



HAL
open science

Caractérisation biochimique et cellulaire des récepteurs PROKR1 et PROKR2 et criblage structural de leur ligand PROK1 : Intérêt pour les pathologies PROK1-dépendantes

Kévin Gemy

► **To cite this version:**

Kévin Gemy. Caractérisation biochimique et cellulaire des récepteurs PROKR1 et PROKR2 et criblage structural de leur ligand PROK1 : Intérêt pour les pathologies PROK1-dépendantes. Biologie cellulaire. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2023. Français. NNT : 2023GRALV026 . tel-04166762

HAL Id: tel-04166762

<https://theses.hal.science/tel-04166762>

Submitted on 20 Jul 2023

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

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

École doctorale : CSV- Chimie et Sciences du Vivant

Spécialité : Biologie cellulaire

Unité de recherche : Biologie et Biotechnologie pour la Santé

Caractérisation biochimique et cellulaire des récepteurs PROKR1 et PROKR2 et criblage structural de leur ligand PROK1 : Intérêt pour les pathologies PROK1-dépendantes

Biochemical and Cellular Characterization of PROKR1 and PROKR2 Receptors and Structural Screening of their Ligand PROK1: Interest for PROK1-Dependent Pathologies

Présentée par :

Kévin GEMY

Direction de thèse :

Mohamed BENHAROUGA

MAITRE DE CONFERENCE, Université Grenoble Alpes

Nadia ALFAIDY-BENHAROUGA

DIRECTRICE RECHERCHE, INSERM

Directeur de thèse

Co-directrice de thèse

Rapporteurs :

Philippe RONDARD

DIRECTEUR DE RECHERCHE, INSERM délégation Occitanie Méditerranée

Christelle CORAUX

CHARGE DE RECHERCHE HDR, INSERM délégation Grand Est

Thèse soutenue publiquement le **24 mars 2023**, devant le jury composé de :

Emmanuelle PLANUS

PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université Grenoble Alpes

Présidente

Patrice CATTY

DIRECTEUR DE RECHERCHE, CEA centre de Grenoble

Examineur

Franck BOREL

INGENIEUR DOCTEUR, CEA centre de Grenoble

Examineur

Frédéric BECQ

PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université de Poitiers

Examineur

Philippe RONDARD

DIRECTEUR DE RECHERCHE, INSERM délégation Occitanie

Rapporteur

Méditerranée

Christelle CORAUX

CHARGE DE RECHERCHE HDR, INSERM délégation Grand Est

Rapporteuse

Invités :

David Cobessi

CHARGE DE RECHERCHE, Institut de Biologie Structurale



Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué, de loin ou de près, à ce projet. Je tiens également à remercier « La ligue nationale contre le cancer » d'avoir financé mon projet de thèse pendant ces trois années.

Je tiens à remercier Professeur **Frédéric BECQ** d'avoir accepté de présider ma soutenance de thèse. Je remercie également Dr. **Philippe RONDARD** et Dr. **Christelle CORAUX** de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être les rapporteurs de mon manuscrit de thèse. Un grand merci également à Pr. **Emmanuelle PLANUS**, Dr. **Patrice CATTY** et Dr. **Franck BOREL** de faire partie de mon jury de thèse en tant qu'examineurs et Dr. **David COBESSI** en tant qu'invité.

Je tiens tout d'abord à remercier mes parents sans qui je ne serais pas là, qui m'ont toujours soutenu dans mes projets. Merci à vous pour tout ce que vous m'avez transmis, comme valeurs et éducation. Merci de m'avoir laissé autant de liberté.

Merci à toi Mégane, ma compagne, de m'avoir supporté, je pense que le mot est bien choisi, pendant ces trois années qui n'ont pas été toujours faciles. Tu m'as toujours soutenu, aidé (notamment sur le plan administratif) et le plus important nourri, pas seulement moi, mais également tout le laboratoire. Merci d'avoir accepté mon engagement dans ce projet et de m'avoir facilité au plus la vie lors des moments compliqués.

Merci au Dr. **Mohamed BENHAROUGA** d'avoir dirigé mes travaux de thèse de m'avoir encadré pendant ces cinq années. Merci de m'avoir donné ma chance en Master 1, je me souviens comme si c'était hier le jour où tu m'as appelé pour me demander où j'étais de ma recherche de stage. Bien sûr je n'avais pas tellement cherché et tu me l'as bien fait comprendre. Mais j'étais très heureux lorsque tu m'as rappelé quelques minutes plus tard pour me dire que tu me prenais en stage M1. C'est tout naturellement que j'ai accepté de faire mon stage de Master 2 également chez toi. J'étais très déçu lorsqu'à la fin de mon stage de Master 2, nous n'avions pas décroché de bourse, mais quel plaisir lorsque j'ai reçu le mail de Nadia m'apprenant que la bourse de la « Ligue contre le cancer » avait été acceptée.

En étant également sportif j'ai rapidement cerné ta personnalité, nous avons une relation coach/athlète, même si cela ne correspond pas à tout le monde, cela m'allait bien et me motivait à toujours faire plus et à me dépasser. Merci pour ses nombreuses discussions scientifiques, mais également sur la vie en générale, l'éducation, les enfants, le voyage, la politique, la diplomatie. Je n'oublierais jamais des phrases, des mots que tu me répétais sans cesse comme :

« C'est facile » : oui parce que toutes les manips sont faciles

« Tout est une histoire d'ORGANISATION » et c'est très vrai

« Écoute-le vieux » ou dans le même style « Regarde les cheveux blancs sur ma tête, c'est l'expérience » quand je ne t'écoutais pas toujours ou que je n'en faisais qu'à ma tête.

« Je ne vis que pour les résultats »

« C'est en faisant des erreurs qu'on apprend » et je l'ai bien compris pendant ma thèse

« Demande à Mégane » quand il s'agissait de retrouver des documents ou des démarches administratives

Je ne pourrais pas toutes les citer, mais je les garde en mémoire.

Je te remercie également de m'avoir laissé en autonomie et de m'avoir fait confiance sur des parties de mon projet où j'ai pris des initiatives. Je pense notamment à la partie de mon projet sur les parties N-ter et C-ter où lorsque je te l'ai proposé tu n'as pas hésité une seconde et tu m'as dit directement « Passe la commande des constructions ». Enfin merci pour ton engagement notamment pour la rédaction de manuscrit.

J'en profite également pour remercier Dr. **Nadia ALFAIDY**. Merci pour tes conseils, remarques, soutiens et ta grande aide lors de la rédaction de ce manuscrit.

Je voudrais également remercier le directeur du laboratoire LCBM Dr. **Stéphane MENAGE** et la directrice de BioSanté Dr. **Catherine PICART**.

Je tiens à remercier tout le laboratoire LCBM et BioSanté et les équipes BioMet et MAB2 dans lesquels j'ai pu évoluer durant mes stages et ma thèse.

Maintenant dans un ordre chronologique.

Un grand merci à Dr. **Micheline EL KHOURY** qui m'a encadré lors de mon stage de Master 1. Merci pour ta patience et ta pédagogie qui m'ont fait apprécier directement le travail au laboratoire.

Merci à Dr. **Johanna CORMENIER** de m'avoir encadré lors de mon stage de Master 2. J'ai compris la difficulté d'encadrer quelqu'un lorsque j'ai dû le faire moi aussi.

Merci à **Peggy CHARBONIER** et Dr. **Mireille CHEVALLET** pour les gossips du poulailler qui m'ont bien fait rire et qui me manquent.

Merci à Dr. **Patrice CATTY** autrement dit Pat, de m'avoir supervisé durant mon stage de Master 2 et pendant ma thèse. J'ai aimé nos conversations sur la vie et le sport. Merci pour ta patience, ta disponibilité, ton calme et ta pédagogie qui m'ont fait adorer la biologie moléculaire et la production de protéine recombinante.

Merci à **Roger MIRAS** pour ton aide sur la production de protéine, mais également sur les discussions impression 3D et musculation avec Pat.

Merci à Dr. **Julien PERARD** pour ton aide et ton partage de connaissance sur la purification, mais également sur plein d'autres sujets avec toujours des remarques pertinentes.

Maintenant au bâtiment C3.

Je tiens à remercier toute l'équipe MAB2 : Dr. **Christel MARQUETTE**, **Hadi, Margaux, Fred**. Je te tiens à remercier particulièrement la future Dr. **Constance COLLET**, **Nicolas LEMAITRE** et Dr. **Martial DELION**.

Merci à **Constance** aka Popeye (je t'avais dit que j'allais le mettre) pour ton aide au niveau scientifique et ton support moral. Les discussions au bureau des pleurs étaient un bon moyen de décompresser et de vider son sac en fin de journée. Merci également de ton aide au niveau des démarches et règles administratives (notamment les formations) sans laquelle je n'aurais pas pu soutenir dans les temps.

Merci à **Nicolas** qui était toujours disponible pour parler ou si l'on cherchait quelque chose dans le labo. Tu étais toujours prêt à sortir au bar pour décompresser avec un bon levé de coude. Merci pour ta bonne humeur et ton aide au quotidien.

Merci à **Martial**, d'après certains mon jumeau. Même si tu es resté que trop peu de temps à mon goût, tu m'as beaucoup apporté au niveau scientifique et le plus important au niveau personnel avec nos discussions sur la vie en générale, les enfants, les relations homme/femme, le futur, etc. Mais également j'adorais charrier amicalement les gens avec toi. Je suis très content que tu aies pu trouver un job et j'espère que tu t'épanouiras dans celui-ci.

Merci à tous les membres du groupe pour les sorties au bar : **Nicolas, Martial, Constance, Morgane, Margaux, Estelle, Camille, Béatrice, Irinka** et j'en oublie peut-être.

Je remercie également tous les stagiaires que j'ai pu encadrer lors de ma thèse et qui ont participé à mon projet : **Florine, Ghida, Karen, Mohammad, Hasan**.

Et bonne chance à la future doctorante **Camille LYKO** pour la suite de mon projet et bien plus encore.

Merci également à mes amis proches, ma famille et ma belle-famille qui m'ont permis de me changer les idées pendant le weekend.

Table des matières

Liste des Figures et des tableaux	8
Abréviations	12
Resumé	14
Abstract	18
INTRODUCTION.....	22
Préambule.....	24
Les Récepteurs Couplés aux Protéines G (RCPGs)	28
1. Introduction des RCPGs.....	30
2. Structure des RCPGs	32
3. Classification des RCPGs.....	35
3.1. Généralités	35
3.2. Classe A : Rhodopsin.....	36
3.3. Classe B : Secretine et adhesion	38
3.4. Classe C : Glutamate.....	40
3.5. Classe D	41
3.6. Classe E.....	41
3.7. Classe F : Frizzled et Taste2	41
4. Transduction du signal chez les RCPGs	43
4.1. Généralités	43
4.2. Les facteurs extracellulaires.....	43
4.3. Les facteurs intracellulaires	48
5. Synthèse et trafic intracellulaire des RCPGs	58
5.1. Généralités	58
5.2. Les séquences signalétiques.....	59
5.3. Trafic Réticulum Endoplasmique-Golgi.....	60
5.4. Les modifications post-traductionnelles (MPT)	63
5.5. Endocytose recyclage.....	70
6. Oligomérisation des RCPGs.....	78
6.1. Généralités	78
6.2. L'oligomérisation au niveau structural	78
6.3. Formation stable des oligomères	80
6.4. Formation transitoire des oligomères.....	81
6.5. Oligomérisation et pharmacologique	82
Les prokinétines	86

1. Découverte de la famille des prokinéticines	88
1.1. Les ligands	88
1.2. Les récepteurs	90
2. Structure des prokinéticines et de leurs récepteurs	91
2.1. Structure génomique et Régulation.....	91
2.2. Structure et liaison ligand/récepteur	101
3. Modifications Post Traductionnelles (MPTs) : Glycosylation.....	109
4. Interaction avec des protéines accessoires	110
5. Endocytose	111
6. Oligomérisation.....	111
7. Expression, Physiologie et Pathologie des prokinéticines	113
7.1. Expression des prokinéticines.....	113
7.2. Physiologie et Pathologies des prokinéticines	115
OBJECTIFS DE LA THESE	124
ARTICLE 1	130
ARTICLE 2	156
ARTICLE 3	194
DISCUSSION GENERALE	216
CONCLUSION GENERALE	222
PERSPECTIVES.....	228
REFERENCES.....	234
ANNEXES	272

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Figure 1: Différents types de récepteur membranaires	26
Figure 2: Diversité des ligands des RCPGs	31
Figure 3 : Prix Nobel associés aux RCPGs	32
Figure 4: Structure de la rhodopsine bovine, publiée en 20.....	33
Figure 5: Nombre de structures de RCPGs disponibles pour les 7 classes de récepteurs, depuis l'année 20	33
Figure 6: Structure générale des RCPG	34
Figure 7: Structure générale des RCPGs de classe A, B et C montrant les sites de liaisons orthostériques et allostériques.	36
Figure 8: Classification des récepteurs de la sous-famille Rhodopsine (classe A).....	38
Figure 9: Classification des récepteurs du sous-groupe Sécrétine (B1).....	39
Figure 10: Classification des récepteurs du sous-groupe Adhésion (B2)	40
Figure 11: Classification des récepteurs du sous-groupe Glutamate (C).....	41
Figure 12: Classification des récepteurs de la sous-famille Frizzled (F)	42
Figure 13: Classification des récepteurs du sous-groupe Taste2	43
Figure 14: Modèle d'activation des RCPGs.....	44
Figure 15: Représentation schématique des différents types de ligands des RCPGs classés selon leurs effets biologiques	45
Figure 16: Différents types de modulateurs allostériques PAM ou NAM.....	47
Figure 17: Modèle d'activation des RCPGs	48
Figure 18: Structure secondaire de la sous-unité $G\alpha$	49
Figure 19: Mécanisme d'échange nucléotidique de la pG	50
Figure 20: Cycle d'activation du complexe hétérotrimérique G.....	51
Figure 21: Structure de l'adénylate cyclase	51
Figure 22: Modèle de raft lipidique membranaire	53
Figure 23: Mode d'activation de la protéine G hétéro-trimérique	54
Figure 24: Voies de signalisation des RCPGs médiées par les pGs.....	56
Figure 25: Activation des pGs par les RCPGs et les protéines GBA.....	56
Figure 26: Structure de la β -arrestine	57
Figure 27 : Transport des RCPGs par la voie de sécrétion avec les différents types de séquences signalétiques.....	59
Figure 28: Synthèse protéique, repliement et maturation des RCPGs	60

Figure 29: Trafique antérograde et rétrograde de la voie de sécrétion.....	61
Figure 30: Différents types de modifications post-traductionnelles identifiées sur les RCPGs	63
Figure 31: Différentes fonctions de la phosphorylation des RCPGs.....	64
Figure 32: Différentes fonctions de l'ubiquitination des RCPGs	65
Figure 33: Glycosylation des RCPGs et trafic intracellulaire	67
Figure 34: Différentes fonctions des glycosylations des RCPGs.....	67
Figure 35: Différentes fonctions de la palmitoylation des RCPGs	69
Figure 36: Modèle d'internalisation des RCPGs par la voie dépendante de β -arrestine.....	71
Figure 37: Différents mécanismes d'internalisation des GPCRs	73
Figure 38: Domaines des GRKs	74
Figure 39: Tri des endosomes contenant les RCPGs vers le recyclage ou la dégradation.....	76
Figure 40: Différents modes de recyclage des RCPGs	77
Figure 41: Interface potentielle de dimérisation de RCPGs.....	79
Figure 42: Oligomérisation des récepteurs β 1-adrénergique	80
Figure 43: Oligomérisation transitoire des RCPGs.....	81
Figure 44: Dimérisation et signalisation	83
Figure 45: Fonctions physiologiques pathologiques impliquant des RCPGs	83
Figure 46 : Signal peptidique de PROK1 et PROK2 selon les espèces	91
Figure 47: Alignement de séquence de PROK1 et 2 selon les espèces.....	91
Figure 48: Alignement de séquence de PROK2 et PROK2L.....	92
Figure 49: Alignement de séquence de l'insert basique présent dans PROK2L en fonction des espèces	92
Figure 50: Clivage de la protéine PROK2L en PROK2 β par la furine	93
Figure 51 : Alignement de séquence de PROK2 entre le rat/souris et l'homme.....	93
Figure 52: Épissages alternatifs de PROK2	94
Figure 53: Promoteur de PROK2 : Boite E, CRE	94
Figure 54: Promoteur de PROK2 entre l'homme et la souris	95
Figure 55: Régulation de l'expression de PROK2 par VEGF et TBX20.....	96
Figure 56: Alignement des séquences d'acides aminés de PROK1 chez l'homme et la souris par exon	97
Figure 57: Mécanisme de régulation des prokinétines dans le placenta	98
Figure 58: Région promotrice de PROK1 chez l'homme et à la souris	99
Figure 59: Structure génomique de PROKR2.....	100

Figure 60: Épissages alternatifs de PROKR1 et PROKR2	100
Figure 61: Alignement de séquence d'acides aminés de PROKR1 et PROKR2	101
Figure 62: Structure tridimensionnelle des récepteurs MIT-1 et Colipase	102
Figure 63: Structure tridimensionnelle de MIT1 avec les potentiels électrostatiques	102
Figure 64: Structure et motifs de la famille RCPG Rhodopsine	104
Figure 65: Structure et alignement de séquence de PROKR1 et PROKR2	105
Figure 66: Mutations de PROKR2 présentes dans le syndrome de Kallmann.....	106
Figure 67: Alignement de séquence de la ICL2 entre PROKR1 et PROKR2	108
Figure 68: Alignement de séquence de la partie C-ter de PROKR1 et PROK2	111
Figure 69: Différentes interfaces de reconnaissance des deux protomères.....	112
Figure 70: Établissement de la circulation fœto-maternelle par le cytotrophoblaste extra- villositaire.....	121
Figure 71: Processus de migration et de prolifération des cellules trophoblastiques extra- villositaires en condition physiologique et tumorale.....	122
Tableau 1: Classification des RCPGs selon Kolakowski et GRAFS	36
Tableau 2: Motifs présents au niveau de la partie C-ter des RCPGs	62
Tableau 3: Les différents TMs participant à l'interface protomère-protomère lors de la dimérisation.....	79
Tableau 4: Affinité des différents ligands pour les récepteurs PROKR1 et PROKR2.	109
Tableau 5: Concentration efficace médiane (EC50) de PROK1 et PROK2 avec les récepteurs PROKR1 et PROKR2.	109
Tableau 6: Profil d'expression des prokinétines dans les différents organes.....	114
Tableau 7 : Processus physiologiques et pathologiques (non cancéreux) impliquant les prokinétines	116

ABREVIATIONS

AC: Adenylate Cyclase	IL: InterLeukine
ACE: Bovine Adrenal Cortex–derived capillary Endothelial cells	IP1: myo-Inositol 1 Phosphate
ADN: Acide DésoxyriboNucléique	IP3: Inositol trisPhosphate
ADNC: Acide DésoxyriboNucléique Codant	KS: Kallmann Syndrome
ADP: Adénosine DiPhosphate	MASH-1: Mammalian Achaete Scute Homolog-1
AHD: α -Helical Domain	MIT-1 : Mamba Intestinal Toxin 1
AMPc: Adénosine Monophosphate Cyclique	MPT: Modification Post-Traductionnelle
ARN: Acide RiboNucléique	MRAP2: Melanocortin Receptor Accessory Protein 2
ATP: Adénosine TriPhosphate	MVB: MutliVesicular Bodies
AVP: Arginin VasoPressin	NAM : negative allosteric modulators
AVPR: Arginin VasoPressin Receptor	NMDA: acide N-méthyl-D-Aspartique
BRET: Bioluminescence Resonance Energy Transfer	N-ter: Amino Terminal
Bv8: Bombina Variegata 8kDa	PAM: Positive Allosteric Modulators
CC: ChorioCarcinome	PAR1: Protease-Activated Receptor 1
CF: Cystic Fibrosis	pG: Protéine G
COP: COat Protein	PI3K: PhosphoInositide 3-Kinase
C-ter : Carboxy terminale	PIP2: Phosphatidyl-Inositol-4,5-bisPhosphate
CXCR: CXC chemokine Receptors	PIP3: Phosphatidyl-Inositol-3,4,5-trisPhosphate
Da: Dalton	PKC: Protéine Kinase C
DAG: DiAcylGlycérol	PROK1=EG-VEGF: PROKinéticine 1
DRG: Dorsal Root Ganglia	PROK2=hBv8: PROKinéticine 2
DTX: DendroToXine	PROKR1: PROKinéticine Receptor 1
ECL: ExtraCellular Loop	PROKR2: PROKinéticine Receptor 2
EG-VEGF: Endocrine Gland Derived-Vascular Endothelial Growth Factor	PS : Peptide Signale ou séquence signal
ERAD: Endoplasmic Reticulum Associated Degradation	Rab: Ras-associated binding
ERGIC: ER-Golgi Intermediate Compartment)	RCPG: Récepteurs Couplés aux Protéines G
ERK: Extracellular signal-Regulated Kinases	RE: Reticulum Endoplasmic
ESCRT: Endosome Sorting Complex Required for Transport	RH: RGS Homology domain
FDA: Food Drug Administration	RMN: Résonance Magnétique Nucléaire
FGFβ: Fibroblast Growth Factor β	SAS : Séquences d'Ancre du Signal
GABA: γ -AminoButyric Acid	Sdf-1: Stromal cell-Derived Factor 1
GASP: GPCR-Associated Sorting Proteins	SF-1: Steroidogenic Factor 1
G-CSF: Granulocyte-Colony-Stimulating Factor	SNARE: Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor
GDP: Guanosine DiPhosphate	SNC : Système Nerveux Central
GnRH: Gonadotropin-Releasing Hormone	SNX: Sorting NeXin
	SP: Signal Peptide
	SRP: Signal Recognition Particle

GRK: G protein-coupled Receptor Kinases
GTP: Guanosine TriPhosphate
G α : protein G subunit α
H8: α -Helix 8
HBH: Hélice-Boucle-Hélice
hCG: hormone Gonadotrophine Chorionique
HIF-1 α : Hypoxia-Inducible Factor-1 α)
HPLC: High Performance Liquid Chromatography
HRE: Hypoxia Response Element
HSP: Heat Shock Protein
ICL: IntraCellular Loop
IHH: Isolated Hypogonadotropic Hypogonadism

STAT3: Signal Transducer and Activator of Transcription 3
TBX20 : T-Box transcription Factor 20
TM: TransMembrane domain
TRPV: Transient Receptor Potential Vanilloide
UTR : Untranslated Transcribed Region
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor
VFT: Venus FlyTrap domain
VPRA : Venum PRotein A
Vps : Vacuolar protein sorting
Wnt: wingless related
WT: Wild Type

RESUME

Le facteur, PROK1 aussi dénommé EG-VEGF appartient à la famille des prokinétines (PROK), dont les membres sont directement impliqués dans le contrôle de l'inflammation et l'angiogenèse. Ces facteurs agissent via deux récepteurs de la famille des RCPG, PROKR1 et PROKR2 et régulent plusieurs processus physiologiques et pathologiques, y compris le cancer. Mon équipe de recherche a récemment démontré que l'expression de PROK1 et PROKR2 était augmentée dans le cancer du système reproducteur féminin, le choriocarcinome gestationnel (CG), et dans la mucoviscidose. L'antagonisation de PROKR2 dans un modèle animal de CG diminue le développement et la progression de ce cancer et réduit la réponse inflammatoire, suggérant que l'inhibition du système PROK1/PROKR2 pourrait constituer une cible thérapeutique prometteuse pour les cancers et les pathologies pro-inflammatoires PROK1-dépendantes. Cependant, les antagonistes anti-PROKR2 ne sont pas spécifiques pour ce récepteur, présentent une toxicité à long terme et peuvent être associés au développement d'effets secondaires, car ils bloquent un récepteur partagé avec d'autres membres de la famille des PROKs. Ainsi, les objectifs de ma thèse étaient, *i*) de développer une nouvelle stratégie d'inhibition de ce système en ciblant le ligand, PROK1, et *i*) de mettre en évidence les différences moléculaires et cellulaires qui caractérisent les récepteurs PROKR1 et PROKR2 afin de proposer, à long terme, des stratégies thérapeutiques ciblant spécifiquement l'un ou l'autre récepteur. Le développement de la stratégie du blocage du ligand PROK1 a nécessité, le clonage de la séquence humaine de *prok1* dans différents plasmides, la mise en place de plusieurs systèmes « eucaryotes ou procaryotes » d'expression et de production, et le développement de nombreuses techniques de purification afin de résoudre sa structure tridimensionnelle (STD). Des analyses *in silico* ont également été réalisées ; pour accélérer la résolution de sa STD, caractériser les interfaces de son interaction avec PROKR2, et réaliser le docking moléculaire dans le but d'identifier des molécules chimiques capables d'inhiber l'interaction PROK1-PROKR2. Un test fonctionnel a aussi été développé pour évaluer *in vitro* les molécules les plus prometteuses. Pour la réalisation de ce test fonctionnel, nous avons généré deux lignées stables exprimant PROKR1 ou PROKR2. La caractérisation cellulaire et moléculaire de PROKR1 et PROKR2 a mis en évidence l'existence de différences post-traductionnelles concernant les demi-vies des récepteurs, leur stabilité, leur mode d'adressage à la membrane et leurs niveaux de repliement. Partant de ce constat, nous avons débuté l'étude des mécanismes sous-jacents à ces différences en ciblant prioritairement les extrémités N- et C-ter et leurs implications dans le processus de dimérisation potentielle de PROKR1 et PROKR2. L'ensemble des résultats de ma thèse ont permis de produire la protéine PROK1, de résoudre sa structure et d'identifier les acides aminés impliqués dans son interaction avec le PROKR2. Le développement des lignées exprimant PROKR1 ou PROKR2 a permis, *i*) de mettre en place un test fonctionnel de l'activité des prokinétines, *ii*) d'identifier trois molécules inhibitrices du ligand PROK1 et *iii*) de démontrer qu'en dépit de la faible différence d'identité entre PROKR1 et PROKR2, que PROKR1 serait plus stable au niveau de la membrane, subirait moins de dégradation au niveau du lysosome, et que sa partie C-ter conférerait la dimérisation entre récepteurs PROKRs.

En conclusion, ma thèse a apporté des outils moléculaires pour l'étude des prokinétines, a permis d'identifier de nouvelles molécules inhibitrices du ligand PROK1 et de son interaction avec PROKR2 et à comparer pour la première fois les deux récepteurs de cette famille. L'ensemble de ces données nous permettra de mieux cibler les récepteurs PROKRs et leurs ligands afin de proposer une pharmacothérapie plus spécifique des cancers PROK-dépendants et des maladies inflammatoires dans lesquelles ils sont dérégulés, comme la prééclampsie et la mucoviscidose.

ABSTRACT

Prokineticin-1 (PROK1) protein, also known as EG-VEGF (Endocrine gland derived-vascular endothelial growth factor) belongs to the prokineticin (PROK) family, whose members are directly involved in the control of key processes such as inflammation and angiogenesis. PROK1 acts via two GPCR receptors, PROKR1 and PROKR2 and regulates several physiological and pathological processes, including cancer and cystic fibrosis (CF). My research team recently demonstrated that the expression of PROK1 and PROKR2 were increased in the female reproductive cancer, gestational choriocarcinoma (GC) and in CF. The antagonization of PROKR2 in an animal model of GC decreased tumor growth and its progression, suggesting that inhibition of the PROK1/PROKR2 system may constitute a promising therapeutic target for all PROK1-dependent cancers and pro-inflammatory diseases. However, anti-PROKR2 antagonists are not specific for this receptor, exhibit long-term toxicity and may be associated with the development of side effects as they block a shared receptor with other members of the PROKs family.

The objectives of my thesis project aimed at i) developing a new strategy that targets the inhibition of the ligand, PROK1, and **ii)** characterizing the molecular and cellular features that differentiate PROKR1 from PROKR2 in order to propose new therapeutic strategies that will specifically target one or the other receptor.

The development of the PROK1 blocking strategy required the cloning of the human *Prok1* sequence in different plasmids, the implementation of several eukaryotic or prokaryotic expression and production systems, and the development of numerous purification techniques in order to resolve its three-dimensional structure (STD). *In silico* analyses were also performed to accelerate the STD resolution of PROK1, to characterize the sites of its interaction with PROKR2, and to perform molecular docking in order to identify chemical molecules able to inhibit the PROK1-PROKR2 interaction. A functional assay was also developed to test *in vitro* the most promising molecules. The functional test required the development of two stable cell lines expressing PROKR1 or PROKR2.

The cellular and molecular characterization of PROKR1 and PROKR2 revealed post-translational differences regarding the receptor's half-life, its stability, trafficking and folding levels. Based on these observations, we initiate the investigation of the mechanisms behind these differences, firstly by targeting the roles of N- and C-terminus in these processes, particularly in the dimerizations of PROKR1 and PROKR2.

Altogether my thesis project allowed the production of a recombinant PROK1 protein, the resolution of its structure and the identification of the amino acids that are involved in its interaction with PROKR2. The development of cell lines expressing PROKR1 or PROKR2 allowed, **i)** the set-up of a functional test of the activity of prokineticins, **ii)** the identification of three inhibiting molecules of the PROK1 ligand and **iii)** the demonstration that, in spite the existence of a huge identity between PROKR1 and PROKR2, PROKR1 would be more stable at the plasma membrane; undergo less degradation at the lysosome level and its C-terminal part may confer the dimerization between PROKRs receptors.

In conclusion, my thesis project established new molecular tools for the study of the prokineticins system; identified new inhibiting molecules of the PROK1-PROKR2 interaction, and compared for the first time PROKRs cellular and biochemical features. All these data will allow better targeting of PROKRs and their ligands in order to propose more specific pharmacotherapies for PROK-dependent cancers and inflammatory diseases, such as preeclampsia and cystic fibrosis.

INTRODUCTION

Au cours de ma thèse, je me suis intéressé à l'identification de molécules chimiques capables d'inhiber l'interaction du ligand prokinéticine-1 (PROK1) avec son récepteur PROKR1. PROK1 appartient à une nouvelle famille de facteurs proangiogéniques et pro-inflammatoires : les prokinéticines. Cette famille est composée de deux ligands : PROK1 et PROK2 et de deux récepteurs : PROKR1 et PROKR2. Ces récepteurs font partie de la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs). Mon introduction sera divisée en deux parties, la première partie concernera les RCPGs et la seconde concernera la famille des prokinéticines.

PREAMBULE

Claude Bernard en 1865 crée, sans le nommer, le concept « **de l'Homéostasie** » dans son ouvrage : *Introduction à l'étude de la médecine expérimentale* ¹.

Le concept est repris en 1926 par Walter Bradford Cannon et est dénommé « **Homéostasie** » ². Ce concept, essentiel à la vie, correspond à la capacité d'une entité à répondre à des fluctuations extérieures afin de maintenir l'équilibre de son milieu intérieur. Une cellule, un organe ou un corps sont des systèmes hautement organisés, et si leur homéostasie est rompue cela engendre une désorganisation qui peut être à l'origine de leur disparition. Ainsi, l'homéostasie est intimement associée à la vie.

Cette notion peut être appliquée à des domaines et à des échelles diverses. C'est le cas de la cellule, unité structurale et fonctionnelle d'un organe. La cellule doit maintenir l'homéostasie de son milieu intérieur en fonction des fluctuations du milieu extérieur. Pour cela, elle a besoin de communiquer avec son environnement. Une structure membranaire doit donc assurer l'interface entre ces deux compartiments afin de permettre la communication entre cellules voisines à travers le maintien de leurs homéostasies.

Cette communication requiert un signal (provenant du milieu extérieur), une réception, une transduction de ce signal dans le milieu intérieur de la cellule et une réponse adaptée à ce signal². Les récepteurs sont des structures souvent présentes à la membrane qui sont capables de capter un signal du milieu extracellulaire et transmettre l'information à l'intérieur de la cellule.

Les récepteurs membranaires ont été classés en trois groupes (**Figure 1**)³ :

- Les récepteurs des canaux ioniques (exemple : Récepteur nicotinique, Récepteur NMDA)
- Les récepteurs liés aux enzymes : (exemple : Tyrosine kinase, Sérine/Thréonine kinase)
- Les **Récepteurs Couplés aux Protéines G (RCPGs)**.

Mon travail de thèse a porté sur deux récepteurs (PROKR1 et PROKR2) de la famille des RCPGs.

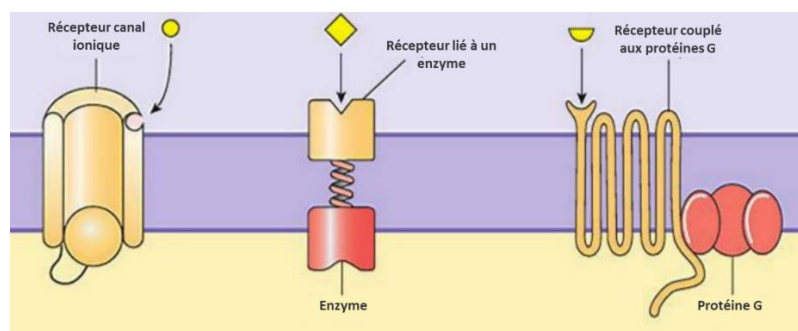


Figure 1: Différents types de récepteurs membranaires³

LES **R**ECEPTEURS **C**OUPLES AUX **P**ROTEINES **G** (**RCPGs**)

1. INTRODUCTION DES RCPGs

Les RCPGs forment le plus large groupe de protéines membranaires codées par le génome humain⁴. Environ 800 gènes ont été identifiés pour les RCPGs, ce qui représente plus de 2% du génome fonctionnel humain⁵. La famille des RCPGs peut être divisée en trois groupes.

- ✓ **Les récepteurs stimulés par des ligands endogènes que l'on peut retrouver dans le milieu extracellulaire comme les hormones (235 identifiés).**
- ✓ **Les récepteurs stimulés par des ligands exogènes provenant de l'extérieur du corps, aussi dénommés récepteurs sensoriels, car ils répondent à des stimuli liés au sens comme le goût, la vision ou l'odorat (423 identifiés).**
- ✓ **Les récepteurs dits « orphelin » dont le(s) ligand(s) n'a(ont) pas encore été identifié(s) (121 identifiés).**

Au niveau structural, ces récepteurs partagent des caractéristiques communes. Ils sont constitués de sept domaines transmembranaires qui traversent la membrane plasmique sous forme d'hélices α séparant ainsi les boucles extracellulaires et intracellulaires, d'où le deuxième nom donné à cette famille de récepteurs « récepteurs à sept segments ou domaines transmembranaires ». Ces récepteurs possèdent également une partie N-terminale extracellulaire et C-terminale intracellulaires. Malgré cette architecture commune, les récepteurs RCPGs diffèrent par leurs parties N- et C-terminales. La stimulation des RCPGs induit une cascade de signalisation intracellulaire dépendante de protéines G hétérotrimériques. Ces dernières sont constituées de trois sous-unités : α , β et γ , et ont la capacité (la sous unité α) de fixer de l'ADP ou le GTP⁶.

Malgré des caractéristiques structurelles communes, ces récepteurs sont capables d'être stimulés par des substances aussi bien physiques que chimiques. Les RCPGs peuvent être stimulés par des photons, des ions (H^+ , Zn^{2+} , Ca^{2+}), des vitamines (niacine, vitamine A1), des métabolites intermédiaires (ATP, acides gras), ainsi que par des peptides et protéines (**Figure 2**)⁷.

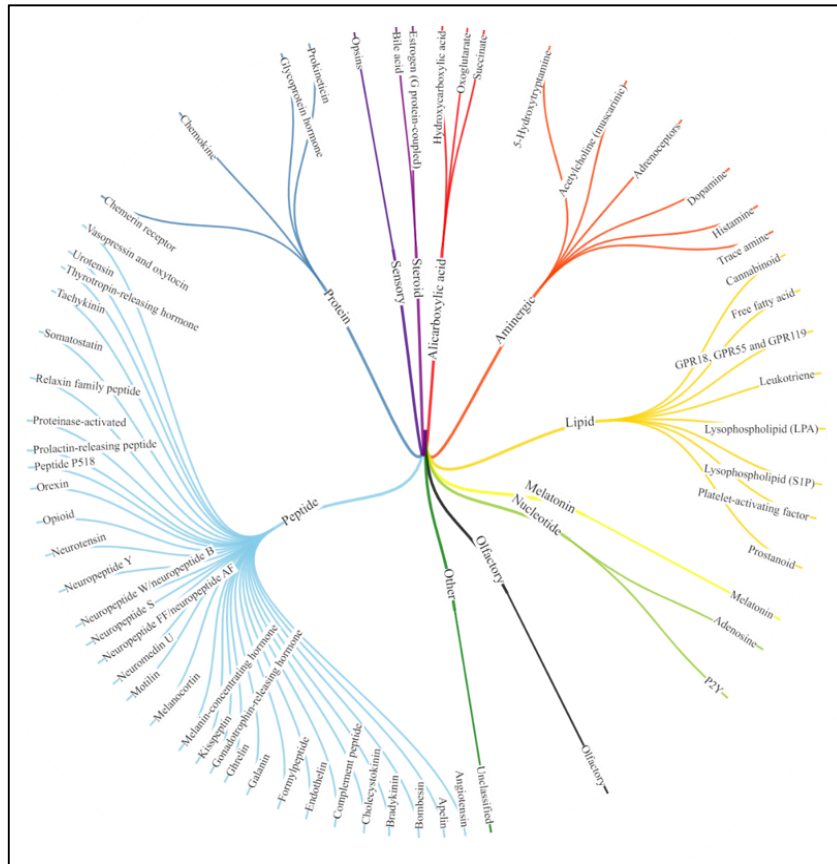


Figure 2: Diversité des ligands des RCPGs

Arbre regroupant les RCPGs par la nature chimique de leur ligand endogène ; adapté de GPCRdb⁸

La diversité dans les ligands et dans la localisation tissulaire des RCPGs est associée aux différentes fonctions qu'ils assurent. Ces récepteurs se retrouvent de manière ubiquitaire dans tous les organes et tissus. Néanmoins, chaque cellule exprime son propre pool de récepteurs. Par conséquent, les RCPGs possèdent un rôle majeur dans un large panel de processus physiologiques comme : l'odorat, la vision, le goût, la chimiotaxie, la prolifération cellulaire, la fonction cardiaque, les processus neurologiques (comportement, apprentissage), la réponse immunitaire^{6,9,10}, mais aussi pathologique comme les maladies psychiatriques (schizophrénie, dépression), les maladies neurodégénératives (Alzheimer), les cancers, les pathologies du système reproducteur, les maladies cardiovasculaires, les troubles métaboliques (diabète, obésité) et les maladies respiratoires (asthme)^{6,11-13}.

En 2017, les médicaments approuvés par la « Food Drug Administration ; FDA » ciblant des RCPGs représentaient 475 molécules (~34%). Malgré cette grande proportion de molécules dirigées contre les RCPGs, seule une faible proportion de récepteurs est ciblée. En effet, les 475 médicaments ciblent uniquement 108 RCPGs, avec seulement une quarantaine qui est fortement ciblés¹⁴.

Sur 321 molécules en essai clinique en 2017, environ 20% concernent de nouveaux RCPGs⁷. Il est donc essentiel de connaître les mécanismes moléculaires et cellulaires en lien avec ces récepteurs et d'augmenter le nombre de molécules candidates afin de développer des thérapies innovantes. La caractérisation des récepteurs orphelins pourrait ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques¹⁴.

L'importance des RCPGs dans la physiopathologie humaine s'est multipliée suite aux nombreux prix Nobel obtenus par les chercheurs travaillant sur ces protéines (**Figure 3**).

Ces prix ont couronné différentes découvertes, allant de la compréhension des mécanismes d'interaction, ligand-récepteur, à la résolution de la structure tridimensionnelle en passant par la caractérisation moléculaire/cellulaire et la régulation fonctionnelle (**Figure 3**).

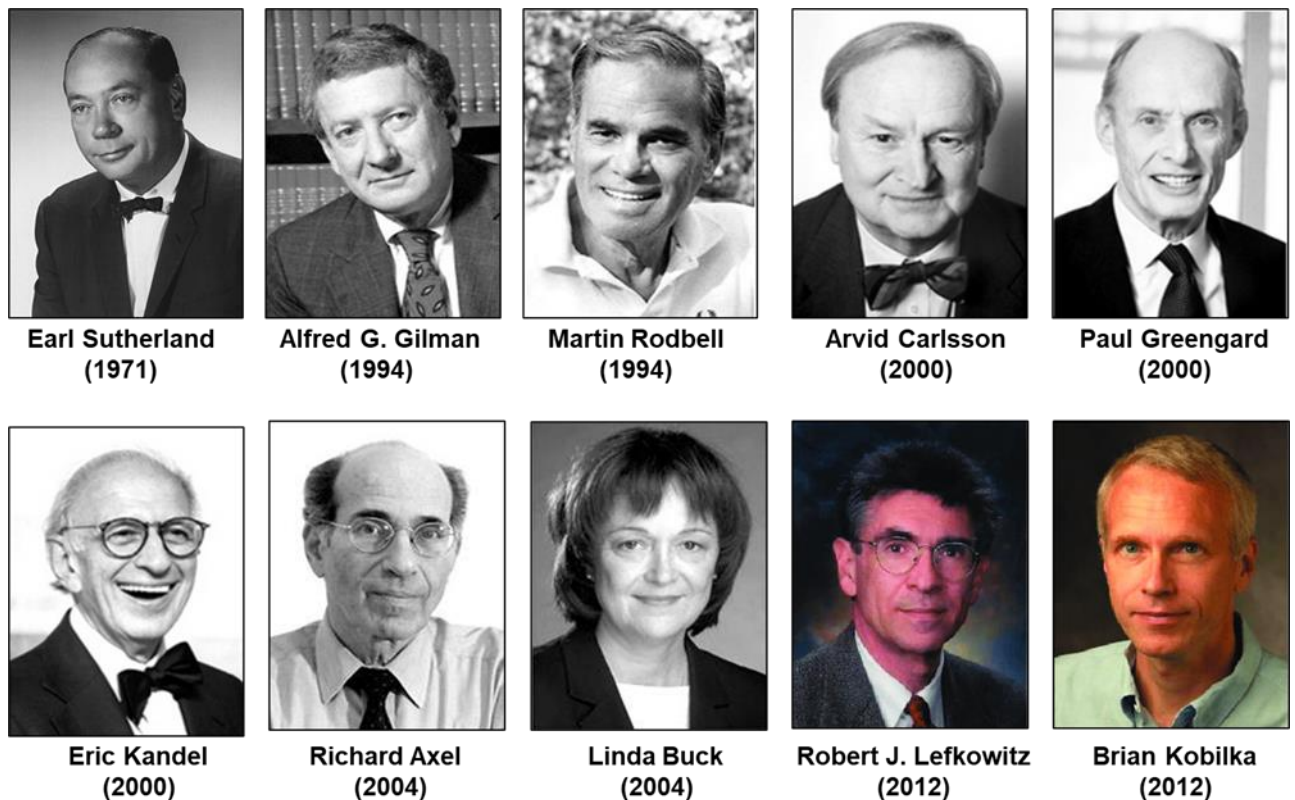


Figure 3 : Prix Nobel associés aux RCPGs

2. STRUCTURE DES RCPGs

La détermination de la structure des RCPGs a été initiée en 1993, suite à l'utilisation de la microscopie électronique pour déterminer la structure bidimensionnelle en projection de la rhodopsine (résolution 9 Å)¹⁵.

En parallèle, l'alignement de séquences primaires des RCPGs identifiés a permis de déduire leurs structures ¹⁶. Ces résultats ont été confirmés, en 2000, grâce à la résolution des structures bi- puis tridimensionnelles par cristallographie (résolution 2.6 Å)(**Figure 4**)¹⁷.

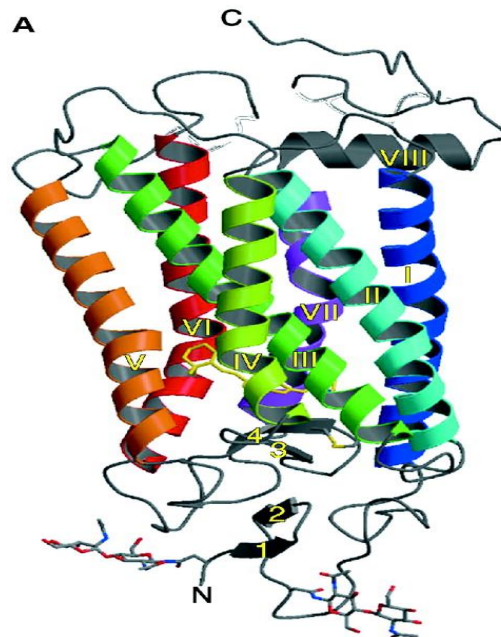


Figure 4: Structure de la rhodopsine bovine, publiée en 2000¹⁷

Topologie caractéristique d'un RCPG de classe A avec sept hélices transmembranaires (I-VII), une partie N-terminale (N) et une autre C-ter (C). L'hélice finale (VIII) est perpendiculaire aux autres hélices et parallèle au côté cytoplasmique de la membrane plasmique.

Aujourd'hui, de nombreuses structures de RCPGs déterminées dans des conformations actives ou non, et en présence ou non d'autres protéines (ligand, β -arrestine, G protéine) sont disponibles (**Figure 5**).

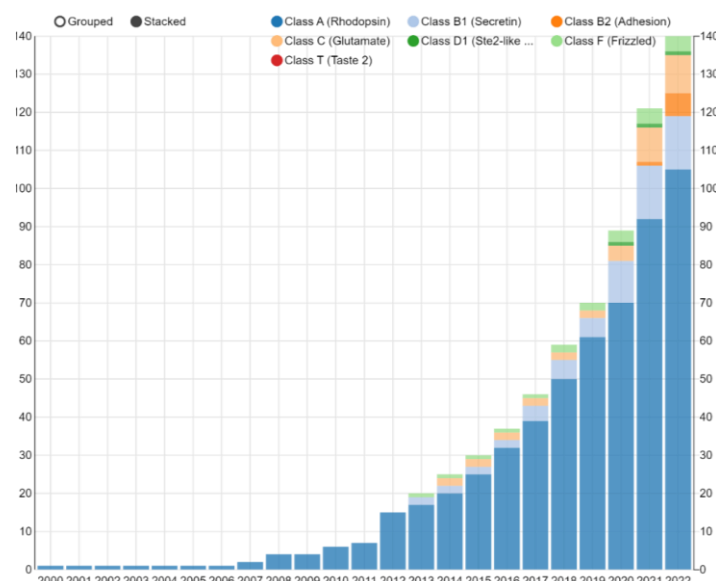


Figure 5: Nombre de structures de RCPGs disponibles pour les 7 classes de récepteurs, depuis l'année 2000¹⁸

Malgré une faible identité de séquence (<20%)¹⁹, les RCPGs partagent une architecture globale commune (**Figure 6**) caractérisée par 7 domaines transmembranaires (notés TM1 à 7). Ces domaines sont structurés en hélice alpha (α) et constituent un tonnelet tridimensionnel permettant l'ancrage du récepteur dans la membrane. Dans la majorité des récepteurs, chaque hélice α est constituée de 25 à 35 résidus. Ces domaines sont reliés par des boucles qui sont localisées soit à l'intérieur de la cellule formant ainsi les boucles intracellulaires (ICL1 à 3), soit à l'extérieur de la cellule s'agencant dans la matrice extracellulaire et formant les boucles extracellulaires (ECL1 à 3). L'extrémité amino-terminale (N-ter) est extracellulaire alors que l'extrémité carboxy-terminale (C-ter) est intracellulaire. La possible présence de cystéine dans les boucles peut donner lieu à la création de ponts disulfures entre boucles du même type. Ce processus se produit entre les ECL1 (ou à la fin de la partie extracellulaire du TM3) et ECL2. Une 8^{ème} hélice α peut également exister entre le TM7 et la partie C-ter (**Figure 6**). Cette hélice est un site potentiel de palmitoylation (modification post-traductionnel) permettant son ancrage dans la bicouche lipidique, créant ainsi une pseudo boucle intracellulaire 4¹⁷.

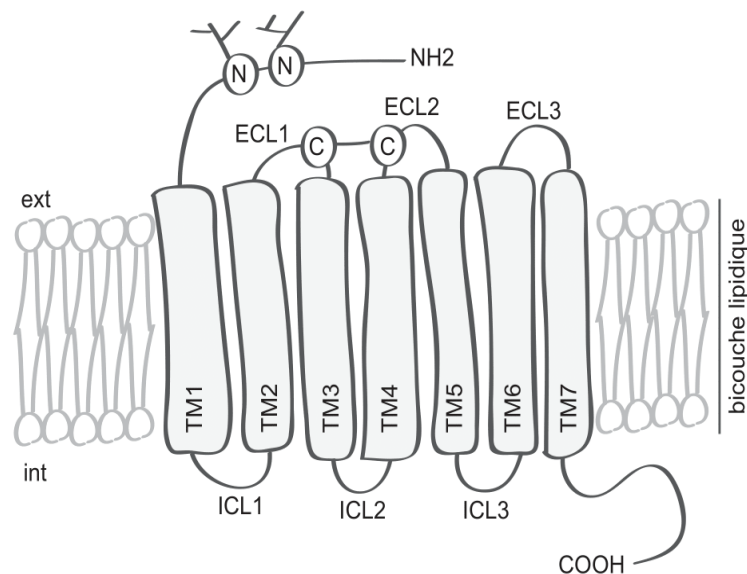


Figure 6: Structure générale des RCPG²⁰

Au niveau de la bicouche lipidique, les RCPGs possèdent des domaines transmembranaires (TM1-TM7) liés entre eux par trois boucles extracellulaires (ECL1-3) et trois boucles intracellulaires (ICL1-3). Des cystéines (C) peuvent être présentes dans les boucles ECL1 et ECL2 formant ainsi un pont disulfure. L'extrémité amino-terminale (NH2) ou N-ter est extracellulaire (ext) et peut subir des modifications post-traductionnelles de type N-glycosylation (N). L'extrémité carboxy-terminale (COOH) ou C-ter est intracellulaire (int).

La similarité dans l'architecture des RCPGs résulte d'une origine évolutive commune qui est notamment visible dans les domaines TM, où l'on retrouve la plus grande identité entre les récepteurs, notamment au niveau des résidus essentiels à leur intégrité. À l'inverse, on trouve

une forte différence dans les parties hydrophiles comme les parties N-ter et C-ter. En effet, la partie N-ter peut compter de 7 (RA₂A de l'adénosine) jusqu'à 5900 résidus (très grand récepteur couplé aux protéines G : **VLGR** (**V**ery **L**arge **G**-protein coupled **R**eceptor)). Ces variations constituent un critère pour la classification des RCPGs et sont imputables à la grande diversité de ligands qu'ils sont capables de lier.

3. CLASSIFICATION DES RCPGS

3.1. Généralités

Les RCPGs sont classés en famille en utilisant différents critères comme la structure, la séquence primaire, la phylogénie, la composition en acides aminés ou encore le mode de liaison du ligand. Deux classifications sont acceptées par la communauté scientifique et sont les plus utilisées. **La première** est la classification de Kolakowski^{21,22} séparant les RCPGs en sept classes nommées de A à F (**Tableau 1**). Cette classification est basée sur l'analogie de séquence primaire et comprend les RCPGs provenant des vertébrés et des invertébrés.

Les récepteurs de la classe A (environ 700 membres chez l'Homme) sont groupés autour du modèle de la rhodopsine. Ceux de la classe B (48 membres chez l'Homme) ont pour modèle la sécrétine. En revanche, ceux de la classe C (22 membres chez l'Homme) sont de type « métabotrope-glutamate/phéromone ». Pour ceux de la classe D, ils sont de type « phéromone fongique (fungal pheromone) », alors que ceux de la classe E et F (37 membres chez l'Homme) ont pour modèle « l'AMP cyclique » et « frizzled/Taste2 », respectivement.

