal.pbio.0040262.
- [79] B. Marks *et al.*, “GTPase activity of dynamin and resulting conformation change are essential for endocytosis,” *Nature*, vol. 410, no. 6825, pp. 231–235, Mar. 2001, doi: 10.1038/35065645.
- [80] S. L. Schmid and V. A. Frolov, “Dynamin: Functional Design of a Membrane Fission Catalyst,” *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 27, no. 1, pp. 79–105, Nov. 2011, doi: 10.1146/annurev-cellbio-100109-104016.

- [81] R. J. Lefkowitz, K. Rajagopal, and E. J. Whalen, "New Roles for  $\beta$ -Arrestins in Cell Signaling: Not Just for Seven-Transmembrane Receptors," *Mol. Cell*, vol. 24, no. 5, pp. 643–652, Dec. 2006, doi: 10.1016/j.molcel.2006.11.007.
- [82] D. S. Kang, R. C. Kern, M. A. Puthenveedu, M. von Zastrow, J. C. Williams, and J. L. Benovic, "Structure of an Arrestin2-Clathrin Complex Reveals a Novel Clathrin Binding Domain That Modulates Receptor Trafficking," *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 43, pp. 29860–29872, Oct. 2009, doi: 10.1074/jbc.M109.023366.
- [83] Y.-M. Kim and J. L. Benovic, "Differential Roles of Arrestin-2 Interaction with Clathrin and Adaptor Protein 2 in G Protein-coupled Receptor Trafficking," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 34, pp. 30760–30768, Aug. 2002, doi: 10.1074/jbc.M204528200.
- [84] J. G. Krupnick, F. Santini, A. W. Gagnon, J. H. Keen, and J. L. Benovic, "Modulation of the Arrestin-Clathrin Interaction in Cells," *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 51, pp. 32507–32512, Dec. 1997, doi: 10.1074/jbc.272.51.32507.
- [85] A. Burtey *et al.*, "The Conserved Isoleucine-Valine-Phenylalanine Motif Couples Activation State and Endocytic Functions of  $\beta$ -Arrestins," *Traffic*, vol. 8, no. 7, pp. 914–931, Jul. 2007, doi: 10.1111/j.1600-0854.2007.00578.x.
- [86] C. L. Mayberry, A. N. Soucy, C. R. Lajoie, J. K. DuShane, and M. S. Maginnis, "JC Polyomavirus Entry by Clathrin-Mediated Endocytosis Is Driven by  $\beta$ -Arrestin," *J. Virol.*, vol. 93, no. 8, Apr. 2019, doi: 10.1128/JVI.01948-18.
- [87] E. M. Smyth, S. C. Austin, M. P. Reilly, and G. A. FitzGerald, "Internalization and Sequestration of the Human Prostacyclin Receptor," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 41, pp. 32037–32045, Oct. 2000, doi: 10.1074/jbc.M003873200.
- [88] K. B. Lee, R. Pals-Rylaarsdam, J. L. Benovic, and M. M. Hosey, "Arrestin-independent Internalization of the m1, m3, and m4 Subtypes of Muscarinic Cholinergic Receptors," *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 21, pp. 12967–12972, May 1998, doi: 10.1074/jbc.273.21.12967.
- [89] R. Pals-Rylaarsdam, V. V. Gurevich, K. B. Lee, J. A. Ptasienski, J. L. Benovic, and M. M. Hosey, "Internalization of the m2 Muscarinic Acetylcholine Receptor," *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 38, pp. 23682–23689, Sep. 1997, doi: 10.1074/jbc.272.38.23682.
- [90] A. Bhatnagar, D. L. Willins, J. A. Gray, J. Woods, J. L. Benovic, and B. L. Roth, "The Dynamin-dependent, Arrestin-independent Internalization of 5-Hydroxytryptamine 2A (5-HT2A) Serotonin Receptors Reveals Differential Sorting of Arrestins and 5-HT2A Receptors during Endocytosis," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 11, pp. 8269–8277, Mar. 2001, doi: 10.1074/jbc.M006968200.
- [91] A. Fraile-Ramos, T. A. Kohout, M. Waldhoer, and M. Marsh, "Endocytosis of the Viral Chemokine Receptor US28 Does Not Require Beta-Arrestins But Is Dependent on the Clathrin-Mediated Pathway," *Traffic*, vol. 4, no. 4, pp. 243–253, Apr. 2003, doi: 10.1034/j.1600-0854.2003.00079.x.

- [92] J. A. Gray, A. Bhatnagar, V. V. Gurevich, and B. L. Roth, "The Interaction of a Constitutively Active Arrestin with the Arrestin-Insensitive 5-HT<sub>2A</sub> Receptor Induces Agonist-Independent Internalization," *Mol. Pharmacol.*, vol. 63, no. 5, pp. 961–972, May 2003, doi: 10.1124/mol.63.5.961.
- [93] J. K. L. Walker, R. T. Premont, L. S. Barak, M. G. Caron, and M. A. Shetzline, "Properties of Secretin Receptor Internalization Differ from Those of the  $\beta$ 2-Adrenergic Receptor," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 44, pp. 31515–31523, Oct. 1999, doi: 10.1074/jbc.274.44.31515.
- [94] I. Rapoport *et al.*, "Regulatory interactions in the recognition of endocytic sorting signals by AP-2 complexes," *EMBO J.*, vol. 16, no. 9, pp. 2240–2250, May 1997, doi: 10.1093/emboj/16.9.2240.
- [95] B. Chini and M. Parenti, "G-protein coupled receptors in lipid rafts and caveolae: how, when and why do they go there?," *J. Mol. Endocrinol.*, vol. 32, no. 2, pp. 325–338, Apr. 2004, doi: 10.1677/jme.0.0320325.
- [96] T. Okamoto, A. Schlegel, P. E. Scherer, and M. P. Lisanti, "Caveolins, a Family of Scaffolding Proteins for Organizing 'Preassembled Signaling Complexes' at the Plasma Membrane," *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 10, pp. 5419–5422, Mar. 1998, doi: 10.1074/jbc.273.10.5419.
- [97] P. Candela *et al.*, "Physiological Pathway for Low-Density Lipoproteins across the Blood-Brain Barrier: Transcytosis through Brain Capillary Endothelial Cells In Vitro," *Endothelium*, vol. 15, no. 5–6, pp. 254–264, Jan. 2008, doi: 10.1080/10623320802487759.
- [98] S. E. W. A. M. P. L. BABAK RAZANI, "Caveolae: From Cell Biology to Animal Physiology," *Pharmacol. Rev.*, 2002.
- [99] N. J. Freedman, A. S. Ament, M. Oppermann, R. H. Stoffel, S. T. Exum, and R. J. Lefkowitz, "Phosphorylation and Desensitization of Human Endothelin A and B Receptors," *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 28, pp. 17734–17743, Jul. 1997, doi: 10.1074/jbc.272.28.17734.
- [100] M. Chun, U. K. Liyanage, M. P. Lisanti, and H. F. Lodish, "Signal transduction of a G protein-coupled receptor in caveolae: colocalization of endothelin and its receptor with caveolin.," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 91, no. 24, pp. 11728–11732, Nov. 1994, doi: 10.1073/pnas.91.24.11728.
- [101] M. Scarselli and J. G. Donaldson, "Constitutive Internalization of G Protein-coupled Receptors and G Proteins via Clathrin-independent Endocytosis," *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 6, pp. 3577–3585, Feb. 2009, doi: 10.1074/jbc.M806819200.
- [102] E. Kelly, C. P. Bailey, and G. Henderson, "Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 153, no. S1, pp. S379–S388, Mar. 2008, doi: 10.1038/sj.bjp.0707604.
- [103] A. C. Magalhaes, H. Dunn, and S. S. Ferguson, "Regulation of GPCR activity, trafficking

- and localization by GPCR-interacting proteins,” *Br. J. Pharmacol.*, vol. 165, no. 6, pp. 1717–1736, Mar. 2012, doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01552.x.
- [104] C. Raiborg and H. Stenmark, “The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins,” *Nature*, vol. 458, no. 7237, pp. 445–452, Mar. 2009, doi: 10.1038/nature07961.
- [105] J. L. Whistler *et al.*, “Modulation of Postendocytic Sorting of G Protein-Coupled Receptors,” *Science (80-. )*, vol. 297, no. 5581, pp. 615–620, Jul. 2002, doi: 10.1126/science.1073308.
- [106] M. Tanowitz and M. von Zastrow, “Ubiquitination-independent Trafficking of G Protein-coupled Receptors to Lysosomes,” *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 52, pp. 50219–50222, Dec. 2002, doi: 10.1074/jbc.C200536200.
- [107] P. Temkin, B. Lauffer, S. Jäger, P. Cimermancic, N. J. Krogan, and M. von Zastrow, “SNX27 mediates retromer tubule entry and endosome-to-plasma membrane trafficking of signalling receptors,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 13, no. 6, pp. 715–721, Jun. 2011, doi: 10.1038/ncb2252.
- [108] M. von Zastrow, “Proteomic Approaches to Investigate Regulated Trafficking and Signaling of G Protein–Coupled Receptors,” *Mol. Pharmacol.*, vol. 99, no. 5, pp. 392–398, May 2021, doi: 10.1124/molpharm.120.000178.
- [109] R. M. Gage, E. A. Matveeva, S. W. Whiteheart, and M. von Zastrow, “Type I PDZ Ligands Are Sufficient to Promote Rapid Recycling of G Protein-coupled Receptors Independent of Binding to N-Ethylmaleimide-sensitive Factor,” *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 5, pp. 3305–3313, Feb. 2005, doi: 10.1074/jbc.M406934200.
- [110] K. A. MONTAGU, “Catechol Compounds in Rat Tissues and in Brains of Different Animals,” *Nature*, Aug. 1957.
- [111] J. D. Berke, “What does dopamine mean?,” *Nat. Neurosci.*, vol. 21, no. 6, pp. 787–793, Jun. 2018, doi: 10.1038/s41593-018-0152-y.
- [112] S. C. Daubner, T. Le, and S. Wang, “Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis,” *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 508, no. 1, pp. 1–12, Apr. 2011, doi: 10.1016/j.abb.2010.12.017.
- [113] W. J. van den Brink, S. Palic, I. Köhler, and E. C. M. de Lange, “Access to the CNS: Biomarker Strategies for Dopaminergic Treatments,” *Pharm. Res.*, vol. 35, no. 3, p. 64, Mar. 2018, doi: 10.1007/s11095-017-2333-x.
- [114] U. Ungerstedt, “Striatal Dopamine Release after Amphetamine or Nerve Degeneration Revealed by Rotational Behaviour,” *Acta Physiol. Scand.*, vol. 82, no. S367, pp. 49–68, Dec. 1971, doi: 10.1111/j.1365-201X.1971.tb10999.x.
- [115] J. W. Keabian, G. L. Petzold, and P. Greengard, “Dopamine-sensitive adenylate cyclase in caudate nucleus of rat brain, and its similarity to the ‘dopamine receptor,’” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 69, no. 8, pp. 2145–2149, Aug. 1972, doi: 10.1073/pnas.69.8.2145.