Les récepteurs de la classe D et E ne sont pas présents chez les animaux. Ils sont respectivement exprimés chez les champignons et les moisissures (*Dictyostelium*).

Une seconde classification plus récente existe aussi. Celle-ci se base sur la phylogénie et est dénommée GRAFS, pour Glutamate, Rhodopsin, Adhesion, Frizzled, Secretine²³. Une comparaison entre ces deux classifications est illustrée dans le **Tableau 1**.

Classification Kolakowski	Classification GRAF	# Membres humains
A	Rhodopsine	689
B	Sécretine (B1)	15
	Adhésion (B2)	33
C	Glutamate	22
D	-	0
E	-	0
F	Frizzled	11
T	Taste 2	25
O	Autre	6

Tableau 1: Classification des RCPGs selon Kolakowski et GRAFS ²⁴

Les classes A, B et C dont la topologie générale est reportée en (**Figure 7**) sont les plus communes chez l'humain.

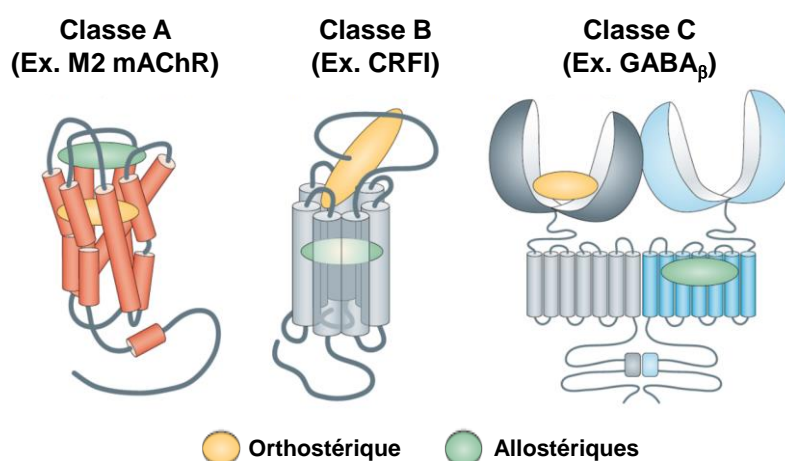


Figure 7: Structure générale des RCPGs de classe A, B et C montrant les sites de liaisons orthostériques et allostériques.²⁵

3.2. CLASSE A : RHODOPSIN

3.2.1. Généralités

Cette classe de RCPGs est la plus prépondérante (~80%). Elle est aussi la classe la plus étudiée et caractérisée sur le plan moléculaire, cellulaire et fonctionnel (**Figure 8**). Ces récepteurs sont activés par une variété de ligands allant de la lumière aux hormones, en passant par des polypeptides et des lipides ou biogènes (sérotonine). Plus de la moitié de cette classe sont des récepteurs sensoriels liés aux différents sens (olfaction, goût, vision).

D'un point de vue structurel, cette famille est caractérisée par une partie N-ter assez courte et par une huitième hélice parallèle à la membrane. Elle comporte également des motifs conservés tels que le motif E/DRY situé du côté intracellulaire du TM3 et jouant un rôle important pour l'activation de ces RCPGs hormis la tyrosine (Y)²⁷. Ce motif constitue un verrou ionique entre les TM3 et 4 qui va être rompu par la fixation du ligand. Un réarrangement va alors s'effectuer rendant disponible le site de fixation des protéines G.

Un autre motif NPXXY situé dans le domaine TM7 est également très conservé. Au niveau du TM2, c'est le résidu aspartate qui semble jouer un rôle important dans la liaison du ligand et dans le couplage à la protéine G²⁷. En effet, la mutation de ce résidu cause un blocage de la régulation allostérique par des cations monovalents comme le sodium (Na⁺)²⁷. Les membres de cette classe possèdent aussi un domaine PIF assez conservé et un motif CWxP impliqué dans l'activation du récepteur et dans la transduction du signal. Concernant le site de liaison du ligand, il est majoritairement fait par la poche hydrophobe constituée par les domaines TM.

En raison de l'importance de cette classe et le fait que ces membres ont une faible homologie de séquence, particulièrement au niveau des parties extracellulaires (site de liaison du ligand), elle a été subdivisée en quatre sous-groupes : **α, β, γ, et δ**. Cette nouvelle classification ne fait pas l'unanimité.

3.2.2. Sous-Groupe α

Ce sous-groupe est composé de récepteurs activés par de petites molécules. Il représente le plus grand cluster des récepteurs olfactifs (388 membres). Le site de liaison du ligand se situe dans la poche hydrophobe formée par les TMs. Ce sous-groupe rassemble des récepteurs aux amines qui sont les plus représentés (récepteurs sérotonine, dopamine, adrénaline, histidine), mais aussi des récepteurs aux prostaglandines, aux opsines répondant à la lumière, à la mélatonine et les récepteurs MECA (mélanocortine, à adénosine, cannabinoïdes).

3.2.3. Sous-Groupe β

Ce sous-groupe est constitué par les récepteurs activés par des peptides, notamment les neuropeptides ainsi que les récepteurs de certaines cytokines. Il est composé par exemple des récepteurs au neuropeptide Y, à la cholécystokinine ou encore aux **prokinétines**. Le site de liaison du ligand implique, en plus de la poche hydrophobe formée par les TMs, la partie N-ter, ECL1 et 2.

3.2.4. Sous-Groupe γ

Il est constitué par les récepteurs aux opioïdes, à la somatostatine, à la mélanine, à l'angiotensine et aux chimiokines.

3.2.5. Sous-Groupe δ

Ce dernier sous-groupe est subdivisé en plusieurs catégories incluant les récepteurs MAS (récepteur à l'angiotensine oncogène Mas) avec pour ligand l'angiotensine, les récepteurs aux glycoprotéines dont le site de liaison se situe dans la partie N-ter, les récepteurs aux purines, et les récepteurs olfactifs (majoritairement orphelin).

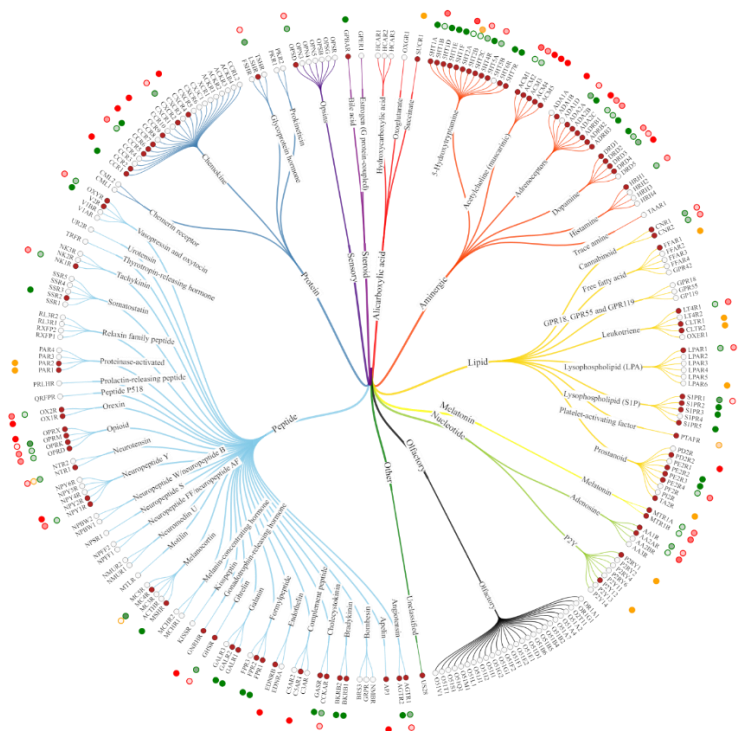


Figure 8: Classification des récepteurs de la sous-famille Rhodopsine (classe A)

La première série de points en partant du centre correspond à l'existence (rouge) ou non (transparent) d'une structure résolue ; le deuxième groupement le plus à l'extérieur correspond à l'état du récepteur sur cette structure existante ; le vert correspond à une structure dans un état actif, le jaune intermédiaire et le rouge inactif ; l'opacité de la couleur dépend de la fréquence de l'état de la structure de faible, pour une faible opacité à haute, pour une haute opacité.

3.3. CLASSE B : SECRETINE et ADHESION

3.3.1. Généralités

Il existe une grande différence entre la classe A et B, principalement marquée par une faible homologie (environ 12%). La classe B ne possède pas les motifs retrouvés dans la classe précédente A.

Au niveau structural, la partie N-ter est beaucoup plus grande au sein de cette famille (jusqu'à 300 résidus) et comporte 6 cystéines. Ces résidus thiols vont induire la formation de ponts

disulfures nécessaires à la structuration de la partie N-ter en deux feuillets β inverse qui vont former le motif sushi essentiel à la reconnaissance du ligand²⁸.

Ces ligands sont majoritairement des hormones et neuropeptides composés de 30 à 40 résidus. Leur partie C-ter se lie à la partie N-ter des récepteurs et la partie N-ter du ligand se lie quant à elle aux domaines TMs. Cette famille de récepteurs est impliquée dans de nombreuses pathologies métaboliques, neurodégénératives, cardiovasculaires, psychiatriques et dans le cancer²⁹. Cette classe est subdivisée en deux sous-groupes : Sécrétine et Adhésion.

3.3.2. Sous-Groupe Sécrétine (B1)

Les récepteurs du sous-groupe Sécrétine (15 membres chez l'Homme) ont pour ligand principalement des peptides et des hormones comme la sécrétine, le glucagon ou l'hormone parathyroïde (PTH) et sont particulièrement étudiés dans le domaine des maladies métaboliques. (Figure 9)³⁰.

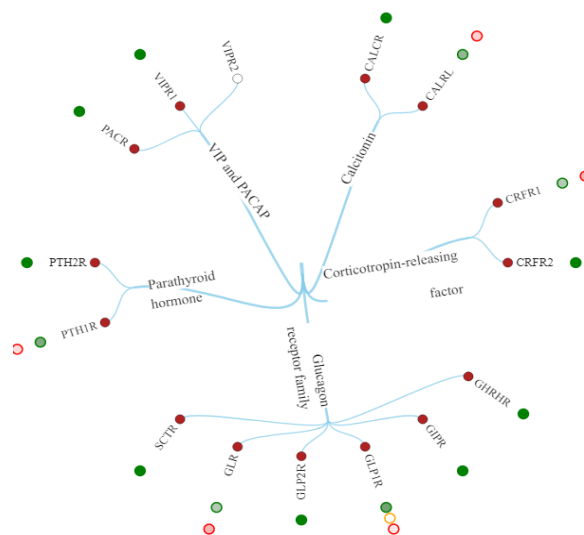


Figure 9: Classification des récepteurs du sous-groupe Sécrétine (B1)

La première série de points en partant du centre correspond à l'existence (rouge) ou non (blanc) d'une structure résolue. La deuxième série, le plus à l'extérieur, correspond à l'état du récepteur au niveau de la structure résolue : État actif (vert), intermédiaire (jaune), inactif (rouge). L'opacité de la couleur dépend de la fréquence de l'état de la structure : une faible opacité (faible fréquence), une haute opacité (forte fréquence).

3.3.3. Sous-Groupe Adhésion (B2)

Les récepteurs du sous-groupe adhésion possèdent une partie N-ter très longue comportant des domaines d'adhésions moléculaires à la cadhérine (CLR), à l'intégrine (ILR), et à la thrombospondine (TLR). Les ligands sont majoritairement des composants de la matrice extracellulaire comme le collagène de type III (Col3a1) pour le GPR56 ou la chondroïtine sulfate^{31,32}. Ces récepteurs sont peu présents chez les vertébrés (33 membres chez l'homme), mais fortement exprimés chez les invertébrés, comme l'oursin qui possède presque une centaine de RCPGs d'adhésion différents.

La majorité des membres de ce sous-groupe possède un motif GPS (GPCR proteolytic site) en N-ter, qui semble être un site d'autoprotéolyse. La fonction exacte de ce clivage reste encore mal connue, mais des mutations dans ce domaine peut entrainer un mauvais repliement du récepteur et causer ainsi des pathologies chez l'Homme (**Figure 10**)³³.

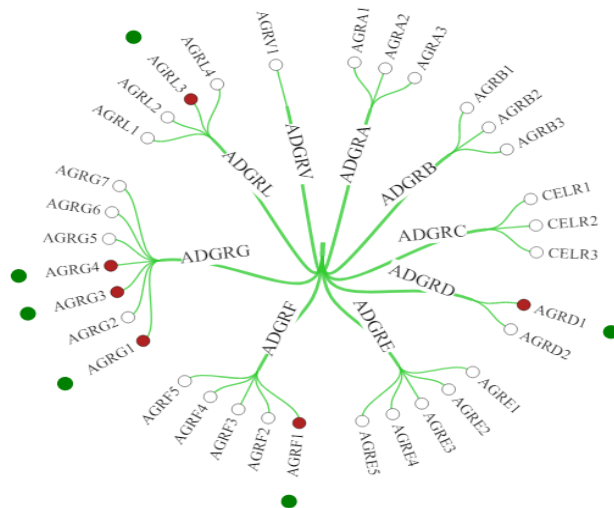


Figure 10: Classification des récepteurs du sous-groupe Adhésion (B2)

La première série de points en partant du centre correspond à l'existence (rouge) ou non (blanc) d'une structure résolue. La deuxième série, le plus à l'extérieur, correspond à l'état du récepteur sur cette structure existante : État actif (vert), intermédiaire (jaune), inactif (rouge). L'opacité de la couleur dépend de la fréquence de l'état de la structure : une faible opacité (faible fréquence), une haute opacité (forte fréquence).

3.4. CLASSE C : GLUTAMATE

Cette classe regroupe différents récepteurs. Ils sont au nombre de 22, comme les récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluR1-8), les récepteurs du goût, les récepteurs GABA, les récepteurs au calcium et les récepteurs aux phéromones. Au niveau structurel, leur partie N-ter est très importante en taille, qui peut atteindre jusqu'à 500 résidus pour la classe B. Elle est essentielle à la fixation du ligand. En effet, en se repliant, elle crée deux lobes qui forment le site de fixation du ligand (orthostérique). Ce site est aussi nommé VFT pour « Venus FlyTrap domain ».

Ce domaine, en fonction de l'agoniste, peut adopter deux états ; ouvert ou fermé. En effet, un agoniste va provoquer la fermeture autour de lui des deux lobes, à l'image d'une plante carnivore, d'où son nom VFT³⁴. Cependant, de nombreux autres ligands (allostérique) peuvent se fixer sur cette famille de récepteur sur un site différent du site orthostérique, modulant ainsi l'activité du récepteur. Une autre spécificité de cette famille est la présence d'une ICL3 courte qui semble très conservée³⁵. De plus, l'oligomérisation est essentielle au bon fonctionnement des récepteurs de cette famille, notamment le site de fixation du ligand qui est composé de deux lobes stabilisés et connectés aux domaines TMs par des ponts disulfures (**Figure 11**)³⁵.

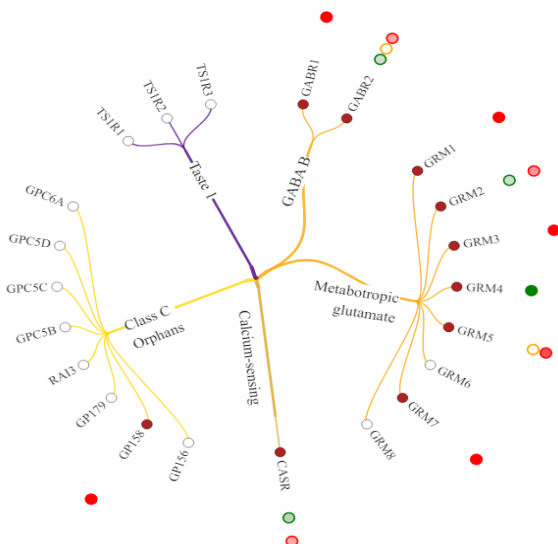


Figure 11: Classification des récepteurs du sous-groupe Glutamate (C)

La première série de points en partant du centre correspond à l'existence (rouge) ou non (blanc) d'une structure résolue. La deuxième série, le plus à l'extérieur, correspond à l'état du récepteur sur cette structure existante : État actif (vert), intermédiaire (jaune), inactif (rouge). L'opacité de la couleur dépend de la fréquence de l'état de la structure : une faible opacité (faible fréquence), une haute opacité (forte fréquence).

3.5. CLASSE D

Cette classe est composée de récepteurs aux phéromones exprimés dans la partie inférieure du nez dans l'organe voméronasal chez les insectes³⁶.

3.6. CLASSE E

Cette classe est minoritaire, n'étant composée que d'un très faible nombre de récepteurs. On y trouve quatre récepteurs à l'AMPC (cAR) et d'autres récepteurs « cAMP receptor-like » présents chez *Dictyostelium discoideum* (moisissure). Dans le génome de cette moisissure, les RCPGs représentent environ 0.5%³⁷.

3.7. CLASSE F : FRIZZLED ET TASTE2

3.7.1. Généralités

Dans cette classe, on trouve deux sous-groupes de récepteurs ne présentant que très peu d'homologie (moins de 20% d'identité), mis à part quelques caractéristiques dans les domaines TM2, 5 et 7. Suite à l'analyse phylogénique, ces caractéristiques ont suffi pour les grouper dans la classe F. Par ailleurs, il a été récemment suggéré, notamment par le site internet GPCRdb, que les récepteurs Taste 2 font partie d'une nouvelle classe : Classe T³⁸.

3.7.2. Sous-Groupe Frizzled/Smoothened

Ce sous-groupe est composé de récepteurs qui jouent un rôle dans le développement embryonnaire, le contrôle de la prolifération, la polarité des cellules et la formation des synapses neuronales. Sur le plan pathologique, ils sont impliqués dans de nombreuses maladies comme

le cancer et les maladies dégénératives. Deux médicaments approuvés par la FDA ciblent ce sous-groupe de récepteurs (Vismodegib et Sonidegib). Au niveau structurel, ils possèdent des ICL très courtes et leur partie C-ter varie de 20 à 200 résidus chez l'Homme^{39,40}.

Aussi, des motifs sont retrouvés chez la majorité des membres de cette famille comme les motifs IFL (TM2), SFL (TM5) et SxKTL (TM7)⁴¹. Les récepteurs de la famille Frizzled (11 membres chez l'Homme) interagissent avec Wnt (wingless integration site) et ainsi participer au contrôle de la différenciation, la prolifération, et l'apoptose au cours du développement embryonnaire⁴². Alors que les récepteurs Smoothened (1 membre chez l'Homme) vont activer le signal Hedgehog, la liaison avec les ligands semble se faire via la partie N-ter riche en cystéines (**Figure 12**).

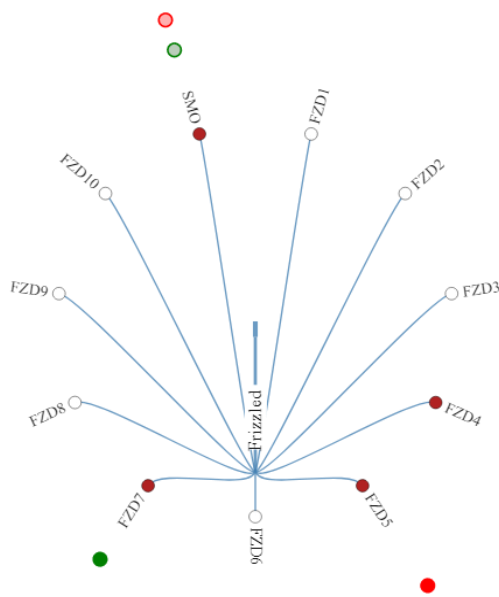


Figure 12: Classification des récepteurs de la sous-famille Frizzled (F)

La première série de points en partant du centre correspond à l'existence (rouge) ou non (blanc) d'une structure résolue. La deuxième série, la plus à l'extérieur, correspond à l'état du récepteur sur cette structure existante : État actif (vert), intermédiaire (jaune), inactif (rouge). L'opacité de la couleur dépend de la fréquence de l'état de la structure : une faible opacité (faible fréquence), une haute opacité (forte fréquence).

3.7.3. Sous-Groupe Taste2

Ces récepteurs (25 membres chez l'Homme) ont un rôle majeur dans le goût, notamment dans la détection du goût amer, sucré et umami (Umami signifie « essence de délice » en japonais, et son goût est souvent décrit comme le délice charnu et salé qui approfondit la saveur). Les goûts salés et acides semblent être contrôlés par des canaux ioniques.

Étonnement, l'expression de ces récepteurs n'est pas limitée à la cavité buccale, mais sont également exprimés dans le système gastro-intestinal, les poumons et le cerveau. En absence de données structurales, le mode de fonctionnement de ces récepteurs n'est pas encore bien caractérisé. Leur site de liaison du ligand semble être dans la poche hydrophobe formée par les domaines TMs (**Figure 13**)⁴³.

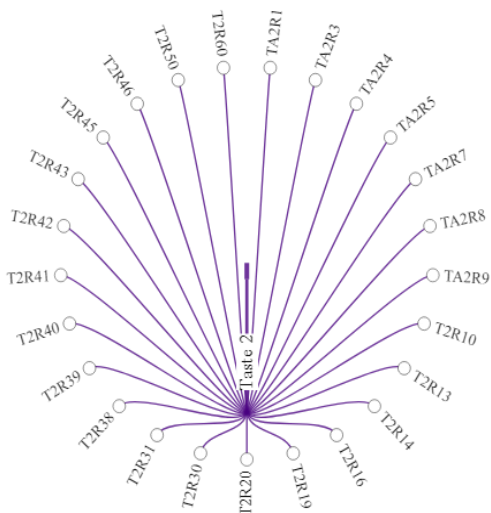


Figure 13: Classification des récepteurs du sous-groupe Taste2

Les cercles blancs en partant du centre correspondent à l'absence de structure résolue.

4. TRANSDUCTION DU SIGNAL CHEZ LES RCPGS

4.1. Généralités

Les RCPGs interagissent avec un grand nombre de partenaires, de nature et de fonction très diverses, et qui peuvent être localisés à l'intérieur ou à l'extérieur de la cellule. Même la composition lipidique de la membrane plasmique peut influencer le degré d'activation de ces récepteurs.⁴⁴⁻⁴⁶ Ces interactions font partie de la transduction du signal et agissent sur les équilibres conformationnels intrinsèques des récepteurs⁴⁷. L'oligomérisation joue également un rôle important dans la transduction du signal⁴⁸.

4.2. Les facteurs extracellulaires

4.2.1. Généralités sur les ligands

Par le passé, on considérait que les RCPGs étaient, en l'absence de leur ligand, dans un état inactif dépourvu d'activité basale. Dans les années 90, des preuves de l'existence d'un niveau basal d'activité pouvant être inhibé par des molécules ont été avancées⁵⁰. Un nouveau modèle est alors établi considérant que les RCPGs possèdent une activité basale qui va exister en équilibre entre un état actif (R*) et un état inactif (R)⁵⁰. Ce modèle s'ajoute au modèle ternaire défini par le triptyque ligand-RCPG-protéine G, nécessaire à la signalisation cellulaire pour aboutir à un modèle ternaire « étendu » incluant les deux états R et R* (**Figure 14**)⁵¹.

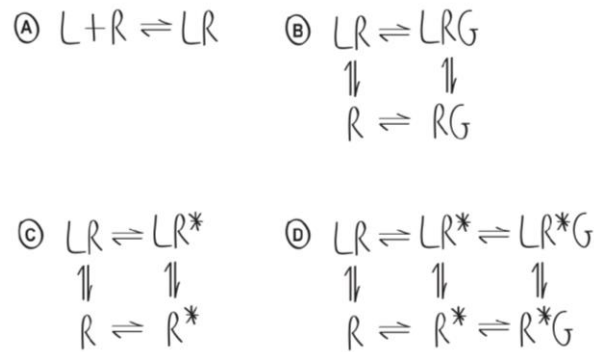


Figure 14: Modèle d'activation des RCPGs²⁰

(A) Modèle initial d'un ligand se fixant sur son récepteur afin de produire une signalisation

(B) Modèle ternaire incluant dans le modèle A la protéine G noté G

(C) Modèle à deux états : R* : actif et R : inactif

(D) Modèle ternaire étendu incluant au modèle ternaire (C) le modèle à deux états (D)

Les ligands peuvent être divisés en deux groupes de par la localisation de leur site de liaison.

- **Les ligands orthostériques, se fixant au niveau du site de fixation des ligands endogènes, le plus souvent constitués des domaines extracellulaires et de la cavité transmembranaire.**
- **Les ligands allostériques, se fixant sur un site en dehors du site de liaison des ligands endogènes.**

Les ligands peuvent également être classifiés en fonction de leurs effets biologiques. Ainsi, ils sont divisés en **3 groupes** :

- **Agoniste conventionnel (complet, partiel ou inverse)**
- **Antagoniste**
- **Agoniste biaisé**

4.2.2. Les ligands orthostériques

4.2.2.1. Les ligands conventionnels

Les agonistes complets ou partiels

Un agoniste se fixe sur un récepteur en induisant un changement de l'équilibre thermodynamique. Ce processus va ainsi favoriser la forme active (R*) pour les agonistes complets et partiels et la forme inactive (R) pour l'agoniste inverse. Cette fixation se fait sur la forme conformationnelle du récepteur ayant la plus grande affinité pour le ligand.

L'agoniste complet va produire une réponse biologique maximale contrairement à l'agoniste partiel qui va induire une faible réponse biologique^{52,53}. Cet effet est inférieur même à des concentrations saturantes et s'expliquerait de deux façons :

- Une plus faible affinité de l'agoniste partiel pour l'état actif du récepteur comparé à l'agoniste complet
- Une conformation active différente entre les deux agonistes (Figure 15).

Les agonistes inverses

Comme indiqué précédemment, à l'état basal, les RCPGs sont dans un équilibre entre l'état actif (R^*) et inactif (R). Dans cette situation, l'agoniste inverse va favoriser la conformation inactive du récepteur. La réponse biologique est donc inférieure au niveau basal (**Figure 15**)⁵⁴.

4.2.2.2. Les antagonistes

Un antagoniste est capable de se fixer sur le récepteur et réduire la fixation de son ligand souvent par compétition. Il induit ainsi une diminution de l'effet biologique jusqu'à le ramener à l'état basal. Possédant la même affinité pour les deux formes du récepteur, les antagonistes sont considérés comme neutre et ne possédant pas d'activité intrinsèque (**Figure 15**).

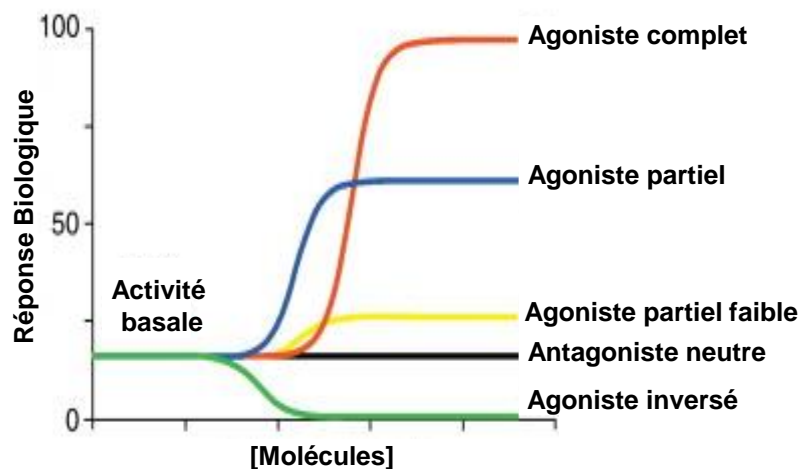


Figure 15: Représentation schématique des différents types de ligands des RCPGs classés selon leurs effets biologiques⁵⁵

4.2.2.3. Les ligands biaisés

Au début de la recherche sur les RCPGs, il était considéré que la fixation d'un agoniste sur son récepteur activait toutes les voies de signalisation avec la même efficacité. Cependant, plusieurs études ont remis en question cette idée et ont permis d'introduire la notion du **ligand biaisé**. Ce

type de ligand est capable, après sa fixation sur son récepteur, d'activer spécifiquement une voie de signalisation plutôt qu'une autre.⁵⁶ Suite à la fixation de ce type de ligand, un récepteur RCPG va, par exemple, activer une protéine G particulière ou encore utiliser une voie de signalisation indépendante des protéines G, comme la voie β -arrestine. Ce nouveau type d'agoniste a ouvert la voie à de nouvelles perspectives thérapeutiques bien plus spécifiques, avec l'espoir de diminuer les effets indésirables.

Ce fut le cas, par exemple, du ligand biaisé se fixant sur le récepteur à l'angiotensine II (AT1a). Ce ligand active spécifiquement la voie β -arrestine et prévient ainsi les effets indésirables du traitement tout en conservant les effets bénéfiques sur la prolifération des cardiomyocytes.⁵⁷

Ce type de ligand a également été exploité dans le domaine de l'analgésie en agissant sur les récepteurs aux opioïdes (MOP). En effet, l'utilisation de ligands biaisés pour la voie $G_{\alpha i}$ a permis une analgésie plus spécifique et a évité les risques de détresse respiratoire associés à la voie β -arrestine⁵⁹.

Il n'y aurait pas seulement des ligands biaisés, mais également des récepteurs biaisés. En effet, le récepteur peut également être biaisé par un manque de signaux nécessaires pour choisir une voie par rapport à une autre. C'est le cas de la voie de phosphorylation dont l'absence d'activation par un récepteur peut défavoriser la voie β -arrestine au profit de la voie des protéines G.

Le système tout entier peut également être biaisé. En effet, si on considère l'exemple précédent, l'absence de phosphorylation peut être due à une répression d'expression de GRK (G protein-coupled receptor kinases) ou à une surexpression des protéines G⁵⁹.

De nombreuses études ont exploré et classé l'activité d'un ligand uniquement par rapport à une seule voie de signalisation. Cependant, cette catégorisation fonctionnelle n'est pas applicable à toutes les autres voies de signalisation. En effet, un ligand peut être, par exemple, un agoniste inverse pour une voie donnée, mais un agoniste partiel pour une autre voie. Le cas d'un ligand du récepteur β_2 -adrénergique ; le propranolol en est un bon exemple : ce ligand est un agoniste inverse de la voie $G_{\alpha s}$ et un agoniste partiel de la voie β -arrestine⁶⁰. La catégorisation fonctionnelle doit donc se faire au regard d'une voie de signalisation spécifique.

4.2.3. Les ligands allostériques

Il s'agit de ligands capables de se fixer sur un récepteur de manière spatialement distincte du site orthostérique. Ce site peut se situer dans la partie extracellulaire ou intracellulaire d'un RCPG et sa fixation induit une modulation de la réponse biologique en agissant sur trois aspects :

- **L'affinité du ligand orthostérique pour son récepteur**
- **L'efficacité de la réponse**
- **La spécificité de la signalisation en modifiant les voies de signalisation activées par le ligand orthostérique seul**⁶¹⁻⁶³.

Cette modification peut être positive ou négative pour la fixation du ligand endogène. Dans le cas positif, le ligand allostérique est dénommé ligand allostérique positif (PAM : positive allosteric modulators). Dans le cas négatif, le ligand est dénommé modulateur allostérique négatif (NAM : negative allosteric modulators). Ces deux types de ligands peuvent être qualifiés de non biaisés ou biaisés (BAM : biased allosteric modulators) si l'effet induit est spécifique ou non d'une voie de signalisation (**Figure 16**)^{25,64}.

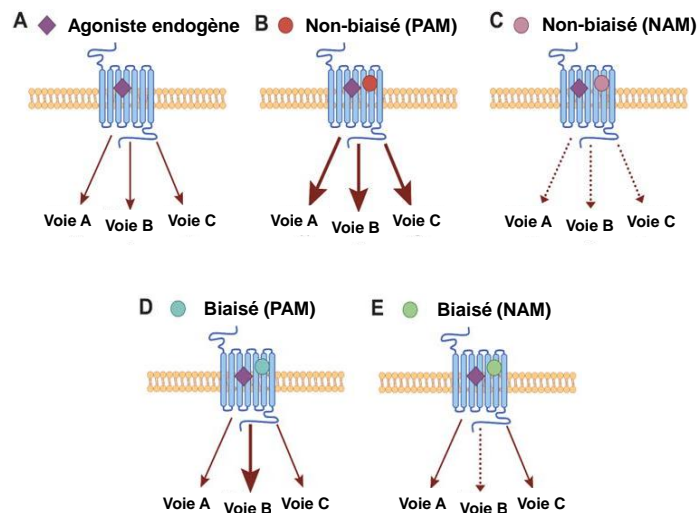


Figure 16: Différents types de modulateurs allostériques PAM ou NAM ²⁵

Il existe également de nombreux autres types de ligands allostériques :

- **Modulateur allostérique silencieux (SAM), considéré comme neutre puisqu'il n'affecte pas l'activité du récepteur.**
- **Agoniste allostérique capable de se fixer sur le site allostérique et de produire une réponse biologique, en absence de ligand orthostérique.**
- **Ligand bitopique capable de se fixer à la fois sur le site orthostérique et allostérique**^{65,66}.

Par ailleurs, les protéines Gs sont considérées comme des ligands allostériques puisqu'elles se fixent au RCPG au niveau d'un site distinct du site orthostérique modifiant ainsi l'affinité du ligand pour son récepteur. L'oligomérisation répond également à la définition de l'allostérie.

L'ensemble de ces éléments impliqués dans la signalisation des RCPGs a fortement complexifié le modèle ternaire étendu (**Figure 16D**) pour arriver au modèle exposé en **Figure 17**.

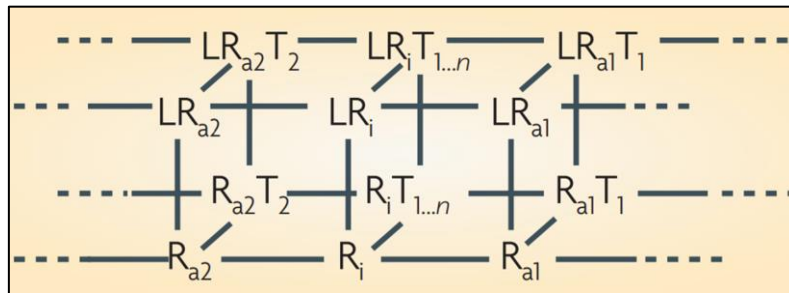


Figure 17: Modèle d'activation des RCPGs ⁶⁷

L : ligand, *R* : Récepteur, *T* : transducteur (ex : protéine *G*), *a* : état actif, *i* : état inactif. Les chiffres correspondent aux voies activées : *T1* = protéine *G*, *T2* = β -arrestine. *a1* et *a2* correspondent aux différentes conformations au cours de l'état d'activation.

4.3. Les facteurs intracellulaires

4.3.1. Transduction du signal : les protéines *G*

4.3.1.1. Généralités

Les protéines *G* (p*G*) sont ubiquitaires dans l'organisme et sont responsables de l'activation d'un grand panel de voies de signalisation induisant un très grand nombre de processus biologiques. Une p*G* est formée d'un complexe hétérotrimétrique composé de 3 sous-unités différentes nommées α , β et γ . La sous-unité α va majoritairement définir les propriétés de la p*G* et notamment sa signalisation. Différentes familles de sous-unités α existent : α_s , α_i , α_q , α_{12} . Les sous-unités β et γ sont très proches au niveau conformationnel et forment un complexe, fort, très difficile à dissocier.

Seulement 16 gènes ont été identifiés comme gènes codant pour 21 sous-unités $G\alpha$. Ces sous-unités forment une petite famille de protéines capable d'interagir avec un grand nombre de récepteurs.

Après activation de la p*G*, cette dernière interagit avec d'autres partenaires appelés messagers secondaires capables d'induire l'effet biologique, soit directement (exemple: canaux ioniques), soit indirectement par le biais d'autres effecteurs intermédiaires. Après leur dissociation suite à leur activation, les sous-unités $G\alpha$ et le complexe des sous-unités β et γ interagissent avec différents messagers secondaires^{68,69}.

4.3.1.2. Structure de la sous-unité $G\alpha$

La sous-unité $G\alpha$ est composée de deux domaines : le domaine AHD (α -helical domain) et le domaine Ras (Rat sarcoma virus). Le domaine Ras possède une activité GTPase, en interagissant avec les nucléotides GDP/GTP, permettant ainsi la transformation du GTP en GDP. Cette activité est minime et des protéines régulatrices nommées RGS (Regulator of G protein signaling) peuvent interagir avec la sous-unité $G\alpha$ afin d'augmenter son activité GTPase, jusqu'à ~2000 fois.

Le domaine Ras est composé de 5 hélices α ($\alpha 1$ – $\alpha 5$) et 6 feuillets β ($\beta 1$ – $\beta 6$) reliés par des boucles. Ces boucles peuvent jouer un rôle important dans la liaison des nucléotides, notamment la boucle $\beta 1$ – $\alpha 1$, P, $\beta 5$ – $\alpha 4$ et $\beta 6$ – $\alpha 5$. Le domaine AHD (α -helical domain) composé de 7 hélices α (αA – αG) forme aussi un domaine de liaison aux nucléotides (Figure 18).

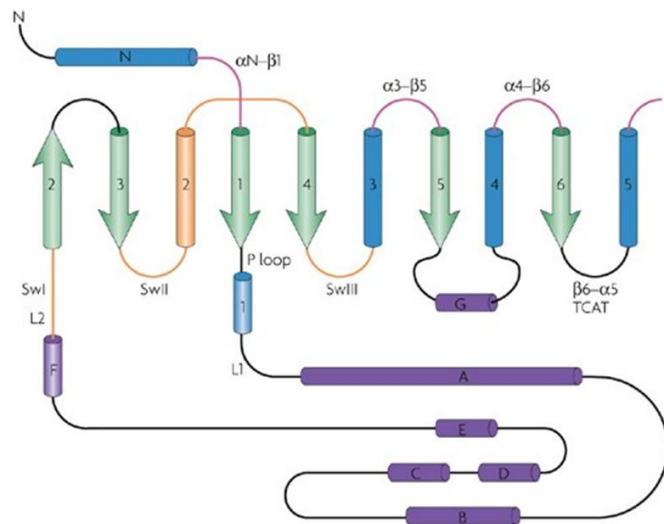


Figure 18: Structure secondaire de la sous-unité $G\alpha$ ⁶⁸

Les hélices- α sont représentées par des cylindres et les feuillets β par des flèches. Le domaine hélicoïdal est représenté par les 7 hélices- α violettes. Les boucles L1 et L2 font le lien entre ce domaine et le domaine GTPase. L'interface avec le RCPG est représentée en rose.

Lors de l'activation du RCPG, il y a séparation des deux domaines AHD et Ras pour libérer le GDP (**Figure 19**).

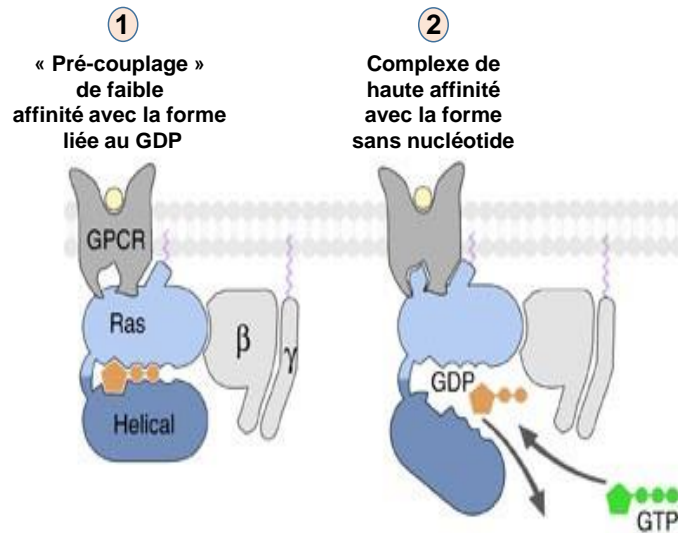


Figure 19: Mécanisme d'échange nucléotidique de la pG ⁷⁰

4.3.1.3. Activation de la pG

Le modèle classique d'activation des RCPGs est un modèle séquentiel impliquant quatre acteurs: le **ligand**, le **RCPG**, la **pG** et l'**effecteur secondaire** (par exemple dans le cas d'une pG α s ou G α i c'est l'adénylate cyclase (AC)).

À l'état basal, le récepteur RCPG est dissocié du complexe G α - β γ stabilisé par l'association avec le GDP (**Figure 20** ; Étape 1). La protéine G existe ainsi sous sa forme hétérotrimérique-GDP.

Durant l'étape de l'association entre le ligand et son RCPG, il se produit une modification conformationnelle du récepteur qui permet le couplage avec le complexe hétérotrimérique (α - β γ) suivi d'un échange de nucléotide où le GTP prend la place du GDP (Figure **20** ; Étape 2). Ceci va induire la dissociation de la sous-unité G α du complexe β γ (**Figure 20** ; Étape 3). Ce remplacement est supposé fonctionner en utilisant un mécanisme inverse de celui de l'expulsion du GDP. Sachant que les deux nucléotides se distinguent seulement par un groupement phosphate, et qu'ils ont la même affinité pour la G α vide, seule la concentration intracellulaire en faveur du GTP favorise le déplacement du GDP⁶⁸.

La protéine G α et le complexe β γ se retrouvent sous la forme active et peuvent induire l'activation d'autres effecteurs intracellulaires. Pour G α s, elle va activer l'AC qui va produire à son tour l'AMPc ; un second messenger. La G α va par la suite via son activité GTPase hydrolyser le GTP en GDP+P mettant ainsi fin à l'activation de l'AC et donc à la transduction

du signal pour former à nouveau le complexe hétérotrimère $G\alpha\text{-}\beta\text{-}\gamma$ liant le GDP (forme inactive). Pour le cas de la sous-unité $G\alpha_i$, le mécanisme reste le même, mis à part que la fixation de cette sous-unité (liant le GTP) sur l'AC induit son inhibition (**Figure 20**).

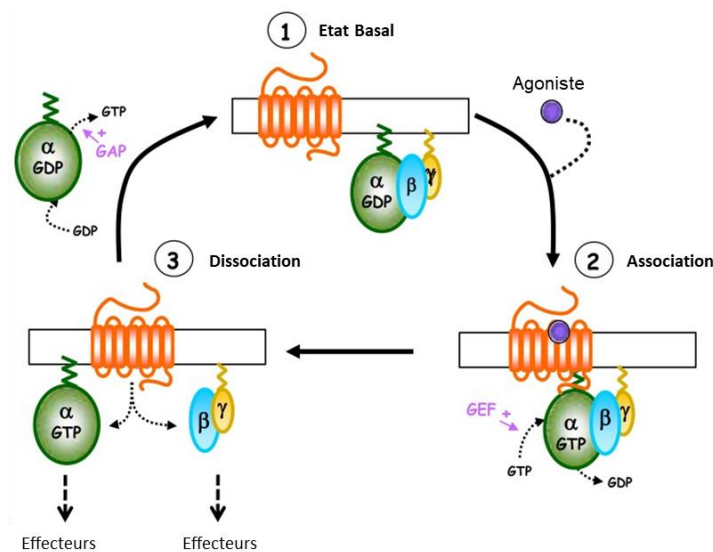


Figure 20: Cycle d'activation du complexe hétérotrimérique G ⁷¹

L'AC est composée de deux domaines cytoplasmiques C1 et C2 qui forment le domaine catalytique de l'enzyme lui permettant de transformer l'ATP en AMPc. La régulation de l'AC dépend étroitement de la fixation différentielle des sous-unités $G\alpha_s$ ou $G\alpha_i$.

En effet, la sous-unité $G\alpha_s$ se fixe sur le domaine cytoplasmique C2 induisant une augmentation d'affinité entre C1 et C2 nécessaire à la catalyse de la réaction (Figure 21). Par contre, la fixation du $G\alpha_i$ sur C1 diminue cette affinité et donc inhibe la catalyse. Il est à noter également qu'une interaction entre la sous-unité $G\alpha$ ou le complexe $\beta\gamma$ avec la partie N-ter cytoplasmique de l'AC participe à cette régulation (Figure 21).

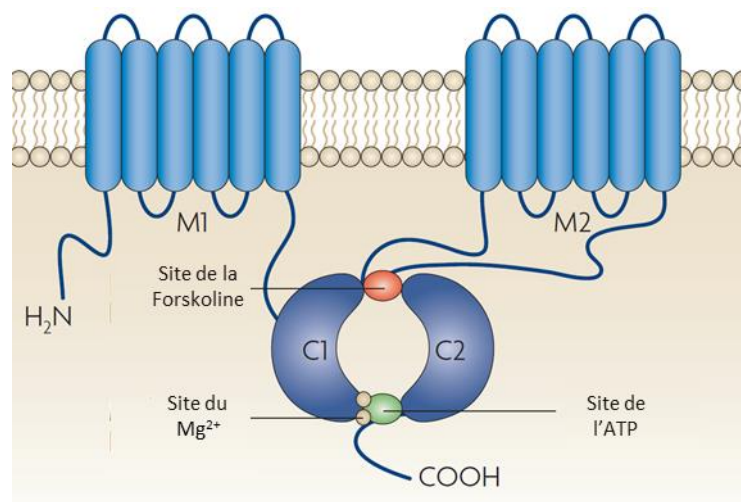


Figure 21: Structure de l'adénylate cyclase ⁷²

Dans ce modèle classique, les différents éléments (RCPG, pG, AC) sont considérés comme des protéines avec un important degré de mobilité dans la membrane plasmique. Ceci est en adéquation avec le modèle de « mosaïque fluide » de la membrane plasmique, où les protéines peuvent diffuser en 2D. Ce modèle classique de transduction du signal porte aussi le nom de « couplage par collision ». Dans ce modèle, les composants diffusent dans la membrane, et le couplage entre le RCPG et la pG se fait par rencontre ou collision. La fixation du GTP au niveau de la sous-unité $G\alpha$ induit la dissociation spatiale du complexe $G\alpha$ - $\beta\gamma$ leur permettant d'aller interagir avec leurs effecteurs respectifs.

Ce modèle est apparu en 1978 et a été appuyé par plusieurs études sur la rhodopsine et les récepteurs β -adrénergiques. Concernant la rhodopsine et son interaction avec la pG, les recherches ont mis en évidence un environnement lipidique particulier lui permettant une plus grande mobilité comparée aux autres RCPGs. Concernant les RCPGs adrénérgiques, beaucoup d'études ont été réalisées sur des récepteurs purifiés et incorporés dans des vésicules phospholipidiques (protéoliposomes) possédant également une importante fluidité lipidique.

Cependant, ce modèle a été remis en cause ; tout d'abord dans des études concernant le récepteur à l'adénosine ($A2A$) où il a été montré un précouplage entre le RCPG et la pG.

Puis il fut également remis en cause par de nombreuses études qui ont mis en évidence l'existence de microdomaines dans la membrane lipidique dénommés « raft lipidique (radeaux lipidiques) » où les protéines RCPG, pG et AC se concentrent. Dans ces microdomaines, on trouve une forte concentration de cholestérol et de sphingolipides, responsables de la baisse de la fluidité membranaire. De plus, ces protéines sont également en interaction avec le cytosquelette de la cellule limitant encore leur mouvement latéral. L'existence de ces microdomaines pourrait favoriser les interactions entre les partenaires en limitant leurs mouvements et donc permettre une transduction du signal plus efficace et plus adaptée (**Figure 22**).

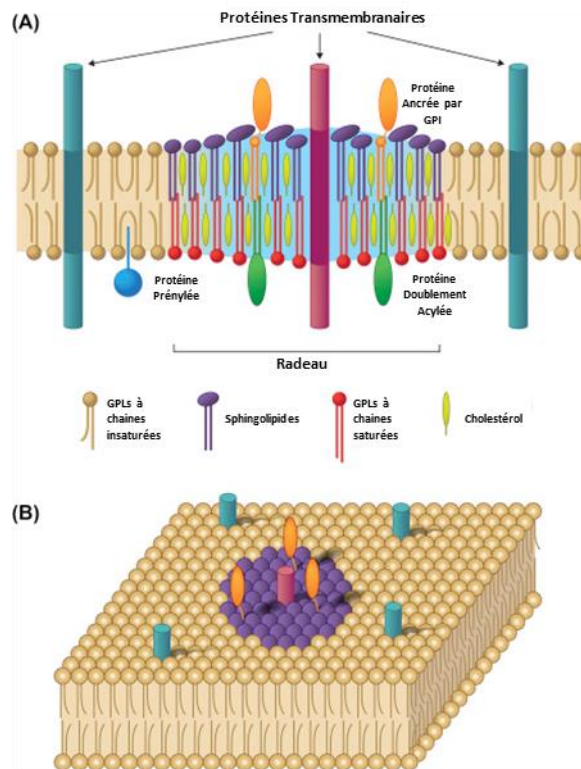


Figure 22: Modèle de raft lipidique membranaire⁷³

Le modèle de précouplage entre RCPG et pG a été appuyé par de nombreuses études. Il va encore plus loin en montrant également l'absence de dissociation entre $G\alpha$ et le complexe $\beta\gamma$, mais aussi l'existence d'un précouplage pG et AC. Le modèle décrit pour la rhodopsine semble être un cas spécifique, non applicable à la majorité des RCPGs, ni à d'autres types cellulaires. En effet, la dissociation du complexe $\beta\gamma$ de la pG a été observé uniquement dans les cellules bâtonnets et non dans les cônes⁷⁴. L'absence de dissociation ne veut pas dire absence de mouvement. Lors de l'activation du RCPG, il y a un changement de conformation de la pG afin de passer sous une forme active⁷⁵.

4.3.1.4. Interface RCPG/pG et dissociation du GDP

La partie C-ter et l'hélice $\alpha 5$ de la pG jouent un rôle très important dans l'interaction avec les domaines TM3, 5 et 6 et avec les ICL2 et 3 du récepteur RCPG⁷⁶⁻⁸⁰. L'utilisation d'un peptide synthétique de la partie C-ter du $G\alpha$ a permis de démontrer que ce peptide est suffisant pour interagir avec les RCPGs et modifier leur dynamique^{81,82}.

Par ailleurs, l'hélice $\alpha 5$ en C-ter possède une orientation différente entre $G_{\alpha s}$ et $G_{\alpha i}$.^{76,83} L'action de la $G\alpha$ pourrait avoir un effet allostérique sur le RCPG induisant un changement de conformation comme ce fut démontré pour le récepteur de l'Adénosine A2A (class A).⁸⁴

En présence de GDP dans la pG, cette hélice $\alpha 5$ interagit de manière hydrophobe avec $\alpha 1$, $\beta 2$, et $\beta 3$. L'activation du récepteur va induire la dissociation de ces liaisons qui aura comme conséquence un mouvement de l'hélice $\alpha 1$, diminuant ainsi son interaction avec αF du domaine AHD et accélérant la sortie du GDP. Le domaine αN - $\beta 1$ a également son importance dans l'interaction avec le RCPG via ICL2. Son activation crée une dynamique dans ce domaine qui le transmet à la boucle P accélérant le relargage du GDP. Le domaine αN - $\beta 1$ joue aussi un important rôle dans le relargage du nucléotide en interagissant avec ICL2 du RCPG assurant ainsi la connexion avec la boucle P. Après activation du RCPG, ce domaine devient plus dynamique (Figure 23)⁸⁵.

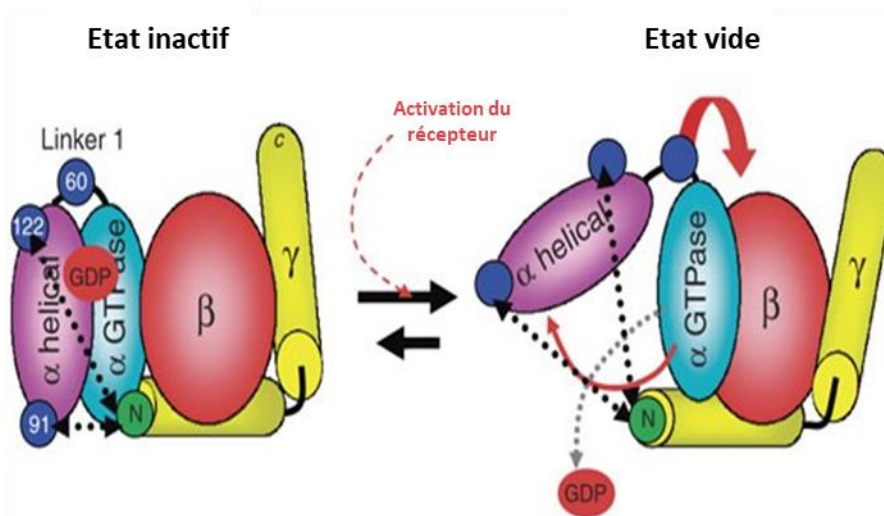


Figure 23: Mode d'activation de la protéine G hétéro-trimérique⁷⁵

4.3.1.5. Formation du complexe hétérotrimétrique

Bien en amont de l'arrivée du ligand sur son récepteur, le complexe hétérotrimétrique se forme entre une sous-unité $G\alpha$ inactive et le complexe $\beta\gamma$. L'interaction entre ces deux éléments se fait entre l'hélice α présente sur la partie N-ter de la $G\alpha$ et un feuillet β de la sous-unité β formant ainsi un cœur très hydrophobe.

Il existe un grand nombre de sous-unités α (x21), β (x6) et γ (x12). Ce processus de complexation des différentes sous-unités s'effectue majoritairement dans l'appareil de Golgi (certaines pGs se complexent à la membrane). Le complexe ainsi formé sera adressé à la membrane où il sera ancré grâce à des résidus qui ont subi auparavant des modifications post-traductionnelles (MPTs). Les domaines impliqués dans l'interface α - β seraient très conservés.

4.3.1.6. Les messagers secondaires

Suite à leur activation, les pGs vont pouvoir, en fonction du type de la pG, interagir avec un grand panel d'effecteurs aussi appelés messagers secondaires (Figure 24).

La protéine Gas

L'activation de cette pG va induire la production de l'AMPc par le biais de l'adénylate cyclase (AC). L'AMPc va alors activer des kinases AMPc-dépendantes comme la protéine kinase A (PKA).

Les protéines Gai/o/t/z

L'activation de cette pG va induire la diminution de la production de l'AMPc par le biais de l'adénylate cyclase (AC) ou la modulation des canaux Ca^{2+} dépendant du voltage.

Les protéines Gaq/11

Cette pG va induire l'activation des phospholipases C (PLC) qui va produire l'inositol-1,4,5-triphosphate (IP3) et le diacylglycérole (DAG) après hydrolyse du phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2). Le relargage d'ion Ca^{2+} se produit après fixation de l'IP3 sur les récepteurs du réticulum endoplasmique tandis que le DAG induit l'activation de la protéine kinase C (PKC).

Les protéines Ga12/13

Cette pG est responsable de l'activation de la phospholipase A2 (production acide arachidonique), de la kinase C-Jun, du RhoGEF et des canaux Ca^{2+} dépendant du voltage (type L).

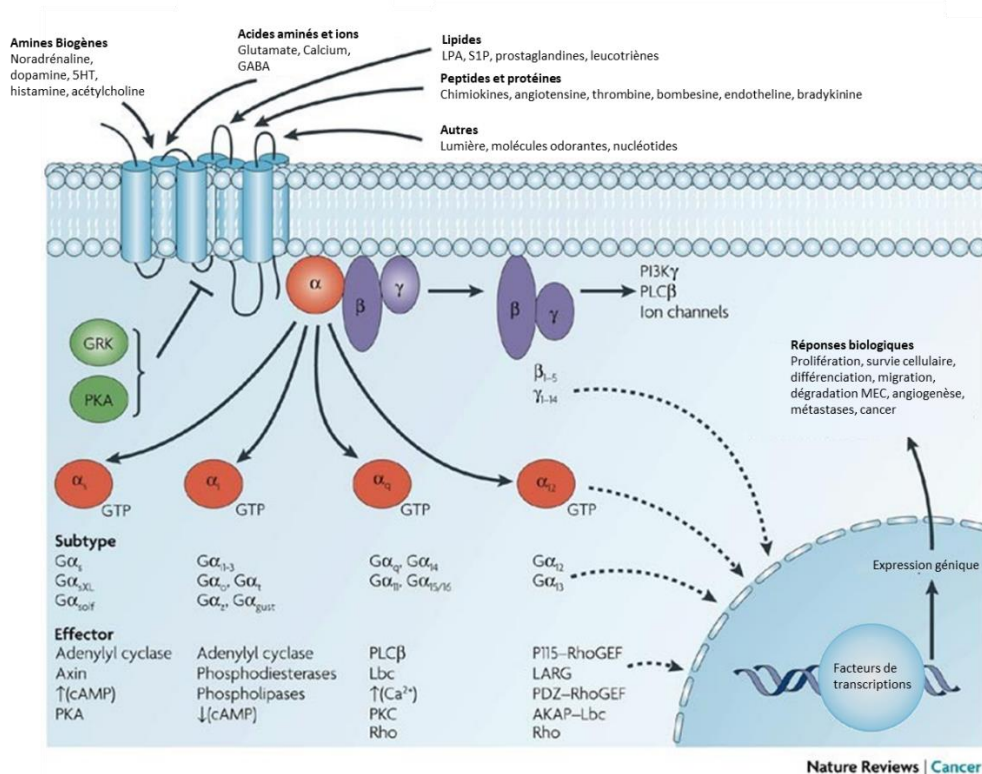


Figure 24: Voies de signalisation des RCPGs médiées par les pGs.⁸⁶

Il a été récemment découvert un autre type de régulation des pGs, indépendant des RCPGs et passant par des protéines intracellulaires capables de les activer. En effet, un nouveau groupe de protéines possédant un motif spécifique pour l'interaction avec les pGs (motif GBA : $G\alpha$ -binding and activating) a été identifié (Figure 25). Cette régulation semble être importante puisqu'une dérégulation de celle-ci serait associée au développement de pathologies graves comme le cancer⁸⁷.

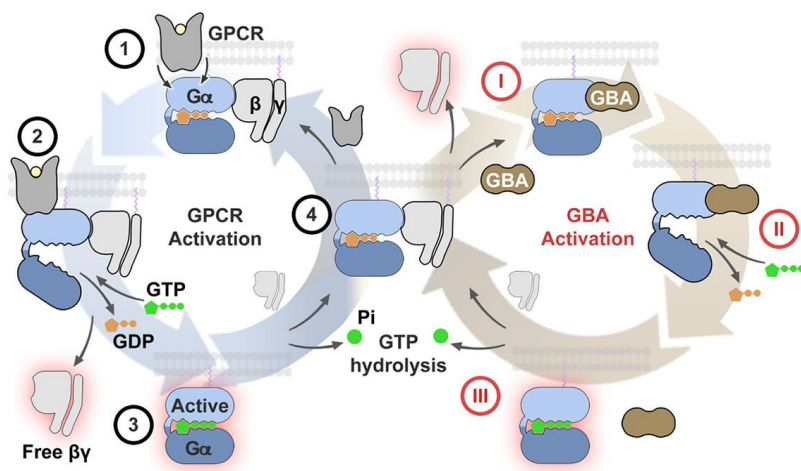


Figure 25: Activation des pGs par les RCPGs et les protéines GBA⁸⁷

Les étapes 1 à 4 représentent le cycle d'activation médié par les RCPGs et les étapes I à III représentent le cycle d'activation média par les protéines GBA.

4.3.2. Transduction du signal : La β -arrestine

Dans les années 90, on a démontré pour la première fois que la protéine β -arrestine est capable d'être activée par la liaison du ligand au récepteur RCPG pour induire une signalisation intracellulaire. Il s'agit d'une protéine cytoplasmique dont l'activation est indépendante des pGs. Elle fut longtemps associée au processus de désensibilisation des RCPGs. En 1999, Luttrell et son équipe ont démontré une signalisation du récepteur β 2-adrénergique passant par cette protéine et activant la kinase Src⁸⁸. Depuis, plusieurs effecteurs secondaires de la β -arrestine ont été identifiés : kinases PIP3 et la tyrosine kinase, confirmant ainsi son rôle dans les voies de signalisation.

La famille des β -arrestine est composée de 4 membres classés en 2 groupes. D'une part, les arrestines visuelles dénommées arrestine 1 et 4 et les arrestines non visuelles dénommées arrestines 2 et 3 ou β -arrestine 1 et 2 respectivement.⁸⁹⁻⁹¹ Elles possèdent une importante homologie structurale formées de feuillettes β antiparallèles reliés par des boucles et une courte hélice α ⁹². La β -arrestine est composée de deux domaines N et C et d'un cœur polaire à l'interface de ces deux domaines (**Figure 26**).

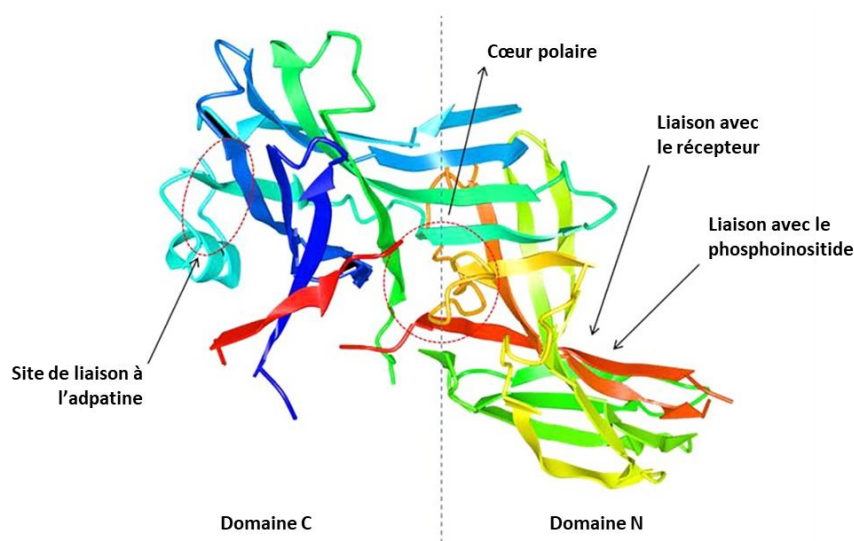


Figure 26: Structure de la β -arrestine⁹³

De par sa structure, la β -arrestine interagit préférentiellement avec un RCPG activé ou phosphorylé. Par ailleurs, son activation se fait lors de l'interaction de son cœur polaire avec une région phosphorylée du RCPG. Cette observation est appuyée par le degré de conservation de certains résidus du cœur polaire et dont les mutations causent une dérégulation de l'activité de la β -arrestine^{92,94}.

La fixation de la β -arrestine requiert un motif de phosphorylation sur le RCPG. La séquence de ce motif est la suivante : Px(x)PxxP/E/D (P désigne une phospho-Serine ou une phospho-Thréonine et X désigne tout autre acide aminé à l'exception de la proline)⁹⁵. Suite à la fixation de la β -arrestine sur un RCPG, son cœur polaire est désorganisé et sa partie C-ter est libérée mettant en évidence les domaines d'interactions pour d'autres protéines en lien avec la désensibilisation ou la signalisation.

Concernant la signalisation, la β -arrestine est capable de lier de nombreux effecteurs, notamment les kinases comme les Src, avec lesquelles elle interagit via son domaine N (riche en proline)^{88,96} ou les MAP par son domaine C⁹⁶.

5. SYNTHÈSE ET TRAFIC INTRACELLULAIRE DES RCPGS

5.1. Généralités

Les RCPGs sont des protéines membranaires dont la synthèse débute dans le cytoplasme. Après la reconnaissance du signal peptide (SP); séquence correspondant aux premiers acides aminés de la partie N-terminale nouvellement synthétisée, par la protéine cytoplasmique SRP (Signal Recognition Particule), la synthèse protéique médiée par les ribosomes cytoplasmiques s'arrête. Le complexe est par la suite dirigé vers le réticulum endoplasmique (RE) où la synthèse du RCPG va reprendre. Cette synthèse sera accompagnée par un repliement co-translationnel et une maturation associée au RE. Les RCPGs nouvellement synthétisés dans le RE, vont subir un trafic intracellulaire pour être acheminés, via les voies vésiculaires, vers la membrane plasmique ou ils vont être insérés pour assurer leurs fonctions physiologiques.

Au niveau de la membrane, la proportion de ces récepteurs est finement contrôlée par des processus extra- (comme les ligands) ou intracellulaire comme, l'internalisation, le recyclage et la dégradation. La défaillance d'adressage cellulaire peut, directement ou indirectement, être à l'origine de pathologies, comme la Néphropathie diabétique ou la Dysgénésie ovarienne⁹⁷.

Le RE joue un rôle essentiel dans cette voie d'adressage. En effet, il contrôle le degré de repliement, l'assemblage et le contrôle de qualité des protéines nouvellement synthétisées⁹⁸.

5.2. Les séquences signalétiques

Deux types de séquences signalétiques permettent la reconnaissance de la protéine pour son adressage et son intégration dans le RE (Figure 27) :

- Les peptides signaux ou séquence signal (SP)
- Les séquences d'ancrage du signal (SAS)

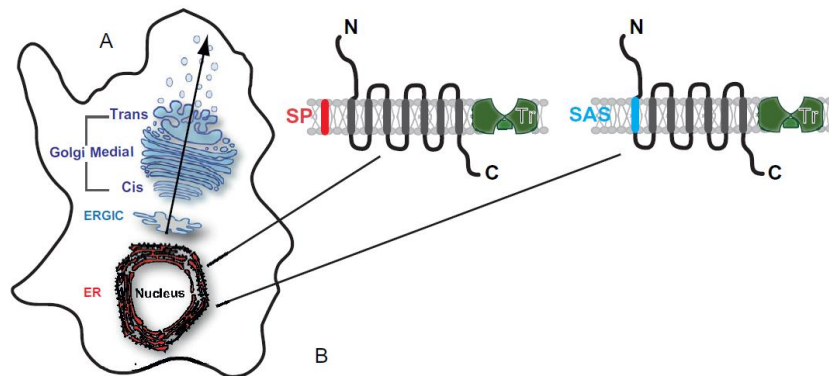


Figure 27 : Transport des RCPGs par la voie de sécrétion avec les différents types de séquences signalétiques⁹⁹

5.2.1. Les peptides signaux ou séquence signal (SP)

Les peptides signaux se situent à l'extrémité N-ter du récepteur et sont reconnus par la SRP (particule de reconnaissance du signal). Cette protéine se lie à son récepteur transmembranaire SR (Signal recognition particle receptor) au niveau du RE. Ce récepteur est lui-même associé avec le translocon, SEC61. Ce complexe protéique permet la translocation du ribosome-polypeptide au RE. Le détachement du complexe SRP-SR permet à la synthèse protéique de reprendre¹⁰⁰ (Figure 28A). À la suite du passage du polypeptide par le translocon, la séquence signal est clivée et le reste de la protéine s'agence dans la membrane. Ce repliement est aidé et supervisé par des chaperonnes et co-chaperonnes, dont la famille la plus connue est celle des HSPs (heat shock protein)^{101,102}. Des modifications post-traductionnelles (MPTs), initiées par d'autres enzymes, s'effectuent également pour accompagner ce processus. Une fois la synthèse terminée, le ribosome se détache et la protéine reste ancrée par l'intégration des hélices α dans la membrane. Ce mécanisme, faisant participer les peptides signaux, est présent chez une infime partie des RCPGs (5-10%). Il existe donc un autre mécanisme majoritaire^{99,103}.

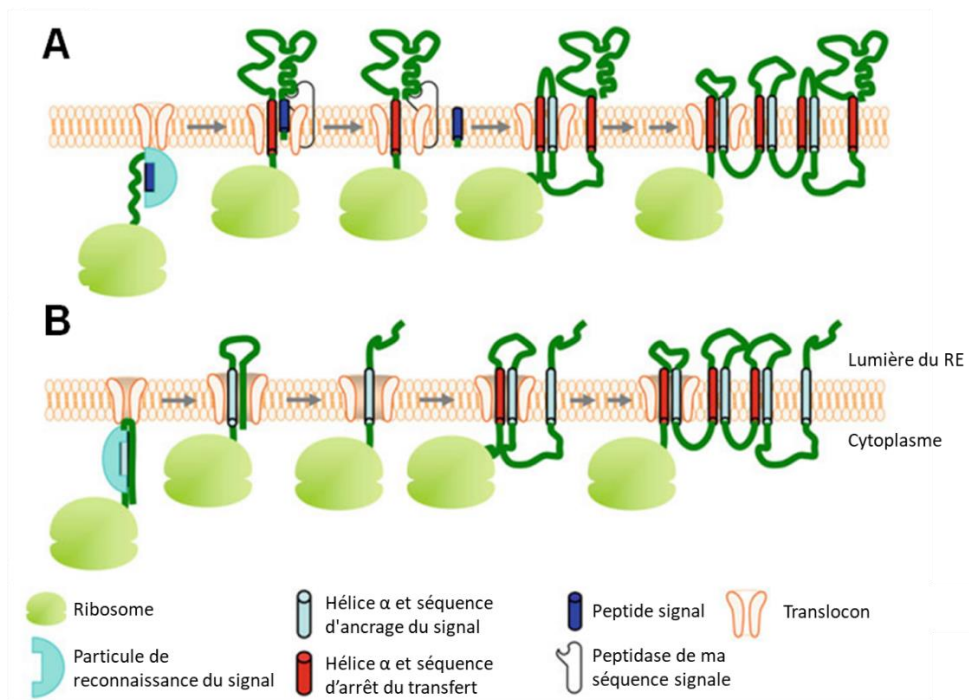


Figure 28: Synthèse protéique, repliement et maturation des RCPGs¹⁰⁴

5.2.2. Les séquences d'ancrage du signal (SAS)

Les séquences d'ancrage du signal sont présentes chez la majorité des RCPGs, et représentent le deuxième type de séquence signalétique. Ces séquences sont localisées au niveau du TM1 du RCPG et sont aussi capables de se lier à la SRP (**Figure 28B**). Par la suite, le complexe formé suit le même mécanisme décrit précédemment. Il n'y a donc pas de clivage de séquence signal dans ce mécanisme.

Comme évoqué précédemment, l'action des chaperonnes dans le repliement des récepteurs est une étape essentielle. Ce contrôle qualité permet un bon repliement de la protéine en évitant son agrégation et donc sa dégradation par le protéasome *via* la voie ERAD (endoplasmic reticulum associated degradation) ou par les lysosomes⁹⁷.

5.3. Trafic Réticulum Endoplasmique-Golgi

5.3.1. Généralités

Suite à la validation de l'étape qualité qui équivaut à un bon repliement du récepteur, celui-ci doit transiter du RE à l'appareil de Golgi. Ce transport est assuré par un système vésiculaire dépendant de la protéine COPII (COat Protein II). Les RCPGs sont alors localisés dans un compartiment dynamique intermédiaire au RE et Golgi dénommé ERGIC (The ER-Golgi

intermediate compartment). Le transport peut s'y faire dans le sens antérograde ou rétrograde. Le sens antérograde signifie un transport vers le cis-Golgi et le sens rétrograde signifie un transport vers le RE, pour des étapes supplémentaires de maturation qui concerne, en particulier, les protéines mal repliées (**Figure 29**)^{105,106}.

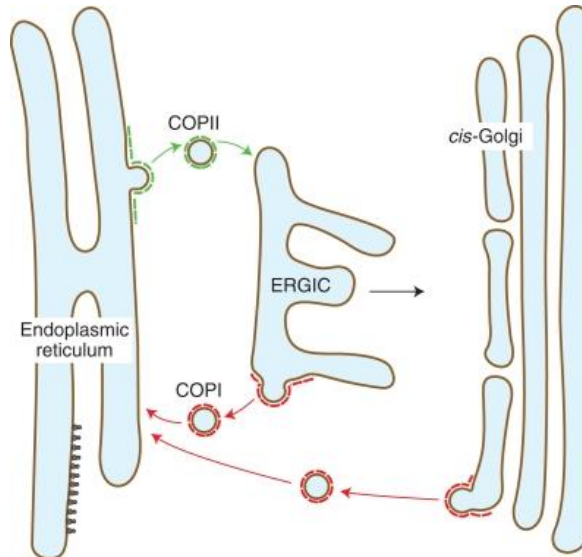


Figure 29: Trafique antérograde et rétrograde de la voie de sécrétion¹⁰⁷

Ces transports sont notamment dépendant de la famille de petites protéines GTPase Rab (Ras-associated binding) permettant le trafic par le biais des filaments d'actine et de tubuline¹⁰⁷.

5.3.2. Les motifs

Des protéines spécialisées, présentes à la surface des vésicules de transport (exemple : Sec23/24) sont responsables de l'interaction avec différents types de motifs présents dans les RCPGs ; elles permettent la régulation de l'export du RE¹⁰⁸.

5.3.2.1. Les motifs d'export

En C-ter

La partie C-ter, et plus précisément la partie proximale, est déterminante pour l'exportation des RCPGs et présente plusieurs motifs conservés, dont voici une liste non exhaustive (**Tableau 2**) :

Motifs	Récepteurs	Références
E(X) ₃ LL	AVPR2	109
F(X) ₃ F (X) ₃ F	D1R	110
FN(X) ₂ LL(X) ₃ L	AVPR3	111
F(X) ₆ LL	α 2BAR, AT1R, β 2-AR et α 1B-AR	112

Tableau 2: Motifs présents au niveau de la partie C-ter des RCPGs

En N-ter

Peu de motifs d'export ont été identifiés au niveau de la partie N-ter, dont l'importance pour ce processus semble dépendante du type de RCPG. Cependant, Un motif a pu être identifié : le YS (Tyrosine Sérine). Il s'agit d'un motif d'export identifié chez les récepteurs adrénergiques (α 2A-AR, α 2B-AR et α 2C-AR)^{113,114}.

5.3.2.2. Motifs de rétention

Il existe également des motifs de rétention induisant la rétention des RCPGs dans les domaines intracellulaires. C'est le cas du motif **RXR** présent dans l'ICL3 d'une forme tronquée du récepteur 2 de l'AVP (AVPR2 ; Arginine Vasopressin Receptor 2). Ce motif causerait la rétention de cette protéine au niveau du RE. Dans sa forme complète, le récepteur est adressé à la membrane suggérant que le repliement et/ou une maturation particulière seraient responsables du masquage de ce motif¹¹⁵. Un exemple du rôle de ce type de motif est le cas des récepteurs métabotropiques. En effet, l'unité fonctionnelle est un dimère composé de deux sous-unités GABABR1 et GABABR2. La sous-unité GABABR1 possède un signal de rétention en C-ter l'empêchant de quitter le RE lorsqu'elle est exprimée seule^{116,117}. GABAR2 quant à elle est capable d'atteindre la membrane, mais n'est pas fonctionnelle^{118,119}. L'hétérodimérisation de ces sous-unités permet de masquer le signal de rétention et d'exporter le complexe fonctionnel vers la membrane plasmique^{116,117,120}. D'autres exemples de motifs de rétention existent comme : **KDEL**, **KKXX**, **KXKXX**. Ces motifs entraîneront un transport rétrograde du récepteur par la voie COPI¹²¹.

5.3.3. Trafic dans le l'appareil de Golgi

C'est dans ce compartiment que les RCPGs atteignent leurs formes matures. Un nombre important de modifications post-traductionnelles (MPT) s'y déroulent tout au long de leur trajet du Cis puis Med et enfin Trans Golgi. Le statut de glycosylation des RCPGs joue aussi un rôle important dans ce processus de trafic intra-Golgi¹²¹. Les protéines Rab, notamment Rab6 et Rab8, seraient impliquées dans ce processus¹²².

5.4. Les modifications post-traductionnelles (MPT)

5.4.1. Généralités

Les MPTs sont nécessaires à de nombreux processus clés qui régissent le repliement, la maturation, la stabilité, la dégradation, l'endocytose et le recyclage des RCPG. Ces MPTs se produisent au niveau de tous les domaines composant les RCPGs : N-ter, C-ter, ECLs, ICLs, et TMs (Figure 30). Des enzymes seraient à l'origine de ces modifications et elles représentent 5% du protéome humain¹²³.

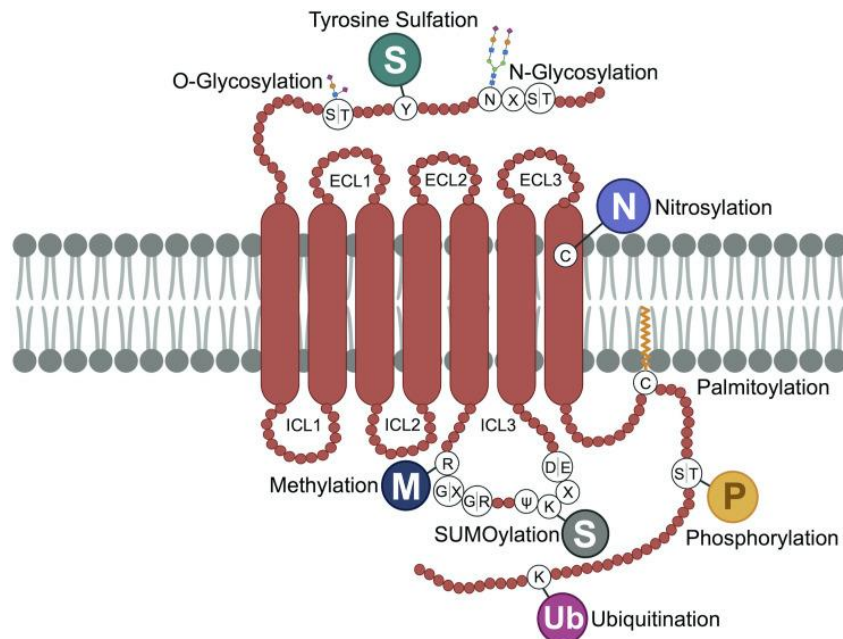


Figure 30: Différents types de modifications post-traductionnelles identifiées sur les RCPGs¹²³

5.4.2. Les phosphorylations

Les phosphorylations sont les MPTs les plus étudiées. La phosphorylation et la déphosphorylation sont contrôlées par deux enzymes ; les kinases et les phosphatases. Ils catalysent la réaction principalement sur des Sérines et thréonines et également dans une moindre mesure sur les tyrosines. Les GRKs (GPCR kinases) et les PKA/PKC sont les kinases les plus connues impliquées dans ce processus.

Un rôle bien défini de la phosphorylation est le recrutement de la β -arrestine. La fixation de cette protéine sur des acides aminés phosphorylés induit l'internalisation du RCPG le découplant ainsi de sa pG.

Le recrutement de la β -arrestine par les phosphorylations peut également être la source d'un nouveau type de signalisation (Figure 31). Cette nouvelle signalisation peut également être

indépendante de la β -arrestine. En effet, la phosphorylation peut induire le découplage d'une pG (exemple : G α s) pour une autre (exemple : G α i)^{124,125}.

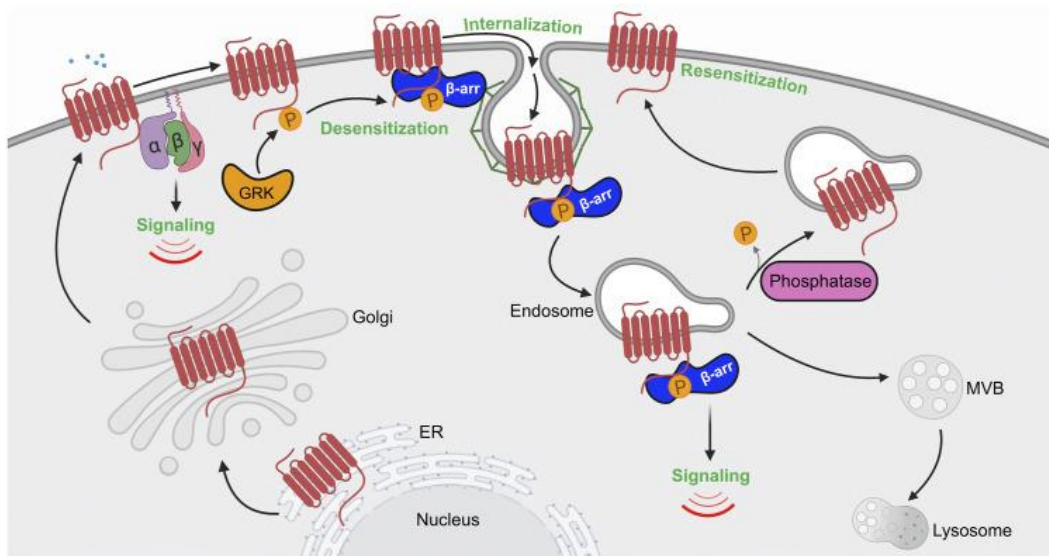


Figure 31: Différentes fonctions de la phosphorylation des RCPGs¹²³

5.4.3. L'ubiquitination

5.4.3.1. Généralités

L'ubiquitine est une protéine d'~ 8 kDa qui se lie de manière covalente au niveau des lysines. Ce type d'MPT est contrôlée par 3 enzymes (E1-E2 et E3). Deux modes d'ubiquitination existent¹²⁶ :

- **L'ubiquitination basale ou constitutive**
- **L'ubiquitination induite par la fixation ligand sur RCPG**

5.4.3.2. Dégradation

Un premier rôle de l'ubiquitination est l'adressage vers le système endosomale puis vers les voies de dégradation protéasome ou lysosome^{127,128}. En effet, les RCPGs mal repliés au niveau du RE sont polyubiquitinylés ce qui induit leur transport par le système ERAD vers le protéasome^{127,129}. L'ubiquitination des RCPGs présents à la membrane se produit également après activation par fixation du ligand. Cette modification dirige les récepteurs vers la voie endosomale pour finir, par le biais du MVB (MutliVesicular Bodies), au niveau du lysosome où ils seront dégradés (Figure 32)¹³⁰. Le contrôle temporel de cette dégradation induite par l'activation du récepteur dépend du type de RCPG. En effet, ce temps est de l'ordre de quelques

minutes pour le récepteur PAR1^{131,132}, de l'ordre de 3 à 6h pour le CXCR4¹³³ ou plus (6-24 h) pour le récepteur adrénergique β 2¹³⁴.

5.4.3.3. Expression à la membrane plasmique

Pour certains récepteurs, une ubiquitination basale a été observée. Elle permet d'inhiber l'endocytose et donc augmenter le temps de vie à la membrane de ces récepteurs¹³⁵⁻¹³⁷.

5.4.3.4. Signalisation

L'ubiquitination peut également modifier la signalisation du récepteur (Figure 32)^{138,139}. C'est le cas par exemple du récepteur CXCR2 dont l'ubiquitination en position 327 induit le recrutement de la β -arrestine conduisant le récepteur vers la voie ERK1/2. Cette signalisation n'est pas retrouvée lorsque la lysine 327 est mutée¹³⁹. La présence de l'ubiquitine peut également modifier la voie de signalisation. C'est le cas par exemple du récepteur PTHR (ParaThyroid Hormone Receptor), qui après ubiquitination active la voie MAPK au lieu d'induire l'accumulation d'AMPc¹⁴⁰.

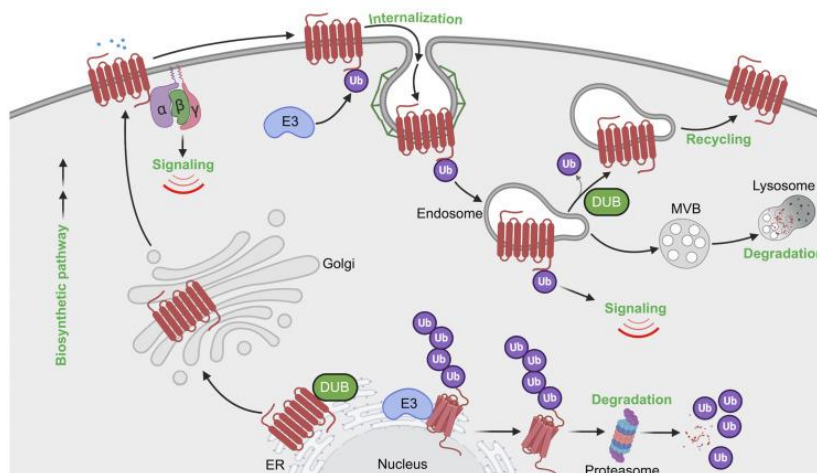


Figure 32: Différentes fonctions de l'ubiquitination des RCPGs¹²³

5.4.4. Glycosylation

La quasi-totalité des RCPGs subissent des glycosylations dans leurs parties extracellulaires et de manière plus prépondérante dans les parties N-ter et ECL2. Les glycosylations s'effectuent dans le RE et dans le Golgi et assurent de nombreux rôles : Repliement, trafic intracellulaire, signalisation, oligomérisation et liaison du ligand (**Figure 34**). Ces modifications sont contrôlées par une centaine d'enzymes.

5.4.4.1. N-Glycosylation

La N-Glycosylation est la fixation d'un glycane sur une asparagine (N) présente dans une séquence **N-X** (X : n'importe quel acide aminé excepté la proline) -**S** (sérine)/**T** (thréonine). Cette modification débute de manière co-traductionnelle dans le RE et se termine dans le Golgi. La N-Glycosylation est majoritairement présente dans la partie N-ter et dans la ECL2 (Figure 33B)¹⁴¹⁻¹⁴³.

5.4.4.2. O-Glycosylation

La O-glycosylation s'effectue au niveau des sérine (S) et thréonine (T) et de manière moindre sur les tyrosines (Y). Elle s'effectue dans le Golgi et est initiée par un transfert de GalNAc (N-AcetylGalactosamine) sur les acides S, T et/ou Y (Figure 33A)¹⁴⁴. Il n'y a pas, à ce jour, de séquence consensus pour la O-glycosylation.

5.4.4.3. Rôles de la glycosylation

Les rôles de la glycosylation sont dépendants des RCPGs. En effet, pour certains récepteurs la glycosylation est essentielle à leur bon fonctionnement ce qui n'est pas le cas pour d'autres¹⁴⁵⁻¹⁵⁴. Pour les récepteurs où la glycosylation est essentielle, celle-ci contrôle leur bon trafic et adressage vers la membrane plasmique. L'endocytose est également dépendante de la glycosylation pour certains RCPGs¹⁵⁵.

Étant présente dans les parties extracellulaires des récepteurs, la glycosylation a un rôle également dans la signalisation et notamment dans la liaison du ligand. En effet, pour certains récepteurs, la glycosylation est essentielle à leur activité¹⁵⁶⁻¹⁶⁰. Il existe aussi des situations où la glycosylation peut masquer la poche d'interaction destinée au ligand^{161,162}.

Tout comme l'ubiquitination, la glycosylation peut induire une modification de la voie de signalisation. Un bon exemple est le récepteur PAR1 (Protease-activated receptor 1) où la N-glycosylation au niveau de l'ECL2 entraîne une signalisation médiée par la voie $G\alpha_{12/13}$, alors que son absence induit l'activation de $G\alpha_q$ ¹⁶². La glycosylation peut également influencer l'état oligomérique des RCPGs¹⁶³, d'une manière positive ou négative¹⁶⁴⁻¹⁶⁶.

Récemment, la O-glycosylation a été impliquée dans le clivage de la partie N-ter de certains récepteurs pouvant induire un changement de la voie de signalisation (**Figure 34**)¹⁶⁷⁻¹⁶⁹.

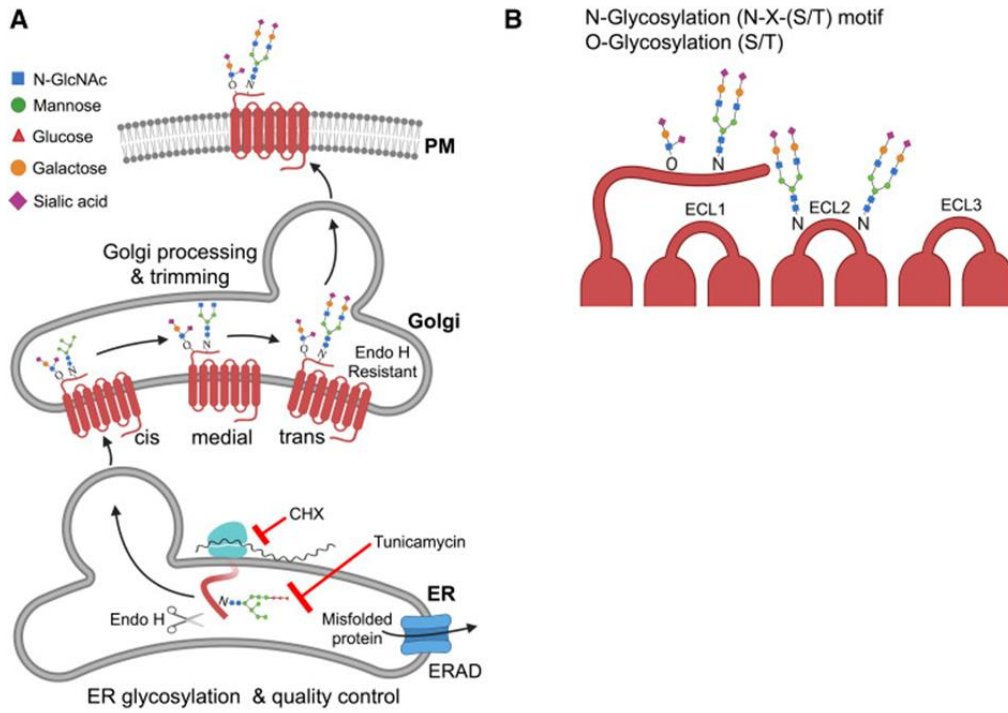


Figure 33: Glycosylation des RCPGs et trafic intracellulaire¹²³

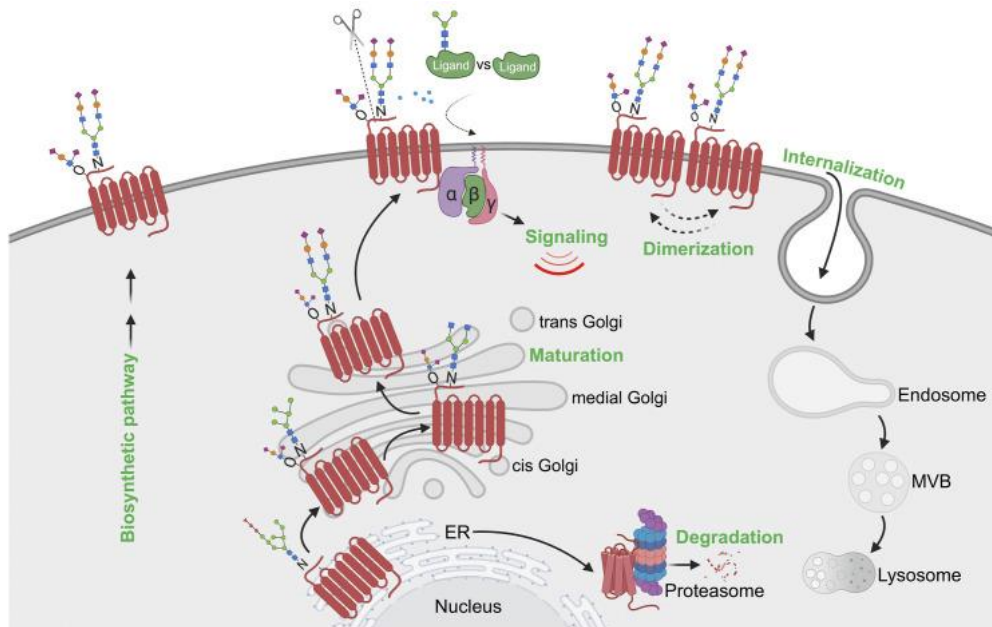


Figure 34: Différentes fonctions des glycosylations des RCPGs¹²³

5.4.5. La palmitoylation

La palmitoylation est l'ajout d'un groupement lipidique (acide gras palmitate) au niveau de cystéines principalement présentes dans la partie C-ter. Cette modification a été identifiée au niveau de la ECL4 de la rhodopsine. Ce processus est réversible et contrôlé de manière enzymatique : PATs (palmitoyl acyl transferases) / APTs (acyl-protein thioesterase)^{170,171}. Ces enzymes sont présentes dans le RE, Golgi et à la membrane plasmique¹⁷¹⁻¹⁷³. Majoritairement, la palmitoylation se produit durant la biosynthèse du RCPG. Cependant, certains récepteurs peuvent subir cette modification après activation par leurs ligands (Figure 35)¹⁷⁴⁻¹⁷⁸.

5.4.5.1. Le trafic cellulaire

L'implication de la palmitoylation dans l'adressage à la membrane plasmique a été démontrée par de nombreuses études réalisées sur différents RCPGs¹⁷⁹⁻¹⁸⁶. En effet, cette modification peut être à l'origine d'un mauvais repliement des RCPGs responsable de leurs dégradations^{180,187}.

5.4.5.2. Les rafts lipidiques et l'oligomérisation

La palmitoylation permet également la localisation des RCPGs dans les microdomaines des rafts lipidiques¹⁸⁸⁻¹⁹⁴. La localisation dans ces microdomaines semblent essentielles à leur oligomérisation¹⁹⁵⁻¹⁹⁷.

5.4.5.3. Internalisation, recyclage et dégradation

La palmitoylation semble également régulée l'internalisation, le recyclage et la dégradation des RCPGs (Figure 35)^{181,184,198-201}. L'explication avancée est le repliement et l'accessibilité de la partie C-ter aux protéines initiant l'internalisation qui est modifiée par la présence ou non de la palmitoylation.

5.4.5.4. Signalisation

Comme vu précédemment, la présence ou non de cette modification peut influencer la structure de la partie C-ter induisant ainsi une modification de recrutement des pGs. Ceci conduit à une modulation de la signalisation intracellulaire^{174,202,203}. Une autre explication est la présence ou non du RCPG dans les rafts lipidiques conduisant à un recrutement différentiel des pGs et une oligomérisation modifiée (**Figure 35**)^{190,191,204,205}.

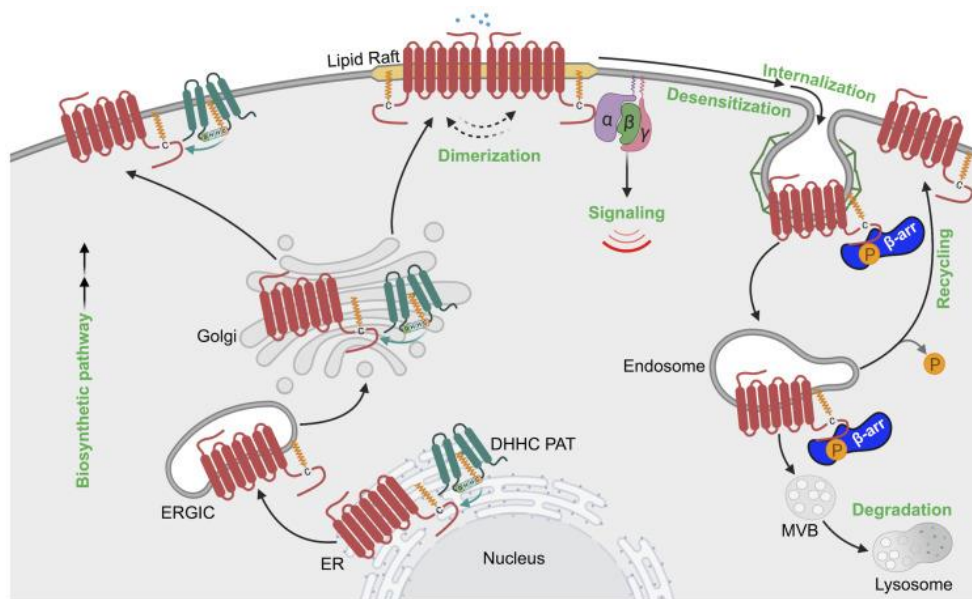


Figure 35: Différentes fonctions de la palmitoylation des RCPGs¹²³

5.4.6. Les autres modifications post-traductionnelles

Les RCPGs subissent aussi de nombreuses autres MPTs, mais qui restent très peu explorées à ce jour (**Figure 30**). C'est le cas de :

- **Méthylation:** Ajout d'un groupement méthyl sur une arginine possédant un motif **RGG** ou **RXR** localisé majoritairement dans la ICL3. Elle peut modifier la signalisation des RCPGs^{206,207}.
- **SUMOylation:** Liaison de la protéine SUMO (~11kDa) sur un résidu lysine comportant le motif ψ -K-X-(D/E) où ψ est un acide aminé aliphatique²⁰⁸. Elle pourrait modifier la signalisation et le trafic des RCPGs^{209,210}.
- **Sulfatation :** Elle s'effectue dans le Golgi et se définit par un transfert d'un groupement sulfate sur une tyrosine. La sulfatation est notamment trouvée dans les récepteurs chimiokines, modifiant ainsi la pharmacologie de ces RCPGs²¹¹⁻²¹⁵.
- **S-nitrosylation :** Elle est majoritairement retrouvée dans les TMs des RCPGs. Elle se caractérise par la fixation d'un groupement monoxyde d'azote (NO) sur une cystéine. Elle peut modifier l'affinité de l'agoniste²¹⁶.

5.5. Endocytose / recyclage

5.5.1. Généralité

L'expression des RCPGs au niveau de la membrane plasmique est régulée par des processus de trafic intracellulaire comme l'endocytose. Il s'agit d'une invagination d'une petite région de la membrane plasmique conduisant à la formation d'une vésicule cytoplasmique nommée endosome.

Ce processus permet l'internalisation des RCPGs après leur activation par des ligands. La désensibilisation est la première étape de ce processus, suivie par l'internalisation (dépendante de la clathrine ou des cavéoles), et finalement un triage en fonction des signaux protéiques pour adresser les RCPGs : soit vers la voie de dégradation, soit vers le recyclage (resensibilisation). En fonction du type de RCPG, ces étapes ne vont pas avoir la même importance, suggérant une fine régulation de ce processus.

5.5.2. Désensibilisation

Cette étape permet de contrôler la durée de l'effet biologique induit par un RCPG. Elle permet de le placer dans un état conformationnel de basse affinité diminuant ainsi son effet.

On peut distinguer deux types de désensibilisation :

- Désensibilisation homologue : seuls les RCPGs activés sont désensibilisés
- Désensibilisation hétérologue : L'activation d'un RCPG entraîne l'inhibition d'un autre RCPG, souvent via des voies de transduction²¹⁷

La phosphorylation initie l'étape de désensibilisation. Celle-ci s'effectue dans la partie intracellulaire du RCPG comprenant donc les ICL et la partie C-ter²¹⁸. Cette phosphorylation s'effectue sur les acides aminés sérine et thréonine présents dans ces domaines. Cette étape est contrôlée par des kinases.

Ces kinases se divisent en deux catégories :

- Les kinases dépendantes des seconds messagers comme la PKA ou la PKC
- Les kinases indépendantes des seconds messagers : Les GRKs (G protein coupled receptor kinases).

L'activation des PKA et PKC s'effectue par le biais de messagers secondaires (AMPc et le DAG) suite à l'activation des RCPGs²¹⁹. Cette phosphorylation va provoquer une baisse d'affinité de la pG pour son RCPG puis le recrutement de la β -arrestine va définitivement décrocher la pG par encombrement stérique. Ceci va initier l'étape d'internalisation⁹⁰.

5.5.3. L'internalisation

5.5.3.1. Dépendance de la protéine β -arrestine

Cette étape est dépendante de la β -arrestine de manière prédominante. La protéine β -arrestine phosphorylée est dans un état inactif réduisant ainsi son affinité pour la clathrine. Une fois recrutée au contact du RCPG, elle est déphosphorylée²²⁰. La vésicule d'endocytose va alors se créer par le recrutement de la clathrine et la protéine adaptatrice AP-2 puis se fermer par le biais d'une protéine GTPase : la dynamine.

La protéine AP-2 est indispensable à l'interaction de la clathrine avec les lipides de la membrane plasmique²²¹. En effet, AP-2 interagit avec la membrane plasmique enrichie en PIP2. Cette interaction induit un changement de conformation de la protéine lui permettant d'exposer des sites de liaisons à la clathrine (Figure 36)²²².

Par le biais du cytosquelette, elle va rejoindre des organites notamment les endosomes²²³.

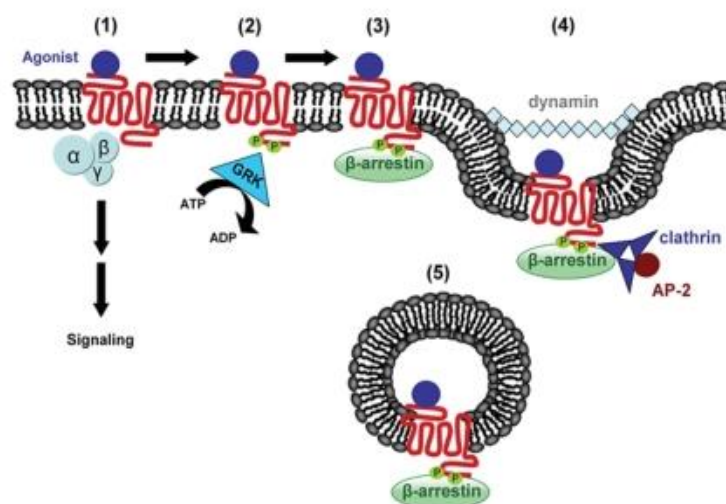


Figure 36: Modèle d'internalisation des RCPGs par la voie dépendante de β -arrestine²²⁴

Les domaines N et C-ter de la β -arrestine permettent la complexation avec la clathrine.^{225,226} La partie C-ter de celle-ci est également nécessaire à l'interaction avec AP-2 via deux arginines (R394 et R396)²²¹. De nombreuses disparités existent quant au temps d'interaction entre la β -arrestine et le RCPG. Cette disparité est dépendante de la classe du RCPG et de la nature du ligand. Une interaction transitoire est retrouvée chez les RCPGs de classe A suite à une phosphorylation préférentiellement par GRK2, alors qu'une interaction plus stable est majoritairement observée chez les RCPGs de classe B, phosphorylés préférentiellement par GRK5 et 6. Cette temporalité oriente le devenir du récepteur avec un recyclage rapide pour des interactions transitoires et un recyclage lent ou une dégradation pour les interactions plus stables

dans le temps²²⁷⁻²²⁹. Cette temporalité semble corrélée avec la stabilité de la β -arrestine ubiquitinylée^{230,231}.

Ces réactions d'ubiquitination et de déubiquitination sont contrôlées par deux enzymes ; l'ubiquitine ligase E3 et l'ubiquitin-specific-protease 33 (USP33), respectivement²³².

Il est à noter que des mécanismes d'internalisation indépendants de β -arrestine et dépendants de la clathrine existent.

Dans ce cas, la complexation se fait directement entre la protéine AP-2 et le RCPG par un motif (YXX ϕ où Y est une tyrosine, ϕ un acide aminé hydrophobe et X peut être n'importe quel acide aminé) en C-ter, qui permet son recrutement dans les vésicules à clathrine²³³.