- [116] K. A. Neve, "Dopamine Receptors," in *Encyclopedia of Biological Chemistry*, Elsevier, 2013, pp. 169–173.
- [117] Y. Wang, T. Sasaoka, and M. T. Dang, "A Molecular Genetic Approach to Uncovering the Differential Functions of Dopamine D2 Receptor Isoforms," 2013, pp. 181–200.
- [118] J. Guiramand, J.-P. Montmayeur, J. Ceraline, M. Bhatia, and E. Borrelli, "Alternative Splicing of the Dopamine D2 Receptor Directs Specificity of Coupling to G-proteins," *J. Biol. Chem.*, vol. 270, no. 13, pp. 7354–7358, Mar. 1995, doi: 10.1074/jbc.270.13.7354.
- [119] J. P. Montmayeur, J. Guiramand, and E. Borrelli, "Preferential coupling between dopamine D2 receptors and G-proteins.," *Mol. Endocrinol.*, vol. 7, no. 2, pp. 161–170, Feb. 1993, doi: 10.1210/mend.7.2.7682286.
- [120] D. Radl, M. Chiacchiarretta, R. G. Lewis, K. Bami-Cherrier, L. Arcuri, and E. Borrelli, "Differential regulation of striatal motor behavior and related cellular responses by dopamine D2L and D2S isoforms," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 115, no. 1, pp. 198–203, Jan. 2018, doi: 10.1073/pnas.1717194115.
- [121] R. T. Kendall and S. E. Senogles, "Investigation of the alternatively spliced insert region of the D2L dopamine receptor by epitope substitution," *Neurosci. Lett.*, vol. 393, no. 2–3, pp. 155–159, Jan. 2006, doi: 10.1016/j.neulet.2005.09.057.
- [122] D. K. Grandy *et al.*, "Cloning of the cDNA and gene for a human D2 dopamine receptor.," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 86, no. 24, pp. 9762–9766, Dec. 1989, doi: 10.1073/pnas.86.24.9762.
- [123] D. Im *et al.*, "Structure of the dopamine D2 receptor in complex with the antipsychotic drug spiperone," *Nat. Commun.*, vol. 11, no. 1, p. 6442, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41467-020-20221-0.
- [124] L. Fan *et al.*, "Haloperidol bound D2 dopamine receptor structure inspired the discovery of subtype selective ligands," *Nat. Commun.*, vol. 11, no. 1, p. 1074, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41467-020-14884-y.
- [125] J. Yin *et al.*, "Structure of a D2 dopamine receptor–G-protein complex in a lipid membrane," *Nature*, 2020, doi: 10.1038/s41586-020-2379-5.
- [126] J. M. Beaulieu and R. R. Gainetdinov, "The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors," *Pharmacological Reviews*, vol. 63, no. 1, pp. 182–217, Mar. 2011, doi: 10.1124/pr.110.002642.
- [127] K. Ito, T. Haga, J. Lameh, and W. S. Âe, "Sequestration of dopamine D2 receptors depends on coexpression of G-protein-coupled receptor kinases 2 or 5," 1999.
- [128] N. Ozaki, K. Moroi, T. Kadota, S. Suzuki, and K. Kadota, "Dopamine D1 and D2 Receptors and Their Signal System Present in Coated Vesicles Prepared from Bovine Striatal Tissue," *J. Neurochem.*, vol. 62, no. 2, pp. 582–591, Nov. 2002, doi: 10.1046/j.1471-4159.1994.62020582.x.

- [129] M. Skinbjerg *et al.*, "Arrestin3 mediates D2 dopamine receptor internalization," *Synapse*, vol. 63, no. 7, pp. 621–624, Jul. 2009, doi: 10.1002/syn.20636.
- [130] C. A. Marsden, "Dopamine: the rewarding years," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 147, no. S1, pp. S136–S144, Jan. 2006, doi: 10.1038/sj.bjp.0706473.
- [131] S. Moritz, B. C. Schneider, J. Peth, S. Arlt, and L. Jelinek, "Metacognitive Training for Depression (D-MCT) reduces false memories in depression. A randomized controlled trial," *Eur. Psychiatry*, vol. 53, pp. 46–51, Sep. 2018, doi: 10.1016/j.eurpsy.2018.05.010.
- [132] N. M. Urs, S. M. Peterson, and M. G. Caron, "New Concepts in Dopamine D2 Receptor Biased Signaling and Implications for Schizophrenia Therapy," *Biol. Psychiatry*, vol. 81, no. 1, pp. 78–85, Jan. 2017, doi: 10.1016/j.biopsych.2016.10.011.
- [133] A. H. Tran *et al.*, "Altered accumbens neural response to prediction of reward associated with place in dopamine D2 receptor knockout mice," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 99, no. 13, pp. 8986–8991, Jun. 2002, doi: 10.1073/pnas.132284599.
- [134] P. Trifilieff *et al.*, "Increasing dopamine D2 receptor expression in the adult nucleus accumbens enhances motivation," *Mol. Psychiatry*, vol. 18, no. 9, pp. 1025–1033, Sep. 2013, doi: 10.1038/mp.2013.57.
- [135] E. Messamore and R. K. McNamara, "Detection and treatment of omega-3 fatty acid deficiency in psychiatric practice: Rationale and implementation," *Lipids Health Dis.*, vol. 15, no. 1, pp. 1–13, 2016, doi: 10.1186/s12944-016-0196-5.
- [136] E. D. Korn, "Structure and Function of the Plasma Membrane," *J. Gen. Physiol.*, vol. 52, no. 1, pp. 257–278, Jul. 1968, doi: 10.1085/jgp.52.1.257.
- [137] S. Vanni, L. Riccardi, G. Palermo, and M. De Vivo, "Structure and Dynamics of the Acyl Chains in the Membrane Trafficking and Enzymatic Processing of Lipids," *Acc. Chem. Res.*, vol. 52, no. 11, pp. 3087–3096, Nov. 2019, doi: 10.1021/acs.accounts.9b00134.
- [138] S. Sonnino and A. Prinetti, "Membrane Domains and the Lipid Raft Concept," *Curr. Med. Chem.*, vol. 20, no. 1, pp. 4–21, Dec. 2012, doi: 10.2174/0929867311302010004.
- [139] P. A. Janmey and P. K. J. Kinnunen, "Biophysical properties of lipids and dynamic membranes," *Trends Cell Biol.*, vol. 16, no. 10, pp. 538–546, Oct. 2006, doi: 10.1016/j.tcb.2006.08.009.
- [140] B. Fadeel and D. Xue, "The ins and outs of phospholipid asymmetry in the plasma membrane: Roles in health and disease," *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 44, no. 5, pp. 264–277, 2009, doi: 10.1080/10409230903193307.
- [141] J. H. Lorent *et al.*, "Plasma membranes are asymmetric in lipid unsaturation, packing and protein shape," *Nat. Chem. Biol.*, vol. 16, no. 6, pp. 644–652, Jun. 2020, doi: 10.1038/s41589-020-0529-6.
- [142] S. Takamori *et al.*, "Molecular Anatomy of a Trafficking Organelle," *Cell*, vol. 127, no. 4, pp. 831–846, Nov. 2006, doi: 10.1016/j.cell.2006.10.030.

- [143] R. P. Bazinet and S. Layé, "Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 15, no. 12, pp. 771–785, Dec. 2014, doi: 10.1038/nrn3820.
- [144] S. A. Moore, "Polyunsaturated Fatty Acid Synthesis and Release," *J. Mol. Neurosci.*, vol. 16, no. 2–3, pp. 195–200, 2001, doi: 10.1385/JMN:16:2-3:195.
- [145] R. K. Saini and Y.-S. Keum, "Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance — A review," *Life Sci.*, vol. 203, pp. 255–267, Jun. 2018, doi: 10.1016/j.lfs.2018.04.049.
- [146] A. Yamashita *et al.*, "Acyltransferases and transacylases that determine the fatty acid composition of glycerolipids and the metabolism of bioactive lipid mediators in mammalian cells and model organisms," *Prog. Lipid Res.*, vol. 53, pp. 18–81, Jan. 2014, doi: 10.1016/j.plipres.2013.10.001.
- [147] A. Yamashita *et al.*, "Glycerophosphate/Acylglycerophosphate Acyltransferases," *Biology (Basel)*, vol. 3, no. 4, pp. 801–830, Nov. 2014, doi: 10.3390/biology3040801.
- [148] F. Elinder and S. I. Liin, "Actions and Mechanisms of Polyunsaturated Fatty Acids on Voltage-Gated Ion Channels," *Front. Physiol.*, vol. 8, Feb. 2017, doi: 10.3389/fphys.2017.00043.
- [149] L. Wang *et al.*, "Metabolic Interactions between the Lands Cycle and the Kennedy Pathway of Glycerolipid Synthesis in *Arabidopsis* Developing Seeds," *Plant Cell*, vol. 24, no. 11, pp. 4652–4669, Nov. 2012, doi: 10.1105/tpc.112.104604.
- [150] V. A. Bankaitis, "The Cirque du Soleil of Golgi membrane dynamics," *J. Cell Biol.*, vol. 186, no. 2, pp. 169–171, Jul. 2009, doi: 10.1083/jcb.200907008.
- [151] D. A. Los and N. Murata, "Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1666, no. 1–2, pp. 142–157, Nov. 2004, doi: 10.1016/j.bbamem.2004.08.002.
- [152] K. M. J. H. I. T. H. R. B. O. G. M. Jesper Lemmich, "The effect of cholesterol in small amounts on lipid-bilayer softness in the region of the main phase transition," *Eur. Biophys. J.*, 1997.
- [153] V. A. M. Villar, S. Cuevas, X. Zheng, and P. A. Jose, "Localization and signaling of GPCRs in lipid rafts," in *Methods Cell Biol.*, 2016, pp. 3–23.
- [154] S. R. Wassall and W. Stillwell, "Docosahexaenoic acid domains: the ultimate non-raft membrane domain," *Chem. Phys. Lipids*, vol. 153, no. 1, pp. 57–63, May 2008, doi: 10.1016/j.chemphyslip.2008.02.010.
- [155] S. R. Wassall and W. Stillwell, "Polyunsaturated fatty acid–cholesterol interactions: Domain formation in membranes," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1788, no. 1, pp. 24–32, Jan. 2009, doi: 10.1016/j.bbamem.2008.10.011.
- [156] K. R. Levental *et al.*, "Polyunsaturated Lipids Regulate Membrane Domain Stability by