5.5.3.2. Indépendante de la protéine β -arrestine

La voie cavéole

Au début de ce chapitre, j'ai mentionné l'existence également d'un mécanisme d'internalisation passant par les cavéoles et non la clathrine²³⁴. La formation des cavéoles est dépendante de trois protéines : caveoline, cavine et pacsine. Ce mécanisme est initié dans les rafts lipidiques riches en glyco-sphingolipides et en cholestérol. La cavéoline lie directement le cholestérol. L'interaction avec le récepteur peut se faire directement avec la cavéoline par le biais de motifs présents sur le récepteur (ϕ X ϕ XXXX ϕ et ϕ XXXX ϕ XX ϕ , où ϕ est un résidu aromatique : Trp, Phe ou Tyr, et X peut être n'importe quel acide aminé). L'interaction peut également se faire uniquement par l'intermédiaire de la sous unité α q, qui en se liant à la cavéoline facilite son association avec le RCPG (Figure 37C)^{235,236}.

Il est à noter que les mécanismes d'internalisation sont aussi dépendants de la classe de RCPG. Certains RCPGs peuvent utiliser plusieurs voies d'endocytose^{237,238}. Pour un même récepteur, la spécificité est également dépendante de la nature et de la présence ou non de l'agoniste^{239,240}.

La voie endophiline

Les endophilines sont impliquées dans une voie d'endocytose très rapide induite après l'activation d'un RCPG (quelques secondes). Ce processus est nommé FEME (fast endophilin-mediated endocytosis)²⁴¹. Cette protéine s'accumule dans des domaines au niveau de la membrane plasmique de manière dynamique en fonction de l'activation ou non des RCPGs. Cette accumulation se fait par recrutement via un complexe protéique impliquant également des lipides : Cdc 42, FBP17, CIP4, SHIP, Lmpd, PIP2 et PIP3.

L'endophiline, par le biais de son domaine BAR et d'une hélice α présente en N-ter, possède la capacité d'incurver la membrane et donc d'initier la formation de vésicule d'internalisation. L'interaction avec les RCPGs s'effectue quant à elle via son domaine Src homology 3 (SH3), qui se lie au domaine riche en proline de l'ICL3 du récepteur (Figure 37B)²⁴¹⁻²⁴⁴.

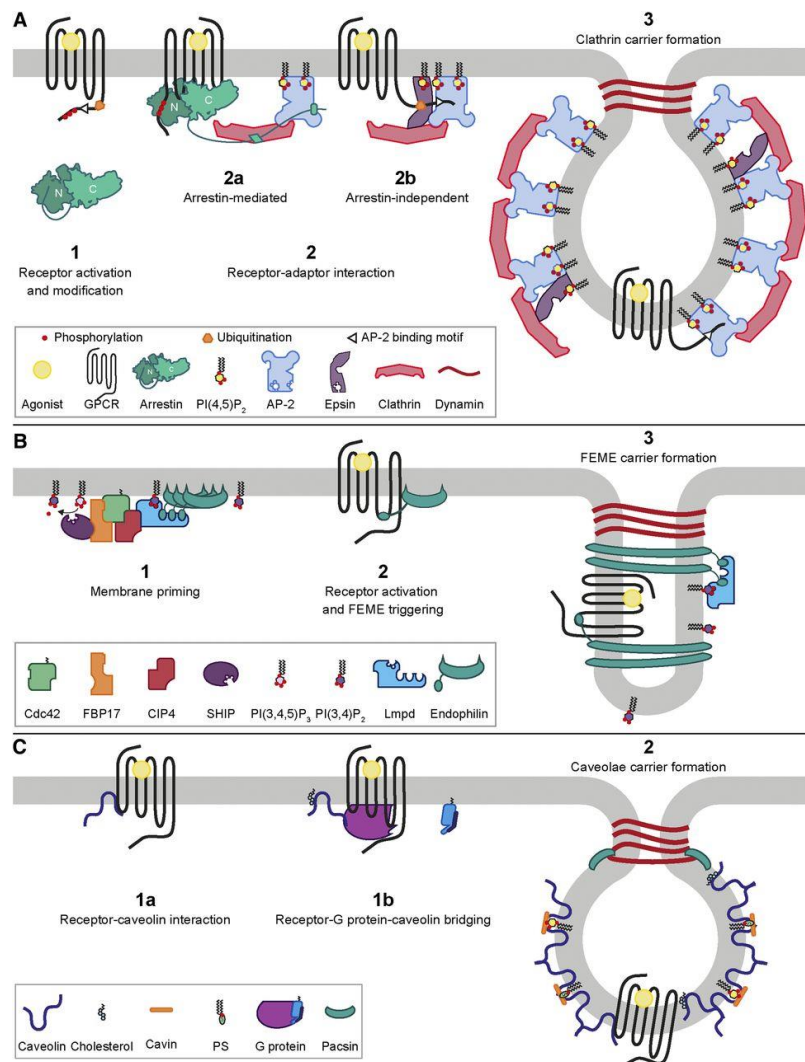


Figure 37: Différents mécanismes d'internalisation des GPCRs²⁴⁵

- (A) Mécanisme Clathrine dépendant et β -arrestine dépendant (2a) ou indépendant (2b)
 (B) Mécanisme endophiline dépendant
 (C) Mécanisme cavéole dépendant

5.5.3.3. La voie GRKs :

La découverte de la famille des GRKs se produit de manière concomitante à celle de la phosphorylation d'un RCPG. En effet, dans les années 70, suite à l'activation de la rhodopsine, on détecte une phosphorylation médiée par une kinase identifiée comme GRK1²⁴⁶⁻²⁴⁸. De

nombreux membres de cette famille furent par la suite identifiés comme interagissant avec de nombreux RCPGs. Cette famille est composée de 7 membres divisés en 3 groupes de par leur distribution tissulaire et leur sélectivité :

- GRK1 et 7 : GRK de la rhodopsine
- GRK2 et 3 : ubiquitaire
- GRK4 : exprimée dans les testicules, le cerveau et les reins

GRK5 et 6 : ubiquitaire

Les GRKs possèdent plusieurs domaines spécifiques avec un domaine catalytique permettant la phosphorylation ; un domaine RH (RGS homology domain), jouant un rôle dans sa localisation à proximité de la membrane ; un domaine PH uniquement présent chez GRK2 et 3 permettant l'interaction avec le complexe $\beta\gamma$ de la pG, et des domaines N-ter et C-ter variables²⁴⁹⁻²⁵¹. La partie N-ter est essentielle à la localisation de la kinase, mais également à sa fixation à d'autres protéines. Le lieu de la phosphorylation est dépendant de chaque RCPG, avec une préférence pour la partie C-ter et ICL3²⁵². La phosphorylation va alors jouer un rôle d'appât pour le recrutement d'autres protéines comme la β -arrestine (Figure 38).

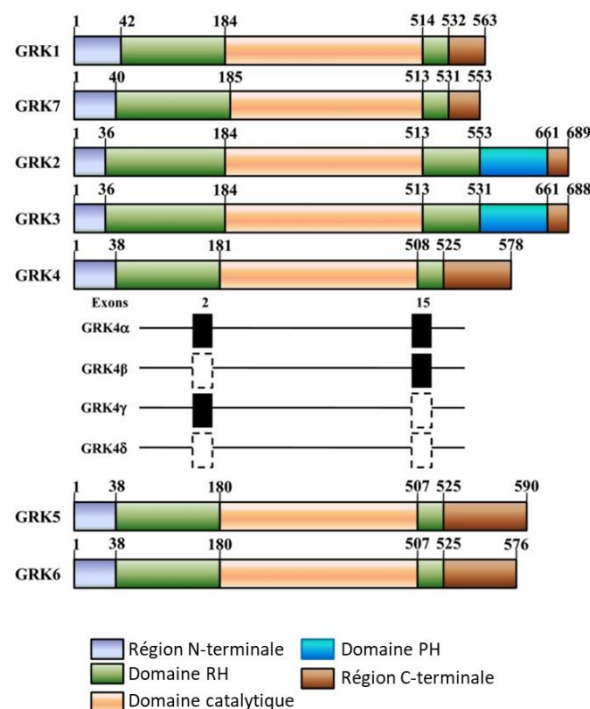


Figure 38: Domaines des GRKs ²⁵³

RH: Regulator of G protein signaling (RGS) homology domain

PH: pleckstrin homology, permet l'interaction avec le complexe $\beta\gamma$ de la pG

GRK4 possède un épissage alternatif avec la présence (rectangle noir) ou non (rectangle blanc) des exons 2 et 15

Les GRKs sont des protéines solubles agissant à proximité de la membrane plasmique. Pour cela un mécanisme doit leur permettre d'arriver à proximité des RCPGs. Ce mécanisme est dépendant des sous-groupes précédemment exposés.

GRK1 et 7 :

Assurent la prénylation (modification post-traductionnelle qui consiste en l'attachement par liaison covalente d'un groupement farnésyl (C15) ou géranylgeranyl (C20) à l'extrémité C-terminale de certaines protéines) sur la partie C-ter, ce qui leur permet d'être constamment à la membrane plasmique²⁵⁴.

GRK2 et 3 :

Participent au recrutement à la membrane plasmique en se fixant aux sous-unités $\beta\gamma$ par le domaine PH^{255,256}.

GRK 4, 5 et 6:

Assure la palmitoylation (formation d'une liaison covalente entre un acide gras, comme l'acide palmitique, et un résidu de cystéine, moins fréquemment de sérine ou de thréonine, généralement sur une protéine membranaire) de la partie C-ter ou d'une hélice α ²⁵⁷.

5.5.4. Recyclage ou dégradation

Suite à l'internalisation, plusieurs voies sont possibles pour les RCPGs, mais dans un premier temps, la vésicule membranaire formée par endocytose et contenant le complexe ligand-RCPG va être acheminée vers les organites vésiculaires ; l'endosome précoce, avec lequel elle fusionne et où s'effectue le tri du contenu vésiculaire. Un pH de 6,5 au sein de cet organite favorise l'action de dissociation des complexes ligand/RCPG. Suite à cette étape, deux voies principales sont possibles pour ces protéines :

- **La première est le recyclage du RCPG :**

Ce processus est alors nommé resensibilisation. Il permet aux RCPGs de retourner à la membrane plasmique où ils peuvent assurer de nouveau leur rôle physiologique.

- **La seconde est la dégradation du RCPG :**

Ce processus catalytique est assuré par les lysosomes, et participe à la régulation négative du niveau d'expression membranaire du récepteur²⁵⁸.

Ce tri s'effectue par une sélection spatiale au sein de l'endosome formant des tubes ou des vésicules selon le devenir des RCPGs : Recyclage ou dégradation (**Figure 39**).

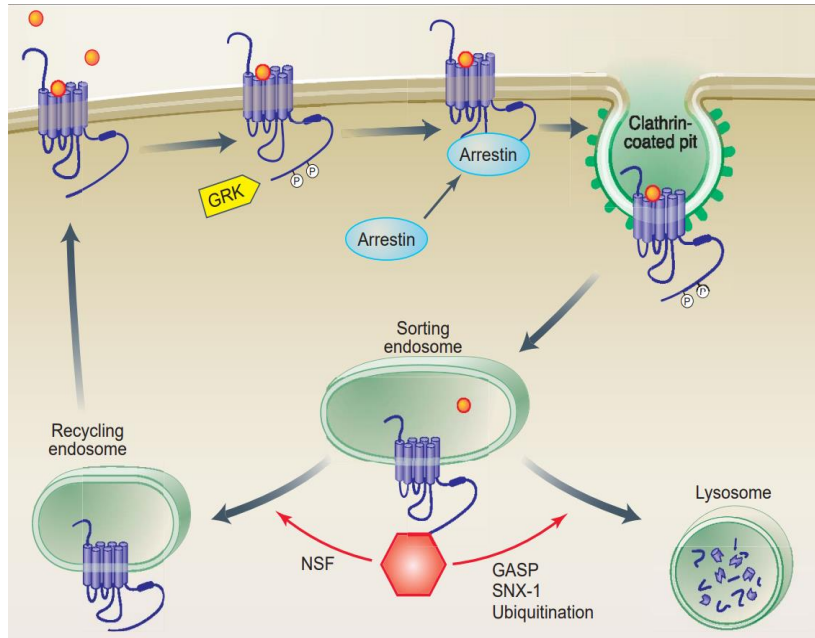


Figure 39: Tri des endosomes contenant les RCPGs vers le recyclage ou la dégradation²⁵⁹

5.5.4.1. La dégradation

Trois voies dirigent les récepteurs vers la dégradation, la voie ESCRT (endosome sorting complex required for transport), GASP (GPCR-associated sorting proteins) ou SNX-1 (Sorting Nexin-1). Les RCPGs sont dirigés vers l'endosome tardif ou MVB (Multi Vesicular Body) par ces trois voies de manière ubiquitine dépendante (ESCRT) ou non (GASP ou SNX-1). Les trois voies dirigent ces protéines vers la voie lysosomale pour la dégradation²⁶⁰⁻²⁶³. L'ubiquitination s'effectue en amont sur le RCPG (partie C-ter) au niveau de la membrane afin de permettre son acheminement vers le MVB et sa dégradation par les lysosomes^{264,265}.

5.5.4.2. V.3.2. Le recyclage

Le recyclage utilise plusieurs voies.

La voie ASRT

Pour le recyclage des RCPGs, un autre complexe est mis en jeu, celui du complexe ASRT (actin-sorting nexin 27-retromer tubule)²⁶⁶⁻²⁶⁸. Ce complexe est composé de la SNX27 et du

rétromère lui-même composé des protéines Vps (vacuolar protein sorting). Il participe à l'organisation en tubules des endosomes précoces. Ce complexe se lie à un motif présent sur la partie intracellulaire du RCPG nommé PDZ (PSD-95/Discs-large/ZO-1). Ce complexe se lie préférentiellement aux RCPGs de la classe A par rapport à la classe B, ce qui peut expliquer la différence dans la vitesse de recyclage^{269,270}.

Des modifications comme la phosphorylation ou la formation de pont disulfure peuvent altérer la reconnaissance de ce domaine et donc le recyclage (Figure 40). Il est à noter qu'une voie indépendante de la SNX27 existe (Figure 40).

V.3.2.2. La voie rétrograde

Une voie rétrograde existe aussi et passe par l'appareil de Golgi avant l'étape de recyclage vers la membrane plasmique. Ce mécanisme semble être rétromère (Vps35) dépendant (**Figure 40**)²⁷¹.

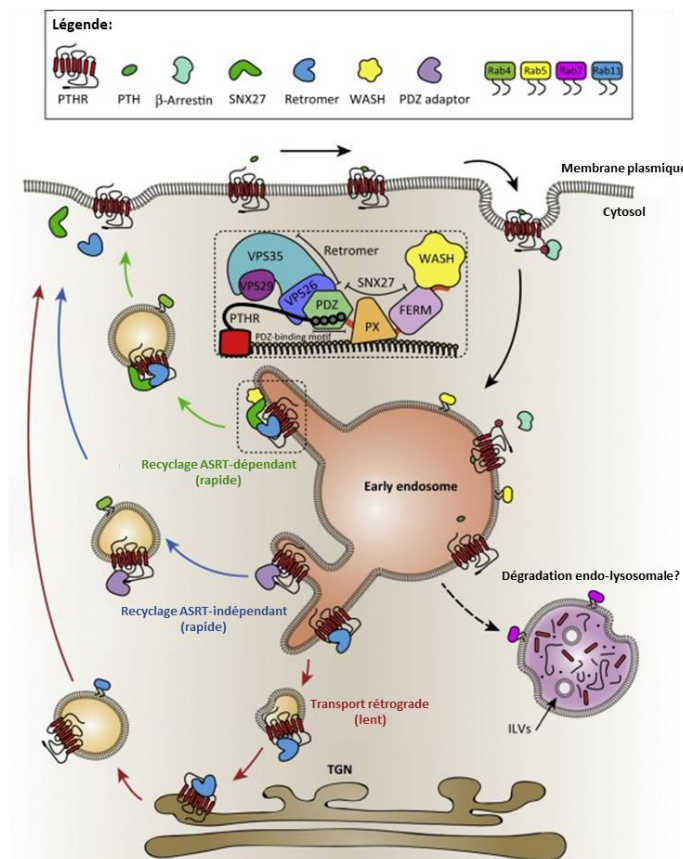


Figure 40: Différents modes de recyclage des RCPGs²⁷¹

Cas des protéines Rab

Les protéines Rab sont une grande famille de protéines GTPase (60 membres) qui ont des rôles dans de nombreux processus biologiques en lien avec le trafic des RCPGs : transport réticulum-Golgi, endocytose, recyclage, dégradation²⁷². Elles jouent ce rôle en se fixant sur la partie C-ter des RCPGs²⁷³⁻²⁷⁵.

Rab4 est impliquée dans le recyclage rapide de l'endosome à partir de la membrane plasmique. Pour la formation de l'endosome précoce, c'est Rab5 qui joue un rôle dans la formation et la fusion des vésicules composées de clathrine^{272,276}. Ces protéines ont aussi un rôle dans le tri vésiculaire. Étonnement, il n'existe pas de séquence consensus pour la fixation des Rabs sur les RCPGs.

6. OLIGOMÉRISATION DES RCPGS

6.1. Généralités

Nous avons longtemps pensé que les RCPGs fonctionnaient exclusivement sous la forme monomérique avec un rapport stœchiométrique de 1:1 avec sa pG. Mais depuis plus d'une vingtaine d'années, de nombreuses études ont démontré, non seulement l'existence, mais également le rôle des oligomères des RCPGs : dimères, mais aussi des structures d'un ordre supérieur. Des données de l'existence des homodimères sont issues d'expériences de réticulation, d'inactivation par rayonnement, d'études hydrodynamiques et de clonage. Concernant l'existence des hétérodimères, ils ont été suggérés suite à des expériences de récepteurs chimères (récepteur adrénergique $\alpha 2C$ et muscarinique m3). Ces études ont démontré, par exemple, que le récepteur GABA B, non fonctionnel, a besoin d'acquérir une structure en hétérodimère pour devenir fonctionnel. Cette complexification a permis la considération de nouvelles cibles thérapeutiques qui restent à explorer.²⁷⁷ Cependant, d'autres études ont aussi montré l'existence de récepteurs monomériques capables de produire un signal. Ceux-ci fut démontré par l'isolation des récepteurs β_2 -adrénergique ou rhodopsine en situation monomérique avec leur pG (Gas ou Gat)^{205,278}.

6.2. L'oligomérisation au niveau structural

De nombreuses études ont montré biochimiquement l'existence de l'oligomérisation des RCPGs. Cependant, peu de structures cristallographiques existent. Concernant les homodimères, on peut trouver celle des récepteurs aux chimiokines CXCR4²⁷⁹ et celles des récepteurs opioïdes μ et κ ^{280,281}. Les interfaces dans ces structures étaient localisées dans les

domaines TM5 et TM6 pour les récepteurs CXCR4 et μ -opioïde et TM1, 2 et 3 pour le récepteur κ -opioïde. Ces données démontrent l'existence d'une diversité d'interfaces concernant les homodimères. Ceux-ci sont résumés dans le **Tableau 3** et la **Figure 41**.

Technique	RCPG	TMs impliqués dans la dimérisation
Cristallographie aux rayons X	Adénosine A ₁	IV-V
Approche biochimique	CCR5 (Chimiokine)	V
Réticulation (cross-linking)	Rhodopsine	I-II, IV-V
Filtration sur gel	Thromboxane A ₂	I
Approche biophysique	Rhodopsine	I-II, IV-V
BRET	Angiotensine II type 1	I-IV, IV-V, VI-VII
FRET	β 2-adrénérique	I-Hélice VIII
Spectroscopie de corrélation de fluorescence	Dopamine D ₃	I-II-Hélice VIII, IV-V
Excitation entrelacée d'impulsions	Muscarinique M ₃	I-II-Hélice VIII-V-VI-VII
Spectroscopie de fluorescence à corrélation croisée	CCR5 (Chimiokine)	V
Spectroscopie de corrélation de fluorescence	Opsine (cône)	V
Complémentation bimoléculaire de fluorescence	Opsine (cône)	V
	β 2-adrénérique	I-Hélice VIII
	β 2-adrénérique	I-Hélice VIII

Tableau 3: Les différents TMs participant à l'interface protomère-protomère lors de la dimérisation²⁸²

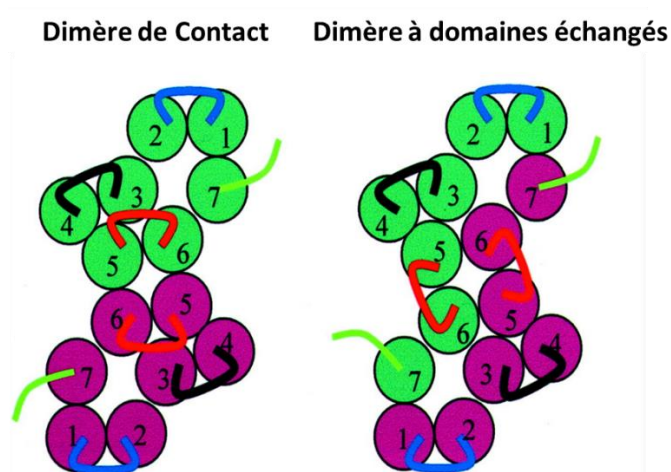


Figure 41: Interface potentielle de dimérisation de RCPGs²⁸³

Le domaine N-ter peut également être impliqué dans l'interface entre les protomères^{284,285}.

Concernant les oligomères, la structure résolue du récepteur β 1-adrénérique a montré la jonction de deux dimères possédant deux interfaces différentes (**Figure 42**) qui mettent en jeu pour :

- L'interface 1 : TM1, 2, hélice $\alpha 8$, ECL1
- L'interface 2 : TMIV,V, ICL2 et ECL2.

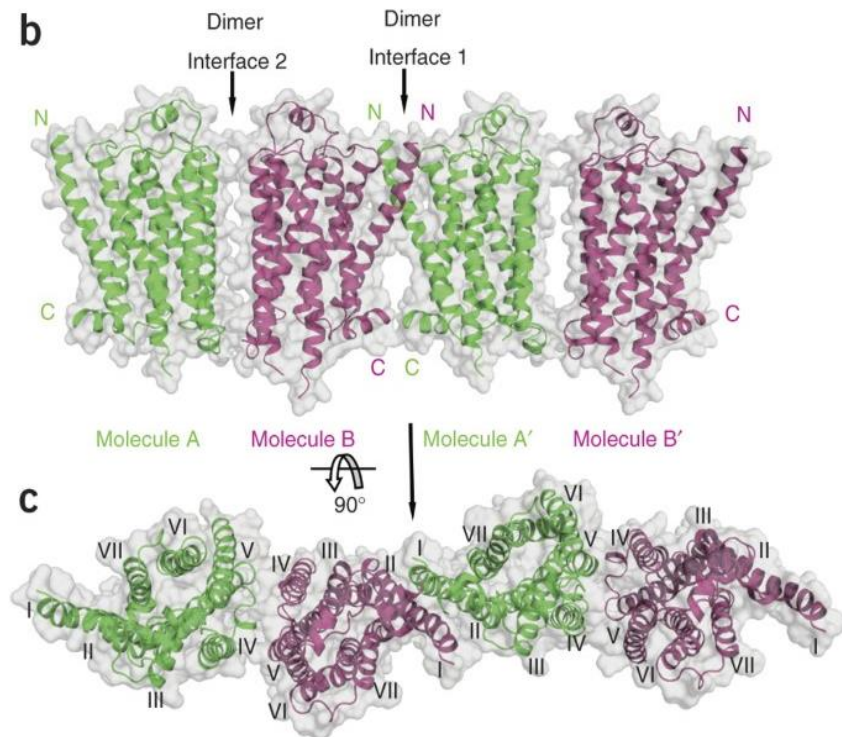


Figure 42: Oligomérisation des récepteurs $\beta 1$ -adrénergique²⁸⁶

Peu de structures d'homo ou hétéro-oligomère existent, car les conditions de purification et de reconstitution pour des études structurales ne sont pas encore optimales.

6.3. Formation stable des oligomères

De nombreuses études ont suggéré l'existence d'entité stable de ces oligomères qui se forme au cours de leur biosynthèse, notamment dans le réticulum endoplasmique (RE). Cette suggestion est appuyée par l'existence de récepteurs dont la dimérisation est nécessaire pour leur expression à la membrane plasmique. C'est le cas des récepteurs $\beta 2$ -adrénergiques et $\alpha 1B$ -adrénergiques²⁸⁷⁻²⁸⁹. Il a également été montré que les oligomères pouvaient se pré-coupler avec la pG et avec des effecteurs secondaires dans le RE²⁸⁷⁻²⁸⁹. Un modèle est alors apparu, considérant ces oligomères comme une base ou un échafaudage nécessaires à la formation du complexe signalétique complet, comprenant les oligomères de RCPGs, les pGs et certains effecteurs secondaires (adénylate cyclase^{290,291}, canaux Kir3^{290,292}). Ces complexes seraient assemblés dans le RE afin d'être fonctionnels rapidement et répondre, d'une manière spécifique, dès leur insertion dans la membrane plasmique. En effet, une composition spécifique de l'oligomère (hétéro ou homo/dimère ou multimère) permet la création d'un complexe spécifique et unique pour une signalisation donnée.

6.4. Formation transitoire des oligomères

Une nouvelle approche, la microscopie SM (Single-molecule localization microscopy), permet de suivre une protéine couplée à un fluorochrome jusqu'à son arrivée à la surface cellulaire. L'apparition de cette technique pour l'étude des RCPGs a remis en question l'oligomérisation stable exposée précédemment et tend davantage vers une oligomérisation transitoire et brève. Peu d'études à ce jour ont été entreprises pour l'investigation de la stœchiométrie des RCPGs. Les études existantes montrent une faible proportion de formes dimériques : 30, 26, 40, 30, et 36% pour les récepteurs muscarinique M1, muscariniques M2, FPR (internalization-deficient N-formyl peptide receptor), dopaminergique D2L, et à l'apéline, respectivement. À ce jour, très peu d'études utilisant cette technique se sont intéressées à l'hétérodimerisation. Aussi, plusieurs études ont démontré l'existence d'une stabilisation plus importante de la forme dimérique en présence du ligand. Ainsi, les récepteurs neurokinine-1²⁹³, muscarinique M1²⁹³ et dopaminergique D2 présentent une demi-vie basale de 69 ms pour le complexe dimérique qui passe à 98 ms en présence de l'agoniste^{197,294}. La présence du ligand ne suffit pas en soi puisque celui-ci doit se fixer sur son récepteur²⁹⁵. La présence de certains agonistes peut induire la dissociation des formes oligomériques en structure monomérique^{295,296}. Ces résultats sont en faveur d'une oligomérisation transitoire influencée par le contexte cellulaire (présence de l'agoniste, densité du récepteur, courbure de la membrane) (Figure 43)²⁹⁷.

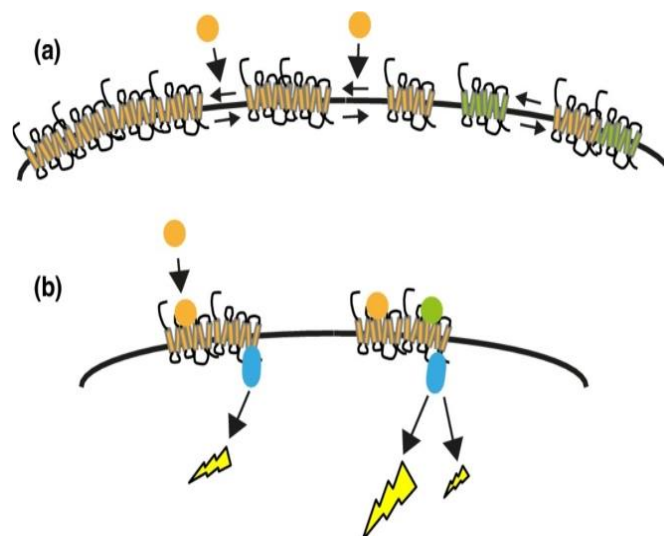


Figure 43: Oligomérisation transitoire des RCPGs²⁸²

(a) Échange dynamique entre les formes monomères, hétéromères et oligomères.

(b) Signalisation croisée entre protomères d'un dimère : La fixation d'un premier ligand (orange) sur un protomère induit une voie de signalisation et la fixation d'un autre ligand (vert) sur l'autre protomère module la signalisation.

Afin de réconcilier ces deux modèles, on peut imaginer que la formation du complexe oligomérique lié à la pG et aux effecteurs pourrait, une fois à la membrane, acquérir une flexibilité pour mieux répondre aux contraintes de son environnement cellulaire. Néanmoins, il est difficile à ce jour de conclure pour l'un ou l'autre des modèles. Des techniques différentes pour l'étude d'un même récepteur donnent des résultats différents. De plus, la majorité de ces études ont utilisé un récepteur purifié ou un modèle cellulaire surexprimant les récepteurs, conditions éloignées de la physiologie de ces récepteurs.

6.5. Oligomérisation et pharmacologie

La dimérisation aurait d'importants impacts sur la pharmacologie des RCPGs. Qu'elle soit homo ou hétéro, la dimérisation induit une modification des propriétés pharmacologiques du récepteur comparé à son état monomérique. Plusieurs paramètres peuvent être modifiés comme l'affinité aux ligands, sa capacité de signalisation, son adressage à la membrane, son taux d'internalisation^{298,299}.

Pour certains récepteurs, la dimérisation est nécessaire à la signalisation (Figure 44A), c'est le cas des récepteurs GABAR1 et GABAR2, où le premier récepteur permet la fixation du ligand et le second la transduction du signal^{300,301}. La dimérisation peut également permettre d'orienter préférentiellement le dimère vers un effecteur différent de celui des monomères (Figure 44B et C). C'est par exemple le cas pour les récepteurs à la dopamine où l'hétérodimérisation de D1 et D2 permet une sélection parmi les pGs. En effet, l'hétéromère va préférentiellement activer la voie Gαq alors que les monomères vont activer les voies Gαs et Gi, respectivement (Figure 44B)³⁰². Une sélection entre différents effecteurs est également possible. C'est le cas du récepteur MOR (μ-opioid receptors), qui après son hétérodimérisation avec le récepteur DOR (δ-opioid receptor) induit une signalisation via la voie β-arrestine, contrairement à son monomère qui utilise une signalisation pGs-dépendante (**Figure 44C**)³⁰³.

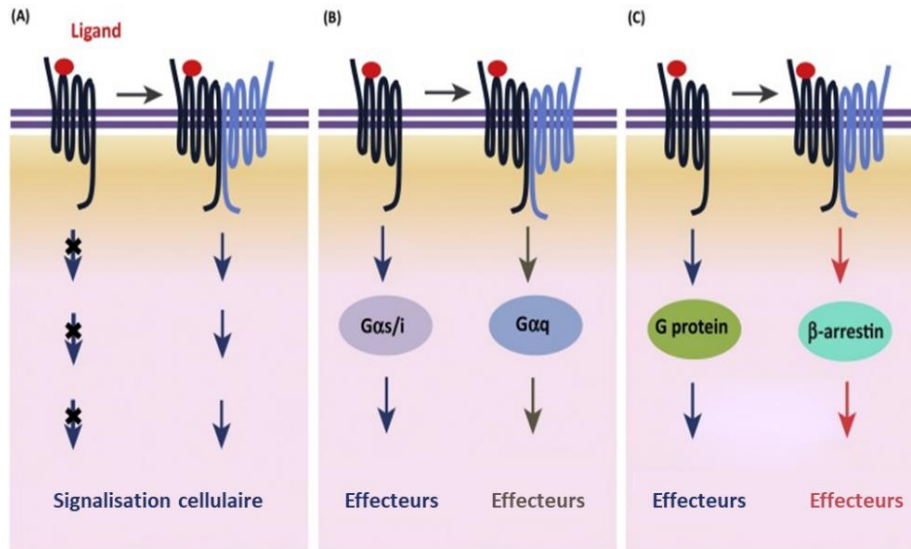


Figure 44: Dimérisation et signalisation³⁰⁴

Comme nous venons de le voir, les RCPGs sont exprimés dans tous les tissus chez l'homme et sont impliqués dans un large panel de processus physiologiques, mais également pathologiques comme résumé sur la **Figure 45**.

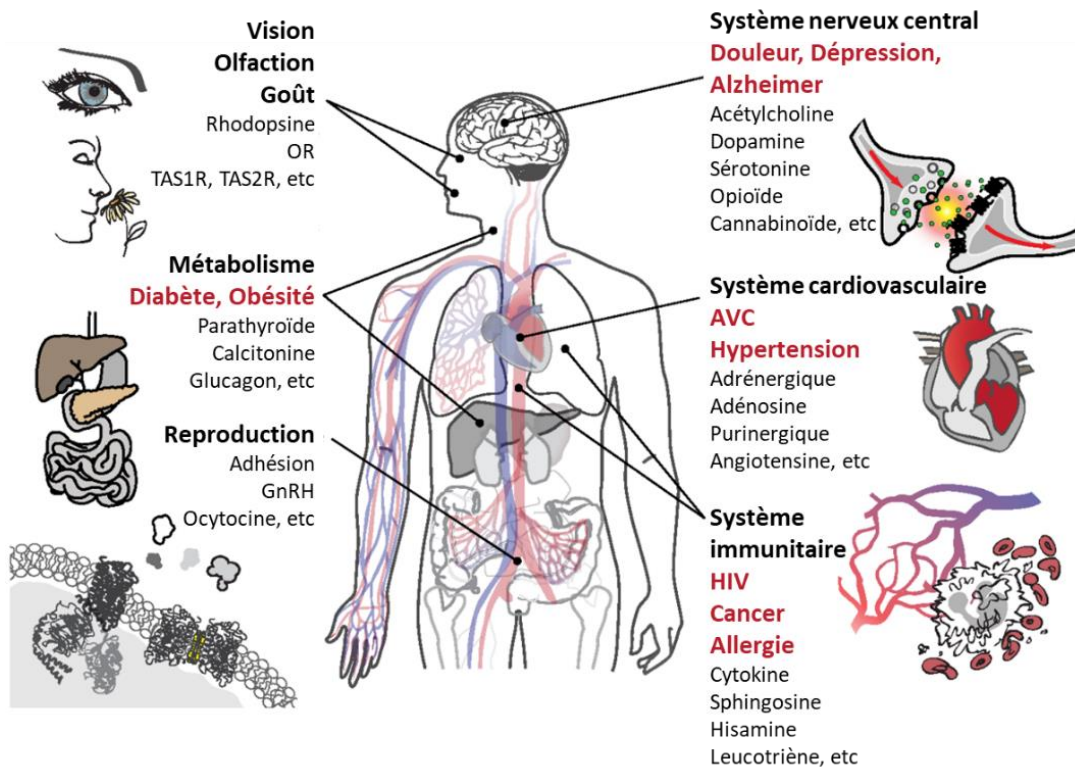


Figure 45: Fonctions physiologiques pathologiques impliquant des RCPGs³⁰⁵

Au cours des vingt dernières années, mon équipe s'est intéressée à une nouvelle famille de protéine, les prokinétines. Cette famille est composée de deux ligands PROK1 et PROK2 et de deux récepteurs PROKR1 et PROKR2 appartenant à la famille RCPGs. Dans le prochain chapitre, je vais décrire cette famille au niveau génique, protéique, physiologique et pathologique.

LES PROKINETICINES

1. DECOUVERTE DE LA FAMILLE DES PROKINETICINES

1.1. Les ligands

L'histoire des prokinétines commence au début des années 1970 grâce aux travaux des chercheurs sud-africains Daniël J. STRYDOM et François J. JOUBERT³⁰⁶. Ils s'intéressaient à l'étude du venin du serpent le plus dangereux de leur pays, le mamba noir, également connu sous le nom de *Dendroaspis polylepis*³⁰⁶. Ils ont commencé par séparer, purifier et séquencer plusieurs composants de ce venin³⁰⁷, dont une protéine qu'ils ont dénommée en 1980, protéine A du venin de mamba noir (VPRA)³⁰⁸. Dix ans plus tard, une équipe française, celle de Hugues SCHWEITZ et Michel LAZDUNSKI, qui s'intéressait à la régulation des canaux ioniques du tissu épithélial, a pu caractériser des protéines du venin de mamba, particulièrement la Dendrotoxine I, en utilisant la méthode HPLC (High Performance Liquid Chromatography)³⁰⁶. Cette protéine représente 20% des constituants du venin du mamba noir, et exerce des effets régulateurs de l'activité des canaux étudiés par l'équipe.

Grâce à l'HPLC, ils ont isolé 28 peptides qui représentent 99% des protéines présentes dans le venin. 14 peptides cationiques appartenaient à la famille des dendrotoxines (DTX). Les 14 autres peptides, moins cationiques, ne se liaient pas aux récepteurs DTX et n'induisaient pas la libération de GABA par les synaptosomes, après injection intracérébroventriculaire, caractéristique des protéines appartenant à cette famille³⁰⁹. La moitié de ces peptides ont eu une action contractile sur l'iléon du cobaye. Une seule protéine se distingua des autres par son fort pouvoir de contraction dénommée dans cette étude G4 en référence à l'ordre de sa sortie de la colonne de l'HPLC³⁰⁹. Ce n'est qu'entre 1998 et 1999 que la même équipe a pu caractériser la structure (par Résonance Magnétique Nucléaire) et la fonction de la protéine G4, qu'ils ont dénommée, **MIT-1** pour Mamba Intestinal Toxin 1 en raison de son action sur l'iléon^{310,311}. En 1998, grâce au séquençage de la protéine MIT-1, on découvre qu'il s'agit de la protéine VPRA. **MIT-1** représente 3,2% du poids du venin sec et est composée de **81 acides aminés**.

Un autre membre de la famille des prokinétines a été découvert en 1999 dans les sécrétions cutanées de la grenouille *Bombina Variegata* et a été dénommé Bv8 en référence à son espèce d'origine et à son poids moléculaire ; 8kDa. Cette protéine a été purifiée et séquencée par la même équipe qui a montré que la protéine Bv8 mature était composée de 77 acides aminés (8kDa) avec 10 cystéines comme MIT-1, et un peptide signal (PS) de 19 acides aminés. Bv8 induit également une contraction de l'iléon chez les cobayes, les rats et les souris³¹². Des protéines de type Bv8 ont également été trouvées dans les sécrétions cutanées de *Rana temporaria* et *Rana esculenta*. Bv8 et MIT-1 ont 58% d'identité³¹².

La première trace d'un analogue des prokinétines chez les mammifères date de 1994, lorsque, dans une expérience de piégeage d'exon, un homologue possible de MIT-1 a été trouvé chez la souris ³¹³. Mais ce n'est qu'en 1999 que l'analogue de Bv8 chez les mammifères a pu être identifié par la même équipe qui a découvert Bv8 chez les grenouilles. Cet analogue de Bv8 a été identifié dans des extraits de cellules cérébrales ³¹⁴. Le peptide mature a 60 acides aminés (ou 86 avec sa séquence signal : **SP**). La séquence codante présente 62% d'identité avec son analogue chez la grenouille. Deux isoformes de Bv8, une longue de 121 acides aminés (Bv8-b) et une plus courte de 107 acides aminés (Bv8-a) ont aussi été identifiées dans les testicules de souris ³¹⁴.

À quelques mois d'intervalle, deux autres équipes ont découvert en 2001 les analogues humains des prokinétines.

En utilisant un algorithme comparant les séquences du génome humain avec celles de Bv8 et MIT1, l'équipe de Zhou a découvert deux analogues humains ³¹⁵. Deux séquences ont émergé de cette recherche : aa883760 et ai277349 qui codent, respectivement, pour une protéine mature de 86 acides aminés (+19 SP) et une protéine mature de 81 acides aminés (+27 SP). Ces protéines qui présentent 44% d'identité ont été nommées, respectivement, prokinétine 1 (PROK1) et 2 (PROK2) pour leurs effets contractants du muscle lisse du tube digestif ³¹⁵.

La même année, l'équipe de Napoleone Ferrara a identifié une même protéine de 86 acides aminés, similaire à PROK1 dans une peptidothèque. Le but de cette équipe était d'identifier de nouveaux mitogènes angiogènes³¹⁶. L'équipe a démontré que cette protéine est capable d'induire uniquement la prolifération des cellules endothéliales (ACE: bovine adrenal cortex-derived capillary endothelial). Elle est, par contre, sans effet, sur la prolifération de nombreux autres types cellulaires testée comme les cellules musculaires lisses vasculaires (VSMC), les péricytes, les fibroblastes ou les kératinocytes ³¹⁶.

Contrairement au VEGF (Vascular endothelial growth factor) ou au FGFβ (Fibroblast growth factor β), qui induisent la prolifération de tous les types de cellules endothéliales, cette protéine n'est pas capable de stimuler la prolifération des autres cellules endothéliales comme les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVEC), les microvasculaires dermiques humaines (HMVEC), les capillaires cérébraux bovins (BBC) et les aortiques de bovins adultes (ABAE)³¹⁶. Ces résultats suggèrent un effet dépendant du type de cellules endothéliales considérées.

Pour son effet similaire au VEGF et sa spécificité pour les glandes endocrines, les chercheurs lui ont donné le nom d'EG-VEGF pour Endocrine Gland Derived-Vascular Endothelial Growth

Factor. En plus de son effet prolifératif, l'EG-VEGF a également une action chimiotactique pour les cellules endothéliales, ce qui lui confère un rôle clé dans l'angiogenèse ³¹⁶.

1.2. Les récepteurs

Jusqu'à 2001, les deux ligands de la famille des prokinétines, PROK1 et PROK2, n'avaient pas de récepteurs connus. On savait qu'ils étaient capables d'induire des processus cellulaires via des protéines membranaires, mais la nature de ces protéines partenaires restait inconnue.

En 2001, l'utilisation d'un inhibiteur de la protéine Gs (GTP γ S ; la forme non hydrolysable du GTP) a aboli l'effet contractile de PROK1 sur l'iléon, suggérant que son effet passait par un récepteur de la famille des RCPGs ³¹⁵. En 2002, trois équipes ont découvert les deux récepteurs des prokinétines avec deux stratégies distinctes. L'équipe de Masahiko Fujino et celle de Kiyoshi Furuichi ont toutes deux adopté une stratégie similaire qui consistait à rechercher dans le génome humain de nouveaux RCPGs potentiels. Deux séquences ont attiré leur attention, la séquence de ZAQ, un récepteur homologue de GPR73 chez la souris, et la séquence de 15E. Ces séquences, ZAQ et 15E, codent pour deux protéines de 393 et 384 résidus, respectivement. Ces deux récepteurs orphelins présentent une forte homologie (85% d'identité) et sont présents chez l'homme sur les chromosomes 2 et 20, respectivement. En mesurant la mobilisation du calcium intracellulaire dans les cellules de mammifères surexprimant l'un ou l'autre des récepteurs, les deux équipes ont cherché à identifier leurs ligands.

Pour la première équipe, c'est le lait bovin qui a provoqué une forte activation du récepteur ZAQ. Après plusieurs étapes de purification et des mesures d'activité, PROK1 a été identifiée comme ligand. Par la suite, MIT-1, PROK1 ainsi que PROK2 ont montré leur capacité à activer ZAQ et 15E. ³¹⁷ Pour la deuxième équipe, les PROK1 et PROK2 recombinants ont été testés et ont induit une forte réponse sur les deux RCPGs ³¹⁸.

La troisième équipe, celle de Qun-Yong Zhou, a mené une stratégie diamétralement opposée puisqu'elle travaillait déjà sur les prokinétines. C'est en effet cette équipe qui a découvert l'analogue humain de Bv8 et MIT1. Ils ont donc cloné tous les RCPGs orphelins récemment découverts dans le génome humain et ont testé PROK1 et PROK2 sur ces différents récepteurs en mesurant le calcium intracellulaire. Seuls deux récepteurs ont répondu à ce stimulus, ZAQ et 15E ³¹⁹. Ces trois équipes, ont par la suite renommés ZAQ et 15E, **PROKR1** et **PROKR2**, respectivement ³¹⁹.

2. STRUCTURE DES PROKINETICINES ET DE LEURS RECEPTEURS

2.1. Structure génomique et Régulation

La famille des prokinéticines (PROK) est divisée selon les espèces en deux groupes, les PROK de type 1 (PROK1) et de type 2 (PROK2). Ces deux types peuvent être distingués par leur séquence génique, leur signal peptidique ou la protéine mature. En effet, une différence existe notamment au niveau du signal peptidique qui a une taille et une composition en acides aminés caractéristiques de chaque type (**Figure 46**).

Type 1		
Humain		MRGATRVSIMLLLLVTVSDC
Rat		MRGAVQVFIMLLLLATVSDC
Souris		MRGAVHIFIMLLLLATASDC
Grenouille		MKCFAQIVVLLLLVIAFSHG
		: .:: :: : *
Type 2		
Souris	MGDPRCAPLLLLLLLP-LLFTPPAGDA	
Rat	MEDPRCAPLLLLLLLP-LLLTTPAGDA	
Humain	MRSLCCAPLLLLLLLPPLLLTTPRAGDA	
Bovin	MRSSRCARLLLLLLLPPLLLTTPAGDA	
	* . ***** **.* *	

Figure 46 : Signal peptidique de PROK1 et PROK2 selon les espèces³²⁰

Malgré cette spécificité, PROK1 et PROK2 possèdent une caractéristique commune qui réside au niveau du motif AVITGA en N-ter (**Figure 47**). Ce dernier est très conservé entre les espèces, d'où le nom de protéine AVIT proposé pour les PROK par A.Kaser³²⁰.

H1	AVITGACERDVQCGAGTCCAI	SLWLRGLRMCTPL	GREGEECHPGSHKVPFFR-KRKHHTCPCLPNLLC	SRFPDGRYRCSMDLKNINF	86
R1	AVITGACERDVQCGAGTCCAI	SLWLRGLRLCTPL	GREGEECHPGSHKIPFFR-KRQHHTCPCSPSLLC	SRFPDGRYRCSQDLKNVNF	86
M1	AVITGACERDIQCGAGTCCAI	SLWLRGLRLCTPL	GREGEECHPGSHKIPFLR-KRQHHTCPCSPSLLC	SRFPDGRYRCFRDLKNANF	86
Mam	AVITGACERDLQCGKGTCCA	AVSLWIKSVRVCTPV	GTSGEDCHPASHKIPFSGQRKMHHTCPCAPNLAC	VQTSPPKFKCLSK	80
Bom	AVITGACDKDVQCGSGTCCA	ASAWSRNIRFCIPL	GNSGEDCHPASHKVPYDG-KRLSSLCPCCKSGLTC	SKSGE-KFKCS	77
F1	AVITGACERDVQCGGLGCCA	VSLWLRGLRMCAPR	GLEGDECHPFSHKVPYPG-KRQHHTCPCLPHLVC	TRDRDSKYRCTDDFKNVDLYEVGQTLR	94
H2	AVITGACDKDSQCGGMCCA	VAIWKSIRICTPM	GKLGDSCHPLTRKVPFFG-RRMHHTCPCLPGLAC	LRTSFNRFICLAQK	81
M2	AVITGACDKDSQCGGMCCA	VAIWKSIRICTPM	GQVGDSCCHPLTRKVPFFG-RRMHHTCPCLPGLAC	LRTSFNRFICLARK	81
R2	AVITGACDKDSQCGGMCCA	VAIWKSIRICTPM	GQVGDSCCHPLTRKVPFFG-RRMHHTCPCLPGLAC	LRTSFNRFICLARK	81
B2	AVITGACDRDPQCGGMCCA	VSLWIKSIRICTPM	GKVGDSCHPMTRKVPFLG-RRMHHTCPCLPGLAC	SRTSFNRYTCLAQK	81
F2	AVITGACEKDSQCGGMCCA	VSLWIRSLRMCTPM	GREGDDCHPMSHTVPFFG-KRLHHTCPCLPNLSC	IPMDEGRAKCLSTYKYPDYLY	88

Figure 47: Alignement de séquence de PROK1 et 2 selon les espèces³²⁰

H : Humain, R : Rat, M : Souris, Mam : Mamba noir (serpent), Bom : Bombina variegata (grenouille), F : poisson Fugu

2.1.1. Bv8/PROK2

PROK2 est situé sur le chromosome 6 chez la souris, près du gène Mem1, entre les marqueurs microsatellites D6Mit66 et D6Mit36 et le chromosome 3 en 3p13 chez l'Homme. Trois variants de PROK2 existent en raison d'un épissage alternatif. En effet, deux formes de PROK2 : mBv8-a (ou mBv881, mPROK2, transcrit v3) et mBv8-b (ou mBv8102, mPROK2L, transcrit v1) ont été trouvées dans les testicules murins tandis qu'une troisième forme tronquée (transcrit v2) a été identifiée dans le cerveau ^{314,321}.

mBv8-b est composée de 121 résidus tandis que la forme courte, mBv8-a, en contient 107. Les deux ligands possèdent un peptide signal de 26 résidus. La forme longue a un excédent de 21 acides aminés dont 11 sont basiques (arginine ; R ou lysine ; K). La forme tronquée est dépourvue de l'insert basique ainsi que de la partie C-ter ^{314,321}.

Les 2 premières formes ont également été identifiées chez l'homme : PROK2 et PROK2L (Figure 52). Elles sont composées respectivement de 108 et 129 résidus avec un peptide signal de 27 acides aminés (**Figure 48**).

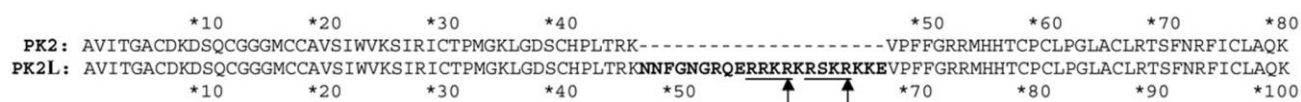


Figure 48: Alignement de séquence de PROK2 et PROK2L ³²²

PROK2L possède également cet insert basique positionnée entre la lysine 47 et la valine 48 de la PROK2 mature. Cette séquence additionnelle est hautement conservée parmi les différentes espèces (Figure 49).



Figure 49: Alignement de séquence de l'insert basique présent dans PROK2L en fonction des espèces ³²⁰

La masse théorique de la PROK2L mature est d'environ 11,5 kDa, cependant une seconde bande apparaît en immunoblot entre 6 et 7 kDa. Cette différence est due à un clivage protéolytique. En effet, dans l'insert de 21 acides aminés se trouvent 2 sites de clivage à la furine : **Arg-Arg-Lys-Arg60** et **Arg-Ser-Lys-Arg65** (Arg-X-Lys-Arg ou Arg-X-Arg-Arg). La protéine protéolysée a été nommée PROK2 β , mais les mécanismes moléculaires et le type de protéases

in vivo impliquées restent à élucider (**Figure 50**). Néanmoins ce clivage est essentiel pour son activité biologique.

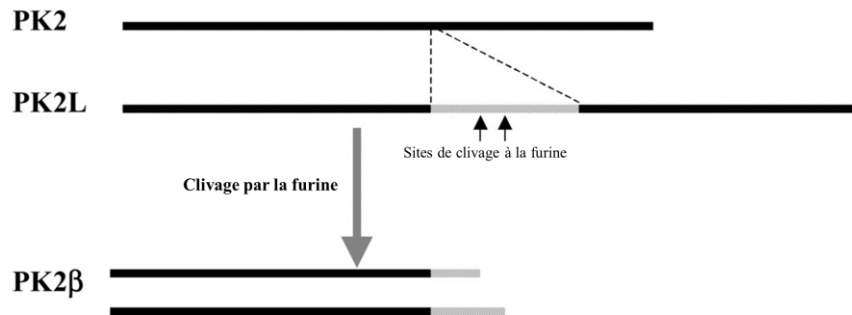


Figure 50: Clivage de la protéine PROK2L en PROK2β par la furine ³²²

Au niveau de la séquence, la comparaison des protéines murine et humaine montre que la forme longue de PROK2 présente une identité de 82% et une similarité de 87%. Quant à la forme courte, elle a une identité de 95% et une similarité de 99% (**Figure 51**) ³²³.

	*10	*20	*30	*40	*50	*60	*70	*80	*90	*100
Humain:	AVITGACDKDSQCGGMCCA	VSIVVKSIRICTPMGKLG	DSCHPLTRK	NNFNGRQERRKRKR	SKRKKE	VPFGRMHHTCPCLPGLACL	RTSFNRFICLAQK			
Consensus:	AVITGACDKDSQCGGMCCA	VSIVVKSIRICTPMG::	GDSCHPLTRK::	NGRQERR::KR.KRKKE	VPF.GRRMHHTCPCLPGLACL	RTSFNRFICLA:K				
Rat/Souris:	AVITGACDKDSQCGGMCCA	VSIVVKSIRICTPMGQV	GDSCHPLTRK	SHVANGRQERRAKRRKR	KKKE	VPFWGRRMHHTCPCLPGLACL	RTSFNRFICLARK			
	*10	*20	*30	*40	*50	*60	*70	*80	*90	*100

Figure 51 : Alignement de séquence de PROK2 entre le rat/souris et l'homme. ³²²

La séquence additionnelle de PROK2L) est indiquée en gras.

Leur organisation reste la même avec l'exon 1 qui code pour le peptide signal et 5 acides aminés. L'exon 2 qui code pour 42 acides aminés dont 6 cystéines. L'exon 3 qui n'est présent que sous la forme longue code pour 21 acides aminés, et enfin l'exon 4 code pour 34 acides aminés, dont 4 cystéines ³²³.

Grâce à sa partie hautement basique, PROK2β possède une plus grande capacité à se lier à l'héparine comparé à PROK2. L'héparine est un protéoglycane très présent dans la matrice extracellulaire qui module la biodisponibilité de nombreux facteurs pro-angiogéniques (VEGF, FGFβ) ou autres cytokines. Cette interaction s'explique par la présence d'une séquence consensus (motif XBBXB, dans lequel B est un acide aminé basique, généralement Arg ou Lys) présente chez PROK2β, mais absente de PROK2 ³²⁴.

Récemment (2022) une nouvelle forme de PROK2 a été identifiée et nommée PROK2C. ³²⁵ Elle est codée par l'exon 1 et 4 et est composée de 40 acides aminés. Elle a été identifiée dans l'hippocampe et la moelle épinière chez la souris (**Figure 52**) ³²⁵.

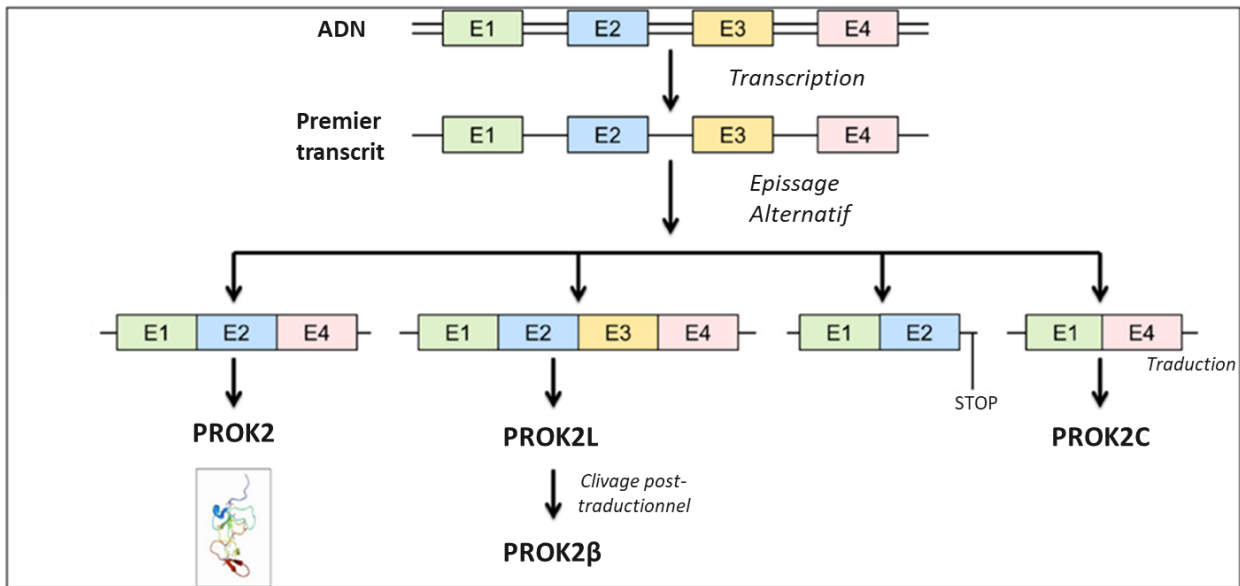


Figure 52: Épissages alternatifs de *PROK2* ³²⁵

Au niveau du promoteur de *PROK2*, il existe de nombreux éléments de réponse à certains facteurs transcriptionnels. En effet, on retrouve des boîtes E (E-box) essentielles pour la fixation de différents facteurs possédant des hélices-boucles-hélices basiques (HBH) comme Clock et Bmal1. Ces derniers sont à la base de la régulation de l'horloge circadienne ³²⁶. Parmi les HBH, on trouve aussi la Neurogenine 1 et MASH-1 (mammalian achaete scute homolog-1) qui régulent la neurogenèse dans le bulbe olfactif ³²⁶.

Ces facteurs reconnaissent et se fixent sur une séquence d'ADN spécifique, CAXXTG (où X peut être n'importe quel nucléotide). Chez la souris, il existe 4 éléments pouvant correspondre à une E-box dans le promoteur du gène *PROK2*, et qui sont conservés chez l'homme. Aucune E-box n'a été trouvée dans le promoteur du gène *PROK1*. Le promoteur de *PROK2* possède également un élément de réponse à l'AMPc (CRE) (**Figure 53**).

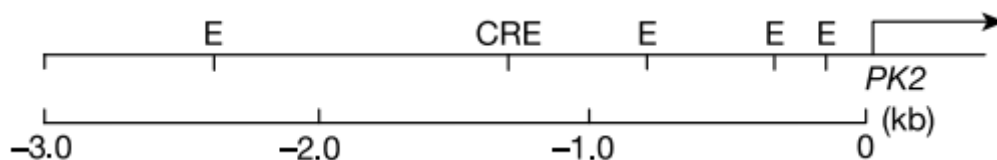


Figure 53: Promoteur de *PROK2* : Boîte E, CRE ³²⁷

Il y a également des sites HRE (Hypoxia Response Element) (flèches noires). On peut également voir cinq parties où la séquence est très conservée (80 à 100%) (boîtes noires). Ceci représente environ 30% de la séquence nucléotidique du promoteur (**Figure 54**).

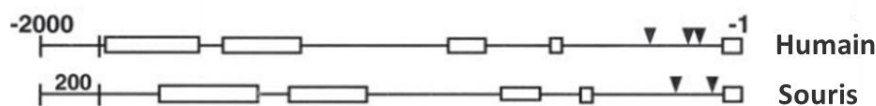


Figure 54: Promoteur de PROK2 entre l'homme et la souris ³²³

L'expression de PROK2 est contrôlée positivement par de nombreux régulateurs. Tout d'abord, elle est régulée par le facteur de stimulation des colonies de granulocytes (G-CSF). En effet, on observe une augmentation de PROK2 (>27 fois) dans les cellules mononuclées de la moelle osseuse non triées (BMMNCs) traitées. En présence de 10 ng/ml de G-CSF, cette augmentation est encore plus élevée (~100 fois) dans les cellules purifiées CD11b+ Gr1+ (cellules constituées principalement de neutrophiles, mais comprenant également des cellules du lignage macrophage). Une dose plus physiologique de 20 pg/ml de G-CSF induit une augmentation de 5 ou 10 fois dans les conditions normales ou hypoxiques, respectivement. Ces résultats ont également été observés *in vivo* chez la souris avec une augmentation des niveaux de PROK2 dans le sérum et les BMMNCs. L'utilisation d'anticorps anti-G-CSF pour bloquer son activité a permis de confirmer son effet positif sur la production de PROK2 à la fois *in vitro* et *in vivo*. Cette régulation se produit par l'activation de la voie Jak/Stat par le biais du G-CSF et par la liaison de phospho-Stat3 sur le promoteur de *PROK2* ^{328,329}. L'interleukine 6 (IL-6) et la chimiokine Sdf-1 ont également un effet régulateur positif, mais uniquement sur les cellules CD11b+ Gr1+, avec une augmentation de 2 à 3 fois ³²⁸. Quant aux lymphocytes et aux monocytes, elles sont régulées par l'interleukine 10 et par le Sdf-1 ³³⁰.

De plus, l'implication du G-CSF, de l'IL-6 et de l'IL-1 β dans l'augmentation de STAT3 dans les neurones et les astrocytes du DRG (dorsal root ganglia) est concomitante avec l'augmentation de PROK2 après une lésion nerveuse ou une inflammation ³³¹. Toujours dans le système nerveux, PROK2 est régulé à la hausse par le peptide β -amyloïde dans les neurones et les cellules gliales ³³².

Il a été également démontré que TBX20, un facteur de transcription impliqué dans l'angiogenèse, agit positivement sur l'expression de PROK2 ³³³.

Alors que la liaison de TBX20 au promoteur de *PROK2* reste à démontrer, un modèle de régulation via VEGF et son récepteur a émergé ³³³. Dans ce modèle, VEGF via l'activation de son récepteur stimule la production de TBX20, qui à son tour induit la transcription de *PROK2*. Ce modèle met en évidence le rôle de PROK2 comme extension et renforcement de l'effet du VEGF (**Figure 55**) ³³³.

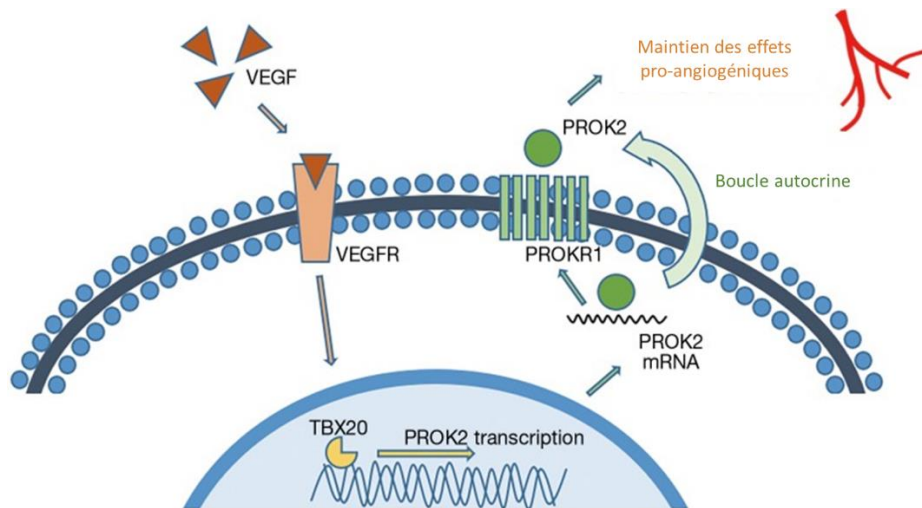


Figure 55: Régulation de l'expression de PROK2 par VEGF et TBX20 ³³⁴

Dlx1/2, un autre facteur de transcription, régule à la baisse l'expression de PROK2 dans les interneurons du bulbe olfactif et dans l'éminence ganglionnaire médiane, représentant ainsi la contrepartie négative de MASH-1 ^{335,336}.

Au niveau de la régulation hormonale, l'AVP (Arginine Vasopressine), également impliquée dans le rythme circadien, régule, *via* son récepteur V1a, positivement PROK2 ³³⁷. En effet, le knock-out de ce récepteur induit une diminution de 50% des pics d'oscillations de PROK2, dont le mécanisme reste à déterminer ³³⁷.

2.1.2. EG-VEGF/PROK1

PROK1 est situé sur le chromosome 3 chez la souris et le chromosome 1 chez l'homme. L'organisation génomique est relativement conservée, avec 3 exons qui codent pour cette protéine sans épissage alternatif connu. Le peptide signal et les cinq premiers acides aminés sont codés par le premier exon. Le deuxième exon code pour 42 résidus contenant 6 des 10 cystéines et l'exon trois code pour les 49 derniers acides aminés ³³⁸.

En comparant les séquences protéiques chez l'homme et la souris, on note une identité de 88% et une similarité de 93%. Cette forte conservation se retrouve également au niveau du signal peptidique avec une conservation de 73%. Les parties divergentes de la séquence génomique, encadrées en noir, sont mises en évidence sur la **Figure 56**.

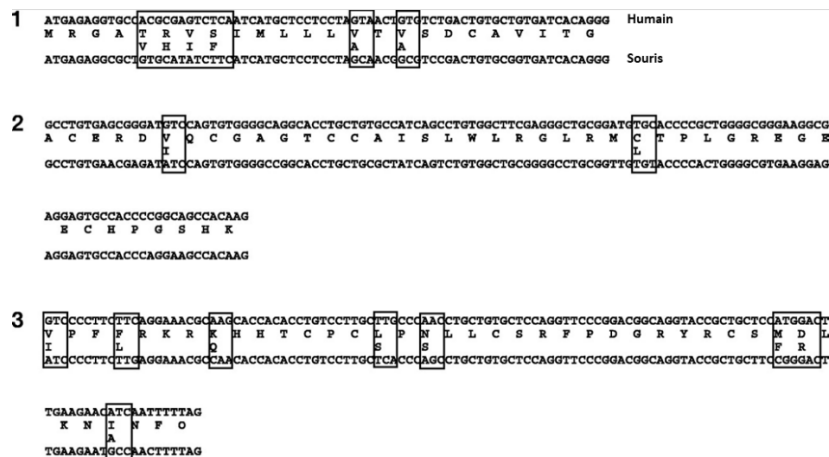


Figure 56: Aligment des séquences d'acides aminés de PROK1 chez l'homme et la souris par exon ³³⁸

Au niveau du promoteur *PROK1*, on retrouve également de nombreux éléments de réponse à certains facteurs. En effet, on retrouve des sites consensus C/EBP (CCAAT Enhancer Binding Proteins) qui est un facteur de transcription exprimé dans les adipocytes, les cellules myélomonocytaires, les hépatocytes, les cellules épithéliales intestinales, les cellules lutéales ovariennes, les kératinocytes, les cellules épithéliales mammaires et les cellules neuronales. Cinq sites C/EBP existent chez la souris, contre un seul chez l'homme en position -393 ^{338,339}.

Il existe également un site de liaison Sf-1 (Steroïdogenic factor 1) (gène *NR5A1*) qui est un récepteur nucléaire qui se lie au motif AGGTCA. Il joue un rôle clé dans le développement et la fonction des glandes endocrines, en particulier les gonades et les surrénales. Dans ces tissus, Sf-1 est exprimé dans les cellules corticales des surrénales, les cellules de Leydig et de Sertoli des testicules, les cellules de la thèque et de la granulosa des ovaires (follicules antraux), le placenta et le corps jaune des vaches, des rats et des souris. Sf-1 est également exprimé dans des tissus non stéroïdogènes tels que l'hypothalamus ventromédial (VMH), les cellules endothéliales du sinus et de la veine pulpeuse de la rate et de la peau. La similarité du profil d'expression entre PROK1 et ce récepteur peut suggérer un fort pouvoir régulateur de Sf-1 sur l'expression de PROK1. Cependant, ce site n'est pas présent dans le promoteur de la souris, ce qui peut suggérer des schémas et des rôles différents de Sf-1 (**Figure 58**) ^{338,340}.

Comme pour le promoteur de *PROK2*, on note la présence de quatre sites HRE (hypoxia response element, flèches noires **Figure 58**) sur celui de *PROK1*. Deux éléments canoniques de réponse à l'AMPc à la position -1728 bp, et -383 bp sont également présents. Enfin, il existe 3 boîtes hautement conservées, représentant ~5,2% du promoteur, et une boîte TATA uniquement dans le modèle murin ³³⁸.

Plusieurs régulateurs peuvent modifier l'expression de PROK1. En effet l'hormone gonadotrophine chorionique (hCG), HIF-1 α (Hypoxia-Inducible Factor-1 α), l'insuline, les œstrogènes et la progestérone régulent positivement sur PROK1.

Pour la progestérone, il y a deux sites putatifs de liaison au récepteur de la progestérone sur le promoteur de PROK1, ce qui suggère une action directe. Cependant, plusieurs données utilisant des antagonistes du récepteur de la progestérone suggèrent plutôt une action indirecte. L'addition de de progestérone (10⁻⁶ M) au niveau du tissu endométrial induit une augmentation de l'expression de PROK1 d'~3 fois, alors que des concentrations de 10⁻⁹ M de progestérone ou d'œstrogène sont suffisantes pour créer cet effet positif³⁴¹.

L'utilisation de la forskoline (1 μ M), un booster de l'AC, sur une lignée de cellules granuloza humaines (SVOG) induit une augmentation d'~124 fois. De plus, une forte expression de PROK1 a été observée dans les échantillons endométriaux péri-implantatoires chez les femmes ayant des cycles stimulés par les gonadotrophines dans un contexte de fécondation *in vitro*, ou chez les femmes traitées par hormonothérapie substitutive. Ces résultats suggèrent une régulation du gène *PROK1* par l'hCG. La surexpression de PROK1 en réponse à l'hCG a ensuite été démontrée dans des explants placentaires et les cultures primaires de trophoblastes. En effet, l'hCG est produite par le syncytiotrophoblaste et agit de manière autocrine sur l'expression de l'ARNm et de la protéine PROK1 (**Figure 57**). Cette surexpression est régulée par l'activation, via le récepteur de l'hCG, de la voie de l'AMPC, qui va se lier au promoteur de PROK1 en position -383pb comme décrit précédemment³⁴²⁻³⁴⁴.

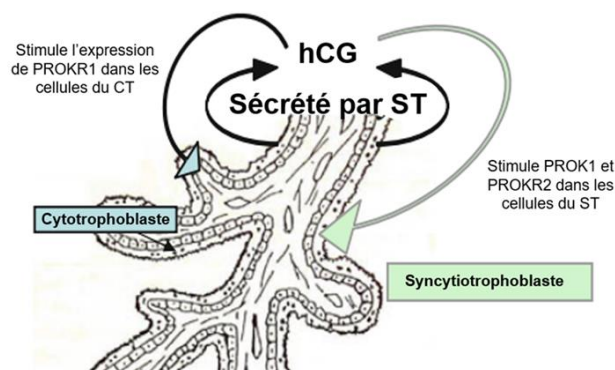


Figure 57: Mécanisme de régulation des prokinétines dans le placenta³⁴⁴

En cas d'hypoxie (2% O₂), l'expression de PROK1 est également fortement augmentée d'~ 275 et ~210 fois dans les lignées cellulaires SW13 (Human Caucasian adrenal cortex adenocarcinoma cell line) et H295R (angiotensin-II-responsive steroid-producing

adrenocortical cell line), respectivement. Ces résultats s'expliquent par la liaison de HIF-1 α aux sites consensus précédemment décrits. Cette surexpression a été également observée dans les cellules trophoblastiques isolées de placentas âgés de 7 à 10 semaines ^{316,345}.

L'insuline induit aussi une augmentation de l'expression du PROK1 au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel. Ces résultats ont été observés dans les cellules stromales endométriales en cours de décidualisation dépendante de HIF-1 α et utilisant la voie PI3K ³⁴⁶.

Il existe également des régulateurs négatifs de PROK1. En effet, la testostérone diminue l'expression de la prokinéticine *in vitro* (dans la lignée cellulaire d'insulinome de rat ; RINm5F) et *in vivo* (pancréas de rat). Cet effet semble être médié par le récepteur d'androgène.³⁴⁷ La thrombine exerce aussi une régulation négative sur PROK1, en diminuant son expression dans les cellules SVOG (immortalized human granulosa-lutein cell line) ³⁴².

La régulation hormonale de l'expression de PROK1 n'est pas exclusive. Elle a aussi été décrite pour d'autres facteurs pro-angiogéniques tels que le FGF et le VEGF. En effet, ils sont tous deux régulés par les œstrogènes et la progestérone ³⁴¹.

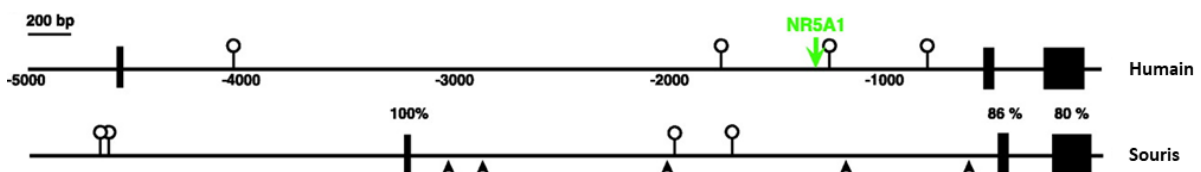


Figure 58: Région promotrice de PROK1 chez l'homme et à la souris ³³⁸

2.1.3. Les récepteurs : PROKR1/PROKR2

Le gène codant pour le récepteur PROKR1 est localisé sur le chromosome 2 chez l'homme et le chromosome 6 chez la souris. Il code pour un polypeptide de 393 acides aminés. Pour PROKR2, le gène est situé sur le chromosome 20 chez l'homme et sur le chromosome 2 chez la souris. Les deux gènes codent pour 384 et 381 acides aminés, respectivement. Les deux récepteurs humains ont une identité très élevée de 87% avec des différences marquées principalement au niveau N-terminal. La région codante pour PROKR1 et PROKR2 est constituée de deux exons dont la jonction se fait au niveau de l'arginine dans le TM3 (**Figure 61**, flèche noire). Ces trois facteurs communs peuvent suggérer que ces RCPGs dérivent d'un même gène ancestral. Cependant, il existe un troisième exon situé en 5' UTR qui n'est pas

transcrit et qui n'est présent qu'au niveau du gène codant pour PROKR1 murin et humain et pour PROKR2 murin (**Figure 59**)^{318,319,325}.

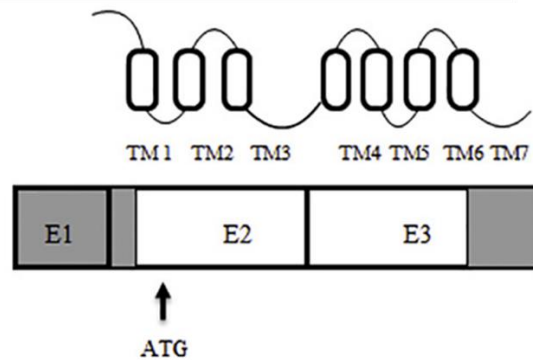


Figure 59: Structure génomique de PROKR2³⁴⁸

Gris : non transcrit. Blanc : transcrit. E : exon. TM : transmembrane.

Pour PROKR1, aucun épissage alternatif n'a été mis en évidence. Par contre, deux transcrits ont été identifiés pour PROKR2. Le premier correspond à la transcription des exons 1 et 2 et code pour la protéine PROKR2 sans les TM6 et TM7. Le deuxième découle de la transcription des exons 1 et 3 codants pour un PROKR1 sans les TM1, TM2 et TM3 (**Figure 60**). Ce dernier est fonctionnel, et a été identifié dans l'hippocampe du rat³⁴⁸.

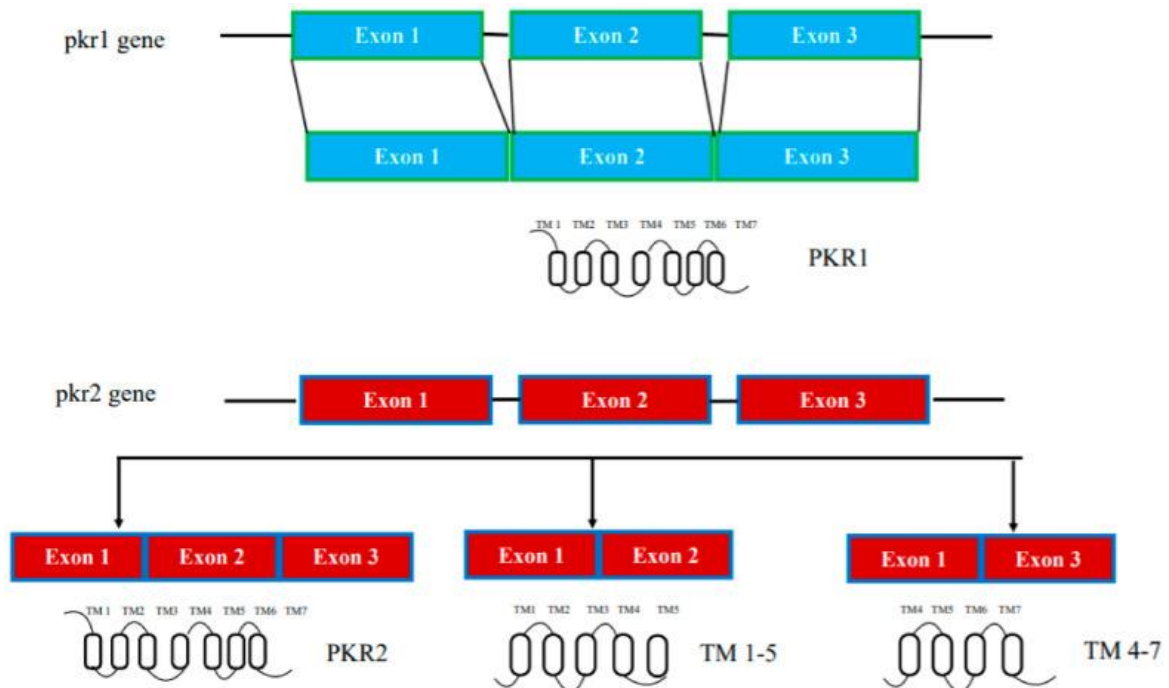


Figure 60: Épissages alternatifs de PROKR1 et PROKR2³⁴⁹

(PK-R1)	METTMGFMD	NATNTSFL	SVLNPHGAHA	TSFPFNFSYS	DYDMPLEDE	50
(PK-R2)	MA-----	-AQNNTSFT	PNFNPPQDHA	SSLSFNFSYG	DYDLPMEDE	41
TM1						
(PK-R1)	DVTNSRTFFA	AKIVIGMALV	GIMLVCGIGN	FIFIAALVRY	KKLRNLNLL	100
(PK-R2)	DMTKTRTFFA	AKIVIGIALA	GIMLVCGIGN	FVFIAALTRY	KKLRNLNLL	91
TM2						
(PK-R1)	IANLAISDFL	VAIVCCPFEM	DYYVVRQLSW	EHGHVLCISV	NYLRTVSLYV	150
(PK-R2)	IANLAISDFL	VAIICCPFEM	DYYVVRQLSW	EHGHVLCASV	NYLRTVSLYV	141
TM3						
(PK-R1)	STNALLAIAI	DRYLAI VHPL	RPRMKQTAT	GLIALVWTVS	ILIAIPSAYF	200
(PK-R2)	STNALLAIAI	DRYLAI VHPL	KPRMNYQTAS	FLIALVWTVS	ILIAIPSAYF	191
TM4						
(PK-R1)	TTETVLVIVK	SQEKIFCGQI	WPVDQQLYYK	SYFLFIFGIE	FVGPVVTMTL	250
(PK-R2)	ATETVLVIVK	SQEKIFCGQI	WPVDQQLYYK	SYFLFIFGVE	FVGPVVTMTL	241
TM5						
(PK-R1)	CYARISRELW	FKAVPGFQTE	QIRKRLRCRR	KTVLVLMCIL	TAYVLCWAPF	300
(PK-R2)	CYARISRELW	FKAVPGFQTE	QIRKRLRCRR	KTVLVLMCIL	TAYVLCWAPF	291
TM6						
(PK-R1)	YGFTIVRDEF	PTVFVKEKHY	LTAFYIVECI	AMSNSMINTL	CFVTVKNDTV	350
(PK-R2)	YGFTIVRDEF	PTVFVKEKHY	LTAFYVVECI	AMSNSMINTV	CFVTVKNTM	341
TM7						
(PK-R1)	KYFKKIMLLH	WKASYNGGKS	SADLDLKTIG	MPATEEVDCI	RLK	393
(PK-R2)	KYFKKIMLLH	WRPSQRGSKS	SADLDLRTNG	VPTTEEVDCI	RLK	384

Figure 61: Alignement de séquence d'acides aminés de PROKR1 et PROKR2 ³¹⁸

Au niveau du promoteur de PROKR1, il existe un site potentiel pour la fixation de HIF1 α . La présence de ce site est soutenue par l'augmentation d'expression du récepteur en hypoxie (3% O₂) dans les cellules trophoblastiques isolées de placentas âgés de 7 à 10 semaines ³⁴⁵. PROKR1 est également induit par l'hCG notamment lors de la gestation ³⁵⁰. Concernant PROKR2, son expression est stimulée par TSHZ1 (Zinc Finger Homeodomain Family member 1), un facteur de transcription essentiel pour le développement de bulbe olfactif (OB ; Olfactory Bulb) ³⁵¹.

2.2. Structure et liaison ligand/récepteur

2.2.1. Structure des ligands

Seuls deux ligands de la famille des prokinétines ont leur structure connue. En effet, la première structure découverte a été celle de MIT1 par RMN en 1998³¹⁰, suivie de celle de Bv8 de *bombina variagata* qui a été synthétisée chimiquement et sa structure résolue par RMN ³⁵². Cependant, aucune structure n'est disponible pour les homologues humains. Nous pouvons supposer que leur structure sera similaire aux différentes protéines de cette famille compte tenu de leur grande homologie. En effet, la famille des prokinétines est caractérisée par une séquence N-terminale **AVITGA** et une partie carboxy-terminale riche en cystéines formant 5 potentiels ponts disulfures. L'espacement de ces cystéines est préservé, ce qui caractérise une structure relativement compacte qui est également résistante à différentes protéases (trypsine, pepsine et carboxypeptidase Y pour MIT1). Au niveau de la structure elle-même, les

prokinéticines présentent deux groupes de 3 feuillets bêta inversés avec les extrémités N-ter et C-ter positionnées à la surface de la protéine.

Cependant, cette forme structurale n'est pas exclusive à cette famille. La co-lipase des mammifères a une structure similaire à celle de MIT-1 (**Figure 62**). C'est une protéine de 90 acides aminés impliquée dans la digestion des acides gras en se liant comme cofacteur à la lipase pancréatique.

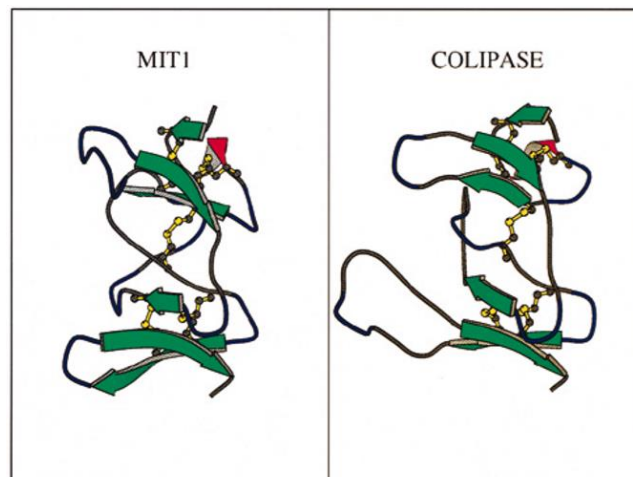


Figure 62: Structure tridimensionnelle des récepteurs MIT-1 et Colipase ³¹⁰

En effet, on y retrouve le même schéma de cystéines et de groupes de feuillets bêta inversés. De plus, dans les deux protéines, la plupart des acides aminés hydrophobes sont partiellement ou totalement exposés au solvant. Néanmoins, ces deux protéines diffèrent par leur surface électrostatique. MIT-1 présente un côté chargé positivement (**Figure 63**, couleur rouge) tandis que le côté opposé représente une poche chargée négativement (**Figure 63**, couleur bleu) et composée de Val21, Thr32, Pro33 et Glu39.

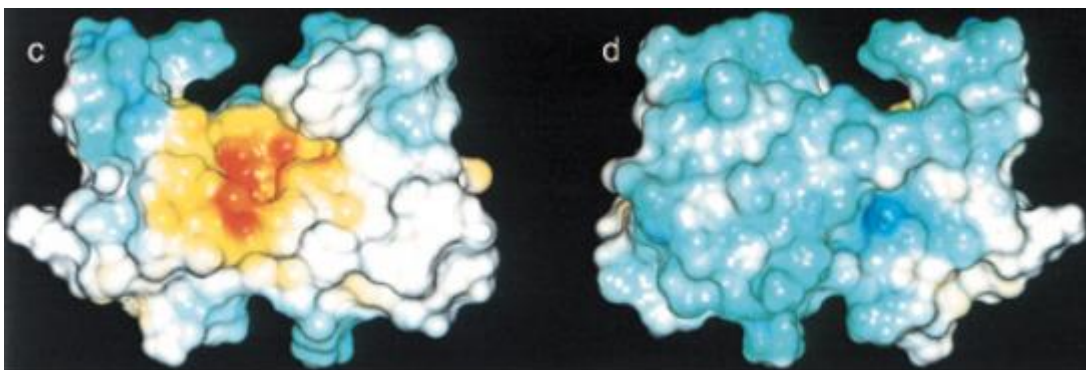


Figure 63: Structure tridimensionnelle de MIT1 avec les potentiels électrostatiques ³¹⁰

Rouge : acides aminés chargés positivement, Bleu : acides aminés chargés négativement / Entre c et d rotation de 180°

Ce repliement est très important pour l'activité biologique de ces protéines. Les protéines dépliées sont inactives³¹⁵. D'autres protéines ont un motif cystéine similaire à celui des prokinétines comme les membres de la famille Dickkopf.

Ce sont des protéines extracellulaires qui régulent une voie métabolique essentielle au développement de la tête chez l'embryon *via* la signalisation Wnt (wingless related) / β -caténine. D'autres protéines présentes dans le venin de certaines araignées (atracotoxine de type MIT), de serpents (toxines curarémimétiques, toxines neuronales, toxines muscariniques, cytotoxines, fasciculines, calciseptines), et chez les cnidaires et les écrevisses (astakines), possèdent également cette forme de repliement proche de la colipase. Cependant, cette forme de repliement n'est pas suffisante pour la fonction de la protéine. Par exemple, les astakines sont incapables d'activer les PROKRs et Bv8 ne semble pas avoir les mêmes propriétés que la protéine Dickkopf³⁵³. Les éléments essentiels à leur fonction biologique ont été déterminés par diverses mutations : insertions, fusions ou délétions. La partie N-terminale semble être essentielle à leurs fonctions. La plupart des modifications de l'hexapeptide **AVITGA** rendent la protéine inactive (Ala1Met, delMet et delAla6 chez PROK1) ou la rendent très fortement moins active (delAla1 chez PROK2). Cependant, cet hexapeptide n'est pas suffisant, car sa présence fusionnée avec la partie C-ter d'une protéine similaire en motif cystéine comme la colipase ou le dickkopf-4 ne permet pas l'activation du récepteur. En revanche, l'échange des deux parties C-ter de PROK1 et PROK2 est possible avec une réduction mineure de leurs effets biologiques. Les mutations des cystéines, par contre, entraînent une abolition de la réponse (Cys18Ser, Cys60Arg chez les PROKs). En conclusion, l'activation des PROKRs semble dépendre du motif cystéine, qui apparaît être exclusif aux PROKs et de l'hexapeptide de la partie N-ter. Certains changements, en dehors des cystéines, au niveau des C-ter semblent être tolérables^{310,322,354}.

2.2.2. Structure des Récepteurs

PROKR1 et PROKR2 appartiennent à la famille des RCPGs de type A possédant ainsi 7 domaines transmembranaires, 3 boucles intracellulaires et 3 boucles extracellulaires. Deux résidus cystéine localisés au niveau de la première et la seconde boucle extracellulaire forment un pont disulfure entre les deux boucles. Ce pont joue un rôle important dans la stabilisation des 7 hélices transmembranaires. La famille A, également connue sous le nom de la famille des récepteurs de la rhodopsine, est un groupe très hétérogène. Elle constitue le plus grand groupe

de RCPGs, comprenant environ 800 récepteurs chez l'homme et englobant une grande variété de ligands tels que les peptides, les amines et les purines. Du fait de leur hétérogénéité, leurs structures diffèrent principalement au niveau des hélices transmembranaires contrairement à leurs parties N-ter qui sont le plus souvent courtes même si des exceptions existent.

Néanmoins, de nombreuses séquences spécifiques localisées au niveau des parties transmembranaires sont présentes dans la plupart des membres de cette famille, comme le commun motif DRY (D(E)-R-Y(F)) positionné à l'extrémité du TM3, le motif nPxxxy ou le motif CwxP (**Figure 64**)³⁵⁵.

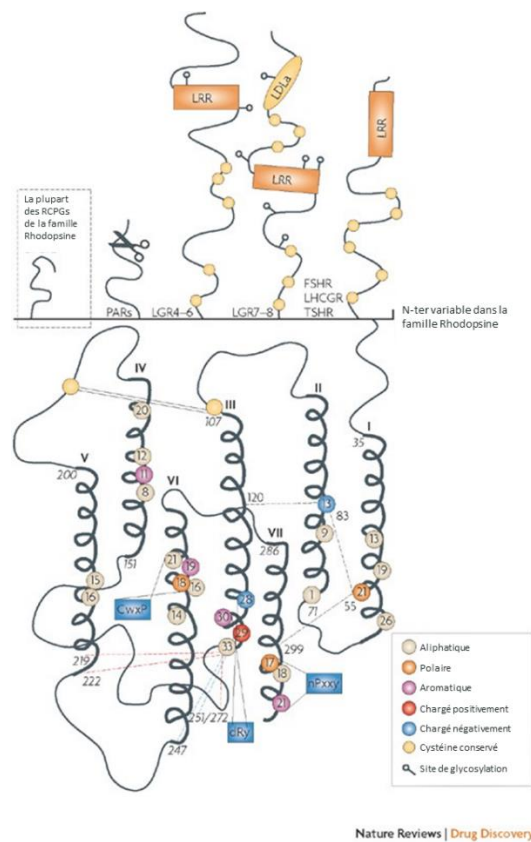


Figure 64: Structure et motifs de la famille RCPG Rhodopsine³⁵⁵

Les PROKRs sont structurellement similaires au récepteur du neuropeptide Y (NPY) qui fait partie de la classe A et de la sous-classe β . PROKR1 et PROKR2 ont 87% d'identité et diffèrent par leurs parties N-terminale. En effet, PROKR1 possède 9 acides aminés de plus que son homologue. Les autres différences se concentrent au niveau de la partie C-ter (**Figure 65**)³⁵³.

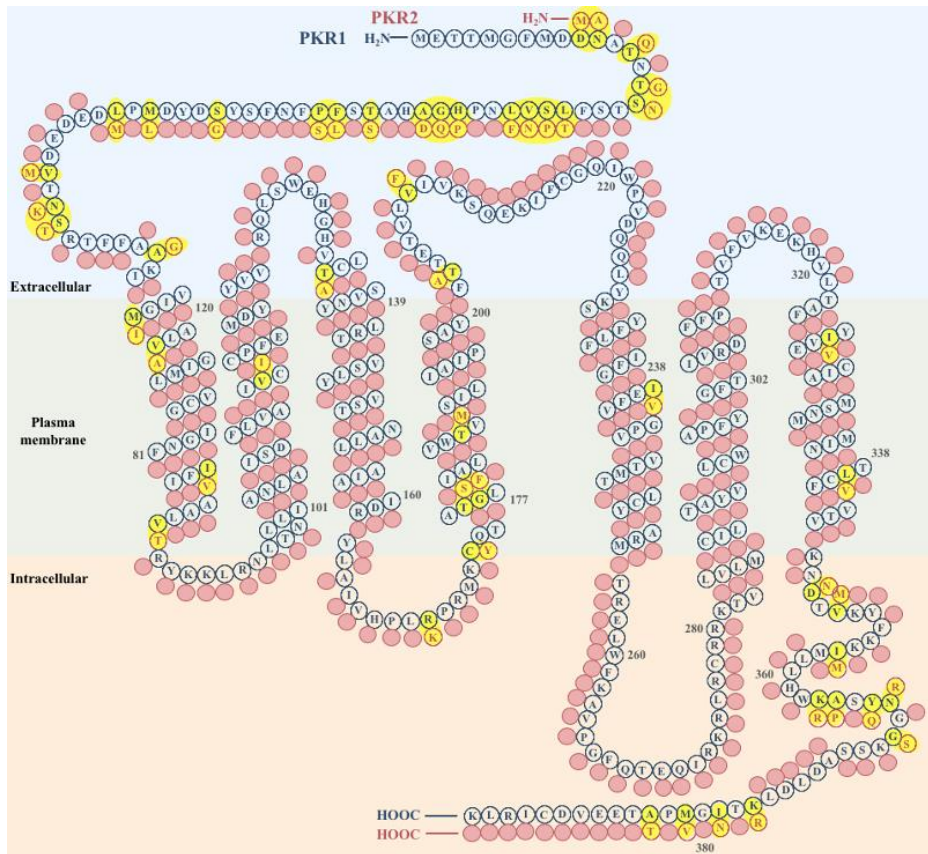


Figure 65: Structure et alignement de séquence de PROKR1 et PROKR2

Les cercles jaunes marquent les différences entre les deux séquences. Cercle rouge : PROKR1 Cercle bleu PROKR2

Des mutations présentes dans les régions transmembranaires (**Figure 66**, rouge) affectent généralement l'expression du récepteur à la surface, alors que les mutations dans les boucles intracellulaires (**Figure 66**, orange) affectent l'activité de ces récepteurs en induisant une diminution des interactions avec les protéines G ou avec d'autres protéines intracellulaires. Des mutations spécifiques de la ECL2 (**Figure 66**, bleu) affectent la liaison du ligand. L'implication de ces acides aminés sera discutée dans la section « Interaction ligand/récepteur ».

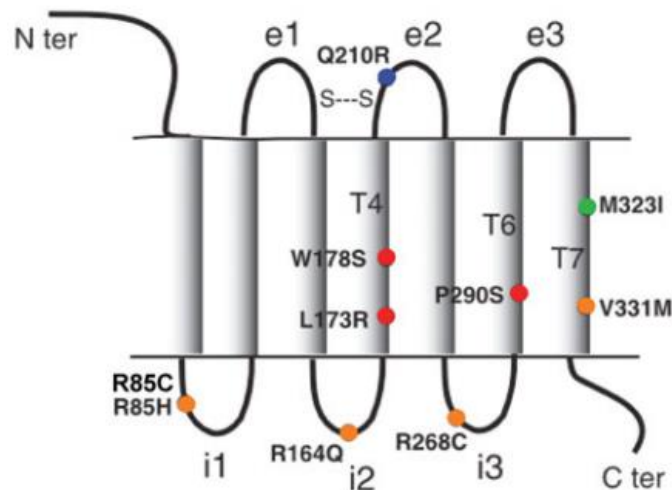


Figure 66: Mutations de PROKR2 présentes dans le syndrome de Kallmann ³⁵⁶

Le rouge, le bleu, l'orange ou le vert indique les mutations qui altèrent l'expression à la surface cellulaire, la liaison au ligand, le couplage à la pG ou pas d'effet sur l'activité, respectivement.

Les acides aminés excédentaires retrouvés chez PROKR1 semblent être importants pour l'affinité de PROK2 β supérieure pour ce récepteur. En effet, la forme longue de PROK2 semble se lier exclusivement à PROKR1. Ceci peut s'expliquer par un modèle de récepteur à deux sites de liaison (« two-sided model »), comme retrouvé dans d'autres membres de la famille A des RCPGs (chimiokines) (voir section « Interaction ligand/récepteur »). La partie conservée dans les 2 formes de PROK2 se lierait aux TMs et la partie divergente C-ter (**Figure 50**, gris) interagirait avec la partie N-ter du récepteur. Ceci expliquerait la différence d'affinité de PROK2 β pour les deux récepteurs. PROK2 β possédant plusieurs acides aminés basiques pourrait se lier à l'excédent d'acides aminés acides présents en N-ter chez PROKR1 et absent chez PROKR2. Ce modèle est également validé par la mutation de la partie N-ter du récepteur qui ne peut plus reconnaître PROK2 β , contrairement à sa forme courte ³²⁴.

Une différence de réponses métaboliques a été observée en fonction du récepteur activé ; PROKR1 ou PROKR2, qui peut s'expliquer par les différences de séquence au niveau des parties intracellulaires entre les deux récepteurs. Les réponses seraient alors dépendantes du type de phosphorylation par les kinases et/ou du type de couplage aux protéines G.

En effet, les sites de phosphorylation nécessaires au recrutement des protéines de signalisation peuvent être différents entre les deux récepteurs induisant des réponses différentes. Certains processus peuvent être partagés par les deux récepteurs, comme ceux liés à leur turnover ou autre régulation, tandis que d'autres sont très certainement spécifiques et diffèrent selon leurs rôles physiologiques.

Ce modèle est également soutenu par les outils de prédiction des sites de phosphorylation avec Thr178/Tyr365 et Thr169/ Gln356 qui semblent être spécifiques de PROKR1 et de PROKR2 humains, respectivement. D'autres expériences sont néanmoins nécessaires pour confirmer le rôle de ces sites dans la voie métabolique de chaque récepteur ³⁵⁷.

2.2.3. Interaction ligand/récepteur

Les prokinéticines sont considérés comme des chimiokines de par leur action sur la migration des leucocytes. Un modèle dénommé : « two-sided model » est proposé pour la fixation des ligands de cette famille sur leurs récepteurs, caractérisant ainsi une fixation en deux étapes.

La première étape est la reconnaissance de la chimiokine induisant la fixation de la partie N-ter du ligand sur la ECL2 du RCPG. La deuxième étape correspond à l'insertion de cette partie N-ter dans la poche hydrophobe du récepteur composé des TMs. La première étape correspondrait à la confirmation de l'identité du ligand et la seconde à l'activation du récepteur induisant des modifications structurelles au niveau des TMs nécessaires au couplage à la pG ³⁵⁸.

L'implication de la ECL2, dans la première étape, a été confirmée par la mutation Q210R (**Figure 66**, bleu) qui a montré une forte diminution de la liaison du peptide ³⁵⁶. De plus, l'affinité des ligands pour les deux récepteurs semble être similaire, ce qui pourrait s'expliquer par l'identité presque parfaite de ce site chez PROKR1 et PROKR2. Ce site diverge juste par un acide aminé dans ECL2 : Val207 chez PROKR1 et Phe198 chez PROKR2. Cette infime différence pourrait expliquer, au moins en partie, les différences minimes dans l'affinité de chaque récepteur. Cette forte conservation du site de liaison est confirmée par la non-spécificité des antagonistes se liant au niveau de cette région ³⁵⁹. De plus, la substitution de Phe198 chez PROKR2 par la valine (comme chez PROKR1) permet une meilleure fixation de PROK2 β sur PROKR2 qui a, normalement, plus d'affinité pour PROKR1, montrant ainsi un rôle de spécificité de cet acide aminé dans la liaison du ligand. ^{322,324} Un autre acide aminé, le Trp 212, a également été montré comme impliqué dans les processus de reconnaissance et d'affinité pour les ligands. La présence d'acide aminé aromatique dans cette ECL2 est une caractéristique des récepteurs aux chimiokines, et son importance a été montrée par des expériences de crosslinking ³⁶⁰.

Au niveau du ligand, le modèle « two-sided » est confirmé avec les mutations au niveau de la partie N-ter induisant une protéine inactive ou moins active.

Des expériences de mutation et de crosslinking ont aussi permis d'identifier l'acide aminé Trp24 comme important dans la liaison PROK1 et PROK2 à leurs récepteurs ^{360,361}.

2.2.4. Couplage et interface avec les pG

Selon le type cellulaire, les récepteurs aux prokinétines sont capables d'interagir avec de multiples pG incluant Gαq/11^{319,362}, Gαi/o³¹⁹ et Gαs³²². Ils sont aussi capables de s'associer avec la β-arrestine2, mais pas la β-arrestine1. L'efficacité du couplage semble comparable pour Gαq/11 et Gαi/o, mais reste inférieure à celle obtenue avec Gαs³⁶³.

Concernant l'interface des pG avec le récepteur, les ICL2 (**Figure 67**) et 3 semblent jouer un rôle prépondérant. Pour ICL2, Gαq semble se lier aux acides aminés basiques, notamment la R164 chez PROKR2 qui lorsqu'il est muté, empêche complètement la signalisation. Cette mutation empêche également l'interaction avec Gαi ou Gα16³⁶⁴.

Néanmoins, chez PROKR1 la mutation seule de son analogue, R173, n'abolit pas le signal. Par contre, une double mutation, R173 et K175 (non présent chez PROKR2, **Figure 67**) empêche la signalisation³⁶⁵.

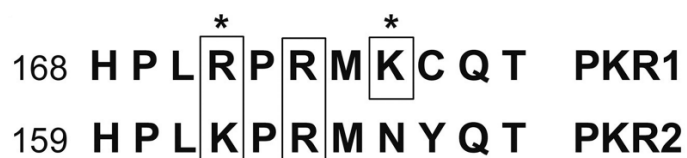


Figure 67: Alignement de séquence de la ICL2 entre PROKR1 et PROKR2³⁶⁵

Concernant l'ICL3, elle peut être divisée en deux parties : proximale et distale. La partie proximale semble essentielle à l'interaction avec la pG, notamment le motif RXR : R264-L265-R266 chez PROKR2. Des mutations ponctuelles de ces acides aminés abolissent la signalisation. Dans la partie distale (acides aminés 270-274), la mutation R270H induit une dissociation de Gαq, mais pas Gαs³⁶⁶. Cette boucle ICL3 est conservée chez PROKR1.

Les affinités des ligands pour leurs récepteurs sont de l'ordre du nanomolaire, mais des différences existent (**Tableau 4**). D'après plusieurs études, on peut dire que l'affinité pour PROKR1 suit cet ordre : PROK2 > PROK1 ≈ PROK2β, pour PROKR2 cet ordre est le suivant : PROK2 > PROK1 > PROK2β. Du point de vue du ligand, l'affinité de PROK2 suit cet ordre PROKR1 > PROKR2, l'affinité de PROK1 suit PROKR2 > PROKR1 et l'affinité de PROK2β suit PROKR1 > PROKR2. La concentration efficace médiane de chaque ligand (EC50) en fonction de différents paramètres expérimentaux est décrite dans le **Tableau 5**.