- Tuning Membrane Order,” *Biophys. J.*, vol. 110, no. 8, pp. 1800–1810, Apr. 2016, doi: 10.1016/j.bpj.2016.03.012.
- [157] W. Stillwell *et al.*, “Docosahexaenoic acid affects cell signaling by altering lipid rafts,” *Reprod. Nutr. Dev.*, vol. 45, no. 5, pp. 559–579, 2005, doi: 10.1051/rnd:2005046i.
- [158] S. R. Shaikh, “Biophysical and biochemical mechanisms by which dietary N-3 polyunsaturated fatty acids from fish oil disrupt membrane lipid rafts,” *J. Nutr. Biochem.*, vol. 23, no. 2, pp. 101–105, Feb. 2012, doi: 10.1016/j.jnutbio.2011.07.001.
- [159] G. R. Ravacci *et al.*, “Lipid raft disruption by docosahexaenoic acid induces apoptosis in transformed human mammary luminal epithelial cells harboring HER-2 overexpression,” *J. Nutr. Biochem.*, vol. 24, no. 3, pp. 505–515, Mar. 2013, doi: 10.1016/j.jnutbio.2012.02.001.
- [160] M. Pinot *et al.*, “Polyunsaturated phospholipids facilitate membrane deformation and fission by endocytic proteins,” *Science (80- )*, vol. 345, no. 6197, pp. 693–697, Aug. 2014, doi: 10.1126/science.1255288.
- [161] M. M. Manni, M. L. Tiberti, S. Pagnotta, H. Lè Ne Barelli, R. Gautier, and B. Antonny, “Acyl chain asymmetry and polyunsaturation of brain phospholipids facilitate membrane vesiculation without leakage,” doi: 10.7554/eLife.34394.001.
- [162] M. L. Tiberti, B. Antonny, and R. Gautier, “The transbilayer distribution of polyunsaturated phospholipids determines their facilitating effect on membrane deformation,” *Soft Matter*, vol. 16, no. 7, pp. 1722–1730, Feb. 2020, doi: 10.1039/c9sm02107h.
- [163] P. S. Sastry, “Lipids of nervous tissue: Composition and metabolism,” *Prog. Lipid Res.*, vol. 24, no. 2, pp. 69–176, Jan. 1985, doi: 10.1016/0163-7827(85)90011-6.
- [164] R. K. McNamara and S. E. Carlson, “Role of omega-3 fatty acids in brain development and function: Potential implications for the pathogenesis and prevention of psychopathology,” *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fat. Acids*, vol. 75, no. 4–5, pp. 329–349, Oct. 2006, doi: 10.1016/j.plefa.2006.07.010.
- [165] C. Joffre, “Polyunsaturated Fatty Acid Metabolism in the Brain and Brain Cells,” in *Feed Your Mind - How Does Nutrition Modulate Brain Function throughout Life?*, IntechOpen, 2019.
- [166] D. Ma *et al.*, “Cellular localization of epidermal-type and brain-type fatty acid-binding proteins in adult hippocampus and their response to cerebral ischemia,” *Hippocampus*, p. NA-NA, 2009, doi: 10.1002/hipo.20682.
- [167] J. Edmond, “Essential Polyunsaturated Fatty Acids and the Barrier to the Brain: The Components of a Model for Transport,” *J. Mol. Neurosci.*, vol. 16, no. 2–3, pp. 181–194, 2001, doi: 10.1385/JMN:16:2-3:181.
- [168] J. A. Hamilton and K. Brunaldi, “A Model for Fatty Acid Transport into the Brain,” *J. Mol. Neurosci.*, vol. 33, no. 1, pp. 12–17, Sep. 2007, doi: 10.1007/s12031-007-0050-3.
- [169] M. Montecillo-Aguado *et al.*, “Importance of the Role of  $\omega$ -3 and  $\omega$ -6 Polyunsaturated Fatty

- Acids in the Progression of Brain Cancer,” *Brain Sci.*, vol. 10, no. 6, p. 381, Jun. 2020, doi: 10.3390/brainsci10060381.
- [170] M. Huan *et al.*, “Suicide attempt and n-3 fatty acid levels in red blood cells: A case control study in china,” *Biol. Psychiatry*, vol. 56, no. 7, pp. 490–496, Oct. 2004, doi: 10.1016/j.biopsych.2004.06.028.
- [171] M. R. Garland *et al.*, “Lipids and essential fatty acids in patients presenting with self-harm,” *Br. J. Psychiatry*, vol. 190, no. 2, pp. 112–117, Feb. 2007, doi: 10.1192/bjp.bp.105.019562.
- [172] R. K. McNamara *et al.*, “Abnormalities in the fatty acid composition of the postmortem orbitofrontal cortex of schizophrenic patients: Gender differences and partial normalization with antipsychotic medications,” *Schizophr. Res.*, vol. 91, no. 1–3, pp. 37–50, Mar. 2007, doi: 10.1016/j.schres.2006.11.027.
- [173] R. K. McNamara *et al.*, “Deficits in docosahexaenoic acid and associated elevations in the metabolism of arachidonic acid and saturated fatty acids in the postmortem orbitofrontal cortex of patients with bipolar disorder,” *Psychiatry Res.*, vol. 160, no. 3, pp. 285–299, Sep. 2008, doi: 10.1016/j.psychres.2007.08.021.
- [174] R. K. McNamara *et al.*, “Selective Deficits in the Omega-3 Fatty Acid Docosahexaenoic Acid in the Postmortem Orbitofrontal Cortex of Patients with Major Depressive Disorder,” *Biol. Psychiatry*, vol. 62, no. 1, pp. 17–24, Jul. 2007, doi: 10.1016/j.biopsych.2006.08.026.
- [175] S.-W. Kim *et al.*, “Relationship between Erythrocyte Fatty Acid Composition and Psychopathology in the Vienna Omega-3 Study,” *PLoS One*, vol. 11, no. 3, p. e0151417, Mar. 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0151417.
- [176] M. P. Freeman and M. H. Rapaport, “Omega-3 Fatty Acids and Depression: From Cellular Mechanisms to Clinical Care,” *J. Clin. Psychiatry*, vol. 72, no. 02, pp. 258–259, Feb. 2011, doi: 10.4088/JCP.11ac06830.
- [177] H. Braarud *et al.*, “Maternal DHA Status during Pregnancy Has a Positive Impact on Infant Problem Solving: A Norwegian Prospective Observation Study,” *Nutrients*, vol. 10, no. 5, p. 529, Apr. 2018, doi: 10.3390/nu10050529.
- [178] E. M. Loomans, B. R. H. Van den Bergh, M. Schelling, T. G. M. Vrijkotte, and M. van Eijsden, “Maternal Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acid Status during Early Pregnancy and Children’s Risk of Problem Behavior at Age 5-6 Years,” *J. Pediatr.*, vol. 164, no. 4, pp. 762–768, Apr. 2014, doi: 10.1016/j.jpeds.2013.11.069.
- [179] I. Fedorova and N. Salem, “Omega-3 fatty acids and rodent behavior,” *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fat. Acids*, vol. 75, no. 4–5, pp. 271–289, Oct. 2006, doi: 10.1016/j.plefa.2006.07.006.
- [180] S.-Y. Lim, J. Hoshiba, T. Moriguchi, and N. Salem, “N-3 Fatty Acid Deficiency Induced by a Modified Artificial Rearing Method Leads to Poorer Performance in Spatial Learning Tasks,” *Pediatr. Res.*, vol. 58, no. 4, pp. 741–748, Oct. 2005, doi:

10.1203/01.PDR.0000180547.46725.CC.

- [181] F. Ducrocq *et al.*, "Causal Link between n-3 Polyunsaturated Fatty Acid Deficiency and Motivation Deficits," *Cell Metab.*, Mar. 2020, doi: 10.1016/j.cmet.2020.02.012.
- [182] J. E. Mellor, J. D. E. Laugharne, and M. Peet, "Schizophrenic symptoms and dietary intake of n-3 fatty acids," *Schizophr. Res.*, vol. 18, no. 1, pp. 85–86, Dec. 1995, doi: 10.1016/0920-9964(95)00084-4.
- [183] G. P. Amminger *et al.*, "Long-Chain  $\omega$ -3 Fatty Acids for Indicated Prevention of Psychotic Disorders," *Arch. Gen. Psychiatry*, vol. 67, no. 2, p. 146, Feb. 2010, doi: 10.1001/archgenpsychiatry.2009.192.
- [184] A. T. Chen, J. T. Chibnall, and H. A. Nasrallah, "A meta-analysis of placebo-controlled trials of omega-3 fatty acid augmentation in schizophrenia: Possible stage-specific effects.," *Ann. Clin. Psychiatry*, vol. 27, no. 4, pp. 289–96, Nov. 2015.
- [185] M. E. Sublette, S. P. Ellis, A. L. Geant, and J. J. Mann, "Meta-Analysis of the Effects of Eicosapentaenoic Acid (EPA) in Clinical Trials in Depression," *J. Clin. Psychiatry*, vol. 72, no. 12, pp. 1577–1584, Dec. 2011, doi: 10.4088/JCP.10m06634.
- [186] G. Grosso *et al.*, "Role of Omega-3 Fatty Acids in the Treatment of Depressive Disorders: A Comprehensive Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials," *PLoS One*, vol. 9, no. 5, p. e96905, May 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0096905.
- [187] S. Jazayeri *et al.*, "Comparison of Therapeutic Effects of Omega-3 Fatty Acid Eicosapentaenoic Acid and Fluoxetine, Separately and in Combination, in Major Depressive Disorder," *Aust. New Zeal. J. Psychiatry*, vol. 42, no. 3, pp. 192–198, Mar. 2008, doi: 10.1080/00048670701827275.
- [188] L. Gertsik, R. E. Poland, C. Bresee, and M. H. Rapaport, "Omega-3 Fatty Acid Augmentation of Citalopram Treatment for Patients With Major Depressive Disorder," *J. Clin. Psychopharmacol.*, vol. 32, no. 1, pp. 61–64, Feb. 2012, doi: 10.1097/JCP.0b013e31823f3b5f.
- [189] D. C. Mitchell, S. L. Niu, and B. J. Litman, "DHA-rich phospholipids optimize G-protein-coupled signaling," in *Journal of Pediatrics*, 2003, vol. 143, no. 4 SUPPL., doi: 10.1067/s0022-3476(03)00405-0.
- [190] D. C. Mitchell, S.-L. Niu, and B. J. Litman, "Enhancement of G Protein-Coupled Signaling by DHA Phospholipids," 2003.
- [191] B. J. Litman, S. L. Niu, A. Polozova, and D. C. Mitchell, "The role of docosahexaenoic acid containing phospholipids in modulating G protein-coupled signaling pathways: Visual transduction," *J. Mol. Neurosci.*, vol. 16, no. 2–3, pp. 237–242, 2001, doi: 10.1385/JMN:16:2-3:237.
- [192] D. C. Mitchell, S. L. Niu, and B. J. Litman, "Quantifying the differential effects of DHA and DPA on the early events in visual signal transduction," in *Chemistry and Physics of Lipids*,