Ligand	PROKR1 (Ki, nM)	PROKR2 (Ki, nM)	Source
PROK1	250.0	81.0	Masuda et al. 2002
	44.0	34.0	Li et al. 2002
	66.3	31.6	Soga et al. 2002
	27.6	52.2	Chen et al. 2005
PROK2	6.9	7.6	Masuda et al. 2002
	13.0	4.5	Li et al. 2002
	5.14	5.9	Soga et al. 2002
	4.5	6.4	Chen et al. 2005
PROK2β	34.6	>1000	Chen et al. 2005

Tableau 4: Affinité des différents ligands pour les récepteurs PROKR1 et PROKR2. (inspiré de ³⁶⁷)

EC50 (pM)	PROKR1	PROKR2	Type Cellulaire	Voie	Technique	Origine ligand	Source
PROK1	140±29	15±2	CHO	Gαq	Fluo-3 AM	E.Coli	Masuda et al. 2002
	2500±870	25100±1260	CHO	Gαq	Fluo-3 AM	293-EBNA cells	Soga et al. 2002
	2200±700	7000 ± 1800	CHO	Gαq	Aequorin	E.Coli	Li et al. 2002
	1100±400	7700±2100	HEK293	Gαq	Fluo-3 AM	COS-7	Chen et al. 2005
	8340±230	20000±4200	SK-N-MC	Gαs	CRE-β Galactosidase	COS-7	Chen et al. 2005
	16800±3400	60000±6500	HEK293	Gαs	cAMP FlashPlate assay kit	COS-7	Chen et al. 2005
PROK2	2900±530	150±31	CHO	Gαq	Fluo-3 AM	E.Coli	Masuda et al. 2002
	530±180	3670±500	CHO	Gαq	Fluo-3 AM	CHO/dhFr ⁻	Soga et al. 2002
	4300 ± 130	7300 ± 2800	CHO	Gαq	Aequorin	E.Coli	Li et al. 2002
	800±230	3600±1600	HEK293	Gαq	Fluo-3 AM	COS-7	Chen et al. 2005
	1270±400	12100±2800	SK-N-MC	Gαs	CRE-β Galactosidase	COS-7	Chen et al. 2005
	3170±1600	41000±5300	HEK293	Gαs	cAMP FlashPlate assay kit	COS-7	Chen et al. 2005
PROK2β	1500±560	80000±9700	HEK293	Gαq	Fluo-3 AM	COS-7	Chen et al. 2005
	11500±	>1 000 000	SK-N-MC	Gαs	CRE-β Galactosidase	COS-7	Chen et al. 2005
	23400±4400	>1 000 000	HEK293	Gαs	cAMP FlashPlate assay kit	COS-7	Chen et al. 2005

Tableau 5: Concentration efficace médiane (EC50) de PROK1 et PROK2 avec les récepteurs PROKR1 et PROKR2.

3. MODIFICATIONS POST TRADUCTIONNELLES (MPTs) : GLYCOSYLATION

Une modification post-traductionnelle est une modification chimique d'une protéine, réalisée le plus souvent par une enzyme, après sa synthèse ou au cours de sa vie dans la cellule. Généralement cette modification entraîne un changement de la fonction de la protéine au niveau de son action, de sa demi-vie, ou de sa localisation cellulaire.

Les RCPGs y compris les PROKRs subissent aussi des modifications post-traductionnelles parmi lesquelles on trouve la glycosylation. Il s'agit de l'addition d'un groupe glycosyl sur un résidu asparagine (N ; N-glycosylation) et/ou sérine/thréonine (O-glycosylation), produisant ainsi une glycoprotéine. La N-Glycosylation est très importante pour le repliement, le trafic et la signalisation des RCPGs. Pour les PROKRs, elle a été seulement étudiée pour PROKR2³⁶⁸. Deux résidus asparagine apparaissent comme étant le siège de la N-glycosylation : N7 et N27. N27 est essentielle pour l'activation du récepteur et sa signalisation³⁶⁸. La mutation de N27 induit une baisse de la signalisation *via* G α s et G α q/11. La mutation de N7 induit le même résultat pour G α s, mais le signal reste inchangé pour G α q/11. Au niveau du trafic intracellulaire, N27 apparaît comme essentielle pour l'adressage vers la membrane du récepteur contrairement à N7.

4. INTERACTION AVEC DES PROTEINES ACCESSOIRES

PROKR1 et PROKR2 ont été rapportés comme protéines interagissant avec MRAP2 (Melanocortin Receptor Accessory Protein 2), protéine régulatrice de l'homéostasie énergétique, processus dans lequel les prokinétines semblent jouer un rôle important³⁶⁹.

MRAP2 est une protéine membranaire contenant un seul TM interagissant avec les récepteurs mélanocortines. PROKR1 fut le premier RCPGs en dehors de cette famille à interagir avec MRAP2. Puis deux nouveaux récepteurs furent identifiés : PROKR2 et l'Orexine 1 (OX1R).³⁷⁰ La fixation de MRAP2 sur PROKR1 ou PROKR2 induit leur séquestration dans le réticulum endoplasmique (RE) et empêche donc leur activation et leur glycosylation. MRAP2 se lie via sa partie C-ter au niveau de la partie N-ter de PROKR2³⁷¹. La partie N-ter étant présentant de nombreuses différences entre les deux récepteurs, MRAP2 pourrait avoir donc une régulation différentielle entre PROKR1 et PROKR2.

PROKR2 interagit également avec la Snapine. Cette protéine fait partie du complexe SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor). La snapine interagit avec PROKR2 en se fixant sur sa partie C-ter (333-384) en utilisant les motifs YFK (343-345) et HWR (351-353) (2 acides aminés aromatiques puis 1 acide aminé basique). Le motif YFK est aussi présent chez PROKR1, mais ce n'est pas le cas du motif HWR où le résidu arginine (R) est remplacé par une lysine (K) (**Figure 68**). Cette fixation n'affecte pas la signalisation, mais augmente la dégradation induite par la fixation du ligand³⁷².

Les parties C-ter sont également différentes chez les PROKRs pouvant donc être à l'origine de régulations différentielles entre PROKR1 et PROKR2.

PKR1 VKNDTVK**YFK**KIMLL**HWK**ASYNGGKSSADLDLKTIGMPATEEVDCIRLK

PKR2 VKNNTMK**YFK**KMMLL**HWR**PSQRGSKSSADLDLRTNGVPTTEEVDCIRLK

Figure 68: Alignement de séquence de la partie C-ter de PROKR1 et PROK2

Les acides aminés basiques : R et K sont respectivement en surbrillance jaune et verte. Les motifs essentiels à la fixation de la Snapine sont en rouge.

5. ENDOCYTOSE

Dans les premiers travaux sur les ligands PROK1/PROK2, des processus de désensibilisation avaient été observés après des stimulations prolongées par l'agoniste^{312,327}. L'endocytose, un processus bien décrit dans la famille des RCPGs, est alors proposée. Les PROKRs n'échappent pas à la règle puisqu'ils subissent une endocytose rapide, uniquement après fixation du ligand. Trois études ont décrit l'endocytose par immunofluorescence. Dans la première étude, l'internalisation du récepteur PROKR2, en présence de 100nM de PROK2, débute à partir de 5min et devient maximale entre 30 et 60min³⁶⁴. Une autre étude a montré l'internalisation complète de PROKR1 et PROKR2, avec 5nM de PROK2, en 5min et 1min respectivement³⁷³. La dernière étude a mis en évidence le mécanisme de ce processus. Ainsi, l'endocytose des PROKRs semble dépendre de GRK2 et des vésicules à clathrine, mais indépendante de la voie β -arrestine. La phosphorylation permettant le recrutement de la kinase reste encore à déterminer³⁶⁵. Le processus de recyclage n'a néanmoins jamais été décrit.

6. OLIGOMERISATION

Il s'agit d'un processus de transformation d'un monomère, ou d'un mélange de monomères, en un oligomère. Cette transformation a été bien décrite pour plusieurs membres de la famille des RCPGs²⁸².

Pour PROKR2, il a été montré qu'il est capable d'exister *in vivo* sous forme dimérique, ce qui n'est pas du tout exceptionnel dans la famille des RCPGs (récepteurs muscariniques m2 et m3, récepteurs β 2-adrénergiques, récepteur κ -opioïde, récepteur β 1-adrénergique, récepteur μ -opioïde, récepteur des chimiokines CXCR4). Une forme dimérique de PROKR2 a été observée dans les neutrophiles où il est fortement exprimé, et dans *Saccharomyces cerevisiae* après surexpression. En général, les RCPG peuvent former des dimères par plusieurs mécanismes, capables de se combiner. Ces mécanismes sont listés ci-dessous :

1) Des interactions coil-coil médiées par le domaine C-ter

2) Des liaisons disulfure covalentes inter-sous-unité

3) Des interactions entre les domaines transmembranaires où deux situations peuvent être distinguées :

a) Dimères de contact : Les monomères sont repliés indépendamment et des interactions se produisent entre ces deux unités (liaisons disulfure/interactions hydrophobes).

b) Les dimères " à domaines échangés " : il y a ici un échange de domaines entre les deux unités qui sont ensuite reliées par une boucle charnière.

C'est ce dernier mécanisme qui semble être à l'origine de la dimérisation de PROKR2.

Par ailleurs, des résultats préliminaires semblent aussi montrer l'existence d'hétérodimères entre PROKR1 et PROKR2 ³⁵⁹.

Néanmoins, une étape de reconnaissance des deux monomères est nécessaire pour la formation du dimère. La plupart du temps, deux interfaces existent pour la dimérisation des RCPGs :

- **Type I : Implique TM1/H8 (Figure 69A)**
- **Type II : Implique principalement TM5 et des parties de TM4 et TM6 (Figure 69B).**

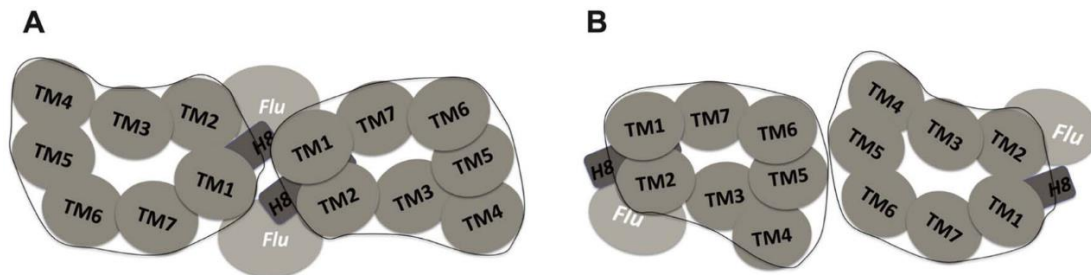


Figure 69: Différentes interfaces de reconnaissance des deux protomères.

A : Type I impliquant TM1 et H8 (ou ICL8)

B : Type II impliquant principalement TM5 et un peu de TM4 et TM6

TM : Domaine transmembranaire, H : Hélice ; ICL : Boucle intracellulaire

La combinaison de mutations au niveau de certains domaines et l'analyse par BRET a permis de mettre en évidence l'implication de l'interface de type II dans la dimérisation de PROKR2 avec un rôle important de TM5 et TM4 ³⁷⁴.

De plus, ces domaines transmembranaires impliqués dans l'interface de type II semblent être assez mobiles lors de l'activation d'un RCPG, contrairement aux domaines TM1 et TM2. Ceci pourrait remettre en cause l'absence du rôle du ligand et donc l'activation du récepteur dans le processus de dimérisation ³⁷⁴. Cette interface est similaire aux récepteurs β 1-adrénergique, μ -opioïde et CXCR4 ^{279,281,286}.

7. EXPRESSION, PHYSIOLOGIE ET PATHOLOGIE DES PROKINETICINES

7.1. Expression des prokinéticines

Les PROKs et leurs récepteurs PROKRs sont retrouvés dans tous les tissus chez l'homme et les mammifères en général. On peut retrouver dans certains tissus les deux récepteurs exprimés. Néanmoins, PROKR1 serait majoritairement exprimé dans les organes reproducteurs, les glandes endocrines, le système digestif, les poumons, le cœur et les cellules sanguines. Alors que PROKR2 est exprimée dans le SNC (système nerveux central). Un résumé de cette expression est représenté dans le **Tableau 6**.

Tissus	PROK1	PROK2	PROKR1	PROKR2
Cerveau	Tractus solitaire, cervelet	Bulbe olfactif, aire préoptique médiane, noyau arqué, noyau accumbens, îles de Calleja, amygdale médiane, mésencéphale, cortex cérébral, cervelet	Ventricules de l'embryon : corps olfactifs, noyau arqué, corps mamillaires, hypothalamus, mésencéphale, ganglion de Gasser	Ventricules de l'embryon, corps olfactifs, cortex piriforme et entorhinal, aire préoptique latérale, hippocampe, globus pallidus, amygdale, noyau paraventriculaire, noyau arqué, éminence médiane, noyau mamillaire, organe subfornical, ganglion de Gasser
Moelle épinière		Astrocytes, terminaisons centrales des nocicepteurs	Astrocytes, terminaisons centrales des nocicepteurs	Neurones de projection et motoneurones
Système nerveux périphérique		DRG : quelques neurones TRPV1+, cellules de Schwann	DRG : principalement neurones TRPV1+, cellules de Schwann	DRG : principalement neurones TRPV1+, cellules de Schwann
Hypophyse				Neurohypophyse
Ovaire	Cellule de la thèque et de la granulosa		Cellules endothéliales des capillaires	Cellules endothéliales des capillaires
Utérus	Épithélium glandulaire, cellules stromales et musculaires lisses	Épithélium glandulaire, cellules stromales et musculaires lisses	Épithélium glandulaire, cellules stromales	Épithélium glandulaire, cellules stromales et musculaires lisses

			et musculaires lisses	
Placenta	Syncytiotrophoblaste Cellules de hoffbauer	Not found	Cellules endothéliales et cellules trophoblastiques	Cellules endothéliales et cellules trophoblastiques
Testicules	Cellules de Leydig	Spermatocytes primaires	Cellules endothéliales de l'interstitium	Cellules endothéliales de l'interstitium
Prostate	Cancer de la prostate			
Cœur	Tissu cardiovasculaire, cellules cardiaques		Tissu cardiovasculaire, cellules cardiaques	
Reins	Tubules épithéliaux			Cellules endothéliales
Glande surrénale	Cellules glomérulaires et fasciculées	Cellules glomérulaires, fasciculées et endothéliales	Cellules glomérulaires, fasciculées et endothéliales	Cellules glomérulaires, fasciculées et endothéliales
Foie		Cellules de Kupffer		
Pancréas	Îlots pancréatiques, cellules stellaires		Cellules endothéliales vasculaires	Cellules endothéliales vasculaires
Estomac	Fundus		Estomac	
Intestin	Muqueuse et mésenchyme de l'intestin embryonnaire	Plexus myentérique	Cellules de la crête neuronale entérique ; cellule épithéliale, neurones sous-muqueux et myentériques de l'iléon, noyau myentérique du côlon.	Plexus myentérique
Adipocytes			Préadipocytes	
Moelle osseuse and cellules sanguines	Cellules B et T	Cellules souches hématopoïétiques, monocytes, neutrophiles, cellules dendritiques. Granulocytes et macrophages inflammatoires.	Cellules souches hématopoïétiques, granulocytes de souris	Cellules souches hématopoïétiques, granulocytes humains et de souris

Tableau 6: Profil d'expression des prokinétines dans les différents organes ³⁵³

7.2. Physiologie et Pathologies des prokinétines

De par leur caractère ubiquitaire, les prokinétines ont des rôles physiologiques divers selon les organes. Leurs rôles sont dépendants de leurs propriétés pro-angiogénique, pro-inflammatoire et de chimiotactisme. Une dérégulation génique ou environnementale de ces protéines est également retrouvée dans de nombreuses pathologies. Leur implication dans ces processus physiologiques ou pathologiques (non cancéreux) est résumée dans le **Tableau 7**.

Organes/Tissus	Physiologie	Pathologie	Réfs
Cœur	PROK2/PROKR1 : Développement embryonnaire du cœur / régénération chez l'adulte PROKR1 : angiogenèse PROKR2 : fenestration	<u>Défaillance cardiaque</u> : augmentation de PROK2 et PROKR1/2 <u>Âge</u> : ↓ PROK1 et ↑ PROKR2	375-384
Cerveau/Tissu adipeux	PROK2/PROKR1 : peptide anorexigène = diminution de la prise alimentaire et diminution développement du tissu adipeux	<u>Obésité</u> : mutation de PROK2 dans le syndrome de Kallmann <u>Diabète</u> : ↓ PROK2 (circulant) ↑ Diabète	369,385-392
Rein	PROK2/PROKR1 : développement embryonnaire du rein		376,393,394
Cerveau/tissus nerveux	PROK2/PROKR2 : - Neurogénèse : migration et survie des neurones produisant la GnRH dans l'hypothalamus au cours du développement - Rythme Circadien (RC) : PROK2 sous le contrôle des facteurs de transcription du RC → suit un rythme (haut le jour et bas la nuit) et agit sur PROKR2 → modifications des processus physiologiques PROK2/PROKR1 : Contrôle le statut inflammatoire et la migration des astrocytes PROK1/PROK2 /PROKR1 Différenciation cellules pluripotentes de la crête neurale entérique essentielle à la formation de neurones/cellules gliales	<u>L'hypogonadisme hypogonadotrope (IHH) congénital /Syndrome de Kallmann (KS)</u> : mutation de PROK2 ou PROKR2 → absence de neurones GnRH → Hypogonadisme hypogonadotrope → infertilité et anosmie (perte odorat) <u>Ischémie / traumatisme crânien</u> : ↑ PROK2 <u>Parkinson</u> : ↑ PROK2 dans les phases précoces de la maladie dans les neurones dopaminergiques (substance noire) <u>Alzheimer</u> : ↑ PROK2 circulant et dans le tissu cérébral Chez le rat, stimulation avec peptides Aβ (amyloid-β) → ↑ PROKR1 / PROKR2 / PROK2	332,354,395-414

		<u>Douleur</u> : PROK2/PROKR1 modulateur de la nociception <u>Sclérose</u> : Implication de PROK2	
Système de reproduction masculin	Rôle mal connu : hypothèses : rôle dans le développement fœtal et l'angiogenèse chez l'adulte	<u>Varicocèle</u> : ↑ PROK2 chez les rats atteints par cette pathologie mais rôle inconnu <u>Orchite</u> : ↑ PROK2 et PROKR1 → ↑ environnement inflammatoire délétère pour la pathologie <u>Syndrome de Klinefelter</u> : modification des niveaux de PROK2 au cours du temps <u>IHH et KS</u> : mauvais développement des gonades → infertilité (voir section Cerveau)	338,415-421
Système de reproduction féminin	PROK1 : - Impliqué dans le cycle ovarien / cycle de l'endomètre - Pendant la grossesse : ↑ taux circulant 1 ^{er} trimestre. PROK1/PROKR2 : Dans le placenta contrôle la migration, l'invasion des cellules trophoblastiques extravillaires et des cellules endothéliales fœtales, essentiel à l'établissement de la circulation fœto-maternelle	<u>Le syndrome des ovaires polykystiques</u> : ↑ PROK1 ↔ hyperplasie tissu ovarien <u>Le syndrome des ovaires hyperstimulés</u> : ↓ PROK1 ↑ sévérité de la maladie <u>Pré éclampsie</u> : ↑ PROK1 circulant (3 ^e trimestre) qui semble être une conséquence de la pathologie <u>Retard de croissance intra-utérin</u> : ↑ PROK1 circulant chez les patientes <u>Fausse couches</u> : mutations de PROK1 / PROKR1 / PROKR2 associés à cette pathologie <u>Endométriose et grossesse ectopique</u> : peu de données	341,343,422-430
Articulation		<u>Arthrose</u> : ↑ PROK2 et PROKR2 (macrophages) ↔ sévérité de la pathologie	431
Peau		<u>Psoriasis</u> : ↑ PROK2 → hyperprolifération des kératinocytes	432
Système digestif	PROK1 et PROK2 : contraction de l'iléon PROK1 : Augmentation de sécrétion des fluides intestinaux PROK2 : modulation des échanges d'ions dans l'intestin	<u>Colites ulcéreuses</u> : implication de PROK2	433-436

Tableau 7 : Processus physiologiques et pathologiques (non cancéreux) impliquant les prokinétines

Notre équipe s'est intéressée ces dernières années à l'implication des prokinétines dans deux pathologies : la mucoviscidose et les cancers en lien avec l'inflammation et l'angiogénèse. Ces différents aspects vont donc être plus approfondis.

7.2.1. La Mucoviscidose

La mucoviscidose (CF : Cystic Fibrosis) est une maladie pulmonaire caractérisée par un défaut fonctionnel de la protéine CFTR participant au transport des ions Cl⁻, essentiel au maintien des propriétés du mucus pulmonaire. L'expression des prokinétines est retrouvée dans l'épithélium du poumon et plus précisément dans les cellules ciliées. Les récepteurs sont retrouvés dans la membrane plasmique apicale.

L'expression de PROK1, PROK 2 et PROKR2 sont fortement augmentées dans le cas de la pathologie de la mucoviscidose chez l'homme. La sécrétion de PROK1 se fait depuis la partie apicale des cellules épithéliales et se retrouve augmentée in vitro dans les cellules CF. Ceci est soutenu par un effet similaire sur les cellules WT où CFTR est invalidée. L'expression des ligands induit une stimulation de l'activité de CFTR par le biais de l'AMPC. Il a également été mis en évidence une augmentation du statut pro-angiogénique dans le tissu pulmonaire CF qui pourrait être en relation avec les prokinétines aggravant ainsi le statut inflammatoire du tissu ⁴³⁷.

7.2.2. Les prokinétines et le cancer

Les prokinétines étant impliquées dans les processus d'angiogénèse, d'inflammation et de prolifération, ils ont été associés au développement de nombreux cancers.

7.2.2.1. Cancer colorectal

Le cancer colorectal est un cancer très agressif, car fortement métastatique dû à une angiogénèse très active. Il est la 2^e et 3^e cause de décès chez les hommes et les femmes respectivement. Les ligands des prokinétines semblent directement impliqués dans ce cancer. L'injection de cellules cancéreuses surexprimant PROK1 ou 2 induit une importante angiogénèse, une croissance de la tumeur, de l'inflammation (présence de cellules immunitaires) et des métastases ^{438,439}. L'injection d'un siRNA ciblant PROK2 abolirait ces effets ⁴⁴⁰.

Chez les patients avec chirurgie, 50% des tumeurs ont montré une forte expression de PROK2. Une corrélation a également été faite entre expression de PROK2 et les métastases lymphatiques engendrant une baisse significative de la survie ⁴³⁹. De nombreuses rechutes existent dans ce type de cancer dû à une résistance au traitement, dont celle ciblant le VEGF. La création d'un modèle de souris présentant ces caractéristiques de résistance a été développée et l'inhibition de PROK2 augmenterait l'efficacité du traitement par une baisse de progression tumorale et des cellules immunitaires infiltrant la tumeur ⁴⁴¹.

La PROK1 a également été comme fortement exprimée dans ces tumeurs et que ses taux étaient corrélés à un mauvais pronostic vital ⁴⁴². Ces effets semblent être médiés par PROKR1 ⁴⁴³. À l'instar de PROK2, le double traitement visant à la fois VEGF et PROK1 confère de meilleurs résultats sur la régression tumorale ⁴⁴³. De plus, l'expression de PROK1 dans la tumeur et dans le plasma était un indicateur d'un mauvais pronostic vital ⁴⁴⁴⁴⁴⁵. Ces résultats supposent un potentiel théranostique de ces ligands dans le cancer colorectal.

7.2.2.2. Carcinome hépatocellulaire

Le Carcinome hépatocellulaire est le plus commun des cancers du foie. Ce cancer est hautement angiogénique et des thérapies ciblant VEGF sont très pratiquées et augmenterait la survie des patients (bevacizumab : double l'espérance de vie) ⁴⁴⁶. Étonnement l'expression de PROK2 se trouve diminuée dans ce cancer du fait d'une baisse de population des macrophages exprimant, en condition physiologique, le ligand ⁴⁴⁷.

7.2.2.3. Adénocarcinome pancréatique

L'adénocarcinome pancréatique est un des cancers le plus agressif et létal (survie nette à 5 ans : 11%) caractérisé par une faible vascularisation, mais hautement inflammé (macrophages, cellules myéloïdes) ⁴⁴⁸. L'évidence de l'implication des prokinétines a été faite dans des modèles de souris de ce cancer où PROK2 a été trouvé comme étant augmenté dans la tumeur et dans la circulation périphérique. L'utilisation d'antagoniste (PKRA7, spécifique de PROKR2) a confirmé ces résultats. Le traitement PKRA7 a confirmé ces résultats. Le traitement PKRA7 a induit une réduction de la taille tumorale. La potentialisation du traitement standard pour ce cancer a également été observée avec un anticorps anti-PROK2, réduisant la taille des tumeurs et les métastases ^{449,450}.

7.2.2.4. Cancer du poumon

Le cancer du poumon est la première cause de décès au niveau mondial, dû à un cancer. Ce cancer est hautement vascularisé et donc métastatique, mais le traitement anti-VEGF ne semble pas donner des résultats satisfaisants ⁴⁵¹. PROK2 a été identifiée à la fois dans des modèles de souris et *in situ* sur des coupes de tumeurs de patients. Il serait produit par les granulocytes et les neutrophiles³³⁰. La suppression de la compétence des granulocytes (= absence de production de PROK2) dans le modèle murin diminuerait la croissance tumorale ⁴⁵².

7.2.2.5. Cancer de la prostate

Le cancer de la prostate est hautement vascularisé et métastatique. Les thérapies ciblant les facteurs pro-angiogéniques sont donc privilégiées ⁴⁵³. PROK1, PROK2, PROKR1 et PROKR2 sont surexprimés dans ce cancer et sont corrélés à l'agressivité du cancer ⁴⁵⁴. D'autres études sont nécessaires pour caractériser le rôle de chaque membre de cette famille dans le cancer de la prostate.

7.2.2.6. Cancer des testicules

PROK1 est exprimé dans les cellules de Leydig dans les testicules sains. Il a été retrouvé un rôle du ligand dans les cancers dérivants de ces cellules uniquement ⁴¹⁶.

7.2.2.7. Cancer de la peau

Le carcinome à cellule de Merkel est un cancer rare et agressif causé majoritairement par une infection virale. L'expression de PROK2 est augmentée dans ce type de cancer associé à une infiltration de macrophages ⁴⁵⁵. Contrairement à PROK1 qui est associé à un mauvais pronostic de ce cancer, PROK2 serait associée avec un bon pronostic vital. L'hypothèse serait en lien avec un rôle de PROK2 dans l'organisation des défenses immunitaires contre le virus.

7.2.2.8. Cancer du sein

Des études précliniques ont montré l'implication de PROK2 dans ce type de cancer. Il augmenterait la migration des cellules possédant des caractéristiques métastatiques

uniquement⁴⁵⁶. Dans un modèle de souris de cancer du sein, PROK2 s'est trouvé fortement exprimé dans les poumons induisant les métastases dans cet organe. La production du ligand se ferait par des neutrophiles présents dans les poumons, mais également par les métastases elles-mêmes⁴⁵⁷.

7.2.2.9. Cancer du col de l'utérus

Le cancer du col de l'utérus se développe également suite à une infection par un virus. Des taux significativement élevés de PROK2 ont été détectés dans des lignées cellulaires. Dans ces cellules la PROK2 induirait la migration et l'invasion. Chez les patientes, la forte expression de PROK2 a été confirmée et est corrélée avec un mauvais pronostic⁴⁵⁸.

7.2.2.10. Cancer du cerveau

Les gliomes sont les tumeurs cérébrales les plus communes et sont hautement vascularisés. Ils tirent leur origine des astrocytes et des oligodendrocytes. L'implication de PROK2 a été mise en évidence dans un modèle de souris, où l'utilisation de l'antagoniste (PKRA7 anti-PROKR2) a induit la diminution de la taille tumorale et la densité de vascularisation, tout en augmentant la nécrose⁴⁴⁹. Cet antagoniste potentialiserait l'effet de la chimiothérapie.

7.2.2.11. Cancer de l'ovaire

PROK1 semble impliqué dans ce cancer et plus précisément dans le type séreux de haut grade (HGSOC)⁴⁵⁹. Le récepteur PROKR1 a également été identifié dans le micro-environnement de la tumeur. Ces récepteurs seraient sécrétés par exosomes provenant des cellules tumorales et agiraient sur l'environnement tumoral, en particulier les cellules endothéliales⁴⁶⁰. À ce jour, les études impliquant les ligands PROK1 et PROK2 restent très controversées en lien avec ce cancer.

7.2.2.12. Cancer du placenta : le choriocarcinome

PROK1 possède un rôle prépondérant dans la grossesse de par sa forte expression dans le placenta. On retrouve sa production par les cellules du syncytiotrophoblaste contrôlant la prolifération, la migration et l'invasion des cellules trophoblastiques extra-villeuses pour l'établissement de circulation fœto-maternelle (**Figure 70**)⁴²⁵.

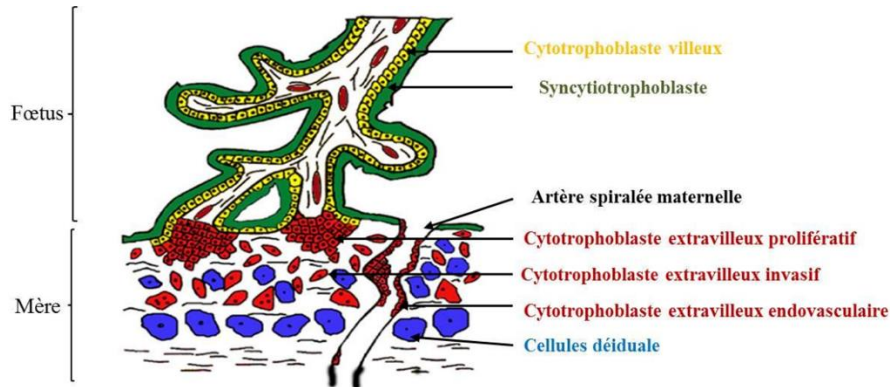


Figure 70: Établissement de la circulation fœto-maternelle par le cytotrophoblaste extra-villeux

Une régulation fine de ce processus est indispensable pour la poursuite normale de la grossesse. En effet, l'invasion trophoblastique est l'élément clé de la placentation et une dérégulation dans ce processus se traduirait par le développement de pathologies grave qui menace la mère et son fœtus. À l'inverse, une invasion excessive et incontrôlée des cellules trophoblastiques serait associée au développement d'un cancer rare, mais encore mortel dans les pays en voie de développement: le choriocarcinome (CC) (**Figure 71**).

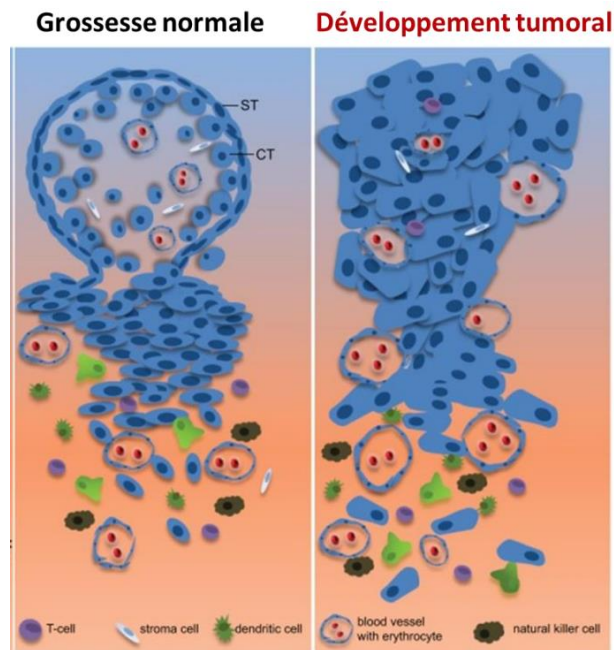


Figure 71: Processus de migration et de prolifération des cellules trophoblastiques extra-villositaires en condition physiologique et tumorale.

La CC est fortement métastatique en raison de la propriété intrinsèque invasive des cellules trophoblastiques. En effet, de nombreux sites métastatiques ont été identifiés comme les poumons et le vagin, mais aussi le foie, la rate, les reins, les intestins et le cerveau. Parmi les femmes atteintes de CC métastatique, 10 à 30 % semblent être résistantes et meurent en raison de l'absence de tout traitement. Notre équipe a démontré durant les 10 dernières années la forte implication de PROK1 dans cette pathologie. Tout d'abord, les taux circulants et placentaires de PROK1 sont augmentés chez les femmes atteintes de CC. De plus, PROK1 induit la prolifération, la migration et l'invasion des cellules JEG3 (lignée humaine de cellules de CC et des cellules trophoblastiques normales du premier trimestre). Lors de cette induction, des voies métaboliques associées au développement tumoral sont activées. *In vivo*, l'administration d'antagonistes de PROKR1 et PROKR2 dans un modèle murin de CC, réduit la progression tumorale tant au niveau de la taille de la tumeur qu'au nombre de métastases⁴⁶¹⁻⁴⁶⁵.

Cette dernière partie a bien reflété l'importance des prokinétines dans de nombreux processus physiologique et pathologique. C'est la raison pour laquelle l'équipe où j'ai réalisé mon stage de thèse, s'est intéressé à cette famille de protéines. L'implication dans les pathologies inflammatoires et cancéreuses fait de cette famille une cible potentiel thérapeutique importante qui est faiblement exploité. La compréhension de cette famille est également nécessaire.

OBJECTIFS DE LA THESE

Le facteur, PROK1 et ses récepteurs PROKR1 et PROKR2 sont impliqués dans de nombreuses pathologies humaines, notamment les pathologies en lien avec l'inflammation et l'angiogénèse. Parmi ces pathologies, on trouve la mucoviscidose, l'inflammation gastro-intestinale, le syndrome des ovaires polykystiques (PCOS), le syndrome des ovaires hyperstimulés (SHO), la pré-éclampsie, le retard de croissance utérin, les fausses couches et de nombreux cancers comme le cancer colorectal, de la prostate, des testicules, de la peau, de l'ovaire et du placenta. Ce dernier, est dénommé choriocarcinome gestationnel (CG) et a fait l'objet de plusieurs études au sein de mon équipe. De façon intéressante, l'équipe a récemment démontré que les niveaux d'expression de PROK1 et de PROKR2 étaient augmentés dans le CG humain et que le traitement de souris modèles de CG par l'antagoniste de PROKR2 diminuait le développement et la progression de la tumeur, suggérant que l'antagonisation du système PROK1/PROKR2 ou PROK1/PROKR1 pourrait constituer une piste thérapeutique. Néanmoins, les antagonistes existants présentent plusieurs points négatifs : une toxicité élevée chez la souris, une faible spécificité pour l'un ou l'autre récepteur, le blocage de l'action des autres ligands de la famille des prokinétines possédant des rôles physiologiques essentiels (cas des différentes formes de PROK2).

Ainsi mon projet de thèse s'est décliné en deux axes (schéma 1) :

- **Le premier a porté sur le développement d'une nouvelle stratégie visant le ciblage direct des ligands de la famille des prokinétines, en particulier, la protéine PROK1.**
- **Le second axe a concerné la caractérisation des récepteurs des prokinétines, PROKR1 et PROKR2 sur un plan moléculaire et cellulaire afin d'identifier leurs spécificités intrinsèques en termes de synthèse, adressage à la membrane et dégradation. Une meilleure connaissance de ces caractéristiques permettrait d'envisager dans le futur le développement de molécules bloquantes plus spécifiques et moins toxiques.**

✓ L'axe 1 :

À travers l'obtention de la structure tridimensionnelle (STD) *in vitro* et *in silico* de PROK1, mon projet visait à identifier par criblage de bibliothèques chimiques nationales et internationales les molécules capables de bloquer la liaison de PROK1 à ses deux récepteurs, principalement PROKR2. Les molécules les plus pertinentes ont été testées en utilisant un test fonctionnel.

Les objectifs l'axe 1 se déclinent en deux points :

1. Clonage, expression, production et purification de PROK1 *in vitro*

L'ensemble de ces étapes a été réalisé en collaboration avec les Dr. Patrice Catty, Julien Perard (LCBM, CEA-Grenoble) et le Dr. David Cobessi (IBS, CEA-Grenoble)

- Clonage : La séquence humaine de *prok1* a été clonée dans différents plasmides selon les hôtes utilisés. Les constructions comportaient toutes une étiquette His pour faciliter l'étape de purification.
- Production : Plusieurs systèmes d'expression et de production ont été testés : eucaryotes ou procaryotes.
- Purification : Pour la partie purification, de nombreuses techniques ont été utilisées dans le but d'obtenir la plus grande quantité de protéines pures afin de résoudre la structure tridimensionnelle (STD) de PROK1 *in vitro*.

2. Résolution de la STD de la protéine PROK1 *in silico* et docking moléculaire

La deuxième étape consistait en l'obtention d'une STD *in silico* de PROK1 et de son récepteur PROKR2 et de déterminer leur interface d'interaction pour diriger au mieux l'étape du docking moléculaire. L'étape du docking moléculaire, effectuée en collaboration avec Dr. Franck Borel (IBS, Grenoble), était une étape déterminante dans l'identification des molécules chimiques pouvant inhiber l'interaction PROK1-PROKR2, en ciblant le ligand.

✓ L'axe 2 :

Les objectifs de l'axe 2 se déclinent aussi en deux points :

1. Développement de modèles cellulaires exprimant les PROKRs et mise en place d'un test fonctionnel

Cette étape nous a permis de générer deux lignées stables (BHK-21) exprimant PROKR1 ou PROKR2. Ces modèles ont servi au développement d'un test fonctionnel en lien avec la question-1 de ma thèse, ainsi qu'aux expériences visant à caractériser le comportement moléculaire et cellulaire des récepteurs PROKR1 et PROKR2.

2. Caractérisation moléculaire et cellulaire de PROKR1 et PROKR2

Dans cette partie nous avons comparé les niveaux d'expression, de la stabilité, de l'adressage à la membrane et de la fonction de PROKR1 et PROKR2. Ce travail s'est poursuivi par la caractérisation des rôles des domaines N- et C-ter de chaque récepteur.

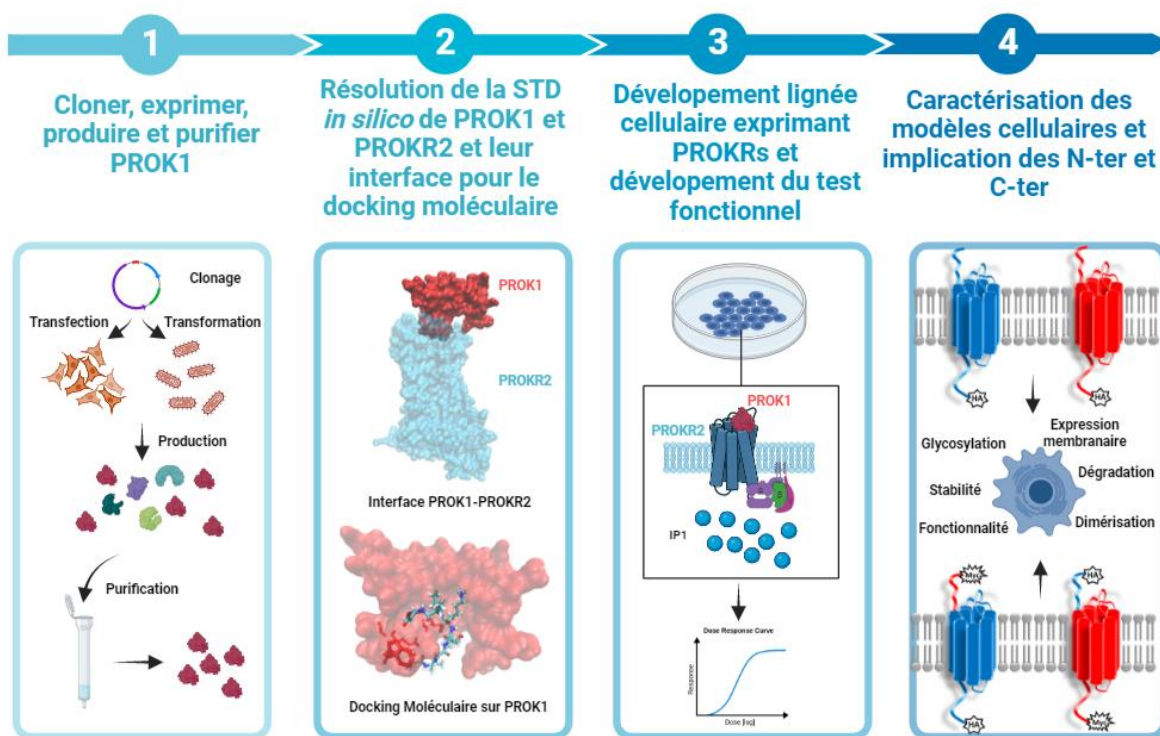


Schéma 1 : Les Différents axes abordés au cours de ma thèse

L'ensemble des résultats obtenus sera présenté en trois parties :

- **Partie I : Clonage, Expression, Production, Purification de la protéine PROK1. Utilisation de sa structure tridimensionnelle déterminée *in silico* pour cribler, par docking moléculaire, des banques de molécules chimiques. Identifications de trois molécules capables d'inhiber l'interaction entre PROK1 et son récepteur PROKR2.**
- **Partie II : Elle est présentée sous forme de manuscrit en cours de soumission pour publication. Elle porte sur le défaut de stabilité de PROKR2 par rapport à PROKR1, et les conséquences sur son expression, sa localisation et sa dégradation.**
- **Partie III : Illustre les premiers résultats obtenus sur les rôles des parties N- et C-ter dans le comportement cellulaire et moléculaire des PROKRs.**

ARTICLE 1

INTRODUCTION

En France, après les maladies cardiovasculaires, le cancer constitue la deuxième cause de mortalité chez la femme. Les cancers du sein, du poumon et colorectal occupent les trois premières places (mortalité : sein ~12 000, poumon~10 000 et colorectal~8 000). Les cancers gynécologiques touchent également de nombreuses femmes (col de l'utérus, ovaires, endomètre) mais aussi pendant de la grossesse. En effet, les cancers trophoblastiques touchent un organe transitoire essentiel au bon déroulement de la grossesse, le placenta. Le cancer affectant le placenta est dénommé, choriocarcinome gestationnel (CG)¹. Ce cancer affecte, non seulement la grossesse, mais également la survie de la femme. L'incidence du CG est estimée entre 2 et 7 cas sur 100 000 grossesses en Amérique du Nord et en Europe. Cette incidence est supérieure en Afrique et en Asie, où les estimations sont de 50 à 202 sur 100 000 grossesses, respectivement²⁻⁴. Le trophoblaste ayant pour propriété intrinsèque une forte invasion, celle-ci lui confère un pouvoir métastatique plus important comparé à n'importe quelle autre cellule tumorale. Plusieurs traitements sont aujourd'hui disponibles pour les femmes ayant développé un CG, mais leur efficacité reste très faible et les effets indésirables sont élevés⁵. En plus, plusieurs patientes développent des résistances aux traitements proposés. Malheureusement, à ce jour encore 10 à 30% des patientes touchées par le CG métastatique deviennent résistantes et décèdent des suites des complications associées à cette pathologie. Ainsi, il est nécessaire de développer de nouvelles approches thérapeutiques pour remédier à ces résistances.

Un des mécanismes qui régissent la métastase est le processus de l'angiogenèse qui fonctionne en paire avec le processus inflammatoire. Peu de protéines ont été rapportées à ce jour comme facteurs qui contrôlent, ces deux processus à la fois.

Mon équipe travaille depuis plus d'une décennie sur une famille de protéines impliquées dans le contrôle de ces deux processus. Il s'agit de la famille des prokinétines. Cette famille est composée de deux ligands; PROK1/EG-VEGF et PROK2/BV8 et leurs deux récepteurs PROKR1 et PROKR2, membre de la famille des RCPGs. Les deux ligands sont de petites protéines compactes de moins de cent acides aminés comportant 5 ponts disulfures⁶. Ces ligands possèdent des propriétés pro-angiogéniques et pro-inflammatoires, et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques dont le cancer^{7,8}. La PROK1 a été beaucoup décrite pour ses propriétés pro-invasives et de prolifératives des cellules endothéliales, au même titre que la protéine VEGF. PROK1 est impliquée dans de nombreux cancers comme le cancer colorectal⁹, de la prostate¹⁰, des testicules¹¹, de la peau¹², de l'ovaire¹³ et du placenta¹.

PROK1 a beaucoup été étudiée en lien avec la grossesse. Elle est directement impliquée dans le développement normal du placenta, en particulier dans l'invasion trophoblastique lors de l'établissement de la circulation fœto-maternelle^{14,15}. Des dérégulations dans ses niveaux d'expression sont associées au développement de pathologies graves de la grossesse. De façon intéressante, mon équipe a récemment démontré que les niveaux circulants de PROK1 étaient plus élevés chez les patientes atteintes de CG et que l'antagonisation de ses récepteurs par des molécules chimiques atténuait le développement tumoral et diminuait les métastases associées¹.

Ces résultats suggéraient que les prokinétines seraient des cibles thérapeutiques intéressantes. Néanmoins, l'utilisation de ces antagonistes présente plusieurs points négatifs : une toxicité élevée chez la souris (données non publiées), une faible spécificité entre les deux récepteurs, et le blocage de l'action des autres ligands de la famille des prokinétines qui possèdent des rôles physiologiques essentiels (différentes formes de PROK2).

Ainsi, dans cette partie de mon travail de thèse, nous avons tenté de cibler directement le ligand PROK1 par des molécules chimiques afin de bloquer sa liaison à son récepteur. L'identification de molécules spécifiques et inhibitrices a été réalisée par une étape de docking moléculaire nécessitant la structure tridimensionnelle (STD) de la protéine PROK1.

Grâce à la résolution *in silico* de la STD de PROK1, nous avons réussi à cribler plusieurs banques de molécules chimiques par le docking moléculaire. Plus de 360 molécules ont été identifiées. À ce jour, nous avons caractérisé l'effet de 15 molécules dont trois se sont avérées prometteuses. Ces molécules sont capables d'inhiber l'activation du récepteur PROKR1 et PROKR2 par le ligand PROK1. Ce criblage a été rendu possible par le développement d'un modèle cellulaire sur-exprimant les récepteurs humains PROKR1 et PROKR2 et d'un test fonctionnel IP1.

MATERIELS ET METHODES

Clonage de l'ADNc de PROK1 humain

La séquence codante de l'ADNc PROK1 humain (GenBank Accession No. NM-032414) a été synthétisée par Eurofins genomics (France) et insérée dans le plasmide pEXA2 par digestion NotI (5') XhoI (3'). La séquence a été marquée à l'extrémité C-terminale avec l'étiquette 6xHis juste après la séquence de reconnaissance de la protéase TEV (Tobacco Etch Virus) (ENLYFQS). Cette cassette 5'-NotI-XhoI-3' a été utilisée par la suite pour cloner l'ADNc du PROK1 dans différents plasmides (sauf pour le plasmide pPICZαB), en fonction du type de la cellule hôte. La présence de PROK1 dans les vecteurs a été contrôlée par PCR en utilisant les amorces suivantes. Sens: 5'AGG TGC CAC GCG AGT CTC AA3', anti-sens: 5'GCA CAT CCG CAG CCC TCG AA3'. Tous les plasmides ont été amplifiés par transformation de bactéries compétentes JM109.

Toutes les extractions et purifications de plasmides ont été réalisées à l'aide du kit Qiagen Plasmid Plus Midi. Le nettoyage de l'ADN après PCR ou digestion avec des endonucléases a été effectué avec GeneClean Turbo MP Biomedicals. Toutes les enzymes de restriction provenaient de Fermentas ou de Thermo Scientific (France). La quantification du plasmide a été réalisée à l'aide du nano-drop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, France).

Expression dans les procaryotes

Les plasmides pet22b et petM40 ont été utilisés pour la production dans les bactéries.

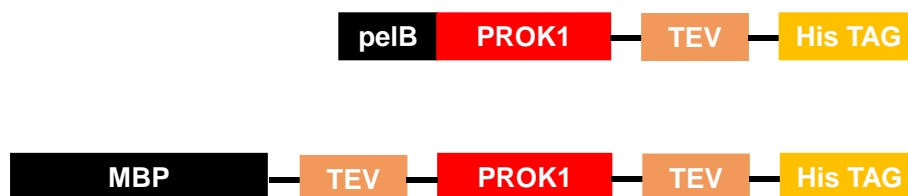


Figure 1 : Constructions plasmidiques pour la production dans les bactéries

Expression dans les cellules eucaryotes

- Spodoptera frugiperda 9 (Sf9)

Pour la production dans les cellules d'insecte Sf9 (Spodoptera Frugiperda 9 de drosophile), PROK1 a été cloné dans le plasmide pFastBac (Thermofisher, France). La pFastBac contenant PROK1 a été transfectée dans des bactéries DH10Bac (Gibco, France) contenant le génome du baculovirus (bacmide). L'intégration de PROK1 dans le bacmide a été contrôlée par un test bleu/blanc et par PCR en utilisant les amorces pUC/M13 (Eurofins Genomics, France) ; sens :

5'CCC AGT CAC GAC GTT GTA AAA CG3', anti-sens : 5'AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG3'.

- **Lignées cellulaires BHK-21 et CHO**

Pour la production dans des cellules de mammifères (BHK-21 et CHO *dhfr*^{-/-}), PROK1 a été clonée dans le plasmide pNut (plasmide non commercial possédant le gène *dhfr*). Toutes les constructions plasmidiques ont été vérifiées par digestion enzymatique et séquençage nucléotidique (Eurofins genomics).

- **Les levures (*Pichia Pastoris*)**

Le plasmide pPICZαB (ThermoFisher) a été utilisé pour la production chez *Pichia Pastoris*. PROK1 a été insérée par digestion enzymatique PstI (5') et XhoI (3') en amont de la séquence signal α. La sélection des clones transformés a été effectuée par la présence du Zeocine dans le milieu de culture.

Le plasmide recombinant a été linéarisé par l'enzyme SacI avant l'étape de transformation des *Pichia Pastoris* (souche GS115 (His⁻)). La présence de PROK1 a été contrôlée par PCR avec les amorces AOX1 : Sens: 5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3', anti-sens : 5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'

- **Cellules et conditions de culture**

Les différentes souches de bactéries (C41 DE3, BL21 DE3, Rosetta DE3) ont été cultivées dans le milieu LB (Roth) en présence de 50µg/ml de kanamycine. Pour les Cellules *Spodoptera frugiperda* 9 (Sf9), elles ont été cultivées en utilisant le milieu SFM Sf-900 II (Gibco, France) complété par de la gentamicine (10 µg/ml) et par 10% de sérum bovin fœtal décomplémenté (30 min à 56°C). La culture cellulaire a été réalisée à 27°C en utilisant un incubateur rotatif (90 rpm). Les cellules BHK-21 et CHO ont été cultivées dans le milieu DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Life-technologies (France)) et dans du DMEM Glutamax I, respectivement. Les milieux ont été additionnés de 5% (pour BHK) ou 7% (pour CHO) de sérum bovin fœtal (FBS) et 100µM de méthotrexate pour maintenir la pression de sélection pour le plasmide pNUT. La culture cellulaire a été réalisée à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO₂/air. Finalement, pour la culture de *Pichia Pastoris* (levure), elle a été réalisée dans BMGH (Buffered Minimal Glycerol supplemented with Histidin, ThermoFisher) à 30°C et à 250 rpm.

Production de PROK1

- **Les cellules Sf9**

Pour les Sf9, les cellules sont cultivées dans un milieu sans FBS dans une boîte de Pétri et transfectées avec 60µg de bacmide avec 60 µL de Fugene6 de Promega. Ce milieu a été

récupéré et a constitué notre stock viral. L'infection pour la production de PROK1 a été réalisée en utilisant une densité cellulaire de 10^6 cellules/mL avec 400 μ L de stock viral.

- ***Les procaryotes***

Les bactéries ont été ensemencées à une densité optique (DO) de 0,1 dans un milieu LB complété par de la kanamycine. À une DO de 0,8, les cellules ont été traitées avec 100 mM d'IPTG pour initier la production de PROK1.

- ***Les cellules BHK-21 et CHO***

Concernant les cellules BHK-21 et CHO, la production de PROK1 est constitutive en présence de méthotrexate.

- ***La Levure Pichia Pastoris***

Après centrifugation, **Pichia Pastoris** a été resuspendue dans un milieu d'induction: BMMH (Buffered Minimal Methanol supplemented with Histidin) contenant du méthanol initiant ainsi la production de PROK1. Le méthanol est utilisé pour induire l'activation du promoteur AOX1.

Préparation et purification des échantillons

Après centrifugation, les bactéries ont été remises en suspension dans un tampon phosphate (50 mM) contenant du NaCl (300 mM), de l'imidazole (20 mM), 10% de glycérol, 1 mM de PMSF et 5 mM de β -Mercaptoéthanol à pH 8. Les cellules ont été lysées par sonication en utilisant Vibra Cell de Bioblock Scientific ou par le réactif B-Per (Thermo Scientific). Une ultracentrifugation à 100 000 x g pendant 30 min a été réalisée afin de séparer la fraction soluble de l'insoluble. L'extraction périplasmique a été effectuée par la méthode TES (Tris/EDTA/Sucrose)¹⁶. Pour les cellules Sf9, BHK, CHO et Pichia Pastoris, le milieu de culture a été récupéré et utilisé pour la purification.

Différentes méthodes de purification ont été utilisées. La première étant une colonne d'affinité en nickel de Qiagen (Ni-NTA) permettant la liaison du Tag-His. L'imidazole 250 mM a été utilisé pour éluer PROK1 de la colonne. La résine amylose a également été utilisée pour lier la protéine MBP. L'élution a été effectuée par 20 mM de Maltose.

Électrophorèse et western blot

La concentration des protéines a été mesurée à l'aide du kit de dosage des protéines Micro BCA (Thermo scientific). Tous les extraits de protéines ont été dénaturés dans du SDS à 2,5 % (p/v) de concentration finale de tampon de Laemmli (LSB), soumis à une électrophorèse sur gel acrylamide (15 % ou 4-20 %), transférés sur des membranes de nitrocellulose (Bio-Rad) et sondés avec les anticorps primaires correspondants. La réaction antigène-anticorps a été révélée à l'aide d'un anticorps IgG couplé à la HRP (Covalab, France) et développée avec ECL (Bio-Rad) en utilisant le Fusion FX7 (Vilbert Lourmat).

Test ELISA

La quantification de PROK1 dans le milieu de culture de cellules de mammifères (BHK/CHO) ou levures a été réalisée à l'aide du test ELISA Sandwich de Peprotech (Human PROK1 Standard ABTS ELISA Development Kit).

Modèle structural in silico de PROK1 et PROKR2

Les structures tridimensionnelles de PROK1 et de son récepteur PROKR2 ont été obtenues *in silico*. Le modèle de PROK1 a été construit par homologie à la protéine MIT-1 (62% d'identité, pdb 1HMT) par le biais du logiciel Swiss-Model. Le modèle de PROKR2 a été obtenu par Raptor X Model par une méthode de deeplearning puisque ne possédant pas de protéine avec une forte homologie. Les deux modèles ont été comparés aux modèles générés par la plateforme AlphaFold (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>). L'interaction de PROK1 et PROKR2 a été effectuée via InterEvDock2 et confirmée par ClusPro. VMD (Visual Molecular Dynamics) a été utilisé pour la visualisation des structures.

Test fonctionnel IP-1 (1D-myo-inositol 1-phosphate)

Pour réaliser ce test, nous avons tout d'abord utilisé les cellules BHK-21 pour générer deux lignées stables exprimant les récepteurs humains, PROKR1 ou PROKR2. 24h avant la réalisation du test, 40 000 cellules ont étéensemencées dans des plaques 96 puits. Par la suite, les cellules sont traitées par le ligand PROK1 aux concentrations indiquées. PROK1 a été préparée dans le tampon de stimulation fourni par le fabricant et ajouté aux cellules pendant 1h à 37°C. Les cellules ont été ensuite lysées et l'IP1 accumulé a été mesuré à l'aide du kit IP-One (Cisbio, France). Les mesures ont été effectuées avec un lecteur de plaques TECAN Spark. Les antagonistes des récepteurs (PKRA505 et PC1) ont été ajoutés aux cellules 15min avant l'ajout de l'agoniste. PC1 a été obtenu du laboratoire du Dr G. Balboni (Université de Cagliari, Italie) et PKRA505 de Dr. QY Zhou (Université d'Irvine en Californie, États-Unis). Les molécules chimiques criblées proviennent de la chimiothèque nationale, une pré-incubation de 30 min à 37°C a été réalisée avec le ligand PROK1.

Docking moléculaire

Les expériences de docking ont été réalisées avec la version 2019-3 de la suite Schrödinger (Schrödinger, LLC, New York, NY).

Le modèle PROK1 construit avec Swiss-Model (<https://swissmodel.expasy.org/>) a été utilisé pour les études. La structure de la protéine a été traitée avec l'outil Protein Preparation Wizard. Pour générer la grille de docking, nous avons défini une zone carrée (45 Å × 45 Å × 45 Å) couvrant la totalité de la protéine. LigPrep a été utilisé pour minimiser l'énergie des ligands et pour générer des structures 3D, des tautomères et des états d'ionisation des ligands. Le criblage

virtuel a été réalisé à l'aide de Glide¹⁷. Il a d'abord été réalisé en mode haut débit (HTVS), puis les poses sélectionnées ont été criblées en mode précision standard (SP) et enfin les meilleurs composés ont été analysés en mode précision supplémentaire (XP).

Aucune contrainte (telle qu'une liaison hydrogène ou la position d'un atome) n'a été appliquée pour guider la liaison. Le score de docking Glide a été utilisé pour classer les poses de docking.

Les molécules chimiques

Les molécules chimiques provenant de la chimiothèque nationale (ChemBioFrance) ont été criblées. Les molécules sont solubilisées dans 100% de DMSO. Lors du test fonctionnel IP1, la concentration finale du DMSO dans le milieu d'incubation des cellules était de 1.6%. La même concentration a été ainsi utilisée pour réaliser nos contrôles en absence des molécules chimiques.

Statistiques

Les différences entre les valeurs moyennes ont été comparées par des Student tests bilatéraux non appariés en utilisant SigmaStat (Jandel Scientific Software, SanRafael, CA, USA). Les données sont exprimées en tant que moyenne \pm SEM. Le seuil de significativité a été fixé à une valeur p bilatérale de 0,05.

RÉSULTATS

Production in vitro

La séquence PROK1 a été clonée dans différents plasmides en fonction du type de cellule hôte.

- **Chez la bactérie**

Les plasmides pET22b et PetM40 ont été choisis pour la production chez la bactérie. Des résultats préliminaires ont montré une toxicité et une agrégation importante de la production cytoplasmique de PROK1 qui pourrait venir de la présence de 5 ponts disulfures. Deux stratégies ont donc été explorées pour pallier à ce problème. Le plasmide pET22b comporte la séquence pelb pour l'adressage périplasmique de la protéine. Ce compartiment cellulaire est oxydant, permettant la formation de ponts disulfures contrairement au cytosol qui est réducteur. Le plasmide pETM40 permet la production de PROK1 liée à la Maltose Binding Protein (MBP) de 40 kDa permettant d'améliorer sa solubilisation.

- **Chez Sf9**

PROK1 a été insérée dans le plasmide pFastBac. Le plasmide recombinant pFastBac-PROK1 a été transformé dans des cellules E.coli DH10Bac, où la transposition a eu lieu du plasmide au bacmide en utilisant deux sites de transposon (Tn7R, Tn7L) en combinaison avec d'autres transposons (miniattTn7). Ce bacmide est le génome modifié du virus qui a permis par la suite d'infecter les cellules Sf9 et l'utilisation de la machinerie cellulaire de Sf9 pour produire PROK1. La présence de PROK1 dans le bacmide a été examinée par le test Blue/White et par PCR. Le test bleu/blanc est basé sur la fragmentation du gène lacZ du bacmide contenant les transposons.

Sans aucune insertion, le gène lacZ présent sur le bacmide va produire la protéine lacZ (β -Galactosidase) qui va transformer le Bluo-Gal en un produit bleu. En cas de recombinaison, le gène lacZ est scindé, la cellule n'est plus capable de transformer le Bluo-Gal ; et les colonies restent blanches. Les colonies blanches positives ont été sélectionnées et une PCR a été réalisée.

- **Chez Pichia Pastoris**

La construction moléculaire a été faite par l'intégration de l'ADNc de PROK1 dans le plasmide pPICZ α B permettant d'avoir l'étiquette His au niveau de la partie C-terminale. Entre la séquence de PROK1 et le tag-His, il y'a la séquence codante pour la protéase TEV. La séquence de PROK1 se trouve en amont du peptide signal α permettant la sécrétion de la protéine recombinante. PROK1 est sous le contrôle du promoteur AOX1 qui est inductible par le méthanol. La transfection a été réalisée par l'intégration du plasmide recombinant dans le génome de Pichia Pastoris GS115 ce qui permet de créer un clone stable.

Production et Purification de PROK1

- Chez la bactérie

Afin de suivre la production de la protéine recombinante, des extraits totaux de protéines ont été préparés toutes les heures. Cette production a été contrôlée par un gel coloré en bleu de Coomassie (Fig. 2A) et par Western Blot (Fig. 2B) pour la construction pET22b. La production de PROK1 a pu être observée dans les deux souches testées: C41 (DE3) et Rosetta (DE3). Nous avons choisi la souche C41 (DE3) pour sa capacité à croître rapidement et pour sa forte production. La production a également pu être confirmée par Western blot en utilisant la construction pETM40 après 4h d'induction (Fig. 2C).

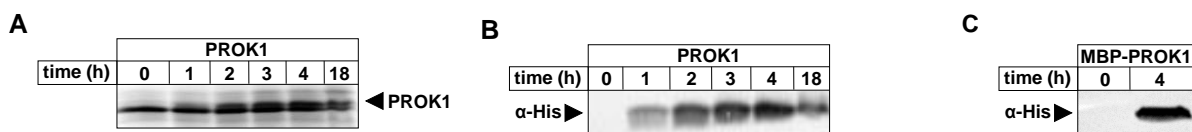


Figure 2 : Production de PROK1 chez E.Coli

Les bactéries *E.Coli* (C41 DE3) ont été transformées par le plasmide pET-22b ou pETM40 contenant le gène codant pour la protéine PROK1 étiquetée au niveau de sa partie C-terminale par le tag His. A une DO de 1, l'induction de l'expression de PROK1 a été induite par l'addition de 1mM d'IPTG aux temps indiqués. La Fig. A correspond au gel coloré par le bleu de Coomassie, tandis que les Figs B et C correspondent aux résultats de Western-Blot révélés avec un anticorps anti-His. Chaque culot bactérien a été extrait par du BPer et les dépôts ont été normalisés par la DO.

La production de PROK1 par le plasmide pet22b qui contient un signal peptidique pelB qui permet l'adressage de la protéine vers le compartiment périplasmique, n'a pas permis de la localiser dans ce compartiment cellulaire (Fig. 3)

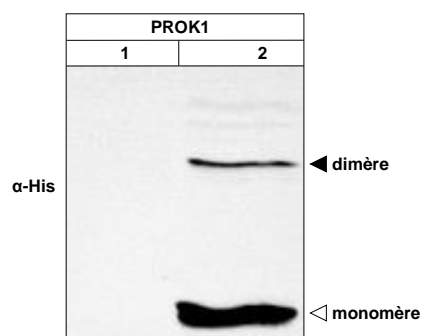


Figure 3 : Extraction périplasmique de PROK1

1 : Extraction du périplasmique des bactéries *E.Coli* (C41 DE3) transformées par le plasmide pET-22b recombinant par la méthode TES (Tris/EDTA/Sucrose).
2 : Extrait total obtenu après sonication.

De plus, PROK1 semble être exclusivement présente dans la fraction insoluble après sonication, confirmant le résultat obtenu avec l'extraction périplasmique. PROK1 semble être produite sous forme de corps d'inclusion dans le cytoplasme. Pour pouvoir la purifier, nous avons réalisé une solubilisation avec 8M d'urée et un repliement sur colonne (Fig. 4).

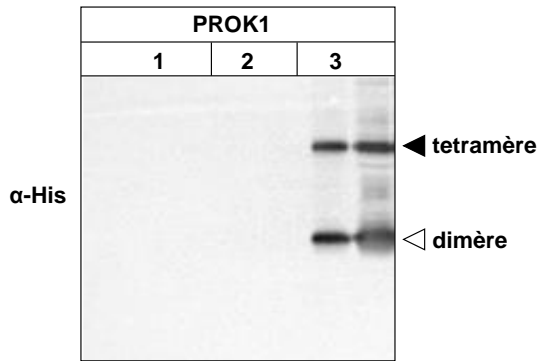


Figure 4 : Purification sur Ni-NTA en condition dénaturante (8M urée) et repliement sur colonne.
 1 : Passage à travers la colonne
 2 : Repliement sur colonne : Lavages 8M Urée à 0M Urée
 3 : Éluion par imidazole

Cependant, même après le repliement sur colonne, on retrouve des formes oligomériques sur un gel dénaturant (SDS-PAGE), ce qui nous laisse penser que la protéine s'agrège en raison d'un mauvais repliement. De plus, la rétention du PROK1 dans le cytoplasme empêche le clivage du peptide signal et donc la présence de la séquence pelB (22 acides aminés) est conservée dans le peptide purifié.

Quant à la purification après production par pETM40, qui permet de produire PROK1 fusionnée avec MBP (Maltose Binding Protein) (40kDa), elle nous a permis, après purification sur résine amylose, d'obtenir de grandes quantités de protéines recombinantes, visibles sur gel SDS-PAGE, après coloration par le bleu de Coomassie (Fig. 5). L'identification de PROK1 a également été confirmée par Western Blot.

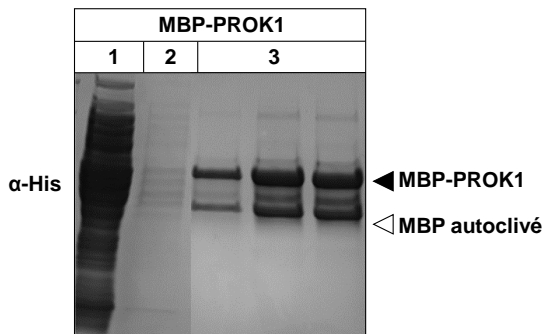


Figure 5: Purification sur résine amylose
 1 : Extraction totale
 2 : Passage à travers la colonne
 3 : Éluion par 20mM de maltose

Néanmoins, après clivage de la MBP par la protéase TEV (Tobacco Etch Virus), la contamination par différentes autres protéines comme la MBP-PROK1, la MBP et la TEV-His a constitué un handicap pour purifier PROK1, même après passage sur différentes résines (Ni-NTA, amylose) (Fig. 6).

De plus, ce clivage produit un agrégat soluble (MALLS) rendant impossible sa séparation par chromatographie d'exclusion ; (*Données non illustrées*). Des résultats similaires ont été obtenus par purification sur colonne Ni-NTA.

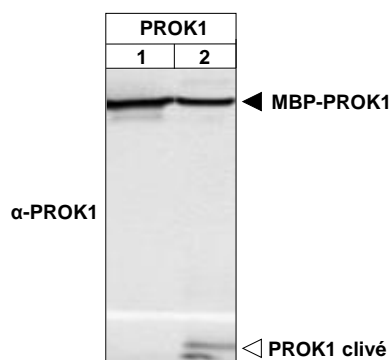


Figure 6: Élué à la TEV sur résine amylose.

Après un premier passage sur résine amylose, l'extrait protéique a été élué par 20mM de Maltose. Un deuxième passage a ensuite été effectué sur la colonne, précédant ou non d'une incubation avec la protéase TEV pendant 1h sous agitation à 4°C.

1 : Incubation en absence de TEV

2 : Incubation en présence de TEV

- Chez les cellules Sf9

Les cellules Sf9 sont des eucaryotes qui présentent deux avantages pour la production d'une protéine biologiquement active et en grande quantité. Le premier est que ces cellules peuvent se développer en suspension, augmentant ainsi la densité cellulaire pour un volume donné. De plus, étant eucaryotes, ces cellules disposent de tout le système sécrétoire pour favoriser la formation de ponts disulfures et obtenir une protéine glycosylée et sécrétée. Après production du stock viral, les cellules Sf9 ont été infectées et des échantillons ont été récoltés à différents temps après infection. En plus du surnageant, nous avons également récupéré les cellules qui ont été lysées par le tampon RIPA, suivi d'une centrifugation pour séparer les protéines solubles et insolubles. Les protéines insolubles ont été placées dans un tampon dénaturant (8M urée) suivi d'une centrifugation pour séparer les protéines solubles et insolubles dans les 8M d'urée. Malheureusement, dans ce modèle, PROK1 n'est pas retrouvée dans le surnageant ni dans la partie soluble des cellules. Nous l'avons trouvé sous forme insoluble même après traitement avec 8M d'urée, ce qui rend inaccessible la protéine pour une étape de purification (Fig. 7).

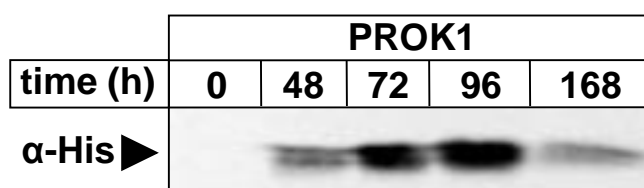


Figure 7: Production de PROK1 chez les Sf9: Fraction insoluble dans 8M d'Urée.

La production de PROK1 a été réalisée par infection des cellules Sf9. Des échantillons furent récoltés à différents temps après infection.

- Chez les cellules BHK-21 et CHO

Le second modèle est les cellules de mammifères BHK-21/CHO déjà transfectées par le plasmide contenant l'ADNc de PROK1 marqué par le tag His. La production de PROK1-His a été quantifiée dans le milieu de culture par le test ELISA. Pour les cellules BHK-21, la

production a atteint **1ng/ml/mg** de protéine, alors que pour les cellules CHO la production reste très faible **~ 0.1 ng/ml/mg** de protéine (Fig. 8).

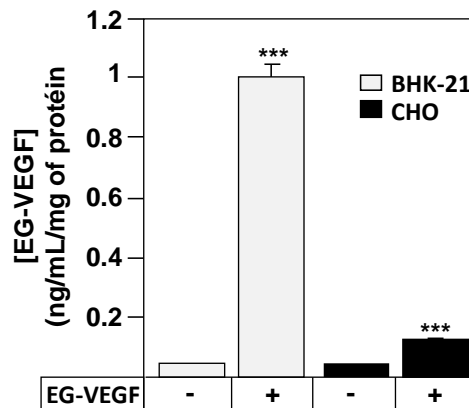


Figure 8: Quantification par test ELISA de la production de PROK1 par les cellules BHK-21 et CHO.
Les quantités de PROK1 dans chaque type cellulaire ont été normalisées par rapport à la quantité totale de protéine mesurée par la méthode BCA.

Étant donné que les cellules BHK-21 et CHO sont cultivées en présence de 5% et 7% FBS, nous avons supposé que la quantité de FBS pouvait influencer la production de PROK1 dans les CHO et les BHK-21. Pour vérifier notre hypothèse, nous avons cultivé pendant 24h les cellules CHO et BHK-21 en présence de quantité décroissante de FBS dans le milieu de culture (Fig. 9).

La production de PROK1 dans les différents milieux de culture a été évaluée par le test ELISA. Nos résultats montrent que la production de PROK1 dans les cellules CHO n'a pas été affectée par le pourcentage de FBS. Cependant, la production dans les cellules BHK-21 a été augmentée significativement avec la diminution de la quantité de FBS disponible dans le milieu (Fig. 9).

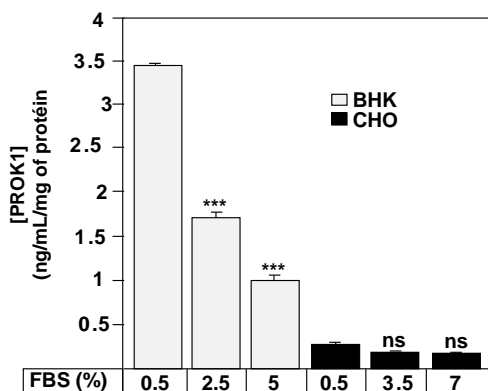


Figure 9: Effet du pourcentage de FBS sur la sécrétion de PROK1 à partir des cellules BHK-21 et CHO.

Après optimisation du pourcentage de FBS (0,5%) et du temps de culture (48h), nous avons réussi à produire 41 ng/mL dans le milieu de culture des cellules BHK-21. Au niveau de la

purification, aucune protéine n'a pu être récoltée en condition native. Seule la purification en condition dénaturante (8M urée) a fonctionné, permettant d'obtenir PROK1 sous forme dimérique et tétramérique (Fig. 10).

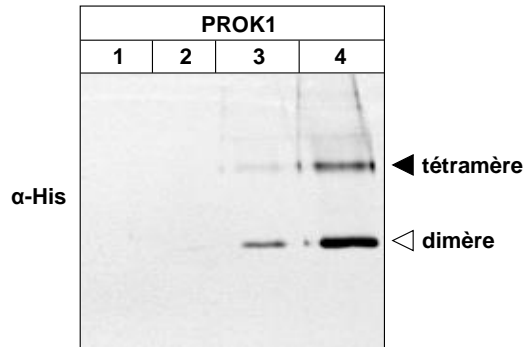


Figure 10: Purification de PROK1 sur colonne Ni-NTA à partir du milieu de culture des cellules BHK-21.

1 : Milieu avant purification
 2 : Milieu passé à travers la colonne
 3 : Éluion avec 50mM d'imidazole
 4 : Éluion avec 250mM d'imidazole

- Chez Pichia Pastoris

Enfin, nous avons développé un nouveau modèle utilisant la levure, Pichia Pastoris. Ce modèle possède les mêmes avantages que les cellules Sf9. Elles poussent en suspension et ce sont des cellules eucaryotes qui produisent des protéines sécrétées. Différents clones recombinants ont été isolés en utilisant la zéocine. La production est induite en rajoutant du méthanol dans le milieu de culture. Après la première production utilisant 12 clones, le clone 5 a été identifié comme le plus productif (Fig. 11A). Ce clone a été sélectionné pour les étapes suivantes. Deux stratégies de production ont été testées, toutes deux partaient d'une densité optique faible (Fig. 11C) ou élevée (Fig. 11B), et utilisant différentes concentrations de méthanol.

La condition avec une faible DO en présence de 3% de méthanol a été la meilleure condition identifiée (Fig. 11C)

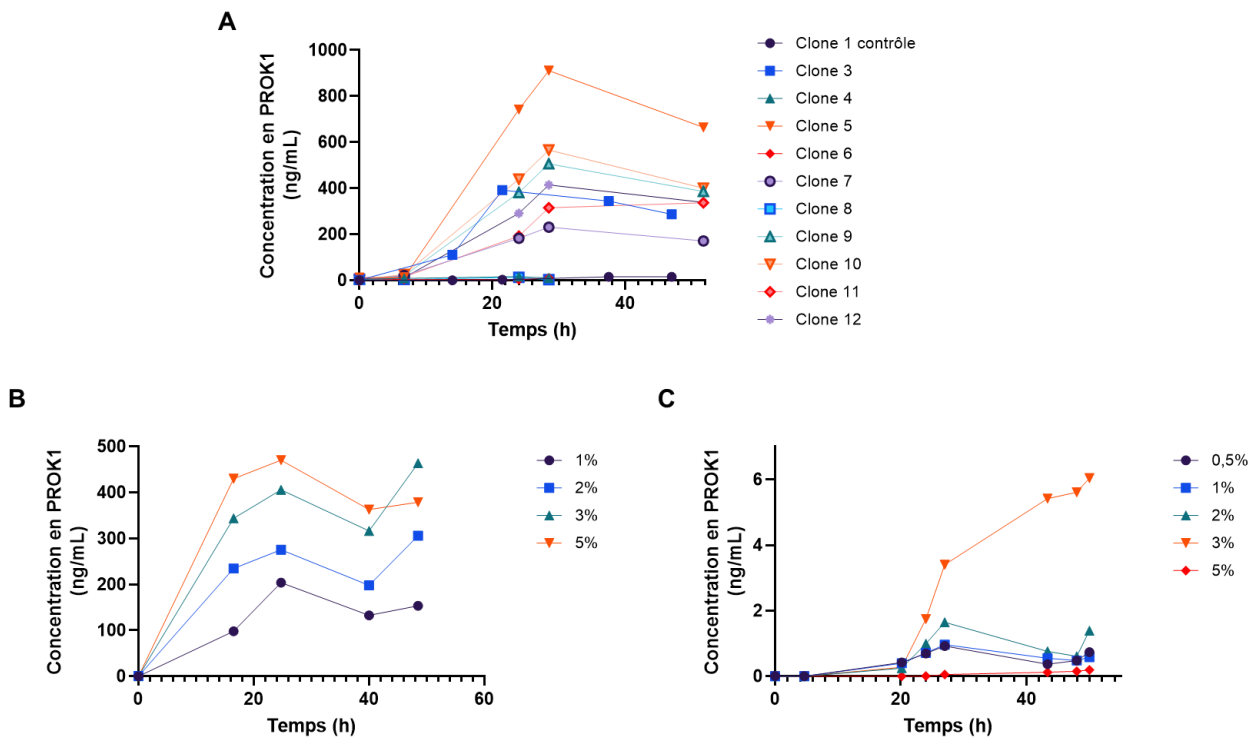


Figure 11: Production de PROK1 dans Pichia Pastoris et quantification par test ELISA.

La production a été induite dans les différents temps par l'ajout de la concentration de méthanol indiquée sur les Fig.s. (A) Production avec différents clones de Pichia Pastoris intégrant pPICZαB-PROK1 (Clones 3-12) par rapport au plasmide vide pPICZαB (Clone 1) en utilisant 0,5% de méthanol ajouté aux temps 0 et 24h, iOD ≈ 1. (B) Production de PROK1 avec le clone 5 induite par différentes concentrations de méthanol ajoutées aux temps 0, 24 et 48h, iOD ≈ 1. (C) Production de PROK1 avec le clone 5 induite par différentes concentrations de méthanol ajoutées aux temps 0, 24 et 48h, iOD ≈ 40.

Pour la purification chez Pichia Pastoris, la résine Ni-NTA a été utilisée sur le surnageant de culture des levures. Pour rappel le milieu de culture des levures est à pH 6, en sachant que le pKa de l'histidine est de 6, le pH optimal pour cette résine se situe entre 7 et 8. Différentes techniques ont été utilisées pour rectifier le pH de la solution: avec une solution de soude, avec plusieurs tampons concentrés sous forme liquide ou solide. Malheureusement, la rectification du pH entraîne une floculation du milieu qui entraîne une précipitation d'une grande partie de PROK1 (plus de 50%). D'autres techniques de purification ont également été testées sans succès comme la précipitation à l'ammonium sulfate ou des chromatographies à échange d'ions (sulfonyl, carboxyméthyl).

Structure in silico de PROK1 et PROKR2

Devant la difficulté d'obtenir une concentration suffisante de PROK1 pour les expériences de cristallographie, j'ai entrepris en parallèle des études *in silico* pour obtenir la structure tridimensionnelle (STD) de PROK1 par homologie avec la protéine MIT1, dont la STD a été résolue par RMN¹⁸.

En utilisant le logiciel Swiss-Model, nous avons réussi à obtenir un modèle de structure de la protéine PROK1 (Fig. 12B). La structure montre la présence de deux groupes de 3 feuillets β antiparallèles et 5 ponts disulfures caractéristiques de cette famille (Fig. 12B).

La STD du PROK1 montre aussi la présence de trois poches qui peuvent potentiellement être ciblées par Docking moléculaire pour cribler plusieurs bibliothèques de molécules chimiques. Cependant, il a été dans un premier temps nécessaire d'identifier la zone d'interaction entre PROK1 et PROKR2. En absence de STD du récepteur, nous avons construit un modèle de PROKR2 grâce au logiciel Raptor-X en utilisant la méthode basée sur le deep learning (Fig. 12A). Cette méthode est adaptée aux protéines ne possédant pas une forte homologie avec une autre protéine dont la structure a été résolue, c'est le cas de PROKR2, dont la plus forte identité (30%), a été associée au récepteur à l'orexine. Le domaine d'interaction PROK1-PROKR2 a été modélisé par le logiciel InterEvDock2 et confirmé par le logiciel ClusPro. Une contrainte a été placée sur une partie de la boucle extracellulaire 2 (Acides aminés 208 à 212) puisque cette partie du récepteur a été montrée comme participant à l'interaction ligand-récepteur par des expériences de cross-linking et mutations^{19,20}.

Plus de 150 modèles ont été produits et ont révélé 5 résidus clés de PROK1 pour son interaction avec son récepteur PROKR2. Les acides aminés Lysine (K) 55, Histidine (H) 56, Arginine (R) 26, Glycine (G) 27 et Tryptophane (W) 24 de PROK1 sont apparus comme des résidus essentiels pour l'interaction du ligand avec son récepteur PROKR2 (Fig. 12C).

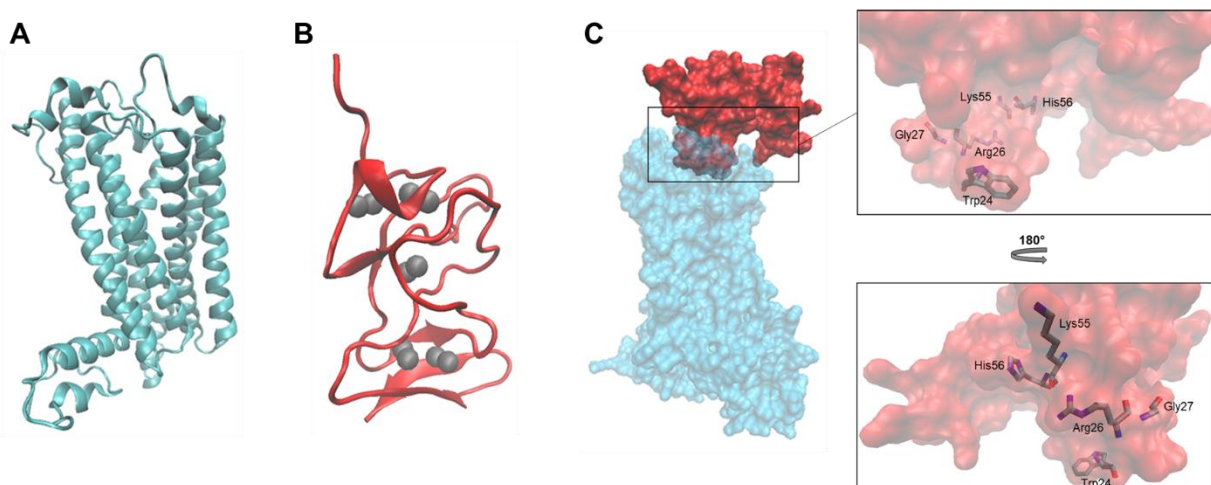


Figure 12: Modèles de structures *in silico* de PROK1 et PROKR2.

(A) Modèle de PROKR2 obtenu par RaptorX. (B) Modèle de PROK1 par homologie avec MIT-1 réalisé par le logiciel Swiss-Model. Les sphères grises représentent les 10 cystéines. (C) Modèle montrant l'interaction de PROK1 (rouge) avec PROKR2 (bleu) mettant en évidence les 5 résidus clés : W.24, R.26, G.27, K.55 et H.56 obtenus par InterEvDock2.

Docking Moléculaire

Le modèle *in silico* de PROK1 (Fig. 12B) a été utilisé pour l'étape de docking moléculaire en collaboration avec le Dr Franck Borel (IBS, Grenoble). Plus de 300 000 molécules chimiques, provenant de différentes bibliothèques, ont été testées à l'aide du logiciel Schrödinger et 360 molécules ont été identifiées comme ayant une bonne affinité de liaison avec PROK1 (score de docking < -8,5) (Fig. 13A). Trois poches ont été identifiées comme des sites de liaison potentiels pour des molécules chimiques (Fig. 13B). Ces molécules seront testées par le test fonctionnel IP1 pour déterminer leurs capacités à antagoniser les effets médiés par PROK1.

A

Chimiothèques	Chimiothèque Nationale	Chembridge	Infarmatik F1204	Inserm U1038	LC00-CC	Prestwick	Edelris (fragments)
Composés	250560	39461	2301	1504	13710	1857	192
Docking Score (DS)	Meilleur DS = -14,43 203 cp < -8,5	Meilleur DS = -8,4 23 cp < -6,0	Meilleur DS = -6,4 1 cp < -6,0	Meilleur DS = -5,33 0 cp < -6,0	Meilleur DS = -12,26 82 cp < -8,5	Meilleur DS = -10,17 10 cp < -8,5	Meilleur DS = -7,59 11 cp < -5,0

B

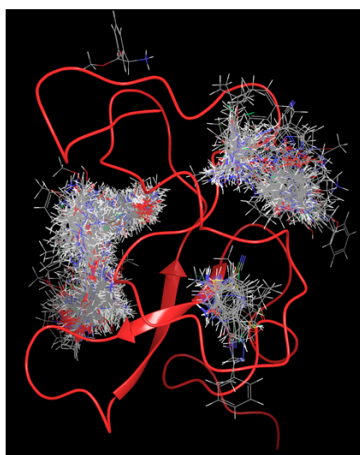


Figure 13 : Identification par docking moléculaire des molécules chimiques ayant une affinité pour PROK1. (A) Tableau récapitulatif de l'étape de docking spécifiant les bibliothèques chimiques, le nombre de composés testés par bibliothèque et le nombre de composés ayant un bon score de docking. (B) Modèle *in silico* de PROK1 (rouge) lié à différentes molécules chimiques provenant de la banque Edelris (fragments)

Test fonctionnel

Le test fonctionnel a été essentiel pour mesurer l'effet inhibiteur des molécules chimiques identifiées. Le test IP1 (Inositol monophosphate) de la société CisBio a été utilisé pour ce criblage. Ce test est basé sur la détection de la production d'IP1 suite à la liaison du ligand à son récepteur et à l'activation de la voie de signalisation Gαq.

Pour réaliser ce test, nous avons généré deux lignées BHK-21 exprimant stablement les récepteurs PROKR1 ou PROKR2. La caractérisation moléculaire et cellulaire de ces deux lignées sera abordée dans la deuxième partie de mes résultats.

Les cellules BHK-21 exprimant PROKR1 ou PROKR2 ont été incubées à 37⁰C et traitées pendant 1h30 par différentes concentrations du ligand PROK1 ou PROK2. L'activation de la voie Gαq a pu être estimée par mesure de la production d'IP1 (Fig. 14A). Les résultats obtenus montrent que l'activation de PROKR1 en présence de PROK1 est plus élevée par rapport à celle de PROK2 suggérant que PROKR1 présente une plus grande affinité que PROKR2 (Fig. 14A). La détermination de l'EC50 montre qu'elle est d'~4,5.10⁻⁹ M pour PROKR1 et de 16.10⁻⁹ M pour PROKR2 (Fig. 14A). La spécificité du signal enregistré par ajout de PROK1 a été contrôlée par l'utilisation des antagonistes des récepteurs, PKRA505 et PC1 (Fig. 14B et C). PKRA505 est antagoniste à la fois PROKR1 et PROKR2, tandis que PC1 est plus spécifique de PROKR1. Les résultats obtenus confirment ces observations et valident notre modèle cellulaire pour tester l'effet inhibiteur des 300 molécules identifiées (Fig. 14B et C). À ce jour une vingtaine de molécules ont été testées, dont seulement trois ont montré une inhibition à 25 et 50 μM (Fig. 14D). Les autres molécules n'avaient aucun effet (Fig. 14C).

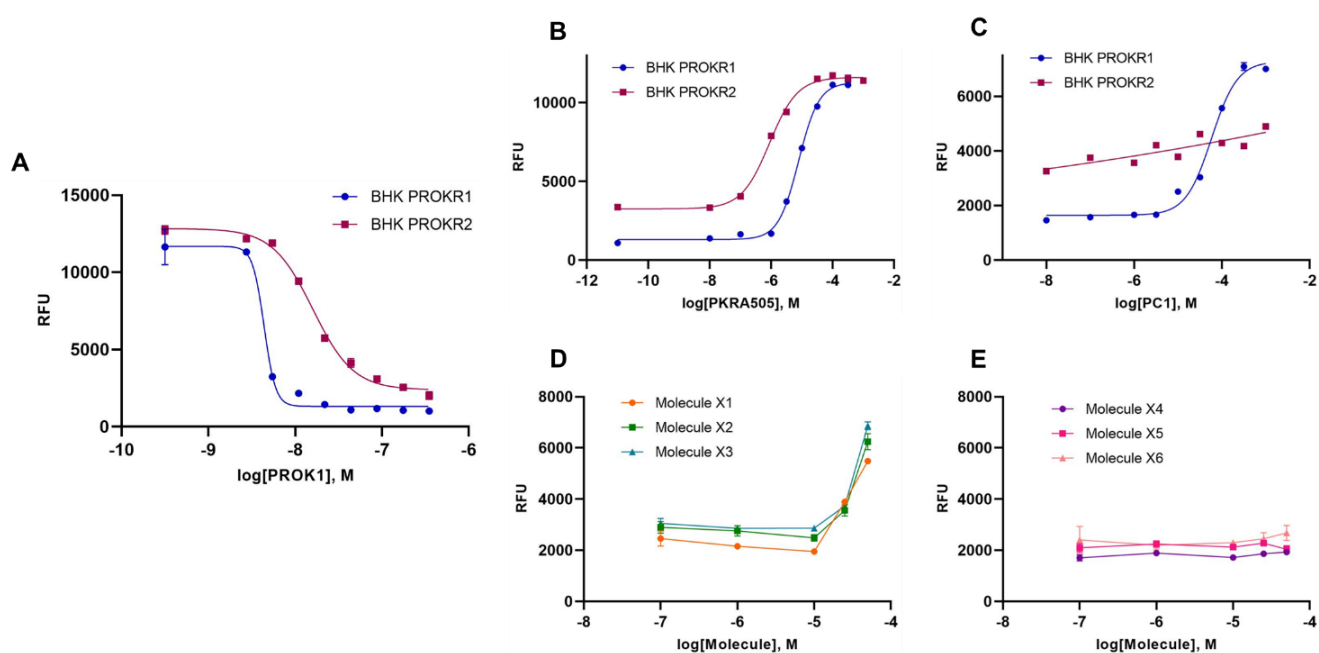


Figure 14: Test fonctionnel IP1 et criblage des molécules chimiques.

(A) BHK-PROKR1 ou PROKR2 ont été stimulées par une gamme croissante de PROK1 exprimé ici en log[PROK1]. (B et C) Une concentration fixe de PROK1 a été utilisée sur les cellules BHK-PROKR1 ou PROKR2 en présence d'une gamme croissante d'antagonistes PKRA505 (B) ou PC1 (C). (D et E) Une concentration fixe de PROK1 a été utilisée sur les cellules PROKR2 en présence d'une gamme croissante de molécules chimiques.

Nous avons par la suite entrepris la caractérisation *in silico* de la spécificité de l'interaction de la molécule la plus efficace, X2, avec la protéine PROK1. L'analyse de plusieurs modèles démontre que cette molécule se fixe au niveau de PROK1 à proximité des acides aminés identifiés comme impliqués dans l'interaction de PROK1 avec son récepteur PROKR2, confortant notre stratégie d'identification de molécules inhibitrices (Fig. 15).

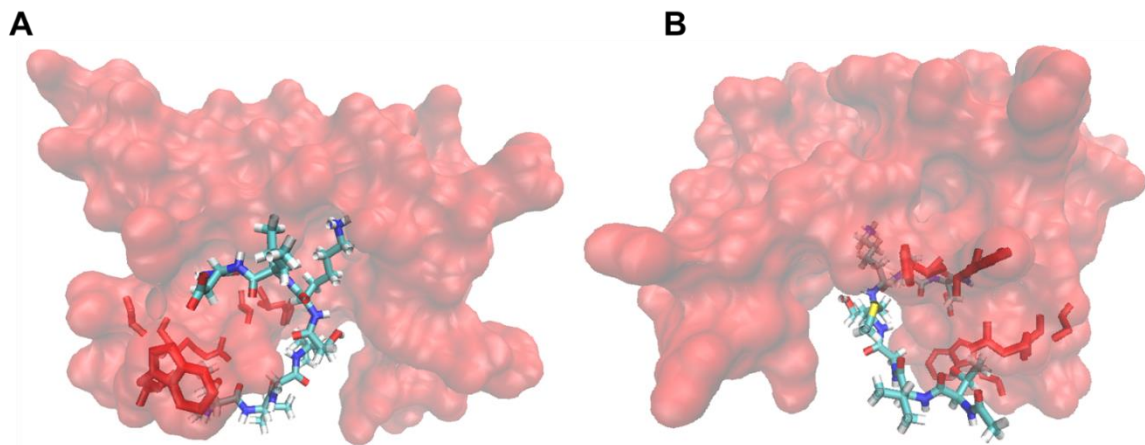


Figure 15: Structure du PROK1 avec la molécule chimique X2.

(A et B) Structure de PROK1 (rouge transparent, Surf) avec les acides aminés importants pour sa fixation sur son récepteur : W.24, R.26, G.27, K.55 et H.56 (Rouge opaque, Bond) interagissant avec la molécule X2 (Multicolore, Bond). Une rotation de 180° a été effectuée entre (A) et (B).

DISCUSSION

La production de protéines recombinantes a toujours été un défi dans le domaine de la recherche. Plusieurs hôtes procaryotes et eucaryotes sont à ce jour utilisés. Parmi ces hôtes *Escherichia Coli* (*E.Coli*) constitue l'outil le plus utilisé pour la production des protéines recombinantes, et ce en raison de sa rapidité de croissance, de la facilité pour la manipuler génétiquement, et de la compatibilité avec de nombreux plasmides. Cependant, la production dans cet hôte est souvent un processus de réussite ou d'échec total. La raison de l'échec serait due à un mauvais repliement de la protéine d'intérêt puisqu'elle n'utilise pas sa voie de sécrétion endogène.

Le mauvais repliement est notamment retrouvé pour des protéines possédant des ponts disulfures. En effet, le milieu cytosolique des bactéries est réducteur empêchant la formation des ponts disulfures. Dans les cellules eucaryotes, un milieu oxydant se trouve notamment dans le RE²¹ favorisant, avec l'aide de chaperonnes, la formation des ponts disulfures. Chez les procaryotes, ce milieu oxydant se trouve dans le périplasma. Il est à noter que la bactérie produit de manière endogène 3 fois moins de protéines avec des ponts disulfures que les eucaryotes²². Par le passé, l'expression de PROK1 chez *E.Coli* avait nécessité une purification en conditions dénaturantes puis un repliement *in vitro* par dialyse. Cette étape est délicate, fastidieuse et le bon repliement de la protéine n'est pas assuré. Pour éviter cela, nous avons tout d'abord opté pour l'expression dans le périplasma. Malheureusement, l'export dans ce compartiment n'a pas fonctionné et la protéine s'est retrouvée sous forme de corps d'inclusions. Ce problème d'export dans le périplasma est souvent rencontré en raison de la saturation de la voie de translocation (translocon SecYEG)²³. De plus, PROK1 produite avec la construction pET22b s'est retrouvée en corps d'inclusions dans le cytoplasme. La fusion de PROK1 avec MBP a permis la solubilisation des protéines fusionnées, mais lors de la purification, la protéine apparaissait sous forme d'agrégat soluble de haut poids moléculaire observé en SEC-MALLS (Size Exclusion Chromatography-Multiple Angle Laser Light Scattering). Ceci expliquerait le faible taux de clivage assuré par la protéase TEV, qui aurait eu un accès limité à son site de clivage sur la protéine.

Pour les cellules Sf9, l'échec serait causé par l'absence de reconnaissance du signal peptidique humain. Dans une précédente étude, la production avec le baculovirus semble avoir fonctionné, mais peu d'informations concernant la quantité de protéines produite sont décrites²².

Nous avons réussi à produire PROK1 dans le milieu de culture de la lignée mammifère ; BHK-21. Cependant, la quantité produite (41ng/ml) était trop faible pour être exploitée. Plusieurs étapes d'optimisation ont été entreprises sans succès.

Un changement d'échelle de production reste difficilement franchissable en travaillant avec un modèle de cellules adhérentes. Un passage en cellules en suspension semble être l'unique solution pour une augmentation de la production. Le principal problème concernant ce modèle reste la purification de la protéine PROK1. En effet, aucune protéine n'a pu se fixer sur la résine Ni-NTA en condition native, en revanche le passage en condition dénaturante a été nécessaire pour obtenir une fixation sur colonne. L'accessibilité du Tag His semble également un point limitant, qui serait dû à un mauvais repliement de la protéine cachant ainsi le Tag.

Concernant la production chez *Pichia Pastoris*, tout comme les cellules de mammifères, la protéine a bien été retrouvée sous forme soluble et sécrétée dans le milieu de culture, mais la production reste faible. Contrairement aux cellules BHK-21, le changement d'échelle est possible puisque les levures sont cultivées en suspension. Le véritable problème avec cet hôte est le milieu de culture qui floccule à pH 7, empêchant son utilisation sur la colonne Ni-NTA. Différentes stratégies pour résoudre ce problème ont été testées sans grand succès.

D'autres stratégies restent à tester comme le changement du milieu par passage sur membrane d'ultracentrifugation²⁵⁻²⁸. Une production de la protéine recombinante dans un tampon directement à pH 7 peut également être envisagée²⁹. Par le passé, uniquement la protéine PROK2 a été produite chez *Pichia Pastoris*. La production a été effectuée dans les mêmes conditions de culture, mais un maximum de production a été retrouvé au bout de 120h, ce qui n'a pas été le cas dans nos conditions (48-72h). De plus, l'induction a été effectuée avec 1% de méthanol avec des levures à densité élevée. Dans cette étude, la purification de PROK2 par résine à échange d'ions avait fonctionné (carboxyméthyl)³⁰.

Le fait que nous n'avons pas réussi à produire des quantités suffisantes de PROK1 pour les expériences de cristallographie, nous avons entrepris de déterminer sa structure *in silico*. Nous avons réussi à résoudre *in silico* la STD de PROK1 et de son récepteur PROKR2. Pour PROK1, le modèle a été développé via Swiss-Model par homologie à la protéine MIT-1 (62% d'identité). Pour PROKR2, le logiciel Raptor X a été utilisé selon la méthode de deep learning qui est plus adaptée aux protéines avec de faible homologie de séquence. C'est en effet le cas de PROKR2 avec un maximum d'identité de 30% avec le récepteur à l'orexine. Ces deux modèles ont été comparés aux modèles produits par AlphaFold avec des scores RMSD (Root Mean Square Deviation) faibles de l'ordre de 1.12 Å et 2.52 Å pour le ligand et le récepteur, respectivement. Afin de diriger au mieux le docking moléculaire, l'interface entre le ligand PROK1 et le récepteur PROKR2 devrait être mieux définie.

Les prokinétines étant qualifiées de chimiokines par leur action sur les leucocytes, cette caractéristique nous a permis de s'inspirer des modèles déjà connus pour leur fixation à leurs

récepteurs^{31,32}. Un modèle à deux sites a été décrit pour cette famille et se fait en deux étapes, la première concerne l'identification du ligand à travers la fixation de sa partie N-ter (N-loop) sur la partie N-ter et ECL2 du récepteur, la seconde consiste en l'insertion de cette partie N-ter dans la poche hydrophobe formée par les TMs (activation du récepteur). Pour les prokinétines, il a été démontré que la boucle extracellulaire ECL2 était impliquée dans la liaison au PROKR2 via les acides aminés F198, Q210 et Trp212^{19,20}. Afin de déterminer l'interface mise en jeu pour PROK1, nous nous sommes inspirés de ce résultat, et avons fixé la partie ECL2 comme boucle impliquée dans l'interaction avec le ligand dans le logiciel InterEvDock2. La création de 150 modèles a permis de mettre en évidence l'implication de plusieurs acides aminés, W.24, R.26, G.27, K.55 et H.56. La Trp24 avait déjà été mise en évidence dans une expérience de cross-linking, confortant nos résultats et le modèle d'interaction que nous avons créé²⁰.

Le modèle que nous avons identifié semble suivre la première étape du modèle proposé pour les chimiokines. Ce modèle considèrerait les acides aminés identifiés comme faisant partie de la N-loop. La deuxième étape faisant intervenir la poche hydrophobe du récepteur a été déjà mise en évidence³³.

L'idée de cibler directement le ligand et non le récepteur est connue depuis une vingtaine d'années³⁴. Plusieurs stratégies ont été développées, comme l'utilisation de récepteurs leurres, d'oligonucléotides ou des aptamères^{35,36}, mais la plupart des molécules ciblant des ligands sont des anticorps, comme c'est le cas pour le facteur pro-angiogénique VEGF. Néanmoins, les coûts très élevés de ces thérapies par anticorps bloquants et les effets secondaires qu'ils engendrent suggèrent le recours à des thérapies utilisant des molécules chimiques plus spécifiques, moins toxiques et moins coûteuses.

Dans cette étude, nous avons choisi de cibler le ligand PROK1 par des molécules chimiques. Nos résultats à ce stade ont identifié trois molécules qui inhibent l'interaction de PROK1 avec son récepteur et diminuent son activité sur un test fonctionnel développé lors de ma thèse. Ces molécules semblent se fixer à proximité d'acides aminés impliqués dans l'interaction du ligand avec son récepteur. Cette stratégie qui vise à inhiber chimiquement l'interaction du ligand avec son récepteur pourrait être à l'origine de thérapies ciblées qui atténueraient les effets pro-inflammatoires et pro-angiogéniques médiés par PROK1 non seulement dans le cancer, mais également dans plusieurs pathologies inflammatoires comme la prééclampsie et la mucoviscidose.

REFERENCES

1. Traboulsi, W. et al. Antagonism of EG-VEGF Receptors as Targeted Therapy for Choriocarcinoma Progression In Vitro and In Vivo. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 23, 7130–7140 (2017).
2. [Choriocarcinoma in Senegal: epidemiology, prognosis and prevention]. ResearchGate https://www.researchgate.net/publication/10995071_Choriocarcinoma_in_Senegal_epidemiology_prognosis_and_prevention.
3. Altieri, A., Franceschi, S., Ferlay, J., Smith, J. & La Vecchia, C. Epidemiology and aetiology of gestational trophoblastic diseases. *Lancet Oncol.* 4, 670–678 (2003).
4. Smith, H. O. Gestational trophoblastic disease epidemiology and trends. *Clin. Obstet. Gynecol.* 46, 541–556 (2003).
5. Cagayan, M. S. & Lu-Lasala, L. R. Management of gestational trophoblastic neoplasia with metastasis to the central nervous system: A 12-year review at the Philippine General Hospital. *J. Reprod. Med.* 51, 785–792 (2006).
6. Kaser, A., Winklmayr, M., Lepperdinger, G. & Kreil, G. The AVIT protein family. Secreted cysteine-rich vertebrate proteins with diverse functions. *EMBO Rep.* 4, (2003).
7. Lattanzi, R., Severini, C. & Miele, R. Prokineticin 2 in cancer-related inflammation. *Cancer Lett.* 546, (2022).
8. Monnier, J. & Samson, M. Prokineticins in angiogenesis and cancer. *Cancer Lett.* 296, (2010).
9. Benlahfid, M. et al. Endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor (EG-VEGF) and its receptor PROKR2 are associated to human colorectal cancer progression and peritoneal carcinomatosis. *Cancer Biomark.* 21, 345–354 (2018).
10. Pasquali, D. et al. The endocrine-gland-derived vascular endothelial growth factor (EG-VEGF)/prokineticin 1 and 2 and receptor expression in human prostate: Up-regulation of EG-VEGF/prokineticin 1 with malignancy. *Endocrinology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16763065/> (2006) doi:10.1210/en.2006-0614.
11. Samson, M. et al. Human endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor: expression early in development and in Leydig cell tumors suggests roles in normal and pathological testis angiogenesis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15292351/> (2004) doi:10.1210/jc.2003-032024.
12. Luttia, S. et al. Prokineticins and Merkel cell polyomavirus infection in Merkel cell carcinoma. *British journal of cancer* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24496457/> (2014) doi:10.1038/bjc.2014.20.
13. Zhang, L. et al. Expression of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor in ovarian carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 9, 264–272 (2003).
14. Alfaidy, N. Prokineticin1 and pregnancy. *Annales d'endocrinologie* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27172869/> (2016) doi:10.1016/j.ando.2016.04.014.