- May 2012, vol. 165, no. 4, pp. 393–400, doi: 10.1016/j.chemphyslip.2012.02.008.
- [193] D. C. Mitchell, M. Straume, and B. J. Litman, “Role of sn-1-Saturated,sn-2-Polyunsaturated Phospholipids in Control of Membrane Receptor Conformational Equilibrium: Effects of Cholesterol and Acyl Chain Unsaturation on the Metarhodopsin I-Metarhodopsin II Equilibrium,” 1992. [Online]. Available: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>.
- [194] B. J. Litman and D. C. Mitchell, “A role for phospholipid polyunsaturation in modulating membrane protein function,” *Lipids*, vol. 31, no. 3 SUPPL., 1996, doi: 10.1007/bf02637075.
- [195] S. L. Niu *et al.*, “Reduced G protein-coupled signaling efficiency in retinal rod outer segments in response to n-3 fatty acid deficiency,” *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 30, pp. 31098–31104, Jul. 2004, doi: 10.1074/jbc.M404376200.
- [196] B. Jastrzebska, A. Debinski, S. Filipek, and K. Palczewski, “Role of membrane integrity on G protein-coupled receptors: Rhodopsin stability and function,” *Progress in Lipid Research*, vol. 50, no. 3, pp. 267–277, Jul. 2011, doi: 10.1016/j.plipres.2011.03.002.
- [197] A. Grossfield, S. E. Feller, and M. C. Pitman, “A role for direct interactions in the modulation of rhodopsin by-3 polyunsaturated lipids,” 2006. [Online]. Available: [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0508352103](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0508352103).
- [198] J. N. Horn, T.-C. Kao, and A. Grossfield, “Coarse-Grained Molecular Dynamics Provides Insight into the Interactions of Lipids and Cholesterol with Rhodopsin,” 2014, pp. 75–94.
- [199] O. Soubias, W. E. Teague, and K. Gawrisch, “Evidence for specificity in lipid-rhodopsin interactions,” *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 44, pp. 33233–33241, Nov. 2006, doi: 10.1074/jbc.M603059200.
- [200] M. Lafourcade *et al.*, “Nutritional Omega-3 deficiency abolishes endocannabinoid mediated neuronal functions Omega-3 deficiency abolishes endocannabinoid mediated neuronal functions,” *Nat. Neurosci.*, vol. 14, no. 3, 2011, doi: 10.1038/nn.2736i.
- [201] S. S. Naughton, M. L. Mathai, D. H. Hryciw, and A. J. McAinch, “Fatty acid modulation of the endocannabinoid system and the effect on food intake and metabolism,” *International Journal of Endocrinology*, vol. 2013, 2013, doi: 10.1155/2013/361895.
- [202] R. Guixà-González *et al.*, “Membrane omega-3 fatty acids modulate the oligomerisation kinetics of adenosine A2A and dopamine D2 receptors,” *Sci. Rep.*, vol. 6, Jan. 2016, doi: 10.1038/srep19839.
- [203] T. Mizumura *et al.*, “Activation of adenosine A 2A receptor by lipids from docosahexaenoic acid revealed by NMR,” 2020. [Online]. Available: <https://www.science.org>.
- [204] F. S. G. Silva, I. G. Starostina, V. V. Ivanova, A. A. Rizvanov, P. J. Oliveira, and S. P. Pereira, “Determination of metabolic viability and cell mass using a tandem resazurin/sulforhodamine B assay,” *Curr. Protoc. Toxicol.*, vol. 2016, pp. 1–15, May 2016, doi: 10.1002/cptx.1.
- [205] Y. Tang *et al.*, “Identification of the endophilins (SH3p4p8p13) as novel binding partners for

- the 1-adrenergic receptor.” [Online]. Available: [www.pnas.org](http://www.pnas.org).
- [206] S. Sposini and A. C. Hanyaloglu, “Spatial encryption of G protein-coupled receptor signaling in endosomes; Mechanisms and applications,” *Biochemical Pharmacology*, vol. 143. Elsevier Inc., pp. 1–9, Nov. 01, 2017, doi: 10.1016/j.bcp.2017.04.028.
- [207] V. A. Jabtojiski in Warschau, “-er den Mechanismus der Photolumineszenz von Farbstoffphosphoren.”
- [208] C. Hoffmann, A. Zürn, M. Bünemann, and M. J. Lohse, “Conformational changes in G-protein-coupled receptors - The quest for functionally selective conformations is open,” in *British Journal of Pharmacology*, Mar. 2008, vol. 153, no. SUPPL. 1, doi: 10.1038/sj.bjp.0707615.
- [209] M. J. Lohse, V. O. Nikolaev, P. Hein, C. Hoffmann, J. P. Vilaridaga, and M. Bünemann, “Optical techniques to analyze real-time activation and signaling of G-protein-coupled receptors,” *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 29, no. 3. Elsevier Ltd, pp. 159–165, 2008, doi: 10.1016/j.tips.2007.12.002.
- [210] M. J. Lohse, S. Nuber, and C. Hoffmann, “Fluorescence/bioluminescence resonance energy transfer techniques to study g-protein-coupled receptor activation and signaling,” *Pharmacological Reviews*, vol. 64, no. 2. pp. 299–336, Apr. 2012, doi: 10.1124/pr.110.004309.
- [211] S. Angers *et al.*, “Detection of 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET),” *PNAS*, 2000. [Online]. Available: [www.pnas.orgcgidoi10.1073pnas.060590697](http://www.pnas.orgcgidoi10.1073pnas.060590697).
- [212] L. Stryer, “FLUORESCENCE ENERGY TRANSFER AS A SPECTROSCOPIC RULERI.” [Online]. Available: [www.annualreviews.org](http://www.annualreviews.org).
- [213] A. Kaur, P. Kaur, and S. Ahuja, “Förster resonance energy transfer (FRET) and applications thereof,” *Analytical Methods*, vol. 12, no. 46. Royal Society of Chemistry, pp. 5532–5550, Dec. 14, 2020, doi: 10.1039/d0ay01961e.
- [214] M. Cottet *et al.*, “BRET and time-resolved FRET strategy to study GPCR oligomerization: From cell lines toward native tissues,” *Frontiers in Endocrinology*, vol. 3, no. JUL. 2012, doi: 10.3389/fendo.2012.00092.
- [215] A. Keppler, S. Gendreizig, T. Gronemeyer, H. Pick, H. Vogel, and K. Johnsson, “A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules in vivo,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 21, no. 1, pp. 86–89, Jan. 2003, doi: 10.1038/nbt765.
- [216] A. Levoye *et al.*, “A broad G protein-coupled receptor internalization assay that combines SNAP-tag labeling, diffusion-enhanced resonance energy transfer, and a highly emissive terbium cryptate,” *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, vol. 6, no. NOV, 2015, doi: 10.3389/fendo.2015.00167.
- [217] Marvin Minsky, “Microscopy apparatus,” *US Pat.*, 1957.



- [218] W. B. Amos, J. G. White, and M. Fordham, "Use of confocal imaging in the study of biological structures," 1987.
- [219] J. Oreopoulos, R. Berman, and M. Browne, "Spinning-disk confocal microscopy. present technology and future trends," in *Methods in Cell Biology*, vol. 123, Academic Press Inc., 2014, pp. 153–175.
- [220] K. N. Fish, "Total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy," *Current Protocols in Cytometry*, no. SUPPL.50. John Wiley and Sons Inc., 2009, doi: 10.1002/0471142956.cy1218s50.
- [221] A. L. Mattheyses, S. M. Simon, and J. Z. Rappoport, "Imaging with total internal reflection fluorescence microscopy for the cell biologist," *Journal of Cell Science*, vol. 123, no. 21. pp. 3621–3628, Nov. 01, 2010, doi: 10.1242/jcs.056218.
- [222] S. Sposini, M. Rosendale, L. Claverie, T. N. N. Van, D. Jullié, and D. Perrais, "Imaging endocytic vesicle formation at high spatial and temporal resolutions with the pulsed-pH protocol," *Nat. Protoc.*, vol. 15, no. 9, pp. 3088–3104, Sep. 2020, doi: 10.1038/s41596-020-0371-z.
- [223] T. J. Crites, L. Chen, and R. Varma, "A TIRF microscopy technique for real-time, simultaneous imaging of the TCR and its associated signaling proteins.," *J. Vis. Exp.*, no. 61, 2012, doi: 10.3791/3892.
- [224] Joseph R Lakowicz, "Principles of Fluorescence Spectroscopy," *springer Sci.*, 2006.
- [225] Y. Verwey, J. G. Th, T. of, G. Weber, and F. J. Farris, "Nature (London) 190, 779," Wiley, 1976. [Online]. Available: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>.
- [226] K. Scheinpflug, O. Krylova, and H. Strahl, "Measurement of cell membrane fluidity by Laurdan GP: Fluorescence spectroscopy and microscopy," in *Methods in Molecular Biology*, vol. 1520, Humana Press Inc., 2017, pp. 159–174.
- [227] S. Hofstetter, C. Denter, R. Winter, L. M. McMullen, and M. G. Gänzle, "Use of the fluorescent probe LAURDAN to label and measure inner membrane fluidity of endospores of *Clostridium* spp.," *J. Microbiol. Methods*, vol. 91, no. 1, pp. 93–100, Oct. 2012, doi: 10.1016/j.mimet.2012.07.023.
- [228] M. Wenzel, N. Vischer, H. Strahl, and L. Hamoen, "Assessing Membrane Fluidity and Visualizing Fluid Membrane Domains in Bacteria Using Fluorescent Membrane Dyes," *BIO-PROTOCOL*, vol. 8, no. 20, 2018, doi: 10.21769/bioprotoc.3063.
- [229] Banwell CN, "Fundamentals of Molecular Spectroscopy: McGraw-Hill Book company(UK) limited; 1972."
- [230] M. Scherman, J. Barros, R. Santagata, A. Bresson, and B. Attal-Tretout, "Thermométrie Raman cohérente pour l'étude de la combustion," *Photoniques*, no. 96, pp. 23–29, May 2019, doi: 10.1051/photon/20199623.
- [231] A. C. S. Talari, Z. Movasaghi, S. Rehman, and I. U. Rehman, "Raman spectroscopy of

- biological tissues,” *Applied Spectroscopy Reviews*, vol. 50, no. 1. Taylor and Francis Inc., pp. 46–111, Jan. 02, 2015, doi: 10.1080/05704928.2014.923902.
- [232] L. Wei *et al.*, “Live-cell imaging of alkyne-tagged small biomolecules by stimulated Raman scattering,” *Nat. Methods*, vol. 11, no. 4, pp. 410–412, 2014, doi: 10.1038/nmeth.2878.
- [233] R. Mendelsohn and C. C. Koch, “Deuterated phospholipids as Raman spectroscopic probes of membrane structure phase diagrams for the dipalmitoyl phosphatidylcholine (and its d62 derivative)-dipalmitoyl phosphatidylethanolamine system,” 1980.
- [234] H. Wu, J. V. Volponi, A. E. Oliver, A. N. Parikh, B. A. Simmons, and S. Singh, “In vivo lipidomics using single-cell Raman spectroscopy,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, no. 9, pp. 3809–3814, Mar. 2011, doi: 10.1073/pnas.1009043108.
- [235] V. De Smedt-Peyrusse, F. Sargueil, A. Moranis, H. Harizi, S. Mongrand, and S. Layé, “Docosahexaenoic acid prevents lipopolysaccharide-induced cytokine production in microglial cells by inhibiting lipopolysaccharide receptor presentation but not its membrane subdomain localization,” *J. Neurochem.*, vol. 105, no. 2, pp. 296–307, 2008, doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.05129.x.
- [236] N. G. Bazan and B. L. Scott, “Dietary omega-3 fatty acids and accumulation of docosahexaenoic acid in rod photoreceptor cells of the retina and at synapses,” *Ups. J. Med. Sci. Suppl.*, vol. 48, p. 97–107, 1990, [Online]. Available: <http://europepmc.org/abstract/MED/2150242>.
- [237] M. Martínez and I. Mougan, “Fatty Acid Composition of Human Brain Phospholipids During Normal Development,” *J. Neurochem.*, vol. 71, no. 6, pp. 2528–2533, Nov. 2002, doi: 10.1046/j.1471-4159.1998.71062528.x.
- [238] F. M. Harris, K. B. Best, and J. D. Bell, “Use of laurdan fluorescence intensity and polarization to distinguish between changes in membrane fluidity and phospholipid order,” 2002. [Online]. Available: [www.bba-direct.com](http://www.bba-direct.com).
- [239] T. Parasassi, E. K. Krasnowska, L. Bagatolli, and E. Gratton, “Laurdan and Prodan as Polarity-Sensitive Fluorescent Membrane Probes,” *J. Fluoresc.*, vol. 8, no. 4, pp. 365–373, 1998, doi: 10.1023/A:1020528716621.
- [240] V. Baeten, P. Hourant, M. T. Morales, and R. Aparicio, “Oil and Fat Classification by FT-Raman Spectroscopy,” 1998. [Online]. Available: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>.
- [241] K. Majzner, S. Tott, L. Roussille, V. Deckert, S. Chlopicki, and M. Baranska, “Uptake of fatty acids by a single endothelial cell investigated by Raman spectroscopy supported by AFM,” *Analyst*, vol. 143, no. 4, pp. 970–980, Feb. 2018, doi: 10.1039/c7an01043e.
- [242] O. Samek *et al.*, “Raman microspectroscopy of individual algal cells: Sensing unsaturation of storage lipids in vivo,” *Sensors*, vol. 10, no. 9, pp. 8635–8651, Sep. 2010, doi: 10.3390/s100908635.
- [243] H. Rosales-Solano, V. Galievsky, K. Murtada, P. V. Radovanovic, and J. Pawliszyn,

- “Profiling of Unsaturated Lipids by Raman Spectroscopy Directly on Solid-Phase Microextraction Probes,” *Anal. Chem.*, vol. 94, no. 2, pp. 606–611, Jan. 2022, doi: 10.1021/acs.analchem.1c04054.
- [244] M. Amaro, F. Reina, M. Hof, C. Eggeling, and E. Sezgin, “Laurdan and Di-4-ANEPPDHQ probe different properties of the membrane,” *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 50, no. 13, Mar. 2017, doi: 10.1088/1361-6463/aa5dbc.
- [245] W. Yu, P. T. So, T. French, and E. Gratton, “Fluorescence generalized polarization of cell membranes: a two-photon scanning microscopy approach.,” *Biophys. J.*, vol. 70, no. 2, pp. 626–36, Feb. 1996, doi: 10.1016/S0006-3495(96)79646-7.
- [246] X. Yang, W. Sheng, G. Y. Sun, and J. C. M. Lee, “Effects of fatty acid unsaturation numbers on membrane fluidity and  $\alpha$ -secretase-dependent amyloid precursor protein processing,” *Neurochem. Int.*, vol. 58, no. 3, pp. 321–329, Feb. 2011, doi: 10.1016/j.neuint.2010.12.004.
- [247] J. E. Vance, “Phospholipid Synthesis and Transport in Mammalian Cells,” *Traffic*, vol. 16, no. 1. Blackwell Munksgaard, pp. 1–18, Jan. 01, 2015, doi: 10.1111/tra.12230.
- [248] J. I. S. MacDonald and H. Sprecher, “Phospholipid fatty acid remodeling in mammalian cells,” *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.*, vol. 1084, no. 2, pp. 105–121, Jul. 1991, doi: 10.1016/0005-2760(91)90209-Z.
- [249] E. Soupene, H. Fyrst, and F. A. Kuypers, “Mammalian acyl-CoA:lysophosphatidylcholine acyltransferase enzymes,” 2007. [Online]. Available: [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0709737104](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0709737104).
- [250] M. Eto, H. Shindou, S. Yamamoto, M. Tamura-Nakano, and T. Shimizu, “Lysophosphatidylethanolamine acyltransferase 2 (LPEAT2) incorporates DHA into phospholipids and has possible functions for fatty acid-induced cell death,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 526, no. 1, pp. 246–252, May 2020, doi: 10.1016/j.bbrc.2020.03.074.
- [251] J. Cao *et al.*, “Molecular identification of a novel mammalian brain isoform of acyl-CoA:Lysophospholipid acyltransferase with prominent ethanolamine lysophospholipid acylating activity, LPEAT2,” *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 27, pp. 19049–19057, Jul. 2008, doi: 10.1074/jbc.M800364200.
- [252] D. Hishikawa, H. Shindou, S. Kobayashi, H. Nakanishi, R. Taguchi, and T. Shimizu, “Discovery of a lysophospholipid acyltransferase family essential for membrane asymmetry and diversity,” 2008. [Online]. Available: [www.pnas.org/cgi/content/full/](http://www.pnas.org/cgi/content/full/).
- [253] Jos A. F. Op Den Kamp, “LIPID ASYMMETRY IN MEMBRANES,” *Annu. Rev. Biochem.*, 1979.
- [254] Y. Posor, M. Eichhorn-Grünig, and V. Haucke, “Phosphoinositides in endocytosis,” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, vol. 1851, no. 6. Elsevier B.V., pp. 794–804, 2015, doi: 10.1016/j.bbalip.2014.09.014.

- [255] B. L. Wolfe and J. A. Trejo, "Clathrin-dependent mechanisms of G protein-coupled receptor endocytosis," *Traffic*, vol. 8, no. 5, pp. 462–470, May 2007, doi: 10.1111/j.1600-0854.2007.00551.x.
- [256] P. J. Bosch *et al.*, "Evaluation of fluorophores to label SNAP-Tag fused proteins for multicolor single-molecule tracking microscopy in live cells," *Biophys. J.*, vol. 107, no. 4, pp. 803–814, Aug. 2014, doi: 10.1016/j.bpj.2014.06.040.
- [257] K. M. Kim, K. J. Valenzano, S. R. Robinson, W. D. Yao, L. S. Barak, and M. G. Caron, "Differential Regulation of the Dopamine D2 and D3 Receptors by G Protein-coupled Receptor Kinases and  $\beta$ -Arrestins," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 40, pp. 37409–37414, Oct. 2001, doi: 10.1074/jbc.M106728200.
- [258] P. Heusler, A. Newman-Tancredi, T. Looock, and D. Cussac, "Antipsychotics differ in their ability to internalise human dopamine D2S and human serotonin 5-HT1A receptors in HEK293 cells," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 581, no. 1–2, pp. 37–46, Feb. 2008, doi: 10.1016/j.ejphar.2007.11.046.
- [259] R. H. Oakley, S. A. Laporte, J. A. Holt, M. G. Caron, and L. S. Barak, "Differential affinities of visual arrestin,  $\beta$ arrestin1, and  $\beta$ arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 22, pp. 17201–17210, Jun. 2000, doi: 10.1074/jbc.M910348199.
- [260] J. L. Goggi, A. Sardini, A. Egerton, P. G. Strange, and P. M. Grasby, "Agonist-dependent internalization of D2 receptors: Imaging quantification by confocal microscopy," *Synapse*, vol. 61, no. 4, pp. 231–241, Apr. 2007, doi: 10.1002/syn.20360.
- [261] L. de Vries, F. Finana, C. Cathala, B. Ronsin, and D. Cussac, "Innovative bioluminescence resonance energy transfer assay reveals differential agonist-induced D2 receptor intracellular trafficking and arrestin-3 recruitment," *Mol. Pharmacol.*, vol. 96, no. 3, pp. 308–319, Sep. 2019, doi: 10.1124/mol.119.115998.
- [262] J. D. Urban, G. A. Vargas, M. Von Zastrow, and R. B. Mailman, "Aripiprazole has functionally selective actions at dopamine D2 receptor-mediated signaling pathways," *Neuropsychopharmacology*, vol. 32, no. 1, pp. 67–77, Jan. 2007, doi: 10.1038/sj.npp.1301071.
- [263] E. W. Tuplin and M. R. Holahan, "Aripiprazole, A Drug that Displays Partial Agonism and Functional Selectivity," *Curr. Neuropharmacol.*, vol. 15, no. 8, Apr. 2017, doi: 10.2174/1570159x15666170413115754.
- [264] B. Masri *et al.*, "Antagonism of dopamine D2 receptor/ $\beta$ -arrestin 2 interaction is a common property of clinically effective antipsychotics," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 36, pp. 13656–13661, Sep. 2008, doi: 10.1073/pnas.0803522105.
- [265] S. N. Roed *et al.*, "Real-time trafficking and signaling of the glucagon-like peptide-1 receptor," *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 382, no. 2, pp. 938–949, 2014, doi:

- 10.1016/j.mce.2013.11.010.
- [266] D. Thompson and J. L. Whistler, "Dopamine D3 receptors are down-regulated following heterologous endocytosis by a specific interaction with G protein-coupled receptor-associated sorting protein-1," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 2, pp. 1598–1608, Jan. 2011, doi: 10.1074/jbc.M110.158345.
- [267] S. Aringhieri *et al.*, "Molecular targets of atypical antipsychotics: From mechanism of action to clinical differences," *Pharmacology and Therapeutics*, vol. 192. Elsevier Inc., pp. 20–41, Dec. 01, 2018, doi: 10.1016/j.pharmthera.2018.06.012.
- [268] J. A. Allen *et al.*, "Discovery of  $\beta$ -arrestin-biased dopamine D 2 ligands for probing signal transduction pathways essential for antipsychotic efficacy," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, no. 45, pp. 18488–18493, Nov. 2011, doi: 10.1073/pnas.1104807108.
- [269] M. Johnson, "Beta2 -adrenoceptors: Mechanisms of action of beta2-agonists," *Paediatr. Respir. Rev.*, vol. 2, no. 1, pp. 57–62, 2001, doi: 10.1053/prrv.2000.0102.
- [270] L. Hertz, D. Lovatt, S. A. Goldman, and M. Nedergaard, "Adrenoceptors in brain: Cellular gene expression and effects on astrocytic metabolism and  $[Ca^{2+}]_i$ ," *Neurochem. Int.*, vol. 57, no. 4, pp. 411–420, Nov. 2010, doi: 10.1016/j.neuint.2010.03.019.
- [271] O. BRODDEt Biochemisches Forschungslobor, "Beta 1- and beta 2-adrenoceptors in the human heart: properties, function, and alterations in chronic heart failure."
- [272] W. P. Hausdorffs, M. Bouvier\$, B. F. O'dowd, G. P. Irons, M. G. Caron, and R. J. Lefkowitz, "Phosphorylation Sites on Two Domains of the  $\beta$ -Adrenergic Receptor Are Involved in Distinct Pathways of Receptor Desensitization," 1989.
- [273] A. Ruiz-Gó Mez and F. Mayor, "Adrenergic Receptor Kinase (GRK2) Colocalizes with-Adrenergic Receptors during Agonist-induced Receptor Internalization\*," 1997. [Online]. Available: <http://www-jbc.stanford.edu/jbc/>.
- [274] A. Jie Zhang, Larry S. Barak, Pieter H. Anborgh, Stephane A. Laporte, Marc G. Caron and S. S. G. Ferguson, "Cellular trafficking of G protein-coupled receptor beta-arrestin endocytic complexes."
- [275] O. B. Goodman *et al.*, " $\beta$ -Arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor," *Nature*, vol. 383, no. 6599, pp. 447–450, Oct. 1996, doi: 10.1038/383447a0.
- [276] E. Toraih, M. H. Hussein, and A. El-Serafi, "Beta2-Adrenergic Receptor Gene Haplotypes in Chronic Obstructive Pulmonary Disease," 2015. [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/302549208>.
- [277] M. Bouvier, "The  $\beta_2$ -adrenergic receptor a model for studying the molecular mechanisms of GPCRs desensitization," *Med. Sci.*, 1995.
- [278] J. Shonberg, R. C. Kling, P. Gmeiner, and S. Löber, "GPCR crystal structures: Medicinal chemistry in the pocket," *Bioorganic Med. Chem.*, vol. 23, no. 14, pp. 3880–3906, Jun.

- 2015, doi: 10.1016/j.bmc.2014.12.034.
- [279] R. Dawaliby *et al.*, "Allosteric regulation of G protein-coupled receptor activity by phospholipids," *Nat. Chem. Biol.*, vol. 12, no. 1, pp. 35–39, Jan. 2016, doi: 10.1038/nchembio.1960.
- [280] M. Manna *et al.*, "Mechanism of allosteric regulation of  $\beta$ 2-adrenergic receptor by cholesterol," *Elife*, vol. 5, no. NOVEMBER2016, Nov. 2016, doi: 10.7554/eLife.18432.001.
- [281] H. Ta *et al.*, "Mapping molecules in scanning far-field fluorescence nanoscopy," *Nat. Commun.*, vol. 6, Aug. 2015, doi: 10.1038/ncomms8977.
- [282] C. L. Hershberger *et al.*, "A Cloned Gene for Human Transferrin," *Ann N Y Acad Sci*, 1996.
- [283] K. M. Mayle, A. M. Le, and D. T. Kamei, "The intracellular trafficking pathway of transferrin," *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, vol. 1820, no. 3. pp. 264–281, Mar. 2012, doi: 10.1016/j.bbagen.2011.09.009.
- [284] R. M. Graham *et al.*, "Liver iron transport," *World J Gastroenterol*, vol. 13, no. 35, pp. 4725–4736, 2007, [Online]. Available: [www.wjgnet.com/http://www.wjgnet.com/1007-9327/13/4725.asp](http://www.wjgnet.com/http://www.wjgnet.com/1007-9327/13/4725.asp).
- [285] Y. Cheng, O. Zak, P. Aisen, S. C. Harrison, and T. Walz, "Structure of the Human Transferrin Receptor-Transferrin Complex and distributing iron. In vertebrates, iron is transported in the serum bound to transferrin (Tf), which also delivers it to cells using an endocytotic pathway involving the," 2004. [Online]. Available: [www.cell.com/cgi/content/full/116/4/565/DC1](http://www.cell.com/cgi/content/full/116/4/565/DC1).
- [286] E. Gammella, P. Buratti, G. Cairo, and S. Recalcati, "The transferrin receptor: The cellular iron gate," *Metallomics*, vol. 9, no. 10. Royal Society of Chemistry, pp. 1367–1375, Oct. 01, 2017, doi: 10.1039/c7mt00143f.
- [287] S. L. Niu *et al.*, "Reduced G protein-coupled signaling efficiency in retinal rod outer segments in response to n-3 fatty acid deficiency," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 30, pp. 31098–31104, Jul. 2004, doi: 10.1074/jbc.M404376200.
- [288] K. A. N. Wang, "Contribution of Serine Residues to Constitutive and Agonist-Induced Signaling via the D 2S Dopamine Receptor: Evidence for Multiple, Agonist-Specific Active Conformations," Hwa and Perez, 1989. [Online]. Available: <http://www.molpharm.org>.
- [289] P. Ghanouni *et al.*, "Functionally Different Agonists Induce Distinct Conformations in the G Protein Coupling Domain of the  $\beta$ 2 Adrenergic Receptor," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 27, pp. 24433–24436, Jul. 2001, doi: 10.1074/jbc.C100162200.
- [290] G. Swaminath, Y. Xiang, T. W. Lee, J. Steenhuis, C. Parnot, and B. K. Kobilka, "Sequential binding of agonists to the  $\beta$ 2 adrenoceptor. Kinetic evidence for intermediate conformational states," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 1, pp. 686–691, Jan. 2004, doi: 10.1074/jbc.M310888200.
- [291] A. Beghin *et al.*, "Localization-based super-resolution imaging meets high-content

- screening,” *Nat. Methods*, vol. 14, no. 12, pp. 1184–1190, Dec. 2017, doi: 10.1038/nmeth.4486.
- [292] S. Granier *et al.*, “Structure and conformational changes in the C-terminal domain of the  $\beta$ 2-adrenoceptor: Insights from fluorescence resonance energy transfer studies,” *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 18, pp. 13895–13905, May 2007, doi: 10.1074/jbc.M611904200.
- [293] S. Granier, S. Kim, J. J. Fung, M. P. Bokoch, and C. Parnot, “FRET-based measurement of GPCR conformational changes,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 552, pp. 253–268, 2009, doi: 10.1007/978-1-60327-317-6\_18.
- [294] R. H. Oakley, S. A. Laporte, J. A. Holt, M. G. Caron, and L. S. Barak, “Differential affinities of visual arrestin,  $\beta$ arrestin1, and  $\beta$ arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors,” *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 22, pp. 17201–17210, Jun. 2000, doi: 10.1074/jbc.M910348199.
- [295] N. R. Orem, L. Xia, and P. J. Dolph, “An essential role for endocytosis of rhodopsin through interaction of visual arrestin with the AP-2 adaptor,” *J. Cell Sci.*, vol. 119, no. 15, pp. 3141–3148, Aug. 2006, doi: 10.1242/jcs.03052.
- [296] D. S. Kang, X. Tian, and J. L. Benovic, “Role of  $\beta$ -arrestins and arrestin domain-containing proteins in G protein-coupled receptor trafficking,” *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 27, no. 1, pp. 63–71, Apr. 2014, doi: 10.1016/j.ceb.2013.11.005.
- [297] H. Lan, Y. Liu, M. I. Bell, V. V. Gurevich, and K. A. Neve, “A dopamine D2 receptor mutant capable of G protein-mediated signaling but deficient in arrestin binding,” *Mol. Pharmacol.*, vol. 75, no. 1, pp. 113–123, Jan. 2009, doi: 10.1124/mol.108.050534.
- [298] C. C. Clayton, P. Donthamsetti, N. A. Lambert, J. A. Javitch, and K. A. Neve, “Mutation of three residues in the third intracellular loop of the dopamine D2 receptor creates an internalization-defective receptor,” *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 48, pp. 33663–33675, Nov. 2014, doi: 10.1074/jbc.M114.605378.
- [299] S. A. Laporte, R. H. Oakley, J. A. Holt, L. S. Barak, and M. G. Caron, “The interaction of  $\beta$ -arrestin with the AP-2 adaptor is required for the clustering of  $\beta$ 2-adrenergic receptor into clathrin-coated pits,” *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 30, pp. 23120–23126, Jul. 2000, doi: 10.1074/jbc.M002581200.
- [300] M. G. H. Scott, A. Benmerah, O. Muntaner, and S. Marullo, “Recruitment of activated G protein-coupled receptors to pre-existing clathrin-coated pits in living cells,” *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 5, pp. 3552–3559, Feb. 2002, doi: 10.1074/jbc.M106586200.
- [301] F. Santini, I. Gaidarov, and J. H. Keen, “G protein-coupled receptor/arrestin3 modulation of the endocytic machinery,” *J. Cell Biol.*, vol. 156, no. 4, pp. 665–676, Feb. 2002, doi: 10.1083/jcb.200110132.
- [302] C. C. M. Lally, B. Bauer, J. Selent, and M. E. Sommer, “C-edge loops of arrestin function as a membrane anchor,” *Nat. Commun.*, vol. 8, Feb. 2017, doi: 10.1038/ncomms14258.

- [303] I. V. Klewe *et al.*, "Recruitment of  $\beta$ -arrestin2 to the dopamine D2 receptor: Insights into anti-psychotic and anti-parkinsonian drug receptor signaling," *Neuropharmacology*, vol. 54, no. 8, pp. 1215–1222, Jun. 2008, doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.03.015.
- [304] M. Scarselli, P. Annibale, and A. Radenovic, "Cell type-specific  $\beta$ 2-adrenergic receptor clusters identified using photoactivated localization microscopy are not lipid raft related, but depend on actin cytoskeleton integrity," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 20, pp. 16768–16780, May 2012, doi: 10.1074/jbc.M111.329912.
- [305] V. V. Gurevich and J. L. Benovic, "Visual Arrestin Binding to Rhodopsin," *J. Biol. Chem.*, vol. 270, no. 11, pp. 6010–6016, Mar. 1995, doi: 10.1074/jbc.270.11.6010.
- [306] M. Kamal, M. Marquez, V. Vauthier, A. Leloire, P. Froguel, and R. Jockers, "Improved donor/acceptor BRET couples for monitoring  $\beta$ -arrestin recruitment to G protein-coupled receptors," *Biotechnol. J.*, vol. 4, no. 9, pp. 1337–1344, 2009, doi: 10.1002/biot.200900016.
- [307] M. Kocan and K. D. G. Pflieger, "Detection of GPCR/beta-arrestin interactions in live cells using bioluminescence resonance energy transfer technology.," *Methods Mol. Biol.*, vol. 552, pp. 305–317, 2009, doi: 10.1007/978-1-60327-317-6\_22.
- [308] I. Gaidarov, J. G. Krupnick, J. R. Falck, J. L. Benovic, and J. H. Keen, "Arrestin function in G protein-coupled receptor endocytosis requires phosphoinositide binding," *EMBO J.*, vol. 18, no. 4, pp. 871–881, Feb. 1999, doi: 10.1093/emboj/18.4.871.
- [309] J. Janetzko, R. Kise, B. Barsi-ryne, and D. H. Siepe, "Membrane phosphoinositides stabilize GPCR-arrestin complexes and offer temporal control of complex assembly and dynamic," *bioXiv*, 2021.
- [310] J. Rohrbough and K. Broadie, "Lipid regulation of the synaptic vesicle cycle," *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 6, no. 2. Nature Publishing Group, pp. 139–150, Feb. 2005, doi: 10.1038/nrn1608.
- [311] M. J. Gandal *et al.*, "Transcriptome-wide isoform-level dysregulation in ASD, schizophrenia, and bipolar disorder," *Science (80-. )*, vol. 362, no. 1265, Dec. 2018, doi: 10.1126/science.aat8127.
- [312] S. H. Witt *et al.*, "Genome-wide association study of borderline personality disorder reveals genetic overlap with bipolar disorder, major depression and schizophrenia," *Transl. Psychiatry*, vol. 7, no. 6, p. e1155, Jun. 2017, doi: 10.1038/tp.2017.115.
- [313] B. S. Beltz, M. F. Tlusty, J. L. Benton, and D. C. Sandeman, "Omega-3 fatty acids upregulate adult neurogenesis," *Neurosci. Lett.*, vol. 415, no. 2, pp. 154–158, Mar. 2007, doi: 10.1016/J.NEULET.2007.01.010.
- [314] F. Calderon and H. Y. Kim, "Docosahexaenoic acid promotes neurite growth in hippocampal neurons," *J. Neurochem.*, vol. 90, no. 4, pp. 979–988, Aug. 2004, doi: 10.1111/J.1471-4159.2004.02520.X.
- [315] T. Harayama and H. Riezman, "Understanding the diversity of membrane lipid



- composition," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 19, no. 5, pp. 281–296, 2018, doi: 10.1038/nrm.2017.138.
- [316] A. L. Duncan, W. Song, and M. S. P. Sansom, "Lipid-dependent regulation of ion channels and g protein-coupled receptors: Insights from structures and simulations," *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, vol. 60. Annual Reviews, pp. 31–50, Jan. 2020, doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010919-023411.
- [317] A. E. Whitton, M. T. Treadway, and D. A. Pizzagalli, "Reward processing dysfunction in major depression, bipolar disorder and schizophrenia," *Curr. Opin. Psychiatry*, vol. 28, no. 1, pp. 7–12, 2015, doi: 10.1097/YCO.000000000000122.
- [318] C. O. Bondi *et al.*, "Adolescent behavior and dopamine availability are uniquely sensitive to dietary omega-3 fatty acid deficiency," *Biol. Psychiatry*, vol. 75, no. 1, pp. 38–46, 2014, doi: 10.1016/j.biopsych.2013.06.007.
- [319] S. Chalon, "Omega-3 fatty acids and monoamine neurotransmission," *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids*, vol. 75, no. 4–5, pp. 259–269, 2006, doi: 10.1016/j.plefa.2006.07.005.
- [320] D. C. Mitchell, S. L. Niu, and B. J. Litman, "Enhancement of G protein-coupled signaling by DHA phospholipids," *Lipids*, vol. 38, no. 4, pp. 437–443, 2003, doi: 10.1007/s11745-003-1081-1.
- [321] N. Salem, B. Litman, H. Kim, and K. Gawrisch, "Mechanisms of Action of Docosahexaenoic Acid in the Nervous System," *Lipids*, vol. 36, no. 9, pp. 945–959, 2001.
- [322] S. E. Feller, K. Gawrisch, and T. B. Woolf, "Rhodopsin exhibits a preference for solvation by polyunsaturated docosohexaenoic acid," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 125, no. 15, pp. 4434–4435, 2003, doi: 10.1021/ja0345874.
- [323] M. C. Pitman, A. Grossfield, F. Suits, and S. E. Feller, "Role of cholesterol and polyunsaturated chains in lipid-protein interactions: Molecular dynamics simulation of rhodopsin in a realistic membrane environment," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, no. 13, pp. 4576–4577, 2005, doi: 10.1021/ja042715y.
- [324] M. Javanainen *et al.*, "Reduced level of docosahexaenoic acid shifts GPCR neuroreceptors to less ordered membrane regions," *PLoS Comput. Biol.*, vol. 15, no. 5, May 2019, doi: 10.1371/journal.pcbi.1007033.
- [325] A. Polozova and B. J. Litman, "Cholesterol dependent recruitment of di22:6-PC by a G protein-coupled receptor into lateral domains," *Biophys. J.*, vol. 79, no. 5, pp. 2632–2643, 2000, doi: 10.1016/S0006-3495(00)76502-7.
- [326] W. Stillwell and S. R. Wassall, "Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid," *Chem. Phys. Lipids*, vol. 126, pp. 1–27, 2003.
- [327] I. Alves, C. Park, and V. Hruby, "Plasmon Resonance Methods in GPCR Signaling and Other Membrane Events," *Curr. Protein Pept. Sci.*, vol. 6, no. 4, pp. 293–312, 2005, doi:

10.2174/1389203054546352.

- [328] E. Harté *et al.*, “Probing the kinetics of lipid membrane formation and the interaction of a nontoxic and a toxic amyloid with plasmon waveguide resonance,” *Chem. Commun.*, vol. 50, no. 32, pp. 4168–4171, 2014, doi: 10.1039/c4cc00571f.
- [329] L. A. A. De Jong, S. Grünewald, J. P. Franke, D. R. A. Uges, and R. Bischoff, “Purification and characterization of the recombinant human dopamine D2S receptor from *Pichia pastoris*,” *Protein Expr. Purif.*, vol. 33, no. 2, pp. 176–184, 2004, doi: 10.1016/j.pep.2003.08.018.
- [330] A. Malmberg and N. Mohell, “Characterization of [3H]quinpirole binding to human dopamine D(2A) and D3 receptors: Effects of ions and guanine nucleotides,” *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 274, no. 2, pp. 790–797, 1995.
- [331] L. Albizu *et al.*, “Time-resolved FRET between GPCR ligands reveals oligomers in native tissues,” *Nat. Chem. Biol.*, vol. 6, no. 8, pp. 587–594, 2010, doi: 10.1038/nchembio.396.
- [332] D. Maurel *et al.*, “Cell-surface protein-protein interaction analysis with time-resolved FRET and snap-tag technologies: Application to GPCR oligomerization,” *Nat. Methods*, vol. 5, no. 6, pp. 561–567, Jun. 2008, doi: 10.1038/nmeth.1213.
- [333] I. D. Alves and S. Lecomte, “Study of G-Protein Coupled Receptor Signaling in Membrane Environment by Plasmon Waveguide Resonance,” *Acc. Chem. Res.*, vol. 52, no. 4, pp. 1059–1067, 2019, doi: 10.1021/acs.accounts.9b00007.
- [334] I. D. Alves, S. M. Cowell, Z. Salamon, S. Devanathan, G. Tollin, and V. J. Hruby, “Different structural states of the proteolipid membrane are produced by ligand binding to the human  $\delta$ -opioid receptor as shown by plasmon-waveguide resonance spectroscopy,” *Mol. Pharmacol.*, vol. 69, no. 1, p. 406, 2004, doi: 10.1124/mol.69.1.406.
- [335] I. D. Alves *et al.*, “The two NK-1 binding sites correspond to distinct, independent, and non-interconvertible receptor conformational states as confirmed by plasmon-waveguide resonance spectroscopy,” *Biochemistry*, vol. 45, no. 16, pp. 5309–5318, Apr. 2006, doi: 10.1021/bi052586d.
- [336] K. Boyé *et al.*, “The role of CXCR3/LRP1 cross-talk in the invasion of primary brain tumors,” *Nat. Commun.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–20, Nov. 2017, doi: 10.1038/s41467-017-01686-y.
- [337] K. Boyé, C. Billottet, N. Pujol, I. D. Alves, and A. Bikfalvi, “Ligand activation induces different conformational changes in CXCR3 receptor isoforms as evidenced by plasmon waveguide resonance (PWR),” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–11, Sep. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-11151-x.
- [338] R. Guixà-González *et al.*, “Membrane cholesterol access into a G-protein-coupled receptor,” *Nat. Commun.* 2017 81, vol. 8, no. 1, pp. 1–12, Feb. 2017, doi: 10.1038/ncomms14505.
- [339] J. M. Beaulieu, R. R. Gainetdinov, and M. G. Caron, “The Akt-GSK-3 signaling cascade in the actions of dopamine,” *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 28, no. 4, pp. 166–172,

- 2007, doi: 10.1016/j.tips.2007.02.006.
- [340] M. Lafourcade *et al.*, "Nutritional omega-3 deficiency abolishes endocannabinoid-mediated neuronal functions," *Nat. Neurosci.*, vol. 14, no. 3, pp. 345–350, Jan. 2011, doi: 10.1038/nn.2736.
- [341] T. Mizumura *et al.*, "Activation of adenosine A2A receptor by lipids from docosahexaenoic acid revealed by NMR," *Sci. Adv.*, vol. 6, no. 12, pp. 8544–8562, 2020, doi: 10.1126/SCIADV.AAY8544.
- [342] M. Carrillo-Tripp and S. E. Feller, "Evidence for a mechanism by which  $\omega$ -3 polyunsaturated lipids may affect membrane protein function," *Biochemistry*, vol. 44, no. 30, pp. 10164–10169, 2005, doi: 10.1021/bi050822e.
- [343] M. J. Bruno, R. E. Koeppe, and O. S. Andersen, "Docosahexaenoic acid alters bilayer elastic properties," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 23, pp. 9638–9643, 2007, doi: 10.1073/pnas.0701015104.
- [344] R. Caires *et al.*, "Omega-3 Fatty Acids Modulate TRPV4 Function through Plasma Membrane Remodeling," *Cell Rep.*, vol. 21, no. 1, pp. 246–258, Oct. 2017, doi: 10.1016/j.celrep.2017.09.029.
- [345] B. Antony, S. Vanni, H. Shindou, and T. Ferreira, "From zero to six double bonds: Phospholipid unsaturation and organelle function," *Trends in Cell Biology*, vol. 25, no. 7. Elsevier Ltd, pp. 427–436, Jul. 01, 2015, doi: 10.1016/j.tcb.2015.03.004.
- [346] K. Gawrisch, N. V. Eldho, and L. L. Holte, "The structure of DHA in phospholipid membranes," *Lipids*, vol. 38, no. 4, pp. 445–452, 2003, doi: 10.1007/s11745-003-1082-0.
- [347] M. L. Jacobs, H. A. Faizi, J. A. Peruzzi, P. M. Vlahovska, and N. P. Kamat, "EPA and DHA differentially modulate membrane elasticity in the presence of cholesterol," *Biophys. J.*, vol. 120, no. 11, pp. 2317–2329, Jun. 2021, doi: 10.1016/J.BPJ.2021.04.009.
- [348] I. Alves, G. Staneva, C. Tessier, G. F. Salgado, and P. Nuss, "The interaction of antipsychotic drugs with lipids and subsequent lipid reorganization investigated using biophysical methods," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1808, no. 8, pp. 2009–2018, Aug. 2011, doi: 10.1016/j.bbamem.2011.02.021.
- [349] C. Tessier, P. Nuss, G. Staneva, and C. Wolf, "Modification of membrane heterogeneity by antipsychotic drugs: An X-ray diffraction comparative study," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 320, no. 2, pp. 469–475, Apr. 2008, doi: 10.1016/j.jcis.2008.01.034.
- [350] F. Lolicato *et al.*, "Membrane-Dependent Binding and Entry Mechanism of Dopamine into Its Receptor," *ACS Chem. Neurosci.*, vol. 11, no. 13, pp. 1914–1924, Jul. 2020, doi: 10.1021/acchemneuro.9b00656.
- [351] A. Grossfield, S. E. Feller, and M. C. Pitman, "A role for interactions in the modulation of rhodopsin by  $\omega$ -3 polyunsaturated lipids," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 13, pp. 4888–4893, 2006, doi: 10.1073/pnas.0508352103.

- [352] L. Lemel *et al.*, "The ligand-bound state of a G protein-coupled receptor stabilizes the interaction of functional cholesterol molecules," *J. Lipid Res.*, vol. 62, p. 100059, Jan. 2021, doi: 10.1016/J.JLR.2021.100059.
- [353] A. Malnoe, H. Milon, and C. Reme, "Effect of In Vivo Modulation of Membrane Docosahexaenoic Acid Levels on the Dopamine-Dependent Adenylate Cyclase Activity in the Rat Retina," *J. Neurochem.*, vol. 55, no. 5, pp. 1480–1485, Nov. 1990, doi: 10.1111/j.1471-4159.1990.tb04929.x.
- [354] M. G. Murphy, "Effects of exogenous linoleic acid on fatty acid composition, receptor-mediated cAMP formation, and transport functions in rat astrocytes in primary culture," *Neurochem. Res.*, vol. 20, no. 11, pp. 1365–1375, 1995, doi: 10.1007/BF00992513.
- [355] J. Z. Yu, J. Wang, S. D. Sheridan, R. H. Perlis, and M. M. Rasenick, "N-3 polyunsaturated fatty acids promote astrocyte differentiation and neurotrophin production independent of cAMP in patient-derived neural stem cells," *Mol. Psychiatry*, 2020, doi: 10.1038/s41380-020-0786-5.
- [356] R. S. Chapkin, N. Wang, Y. Y. Fan, J. R. Lupton, and I. A. Prior, "Docosahexaenoic acid alters the size and distribution of cell surface microdomains," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1778, no. 2, pp. 466–471, Feb. 2008, doi: 10.1016/J.BBAMEM.2007.11.003.
- [357] K. R. Levental *et al.*, "Polyunsaturated Lipids Regulate Membrane Domain Stability by Tuning Membrane Order," *Biophys. J.*, vol. 110, no. 8, pp. 1800–1810, Apr. 2016, doi: 10.1016/J.BPJ.2016.03.012.
- [358] W. Stillwell, S. R. Shaikh, M. Zerouga, R. Siddiqui, and S. R. Wassall, "Docosahexaenoic acid affects cell signaling by altering lipid rafts," *Reprod. Nutr. Dev.*, vol. 45, no. 5, pp. 559–579, Sep. 2005, doi: 10.1051/RND:2005046.
- [359] P. G. Charest and M. Bouvier, "Palmitoylation of the V2 Vasopressin Receptor Carboxyl Tail Enhances  $\beta$ -Arrestin Recruitment Leading to Efficient Receptor Endocytosis and ERK1/2 Activation," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 42, pp. 41541–41551, Oct. 2003, doi: 10.1074/JBC.M306589200.
- [360] S. R. Hawtin, A. B. Tobin, S. Patel, and M. Wheatley, "Palmitoylation of the Vasopressin V1a Receptor Reveals Different Conformational Requirements for Signaling, Agonist-induced Receptor Phosphorylation, and Sequestration," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 41, pp. 38139–38146, Oct. 2001, doi: 10.1074/jbc.m106142200.
- [361] S. S. Karnik, K. D. Ridge, S. Bhattacharya, and H. G. Khorana, "Palmitoylation of bovine opsin and its cysteine mutants in COS cells (fatty acylation/visual pigment/transducin/site-directed mutagenesis/structure-function relationships)," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 90, pp. 40–44, 1993.
- [362] S. Moffett, B. Mouillac, H. Bonin, and M. Bouvier, "Altered phosphorylation and

- desensitization patterns of a human  $\beta$ 2-adrenergic receptor lacking the palmitoylated Cys341," *EMBO J.*, vol. 12, no. 1, pp. 349–356, Jan. 1993, doi: 10.1002/j.1460-2075.1993.tb05663.x.
- [363] T. M. Palmer and G. L. Stiles, "Identification of threonine residues controlling the agonist-dependent phosphorylation and desensitization of the rat A3 adenosine receptor," *Mol. Pharmacol.*, vol. 57, no. 3, pp. 539–545, 2000, doi: 10.1124/mol.57.3.539.
- [364] D. S. Pickering, F. A. Taverna, M. W. Salter, and D. R. Hampson, "Palmitoylation of the GluR6 kainate receptor," *Neurobiology*, vol. 92, pp. 12090–12094, 1995.
- [365] P. Donthamsetti *et al.*, "Arrestin recruitment to dopamine D2 receptor mediates locomotion but not incentive motivation," *Mol. Psychiatry*, vol. 25, no. 9, pp. 2086–2100, 2020, doi: 10.1038/s41380-018-0212-4.
- [366] E. F. Gallo *et al.*, "Accumbens dopamine D2 receptors increase motivation by decreasing inhibitory transmission to the ventral pallidum," *Nat. Commun. 2018 91*, vol. 9, no. 1, pp. 1–13, Mar. 2018, doi: 10.1038/S41467-018-03272-2.
- [367] G. E. Berger *et al.*, "Ethyl-Eicosapentaenoic Acid in First-Episode Psychosis: A Randomized, Placebo-Controlled Trial," *J. Clin. Psychiatry*, vol. 68, no. 12, pp. 1867–75, Dec. 2007.
- [368] D. G. Robinson *et al.*, "A potential role for adjunctive omega-3 polyunsaturated fatty acids for depression and anxiety symptoms in recent onset psychosis: Results from a 16 week randomized placebo-controlled trial for participants concurrently treated with risperidone," *Schizophr. Res.*, vol. 204, pp. 295–303, Feb. 2019, doi: 10.1016/j.schres.2018.09.006.
- [369] G. P. Amminger, M. R. Schäfer, M. Schlögelhofer, C. M. Klier, and P. D. McGorry, "Longer-term outcome in the prevention of psychotic disorders by the Vienna omega-3 study," *Nat. Commun. 2015 61*, vol. 6, no. 1, pp. 1–7, Aug. 2015, doi: 10.1038/ncomms8934.
- [370] Z. Salamon, H. A. Macleod, and G. Tollin, "Coupled plasmon-waveguide resonators: A new spectroscopic tool for probing proteolipid film structure and properties," *Biophys. J.*, vol. 73, no. 5, pp. 2791–2797, 1997, doi: 10.1016/S0006-3495(97)78308-5.
- [371] P. Mueller and D. O. Rudin, "Resting and action potentials in experimental bimolecular lipid membranes," *J. Theor. Biol.*, vol. 18, no. 2, pp. 222–258, Feb. 1968, doi: 10.1016/0022-5193(68)90163-x.
- [372] J. B. Perez, J. M. Segura, D. Abankwa, J. Piguet, K. L. Martinez, and H. Vogel, "Monitoring the Diffusion of Single Heterotrimeric G Proteins in Supported Cell-membrane Sheets Reveals their Partitioning into Microdomains," *J. Mol. Biol.*, vol. 363, no. 5, pp. 918–930, 2006, doi: 10.1016/j.jmb.2006.08.036.
- [373] R. Fernández *et al.*, "Microarray and Mass Spectrometry-Based Methodology for Lipid Profiling of Tissues and Cell Cultures," *Anal. Chem.*, vol. 91, no. 24, pp. 15967–15973, 2019, doi: 10.1021/acs.analchem.9b04529.

- [374] C. Joffre *et al.*, "Modulation of brain PUFA content in different experimental models of mice," *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids*, vol. 114, pp. 1–10, Nov. 2016, doi: 10.1016/j.plefa.2016.09.003.
- [375] J. Folch, M. Lees, and G. H. Sloane Stanley, "A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues.," *J. Biol. Chem.*, vol. 226, no. 1, pp. 497–509, 1957, doi: 10.1016/s0021-9258(18)64849-5.
- [376] W. R. Morrison and L. M. Smith, "Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids," *J. Lipid Res.*, vol. 5, pp. 600–608, 1964, doi: 10.1016/S0022-2275(20)40190-7.
- [377] W. Humphrey, A. Dalke, and K. Schulten, "VMD: Visual molecular dynamics," *J. Mol. Graph.*, vol. 14, no. 1, pp. 33–38, Feb. 1996, doi: 10.1016/0263-7855(96)00018-5.
- [378] B. Webb and A. Sali, "Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER," *Curr. Protoc. Bioinforma.*, vol. 54, no. 1, pp. 5.6.1-5.6.37, Jun. 2016, doi: 10.1002/CPBI.3.
- [379] E. Mayol *et al.*, "Homolwat: A web server tool to incorporate 'homologous' water molecules into gpcr structures," *Nucleic Acids Res.*, vol. 48, no. W1, pp. W54–W59, Jul. 2020, doi: 10.1093/NAR/GKAA440.
- [380] O. Trott and A. J. Olson, "AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading," *J. Comput. Chem.*, vol. 31, no. 2, Jan. 2009, doi: 10.1002/jcc.21334.
- [381] S. Jo, T. Kim, and W. Im, "Automated builder and database of protein/membrane complexes for molecular dynamics simulations," *PLoS One*, vol. 2, no. 9, p. e880, Sep. 2007, doi: 10.1371/journal.pone.0000880.
- [382] E. L. Wu *et al.*, "CHARMM-GUI membrane builder toward realistic biological membrane simulations," *Journal of Computational Chemistry*, vol. 35, no. 27. John Wiley and Sons Inc., pp. 1997–2004, Oct. 2014, doi: 10.1002/jcc.23702.
- [383] M. J. Harvey, G. Giupponi, and G. De Fabritiis, "ACEMD: Accelerating biomolecular dynamics in the microsecond time scale," *J. Chem. Theory Comput.*, vol. 5, no. 6, pp. 1632–1639, Jun. 2009, doi: 10.1021/ct9000685.
- [384] J. Huang *et al.*, "CHARMM36m: An improved force field for folded and intrinsically disordered proteins," *Nat. Methods*, vol. 14, no. 1, pp. 71–73, Dec. 2016, doi: 10.1038/nmeth.4067.
- [385] S. Doerr, M. J. Harvey, F. Noé, and G. De Fabritiis, "HTMD: High-Throughput Molecular Dynamics for Molecular Discovery," *J. Chem. Theory Comput.*, vol. 12, no. 4, pp. 1845–1852, Apr. 2016, doi: 10.1021/acs.jctc.6b00049.
- [386] J. E. Stone, K. L. Vandivort, and K. Schulten, "GPU-accelerated molecular visualization on petascale supercomputing platforms," in *Proc. of UltraVis 2013: 8th Int. Workshop on Ultrascale Visualization - Held in Conjunction with SC 2013: The Int. Conference for High*

*Performance Computing, Networking, Storage and Analysis*, 2013, doi:  
10.1145/2535571.2535595.

[387] H. Wickham, “Ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis,” in *Springer*, 2016.

## **Acknowledgements**

We thank the biochemistry facility of the Bordeaux Neurocampus for the access to the blot imaging system, JP. Toulmé for use of the fluorescence spectrometer (TECAN), JL Banere for providing D2R expressing *Pichia pastoris*.

This study was supported by INRAE, CNRS and the University of Bordeaux, Idex Bordeaux “chaire d’installation” (ANR-10-IDEX-03-02) (P.T.), NARSAD Young Investigator Grants from the Brain and Behavior Foundation (P.T.), ANR “SynLip” (ANR-16-CE16-0022) (P.T.), ANR “FrontoFat” (ANR-20-CE14-0020), Region Nouvelle Aquitaine 2014-1R30301-00003023 (P.T.), NIH grant MH54137 (J.A.J), the Instituto de Salud Carlos III FEDER (PI18/00094) and the ERA-NET NEURON & Ministry of Economy, Industry and Competitiveness (AC18/00030) (J.S.), the European Research Network on Signal Transduction (<https://ernest-gpcr.eu>) (COST Action CA18133) (B.M., R.G-G., J.S.), the Swiss National Science Foundation, grant no. 192780 (R.G-G.).

## **Author contributions**

M-L.J, V.D.P, R.G-G, I.D.A. and P.T. conceived and supervised the study. J.S., G.B-G., E.M., T.D. and J.A.J. provided expertise, reagents and supervised specific experiments. M-L.J., V.D.P., F.D., A.O., R.B., M.H.P., B.M-L., J.S., S.M., T.T-C., S.G. and R.G-G performed experiments and analyzed the data. M-L.J., V.D.P., R.G.-G., I.D.A. and P.T. wrote the original version of the manuscript. All authors discussed the results and reviewed the manuscript.

## **Competing financial interest**

The authors declare no competing interests.