15. Brouillet, S., Hoffmann, P., Feige, J. & Alfaidy, N. EG-VEGF: a key endocrine factor in placental development. *Trends Endocrinol. Metab.* TEM 23, (2012).
16. Neu, H. & Heppel, L. The release of enzymes from *Escherichia coli* by osmotic shock and during the formation of spheroplasts. *J. Biol. Chem.* 240, (1965).
17. Friesner, R. et al. Extra precision glide: docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes. *J. Med. Chem.* 49, (2006).
18. Boisbouvier, J. et al. A structural homologue of colipase in black mamba venom revealed by NMR floating disulphide bridge analysis. *J. Mol. Biol.* 283, 205–219 (1998).
19. Monnier, C. et al. PROKR2 missense mutations associated with Kallmann syndrome impair receptor signalling activity. *Hum. Mol. Genet.* 18, 75–81 (2009).
20. Fullone, M. R., Lattanzi, R., Maftai, D., Bonaccorsi, M. C. & Miele, R. Analysis of role of aromatic residues in extracellular loop 2 of Prokineticin receptor 2 in ligand binding probed with genetically encoded photo-crosslinkers. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1863, 183549 (2021).
21. Feige, M. & Hendershot, L. Disulfide bonds in ER protein folding and homeostasis. *Current opinion in cell biology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21144725/> (2011) doi:10.1016/j.ceb.2010.10.012.
22. Bošnjak, I., Bojović, V., Šegvić-Bubić, T. & Bielen, A. Occurrence of protein disulfide bonds in different domains of life: a comparison of proteins from the Protein Data Bank. *Protein engineering, design & selection: PEDS* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24407015/> (2014) doi:10.1093/protein/gzt063.
23. Pages, J. et al. Normal precursors of periplasmic proteins accumulated in the cytoplasm are not exported post-translationally in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 143, (1984).
24. LeCouter, J. et al. Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. *Nature* 412, (2001).
25. Ben Salah, R., Gargouri, A., Verger, R., Gargouri, Y. & Mejdoub, H. Expression in *Pichia pastoris* X33 of His-tagged lipase from a novel strain of *Rhizopus oryzae* and its mutant Asn 134 His: purification and characterization. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25, 1375–1384 (2009).
26. Driss, D., Bhiri, F., Ghorbel, R. & Chaabouni, S. Cloning and constitutive expression of His-tagged xylanase GH 11 from *Penicillium occitanis* Pol6 in *Pichia pastoris* X33: purification and characterization. *Protein Expr. Purif.* 83, (2012).
27. Wu, D. et al. Expression and purification of the kinase domain of PINK1 in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* 128, (2016).
28. Wang, X. et al. Combined strategies for the improvement of heterologous expression of a His-tagged *Yarrowia lipolytica* lipase Lip2 in *Pichia pastoris*. *Afr. J. Biotechnol.* 10, 18503–18512 (2013).
29. Fan, K. et al. Expression and purification of the recombinant murine REG3 α protein in *Pichia pastoris* and characterization of its antimicrobial and antitumour efficacy. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 29, 740–745 (2015).

30. Miele, R. et al. Expression of Bv8 in *Pichia pastoris* to identify structural features for receptor binding. *Protein Expr. Purif.* 73, (2010).
31. Kufareva, I., Salanga, C. L. & Handel, T. M. Chemokine and chemokine receptor structure and interactions: implications for therapeutic strategies. *Immunol. Cell Biol.* 93, 372–383 (2015).
32. Rajagopalan, L. & Rajarathnam, K. Structural Basis of Chemokine Receptor Function—A Model for Binding Affinity and Ligand Selectivity. *Biosci. Rep.* 26, 325–339 (2006).
33. Gasser, A. et al. Discovery and Cardioprotective Effects of the First Non-Peptide Agonists of the G Protein-Coupled Prokineticin Receptor-1. *PLoS ONE* 10, e0121027 (2015).
34. Attwood, M., Jonsson, J., Rask-Andersen, M. & Schiöth, H. Soluble ligands as drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* 19, (2020).
35. Holash, J. et al. VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, (2002).
36. Riccardi, C. et al. Anti-VEGF DNA-based aptamers in cancer therapeutics and diagnostics. *Med. Res. Rev.* 41, (2021).

ARTICLE 2

Introduction

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) sont des protéines membranaires qui jouent un rôle central dans plusieurs processus physiologiques et physiopathologiques chez l'homme. C'est la famille des protéines la plus abondante dans le génome humain avec environ 800 membres, dont 30% sont des cibles de médicaments actuellement commercialisés. Cette famille reste un réservoir important pour de nouvelles thérapies innovantes. Les RCPG présentent une structure commune avec 7 domaines transmembranaires qui sont reliés par trois boucles extracellulaires et trois boucles intracellulaires et deux extrémités NH₂- et COOH-terminales localisées du côté extra- et intracellulaire, respectivement.

La stimulation des RCPG par leurs ligands entraîne des réarrangements structurels, y compris d'oligomérisation, nécessaires à l'activation des protéines G hétérotrimériques. Ces réarrangements constituent aussi un signal pour différents processus propres aux récepteurs comme l'endocytose, le recyclage ou la dégradation par la voie lysosomale et/ou protéosomale. En 2001, deux nouveaux membres de la famille des RCPG ont été identifiés. Ce sont des récepteurs orphelins activés par deux ligands de la famille des prokinétines (PROK) : PROK1 et PROK2. La spécificité d'activation de ces récepteurs par les ligands PROK1 et PROK2 a permis de les désigner ; PROKR1 et PROKR2. Depuis leur identification, les deux récepteurs ont été caractérisés par rapport à leur expression, localisation, fonction, régulation, et implication dans certaines pathologies humaines.

Sur le plan fonctionnel, l'activation des PROKRs va recruter, en fonction du type cellulaire, différentes protéines G (Gq, G11, Gs ou Gi) et par conséquent mobiliser différentes voies de second messager (Ca²⁺, AMPc, phosphoinositol) et de kinases (Akt, MAPK).

Une caractéristique qui n'est pas encore élucidée pour ces deux récepteurs est leur induction d'effets biologiques différents malgré qu'ils soient exprimés par la même cellule ou le même tissu, ainsi que la capacité de leurs ligands, PROK1 et PROK2 à activer les deux récepteurs sans sélectivité apparente et avec une stimulation d'ordre nanomolaire. Les premières explications incriminent les niveaux d'expression des récepteurs qui semblent être différentes en fonction de la cellule ou du tissu considéré ainsi que la disponibilité de leurs ligands.

Les études menées à ce jour suggèrent fortement que les niveaux circulants des deux ligands et la disponibilité membranaire de leurs récepteurs, PROKR1 ou PROKR2, imposeront le choix du couple ligand-récepteur, nécessaire à l'activation de voie de signalisation propre à un type cellulaire. L'absence de spécificité par rapport au récepteur suggère aussi que la liaison à l'un

ou l'autre des récepteurs dépendra fortement de la concentration relative des ligands et de la disponibilité de PROKR1 ou PROKR2 au niveau de la membrane plasmique.

Les variations des concentrations circulantes des ligands et leurs biodisponibilités à proximité des récepteurs restent énigmatiques et difficiles à élucider. En revanche, les mécanismes qui régissent la disponibilité membranaire des RCPG ont été bien documentés. Ils incluent la biosynthèse, le trafic intracellulaire, la désensibilisation, l'endocytose, le recyclage et la dégradation. Ces mécanismes sont aujourd'hui décrits comme étroitement liés à l'exposition de motifs spécifiques présents au niveau des domaines extra- et intracellulaires comme les extrémités N- et C-terminales. La disponibilité de ces motifs est associée aux réarrangements structurels que subissent les récepteurs, comme l'oligomérisation.

Pour les récepteurs PROKRs, aucune étude, à ce jour, ne s'est intéressée à la comparaison de leur comportement cellulaire et biochimique pour mieux comprendre leur disponibilité membranaire. La difficulté dans ces comparaisons réside dans le fait que ces récepteurs partagent ~85% d'identité. Ainsi, s'il faut les comparer, il faudra s'intéresser au 15% de différence portée par les deux extrémités N- et C-ter et par la boucle extracellulaire.

À l'aide d'un système d'expression hétérologue, nous avons comparé la localisation cellulaire, le trafic et la stabilité membranaire de PROKR1 et PROKR2. Nous avons démontré que PROKR1 et PROKR2 présentent une différence dans la localisation et trafic intracellulaire ainsi que dans la stabilité membranaire. De plus, nous avons apporté la preuve que par rapport à PROKR1, PROKR2 était plus sensible à la dégradation dépendante de la voie lysosomale. Nous avons démontré que le degré de structuration de PROK2 par rapport à PROKR1 serait responsable de sa dégradation rapide.

Ces résultats révèlent, pour la première fois, des caractéristiques moléculaires qui différencient PROKR1 de PROKR2. Ces données vont contribuer à une meilleure compréhension de leurs effets biologiques dans des contextes physiologiques et pathologiques, dans l'objectif final de développer, spécifiquement des thérapies capables de cibler l'un ou l'autre des récepteurs .

Differential conformation and temperature-sensitive stability between PROKR1 and PROKR2 in post-endoplasmic reticulum compartments.

K. Gemy¹, W. Traboulsi², C. Lyko¹, N. Lemaitre¹, P. Hoffmann¹, T. Barjat¹, N. Alfaidy¹, and M. Benharouga¹

- 1. Interdisciplinary Research Institute of Grenoble, IRIG-Biosanté, University Grenoble Alpes, INSERM, CEA, UMR 1292, F-38000 Grenoble, France Centre Hospitalo-Universitaire Grenoble Alpes, Service Obstétrique, CS 10217, 38043 Grenoble Cedex 9, France; Université Grenoble Alpes, France.**
- 2. Lombardi Comprehensive Cancer Center, Laboratory for Immuno-Oncology, Georgetown University Medical Center, Washington, DC 2005, USA**

Corresponding author: Pr. Mohamed Benharouga
Unité INSERM. Laboratoire Biosanté, U1292
CEA Grenoble 17, rue des Martyrs
38054 Grenoble cedex 9
Tel. 04 38 78 0407, Fax 04 38 78 50 58
mohamed.benharouga@cea.fr

Abstract

Prokineticin receptors (PROKR1 and PROKR2), are G protein-coupled receptors (GPCR) involved in several physiological and pathological processes, including immunity, pain, inflammation, and cancer. Human *PROKR* genes are located on two different chromosomes, yet their primary sequences are highly conserved, with nearly 85% identity. The sequence variation is mostly concentrated in the extracellular N- and intracellular C-terminal tails as well as in the second intracellular loop. In addition, both receptors are activated at the nanoscale level by two secreted prokineticins peptides (PROK1 and PROK2). Despite these strong structural and biochemical similarities, and even if both receptors are often expressed in the same tissue, their activation leads to different cellular responses, suggesting that the ligand and receptor pairing may depend on several parameters, including the plasma membrane availability of the receptors. The later, might be associated with intrinsic structural changes, which may affect receptor's cellular localization, trafficking, plasma membrane insertion, and oligomerization. Using heterologous stable expression system, we undertook, in the absence of any transcriptional regulation, a comparative study of the biochemical and cellular fate of PROKR1 and PROKR2. While PROKR1 is mainly localized to the cell surface and exhibit a half-life of ~3.5h, the expression of PROKR2 is mainly found at the ER-Golgi compartment with a significant shorter half-life of ~1.5h. Biochemical and functional assessments showed that PROKR2, compared to PROKR1, has a temperature-sensitive stability defect in post-ER compartments, including the cell surface. The lysosomal accelerated disposal of PROKR2 is, most likely due to a decrease in the stability of its conformation, demonstrated by *in situ* protease susceptibility, SDS-resistant thermo-aggregation and thermo-stability assays.

We propose that the decreased stability of PROKR2, compared to PROKR1, may contribute to its inability to accumulate at the cell surface. Further studies are needed to understand the physiological meaning of PROKR2 biochemical features and how to take advantage from these receptor's specificities to develop interfering molecules to block one or the other receptor in pathological settings.

Introduction

In the pathogenesis of human diseases, G-protein-coupled receptors (GPCRs) play a central role as indicated by the number of drugs that target their cellular biosynthesis and/or functional activities [1]. These receptors represent the largest family of membrane-spanning proteins and respond to numerous extracellular signals. GPCRs control different biological processes upon activation of heterotrimeric G-proteins and second messenger signaling cascades [2]. GPCRs share a central core formed by seven transmembrane helices (from TM1 to TM7) connected by intracellular and extracellular segments, and two end regions corresponding to the extra- and intracellular amino- and carboxy-terminal sequences, respectively [3]. Upon ligand stimulation, GPCRs undergo first tertiary structural changes, necessary for G protein activation, including oligomerization processes, followed by ubiquitin-dependent endocytosis, and recycling or lysosomal/proteosomal degradation [4–7].

In the GPCRs family, two orphan receptors, characterized by an unusual high degree of sequence similarity (~85% amino acid identity [8]) have been identified to be activated by the two canonical members of the prokineticin family (PROK); PROK1 also called EG-VEGF (endocrine gland derived-vascular endothelial growth factor) and PROK2 also called BV8 (Bambina Variegata). The receptors are called PROKR1 and PROKR2 [9-10]. Depending on the type of cellular localization, the activation of PROKRs induce calcium mobilization, phosphoinositol turnover, and activation of Akt kinase and mitogen-activated protein kinase (MAPK) in a Gq, G₁₁, G_s or G_i-dependent pathways [8-13]. The PROKs/PROKR family are involved in diverse biological processes [14-18]. While the mammalian PROKRs are widely coexpressed in various tissues, the level of expression of each receptor was reported to be specific to each tissue, suggesting local regulations that dictate their physiological functions [8, 14, 19]. Recent studies reported divergent roles for PROKRs, as a function of their patterns of expression. In human placenta, gastrointestinal system, and endothelial cells, PROKR1 is highly and differentially expressed compared to PROKR2 [17–19]. Similar results were reported for the development of the olfactory bulb (OB), where both receptors are expressed but only PROKR2 is involved in the migration of GnRH neurons [21, 22]. Another feature of the ligands PROK1 and PROK2 is their capacity to activate both receptors with similar agonist potency and without apparent selectivity [8, 10].

Altogether, these results strongly suggest that the circulating levels of both ligands and the availability of their plasma membrane receptors, PROKR1 or PROKR2, may act in a pair manner to activate particular physiological/cellular signaling pathways.

In addition, the absence of receptor's specificity, strongly suggests that the binding to either receptor will strongly depend on the relative concentration of the ligands and the availability of PROKR1 or PROKR2 at the plasma membrane.

While, several studies reported the physiological and pathological roles of the ligands and the receptor [14-18]. Yet, no empirical evidence is available to support PROKR selective activities. Because the ligand and receptor pairing depends on the type of the ligand; on the signal to be transduced; on the membrane trafficking and receptor availability at the cell surface, and given the differential physiological roles of PROK1 and PROK2, we hypothesize that PROKR1 and PROKR2 may diverge for one or more of those features. Another differentiating feature may be linked to structural differences between the receptors, which may affect their cellular localization, trafficking, and plasma membrane insertion.

Using a heterologous expression system, we compared the cellular localization, trafficking and membrane stability between PROKR1 and PROKR2. We demonstrate that PROKR1 and PROKR2 exhibit different cellular localization, trafficking, and membrane stability. In addition, PROKR1 and PROKR2 were more susceptible to lysosomal-dependent proteolysis at post-Golgi compartments, including the plasma membrane. We propose that the degree of the structural destabilization of PROKR2 may accounts for its rapid degradation compared to PROKR1.

These results reveal, for the first time, some of key differentiating features between PROKR1 and PROKR2. These findings will contribute to a better understanding of PROKR1 and PROKR2 respective physiological roles and facilitate the development of specific agonist or antagonist molecules.

Materials and methods

Plasmid Construction

The human cDNA encoding PROKR1 (NCBI Gene ID: 10887) and PROKR2 (NCBI Gene ID: 128674) proteins were synthesized and inserted in the pCDNA-3.1 plasmid between the Not-I and Xho-1 restriction sites. The 3' region of both sequences was flanked with the influenza hemagglutinin (HA)-flag sequence (5' TAC CCA TAC GAT GTT CCA GAT TAC GCT 3' or 5' TAT CCA TAT GAT GTT CCA GAT TAT GCT 3'). The corresponding constructs were cloned into the pNut plasmid to generate stable baby hamster kidney (BHK) cells under methotrexate selection. The pCDNA-3.1 constructs were used for transient transfection.

Cell lines

To avoid the possible influence of clonal variations on PROKR1 or PROKR2 biosynthesis, trafficking, plasma membrane stability, and function, experiments were carried out both in transient and stable heterologous expression systems. A mixture of stably BHK cells, expressing human wild type (wt) PROKR1 or PROKR2 with a carboxyl-terminal hemagglutinin (HA)-epitope, was generated and maintained as previously described [23]. At least 100 individual clones were combined after methotrexate selection and expanded for subsequent experiments.

COS7 cells were transiently transfected with the pCDNA3.1 plasmid containing wt human PROKR1 or PROKR2 cDNA using the FuGENE6 (Promega, France). BHK and COS7 cells were grown in DMEM/F-12 (5% fetal bovine serum; FBS) and in DMEM (10% of FBS), respectively, at 37°C under 5% CO₂.

Antibodies and reagents

The monoclonal anti-HA Ab (16B12) was purchased from Biolegend, France. Anti-PROKR1 and anti-PROKR2 recognizing 1-14 and 13-25 residues at the N-terminal tail, respectively, and the secondary anti-mouse and anti-rabbit antibodies were purchased from Covalab (France). Endoglycosidase H (Endo H), peptide-N-(N-acetyl- β -glucosaminyl) asparagine amidase (PNGase F), and O-glycosidase neuraminidase bundle were purchased from New England Biolabs (France). Other classical chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (France).

Immunolocalization

Indirect immunofluorescence localizations of WT PROKR1 or PROKR2 (C-terminally tagged with the influenza hemagglutinin (HA) epitope), stably or transiently expressed in BHK or COS-7, respectively, were performed as previously described [24].

HA-tagged receptors were visualized using murine monoclonal anti-HA and Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-mouse antibody (ThermoFisher Scientific, France) in 4% paraformaldehyde fixed and permeabilized cells. Single optical sections were obtained on an LSM 510 fluorescence laser confocal microscope (Carl Zeiss, France) with an oil 63X objective.

Microsome preparation and limited proteolysis

Isolation of ER, Golgi, and plasma membrane-enriched microsomes from BHK cells was performed using hypotonic buffer (pH 6.8, 10mM HEPES, 1mM EDTA, 0.25M sucrose) and

differential centrifugation as described previously [24]. The microsomal pellet was resuspended in hypotonic buffer at pH 7.6 and used either immediately or after being snap-frozen in liquid nitrogen. As described previously [24], the microsome fractions were subjected to the limited proteolysis digestion. PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) was used to stop the reaction and samples were immediately denatured at room temperature (RT) for 30 min in the presence of the 2X Laemmli sample buffer (LSB).

Subcellular fractionation

All procedures were carried out as described previously [23]. Fractions (1 ml) were collected from bottom to top. The density profile of the gradient was verified with density-marker beads (Sigma–Aldrich). The activities of alkaline phosphatase, β -glucuronidase, mannosidase II and α -glucosidase, specific marker enzymes of plasma membrane, lysosomes, Golgi and ER complex, were measured in each fraction [23]. Protein content was determined with BCA kit (Sigma-Aldrich) using bovine serum albumin as a standard.

Metabolic degradation of PROKR1 and PROKR2

The biosynthetic, degradation and trafficking rate of PROKR1 or PROKR2 stably expressed in BHK cells were evaluated using 100 μ g/ml of cycloheximide (CHX), an inhibitor of eukaryotic translation for the indicated time. Following the treatments at 37°C, proteins were extracted using RIPA buffer (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, and 0.5% sodium deoxycholate, pH 8.0) supplemented with proteases inhibitors, separated on a 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred into nitrocellulose membrane. PROKR1 and PROKR2 were identified using anti-HA antibody and ECL kit.

Biotinylation of cell surface PROKR1 or PROKR2

The cell surface expression of wt PROKR1 or PROKR2 stably expressed in BHK cells was evaluated using biotinylation assays [24]. After biotinylation and solubilization, the biotinylated receptors was affinity-isolated on streptavidin-Sepharose (ThermoFisher Scientific), separated with SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, and visualized using anti-HA Abs and Enhanced Chemiluminescence (ECL).

Glycosidase Digestion

To distinguish between O-, high mannose and complex-type *N*-linked oligosaccharide modification of PROKR1 or PROKR2, cell lysates were incubated with O-glycosidase-Neuraminidase, endoglycosidase H, or peptide *N*-glycosidase F at 37°C for 2h at the concentrations indicated by the supplier. The mobility shift of deglycosylated receptors was visualized with immunoblotting using anti-HA mAb.

Electrophoresis and immunoblotting

BHK cells stably expressing PROKR1 or PROKR2 were lysed in RIPA buffer containing proteases inhibitors [25]. Proteins were denatured in LSB, separated on SDS-PAGE, and immunoblotted using mouse monoclonal anti-HA antibody. Primary Abs were visualized by horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG and ECL. Immunoblotting of beta (β)-actin-subunit was performed with the mouse monoclonal (Covalab, France) antibodies. Immunoblots, with multiple exposures, were quantified using iBright Imaging System (Thermo

Fisher Scientific, France) and N.I.H. ImageJ 1.53 software (developed by the National Institutes of Health and available at their web site).

Thermostability of PROKR1 or PROKR2

The degradation rate of PROKR1 or PROKR2 stably expressed in BHK cells was also evaluated using 100 µg/ml of CHX at 26°C and 42°C. Immunoblotting detection of PROKR1 or PROKR2 was performed as previously described [24]. PROKR1 and PROKR2 were identified using anti-HA antibody and ECL kit.

Thermoaggregation assays

Thermoaggregation assays were performed as described previously [24]. Following the solubilization of BHK cells in LSB, the aggregation tendency of PROKR1 or PROKR2 was compared by exposing the lysate to temperatures ranging from 37 to 100 °C for 5min. SDS-resistant macromolecular aggregates were sedimented with centrifugation (14,000 ×g for 15 min). Where indicated, heat denaturation was performed in LSB supplemented with 8M urea. Monomeric PROKR1 or PROKR2 remaining in the supernatant were measured with quantitative immunoblotting using anti-HA Abs and ECL.

Statistical analysis

All our experiments were repeated at least three times. Results are means ± S.E.M. Two-tailed P values were calculated at 95% confidence level with Mix-effects model, using Prism software (GraphPad).

Results

Steady state expression of PROKR1 and PROKR2

Depending on the cell or tissue types, several studies reported that the pattern of expression of endogenous PROKRs could be different [26-28]. We verified whether the differences might be the consequence of transcriptional (*via* their promoters) or post-transcriptional (specific to the protein) regulations. In an attempt to investigate the cellular regulation of PROKRs expression, first, we stably and transiently expressed human PROKR1 or PROKR2 bearing a C-terminal influenza HA epitope in BHK-21 or COS-7 cells, respectively (**Fig. 1A and B**). The steady-state level of PROKRs was determined with immunoblotting using monoclonal antibodies (mAbs) that recognize the C-terminal HA tag (**Fig. 1A and B**). In stably (BHK-21) and transiently (COS-7) transfected cells, both receptors generated a similar pattern, with two characteristic bands that might correspond to the core- (MW ~46 kDa) and complex-glycosylated (MW ~59-61 kDa) forms (**Fig. 1A, B and C**). In addition, PROKR2 showed two more bands at 37 and 28 kDa that represent potentially an intermediate degradation polypeptide (**Fig. 1A, B and C**). Based on their electrophoretic profiles, both forms might correspond to the mature highly (H) and to the intermediate (I) glycosylated form of both receptors (**Fig. 1A and B**). To get more insights into the cellular glycosylation process of PROKR1 and PROKR2, we used protein extracts to test the glycosidase sensitivity of the H- and I-glycosylated forms. Cell lysates were incubated in the presence or absence of endoglycosidase H (H), peptide-N-glycosidase F (F), or O-glycosidase (O), three specific endoglycosidases used to characterize the glycoproteins. The digestion results showed that the 46 kDa band corresponding to the I-glycosylation was sensitive to endoH, producing a 37 kDa band (**Fig. 1C**). However, endoF was only able to digest the 59-61 kDa band, generating a 46 kDa band that correspond to the receptors I-form (**Fig. 1C**). These results confirmed that the 59-61 kDa corresponds to the receptor's H-glycosylated form. The 59-61 kDa band of PROKR1, but not PROKR2, was sensitive to the O-glycosidase (**Fig. 1C**). Interestingly, we observed that the level of expression of PROKR1, stably or transiently expressed in BHK or COS-7, respectively, was higher compared to PROKR2 (**Fig. 1A and B**). The Image-J quantification revealed that the PROKR1 H-form is ~58% more expressed compared to PROKR2 (**Fig. 1D**). No significant difference in the levels of expression of the I-form was observed between the two receptors (**Fig. 1D**). These results suggest that the difference in the expression of PROKR1 and PROKR2 is mainly linked to the H-form, which is localized in the secreted vesicles and present at the plasma membrane domain.

In addition, the detected H- and I-forms are not the result of artefacts that may result from exogenous overexpression since the polyclonal antibodies raised against endogenous PROKR1 or PROKR2 gave similar electrophoretic patterns (**Fig. 1E and F**). These results were confirmed with the Image-J quantification showing an ~1.5 times increase in PROKR1 or PROKR2 expression in transfected BHK-21 cells compared to non-transfected ones (**Fig. 1G**).

Cellular localization of PROKR1 and PROKR2

Although the two receptors belong to the same family of GPCRs, thus sharing the same structural topology, and despite having 85% identity, the weak expression, particularly the H-form of PROKR2 compared to PROKR1, might result from a cellular miss-localization. To verify this hypothesis, we undertook cell localization and colocalization studies. Using immunofluorescence cell imaging, we analyzed the distribution of HA-tagged PROKR1 or

PROKR2 in BHK-21 and COS-7 cells (**Fig. 2**). In permeabilized BHK cells, the anti-HA antibody showed that PROKR1 receptor was expressed at the cellular membrane surface as well as in the cytoplasm, particularly in a perinuclear region (**Fig. 2A**), that corresponds to the ER compartment, based on calnexin (CNX, an ER resident protein) staining and colocalization analyses (**Fig. 2B, PROKR1**). In contrast, PROKR2 receptor was abundantly expressed in the cytoplasm with a very weak expression at the cell surface (**Fig. 2A**). The cytoplasmic localization was mainly found in the ER compartment as showed by HA/CNX colocalization staining (**Fig. 2B, PROKR2**). Similar results were obtained in COS-7 cells transiently expressing HA-tagged PROKR1 or PROKR2 (**Fig. 2A**). In both cell lines, no nuclear staining was observed (**Fig. 2A and B**). These data are in support of the immunoblotting results and strongly suggested that PROKR1 and PROKR2 biosynthesis, trafficking or degradation might be different.

Cell surface delivery of PROKR1 and PROKR2 is preserved

To confirm that the H-form of PROKR1 and PROKR2 have transited through the Golgi and possibly beyond, cell surface biotinylation and functional assays were performed in BHK cells. The plasma membrane targeting and insertion of PROKR1 and PROKR2 H-forms were confirmed by biotinylation assay and immunoblotting, using anti-HA antibody (**Fig. 2C**). The densitometric analysis revealed that, compared to PROKR1, only ~54% of the biotinylated PROKR2 is detected at the plasma membrane (**Fig. 2D**), confirming the immunoblot results (**Fig. 1A and 1B**).

Since the ligand, PROK1 is able to activate PROKR1 and PROK2 in a nanomolar scale, we used the functional test IP1, which is based on the measurement of the production of myo-inositol monophosphate (IP1) upon ligand binding (*see methods section*).

It is important to note that the test is inversely proportional to the ligand activity. The lower the fluorescence ratio, the higher the activation. Based on the results reported in **figure 2E**, PROK1 activates PROKR1 and PROKR2 in at the nanomolar scale. However, PROKR1 exhibited higher effective concentration to PROK1~44% \pm 1.3 compared to PROKR2, supporting the immunoblot and cell surface biotinylation results. To validate these results, we determined the production of IP1 in the presence of PROKR1 and PROKR2 antagonist, PKRA505. Following treatment with PROK1 (25 nM), we compared PKRA505 inhibition of the PROK1-mediated activation in BHK-PROKR1 or BHK-PROKR2 (Figure S1). Albeit at different degree of inhibition, PKRA505 inhibited the activation of both receptors, confirming that PROKR1 and PROKR2 are not only delivered to plasma membrane but they are functional. The correlated decrease in the size of the complex-glycosylated H-form and the biotinylated pools of the PROKR2 suggests that the plasma membrane targeting is preserved.

Because, the decrease in stability of the PROKR2 transcripts, its defective post-translational folding, and its accelerated degradation, or a combination of all these processes, could explain the abrupt reduction in the levels of expression of the PROKR2 complex-glycosylated form, we performed more experiments to determine which of these steps is incriminated.

At the transcriptional level, we quantified the mRNA copy number of PROKR1 or PROKR2 stably expressed in BHK cells using quantitative PCR (qPCR). Our results clearly demonstrate that the copy number of both receptors is similar (**Fig. 3A**), suggesting the involvement of a post-transcriptional regulation. The rates of the biosynthesis of PROKR1 and PROKR2 were

determined by the quantification of the newly synthesized proteins, subsequent to 24h inhibition of protein synthesis using 100 µg/ml of cycloheximide (CHX). The results showed that the biosynthesis rate of PROKR2 was not reduced compared to that of PROKR1 (data not shown).

The folding efficiency of PROKR2 was also assessed by determining the rate of conversion of the I-form (~46 kDa) compared to the complex-glycosylated H-form (~59-61 kDa). The processing efficiencies of stably expressed PROKR2 reached ~80%, similar to those of PROKR1 (**Fig. 3 B and C**).

Based on these results that shows normal transcription, rate of biosynthesis, and folding efficiency, we propose that the decreased steady-state level of PROKR2 might be due to the stability of its H-complex-glycosylated form. To test this hypothesis, the turnover of PROKR1 (**Fig. 3B**) and PROKR2 (**Fig. 3C**) was assessed using CHX treatment at indicated times.

As we anticipated, we observed that the half-life ($t_{1/2}$) of the stably expressed PROKR2 H-form was reduced by ~2.6 fold ($t_{1/2}$ ~1.5h), compared to the half-life of PROKR1 ($t_{1/2}$ ~3h30) (**Fig. 3D and 3E**).

Similar difference was observed for PROKR2 I-form where the half-life was reduced by ~1.5 fold ($t_{1/2}$ ~70 min) compared to PROKR1 ($t_{1/2}$ ~1.5) (**Fig. 3D and E**). The accelerated turnover of the H-form of PROKR2 in the stable expression system provides a plausible explanation for the reduction in its steady state level, and for the decrease in the IP1 activity of PROKR2-BHK cells (**Fig. 2C and E**). The molecular mechanism underlying the stabilization of PROKR2 remains to be resolved.

Because the difference between the two receptors is mainly found in their N- and C-terminal parts, we hypothesized that this may confer the differential stability observed for PROKR1 and PROKR2 through several mechanisms or a combination thereof. For example, C- and/or N-terminal organization for PROKR2 could facilitate lysosomal degradation by exposing different or further endo-lysosomal sorting motifs, or may contribute to lower efficient recycling rate from the endosomal compartment back to the cell surface.

We demonstrated that neither the translational rate, nor the biosynthetic maturation or the plasma membrane targeting of the PROKR2 were significantly different compared to PROKR1. We propose that the destabilization of the mature H-form occurring at latter stages of PROKR2 biosynthesis and endocytosis may depend on its intrinsic properties of PROKR2.

Contribution of endolysosomal proteases to the turnover of PROKR1 and PROKR2

Because of the established mechanism of internalization of GPCRs, involving clathrin- and/or β -arrestin pathways [29], and their proteolysis in the vacuolar/lysosomal compartments [7], we hypothesized that PROKR2 may be targeted to premature endolysosomal proteolysis. To test this hypothesis, we measured the disposal rate of PROKR1 and PROKR2 H- and I-forms in the presence of lysosomal (chloroquin or NH_4Cl) protease inhibitors (**Fig. 4**). The degradation rate was decreased upon exposing the cells to NH_4Cl or chloroquin, two agents known to inhibit endolysosomal proteolysis by dissipating the acidic luminal pH (**Fig. 4A and C**). Both PROKR1 and PROKR2 H- and I-forms were stabilized with a more significant effect with NH_4Cl compared to chloroquin (**Fig. 4B and D**). Similarly, leupeptin and pepstatin A, inhibitors of cathepsins B, H, L, N, S, and T [30], and PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride), a serine protease inhibitor, had significant effects on the degradation rate of H- and I-form of

PROKR1 and PROKR2 (Data not show). The effect of the lysosomal inhibitors was more efficient on the degradation of PROKR1 I-form and PROKR2 H-form (**Fig. 4A-B**). These observations are in support of the difference in the stability of H-form between PROKR2 and PROKR1 (**Fig. 3**).

CHX treatment analysis has revealed that NH₄Cl and chloroquin (**Fig. 4**) mitigated the disposal of the PROKR1 and PROKR2 H-form. To further explore the role of the lysosome in the PROKR1 and PROKR2 degradation, a subcellular fractionation was performed after the enrichment of short-lived proteolytic intermediates that were difficult to detect upon cell treatment with cathepsin inhibitors. Heavy and light microsomes, containing predominantly lysosomes and Golgi complex, plasma membrane and endosomes, respectively, were isolated on Percoll density gradient (**Fig. 4 E**). Only a modest accumulation of PROKR2 in the lysosome fraction, compared to PROKR1 could be observed on the immunoblot analysis (**Fig. 4F**). Compared to PROKR1 that was highly detected in the lysosomal fraction, PROKR2 and its intermediate fragments of degradation (25-35 kDa) did not accumulate in this compartment, confirming the high susceptibility of PROKR2 to lysosomal-mediated degradation. Considering the absence of the ER processing of the core-glycosylated form upon cathepsin treatment [23], our results suggest that endolysosomal proteases are essential for the elimination of PROKR1 and PROKR2 H- and I-forms.

Proteasome-dependent Degradation of PROKR1 and PROKR2

The 26S proteasome is responsible for the degradation of misfolded polypeptides recognized by the ER quality control, short-lived cytosolic and some plasma membrane proteins after their ligand-induced internalization [31, 32]. To reveal the involvement of the 26S proteasome in the metabolism of the PROKR1 and PROKR2, the impact of the peptide aldehyde, MG 132 (CBZ-leu-leu-leucinal), and lactacystin (Lac), a specific, irreversible inhibitor of the 20S subunit [33] was assessed. For PROKR1, the disappearance of both I- and H-forms was not affected, neither by MG132 nor by lactacystin (**Fig. 5A and C**). However, only the degradation of PROKR2 H-form was inhibited by 2- and 2.5-fold by lactacystin and MG132, respectively (**Figs. 5B and D**). Lactacystin exerted a less pronounced effect (**Fig. 4 B**).

Turnover of Cell Surface Resident PROKR1 and PROKR2

The difference between the half-lives of PROKR1 and PROKR2 H-forms might be the consequence of a rapid degradation of the plasma membrane resident fraction. To determine the residence time of PROKR1 and PROKR2 H-form at the cell surface, the turnover of biotinylated PROKR2 was measured using cell surface biotinylation, in the presence of cycloheximide. We demonstrated that the half-life of the biotinylated PROKR2 was twofold shorter ($t_{1/2} \sim 1.5$ h) than the PROKR1 ($t_{1/2} \sim 3.5$ h), **Fig. 6A, B and C**, confirming immunoblot results and demonstrating that at the plasma membrane PROKR2 H-form is less stable.

PROKR2 intrinsic properties destabilize its H-form at the plasma membrane

Our results provide the first direct evidence that the biochemical half-life of the PROKR2 is 2-fold shorter than its PROKR1 counterpart at 37°C, suggesting that structural differences may persist between PROKR1 and PROKR2 at the plasma membrane.

To compare the conformational stability of PROKR1 and PROKR2 H- and I-forms, we performed the following assays: *in situ* protease susceptibility, *in vitro* thermostability, and

thermoaggregation. The conformation of the cytosolic domains was probed with limited proteolytic digestion in conjunction with immunoblotting. This method was implemented to reveal conformational difference between the PROKR1 and PROKR2 [23]. Intact microsomes were isolated by differential centrifugation from BHK cells enriched with PROKR1 or PROKR2 by cyclohexamide treatment, and subjected to limited proteolysis in the presence of an increasing concentration of trypsin. Immunoblot analysis of the proteolytic fragments using the anti-HA antibody demonstrated a distinct proteolytic digestion pattern between PROKR1 and PROKR2, and a moderate but reproducible increased protease sensitivity of PROKR2 compared with PROKR1 (**Fig. 7A**). These results indicate that the conformation of PROKR2 was altered. We then performed a thermoaggregation assay. SDS-solubilized cell lysates, obtained from BHK cells expressing PROKR1 or PROKR2 were heat-denatured at temperatures ranging from 37 °C to 100 °C. Insoluble aggregates were eliminated by centrifugation and monomeric PROKR1 or PROKR2 remaining in the supernatant were quantified by immunoblotting. The thermostability of solubilized receptors was assessed by determining the aggregation temperature (T_a) at which 50% of monomeric PROKR2 are converted into SDS-resistant aggregates (**Fig. 7B and C**). The T_a for PROKR1 was observed at ~80°C with a maximal effect at ~100°C (**Fig. 7B**). However, none of the tested temperatures (from 40 to 100°C) affected the electrophoretic profiles of PROKR2 (**Fig. 7C**).

Finally, no significant difference between the thermoaggregation tendency of PROKR1 and PROKR2 was observed when heat-denaturation was performed in LSB supplemented with 8 M urea (**Fig. 7B and C**), suggesting that the denaturation by urea of residual structural elements, prevailing in SDS micelles, abolished the differences in the thermostability of PROKR2s.

If the H- and I-forms of PROKR2 were unstable at the conformational level, then their thermostability would be compromised *in vitro*. We compared the temperature dependent turnover of the PROKR1 and PROKR2 complex-glycosylated forms using cycloheximide chase experiments. **Fig. 8B and D show that** the remaining PROKR2 I-form at 8h was ~2% at 40°C compared to ~7% at 37°C. Similar decrease was observed for the H-form with a significant decrease from ~9% at 37°C to 3% at 40°C (**Fig. 8B and D**).

In contrast, the remaining H-form of PROKR1 was weakly affected at 40°C (~17% at 40°C vs. 15% at 37°C) (**Fig. 8A and C**). Significant decrease of the remaining I-form, however, was observed at 42°C (~9%) compared to 37°C (~16%) (**Fig. 8A and C**). For PROKR1 H-form, the 40°C treatment did not modify the remaining fraction at 8h, compared to 37°C (**Fig. 8A and C**). At 26°C, the remaining PROKR1/PROKR2 I- and H-forms showed increased and significant stabilization compared to 37°C (**Fig. 8A-D**), suggesting the slowdown in the degradation of both receptors.

Altogether, the conformational stability results propose that PROKR2, unlike PROKR1, presents a deficient folding level, which makes it more sensitive to proteases.

Discussion

PROKR1 and PROKR2 share 85% homology, with most sequence variations located in the N- and C-terminal tail, as well as in the second intracellular loop [8]. We and other showed differential expression and regulation patterns between PROKR1 and PROKR2 [34], which may result from transcriptional, translational, and/or post-translational regulations. To overcome the transcriptional route, we cloned both cDNA in a recombinant plasmid under the

pCMV promoter. The expression pattern showed two characteristic bands corresponding to the complex (H) and core (I)-glycosylated forms as confirmed by the glycosidase results that were in line of what has previously been reported [35]. Importantly, those experiments revealed the presence of O-glycosylation (OG) processes for PROKR1 and not for PROKR2, supporting the primary sequence analysis showing the presence of two OG sites in PROKR1 that were absent from PROKR2 sequence [10]. Moreover, both receptors were functional and responded to the ligand in dose-dependent-manner and their activities were inhibited using PKRA505 (Fig. S1). Other processes, such as cell migration and proliferation known to be regulated by PROKs, have been also validated in our cellular model (Fig. S2 and S3).

Importantly, we observed a degradation intermediate-fragment (28-37 kDa) in the PROKR2 immunoblots that were present even at the steady state level. This finding suggests a higher sensitivity of this receptor to degradation. The higher sensitivity of PROKR2 to the degradation was substantiated from the lower level's of expression of the total and cell surface biotinylated H-form, observed for PROKR2 compared to PROKR1 (two fold decrease). Our results are in line with a previous study that reported a half live of $t_{1/2} \sim 90\text{min}$ for PROKR2 [36].

Our study is the first to compare concomitantly the post-translational fate of PROKR1 and PROKR2. Using cycloheximide chase, we observed that PROKR1 is two-times more stable at the plasma membrane ($t_{1/2} \sim 3\text{h}30$) than PROKR2. The difference in the half-life was not the consequence of the cell type, nor the mode of transfection or the plasmid used, since similar results were obtained using the COS-7 cell line that were transiently transfected with the pCDN3.1 plasmid. This further confirmed that the reduction in PROKR2 expression compared to PROKR1 is rather intrinsic to the protein properties. A similar difference was observed in astrocyte cells when comparing endogenous expression of both receptors [37]. However, in these cells, both PROKR2 mRNA and protein levels were decreased compared to PROKR1, suggesting that, in addition to its regulation at the protein level, PROKR2 might also be regulated at the mRNA level in these cells [19, 37, 38].

Immunolocalization and colocalization assays were also in support of the immunoblot data and confirmed that the expression of PROKR1 at the plasma membrane was higher compared to that of PROKR2. The later was mostly localized in an ER compartment as demonstrated by CNX colocalization. These results are also in line with data reported in astrocyte cells [37].

The decrease in the half-life of PROKR2 compared to PROKR1 is not the consequence of its RNA instability, nor a defect in its protein trafficking or plasma membrane delivery, but likely results from a rapid disposal using a lysosomal-dependent pathway. The involvement of the lysosomal pathway was supported by the effects of the protease inhibitors and by the subcellular fractionation results. The lysosomal fraction contains two types of lysosomes that are involved in the recycling of various substrates, such as receptors, and in the dismantling processes [39]. PROKR1 was highly expressed in the lysosomal enriched fraction compared to PROKR2, however the immunofluorescence colocalization with Lamp1 protein, a dismantling lysosome membrane resident glycoprotein [39], did not show colocalization with Lamp 1, supporting the notion that PROKR1 should mostly be localized to the recycling lysosomes (Fig. S5). These results, suggest the existence of different recycling processes for PROKR1 and PROKR2 that may be in favor of a rapid lysosomal disposal of the PROKR2 H-form. Our hypothesis is supported by the strong colocalization of PROKR2 with Lamp1 protein (Fig. S5).

PROKR2 disposal was slightly inhibited with the specific proteasome inhibitor, lactacystin [33], suggesting the involvement of the proteasome in its degradation. Similarly, PROKR2 was reported to be degraded via the ERAD rather than the lysosomal pathway [36]. In our experiments, the H-form was transported out of the ER as shown by immunoblot, immunofluorescence and cell surface biotinylation, suggesting that a post-Golgi ERAD might be occurring for non-properly folded H-form. Similar observations have been reported for other transmembrane proteins [23].

We did not observe any ubiquitylation of PROKR1 or PROKR2; even if this process has been described in HEK-cells for PROKR2 [36]. The observed ubiquitination may correspond to the endocytosis signal known to be associated with either the recycling or degradation observed for other GPCR and transmembrane proteins [40]. Lysosomes and proteasomes have been reported to be involved in the constitutive and ligand-induced disposal of plasma membrane proteins, including GPCRs [40]. The mechanism by which these substrates are recognized by the proteasome remains unknown.

Finally, one can speculate that the destabilization of the structure of PROKR2 may affect its folding process, which will increase the proportion of nonnative molecules, known to be more susceptible to proteolysis.

Evidence suggests that nonnative states of soluble and membrane polypeptides induced by mutations, thermal or chemical denaturation can lead to accelerated degradation [23, 31]; a paradigm that may apply to the degradation of nonnative GPCRs, such as PROKR1 and PROKR2. Based on the enhanced protease susceptibility, thermoaggregation assay, and the decreased *in vitro* thermostability of PROKR1 and PROKR2, we speculate structural destabilization of the native form of PROKR2 may be induced by disrupted interaction of its intra and inter-domains.

In conclusion, we presented compelling evidence indicating that the decrease in the levels of expression and time of residence of PROKR2 H-form compared to PROKR1 may account for the differential expression and activation of the two receptors when considering different cells and/or tissues. We showed that the degree of folding of both receptors might explain the observed differences. The N- and C-terminal tails may confer the stability to the mature PROKRs by several mechanisms or a combination thereof that still needs to be investigated.

References

1. A. S. Hauser, M. M. Attwood, M. Rask-Andersen, H. B. Schiøth, D. E. Gloriam, Trends in GPCR drug discovery: New agents, targets and indications. *Nat. Rev. Drug Discov.* 16, 829–842 (2017).
2. L. Pierce, R. T. Premont, R. J. Lefkowitz, Seven-transmembrane receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 639-650 (2002).
3. Baldwin JM, Henderson R, Beckman E et al (1988) Images of purple membrane at 2.8Å resolution obtained by cryo-electron microscopy. *J Mol Biol* 202(3):585–591.
4. Lefkowitz, R.J.(2013) A brief history of G-protein coupled receptors (Nobel Lecture). *Angew. Chem.Int.Ed.* 52, 6366– 6378.
5. Flock, T. et al. (2017) Selectivity determinants of GPCR–G-protein binding. *Nature* 545, 317.
6. Gomes, I. et al. (2001) G protein coupled receptor dimerization: implications in modulating receptor function. *J. Mol.Med.* 79, 226–242.
7. Michael R, Dores1, JoAnn Trejo. Endo-lysosomal sorting of G-protein-coupled receptors byubiquitin: Diverse pathways for G-protein-coupled receptordestruction and beyond. *Traffic.*2019;20:101–109.
8. Lin DC, Bullock CM, Ehlert FJ, Chen JL, Tian H, Zhou QY. Identification and molecular characterization of two closely related G protein-coupled receptors activated by prokineticins/endocrine gland vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 277: 19276–19280, 2002. doi:10.1074/jbc.M202139200.
9. Masuda Y, Takatsu Y, Terao Y, Kumano S, Ishibashi Y, Suenaga M, Abe M, Fukusumi S, Watanabe T, Shintani Y, Yamada T, Hinuma S, Inatomi N, Ohtaki T, Onda H, Fujino M. Isolation and identification of EG-VEGF/prokineticins as cognate ligands for two orphan G-protein-coupled receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 293: 396–402, 2002. doi:10.1016/S0006-291X(02)00239-5.
10. Soga T, Matsumoto S, Oda T, Saito T, Hiyama H, Takasaki J, Kamohara M, Ohishi T, Matsushime H, Furuichi K. Molecular cloning and characterization of prokineticin receptors. *Biochim Biophys Acta* 1579: 173–179, 2002. doi:10.1016/S0167- 4781(02)00546-8.
11. Abreu AP, Noel SD, Xu S, Carroll RS, Latronico AC, Kaiser UB. Evidence of the importance of the first intracellular loop of prokineticin receptor 2 in receptor function. *Mol Endocrinol* 26: 1417–1427, 2012. doi:10.1210/me.2012-1102.
12. Ren C, Qiu CY, Gan X, Liu TT, Qu ZW, Rao Z, Hu WP. Prokineticin 2 facilitates mechanical allodynia induced by α -methylene ATP in rats. *Eur J Pharmacol* 767: 24–29, 2015. doi:10.1016/j.ejphar.2015.09.047.
13. Zhou XT, Chen DN, Xie ZQ, Peng Z, Xia KD, Liu HD, Liu W, Su B, Li JD. Functional analysis of the distal region of the third intracellular loop of PROKR2. *Biochem Biophys Res Commun* 439: 12–17, 2013. doi:10.1016/j.bbrc.2013.08.039.
14. Cheng MY, Bullock CM, Li C, Lee AG, Bermak JC, Belluzzi J, Weaver DR, Leslie FM, Zhou QY. Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus. *Nature* 417: 405–410, 2002. doi:10.1038/417405a.

15. Giannini E, Lattanzi R, Nicotra A, Campese AF, Grazioli P, Screpanti I, Balboni G, Salvadori S, Sacerdote P, Negri L. The chemokine Bv8/prokineticin 2 is up-regulated in inflammatory granulocytes and modulates inflammatory pain. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 14646–14651, 2009. doi:10.1073/pnas.0903720106.
16. LeCouter J, Kowalski J, Foster J, Hass P, Zhang Z, Dillard-Telm L, Frantz G, Rangell L, DeGuzman L, Keller G-A, Peale F, Gurney A, Hillan KJ, Ferrara N. Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. *Nature* 412: 877–884, 2001. doi:10.1038/35091000.
17. Shojaei F, Wu X, Malik AK, Zhong C, Baldwin ME, Schanz S, Fuh G, Gerber HP, Ferrara N. Tumor refractoriness to anti-VEGF treatment is mediated by CD11b₊Gr1⁺ myeloid cells. *Nat Biotechnol* 25: 911–920, 2007. doi:10.1038/nbt1323.
18. Traboulsi W, Sergent F, Boufettal H, Brouillet S, Slim R, Hoffmann P, Benlahfid M, Zhou QY, Balboni G, Onnis V, Bolze PA, Salomon A, Sauthier P, Mallet F, Aboussaouira T, Feige JJ, Benharouga M, Alfaidy N. Antagonism of EG-VEGF Receptors as Targeted Therapy for Choriocarcinoma Progression *In Vitro* and *In Vivo*. *Clin Cancer Res*. 2017 Nov 15;23(22):7130-7140. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-0811.
19. Guilini C, Urayama K, Turkeri G, Dedeoglu DB, Kurose H, Messaddeq N, Nebigil CG. Divergent roles of prokineticin receptors in the endothelial cells: angiogenesis and fenestration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298: H844–H852, 2010. doi:10.1152/ajpheart.00898.2009.
20. Kubo A, Sujino M, Masumoto KH, Fujioka A, Terashima T, Shigeyoshi Y, Nagano M. Profiles of Periglomerular Cells in the Olfactory Bulb of Prokineticin Type 2 Receptor-deficient Mice. *Acta Histochem Cytochem* 50: 95–104, 2017. doi:10.1267/ahc.17001.
21. Matsumoto S, Yamazaki C, Masumoto KH, Nagano M, Naito M, Soga T, Hiyama H, Matsumoto M, Takasaki J, Kamohara M, Matsuo A, Ishii H, Kobori M, Katoh M, Matsushima H, Furuichi K, Shigeyoshi Y. Abnormal development of the olfactory bulb and reproductive system in mice lacking prokineticin receptor PROKR2. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 4140–4145, 2006. doi:10.1073/pnas.0508881103.
22. Pitteloud N, Zhang C, Pignatelli D, Li JD, Raivio T, Cole LW, Plummer L, Jacobson-Dickman EE, Mellon PL, Zhou QY, Crowley WF Jr. Loss-of-function mutation in the prokineticin 2 gene causes Kallmann syndrome and normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 17447–17452, 2007. doi:10.1073/pnas.0707173104.
23. Benharouga, Martin Haardt, Norbert Kartner, and Gergely L. Lukacs. COOH-terminal Truncations Promote Proteasome-dependent Degradation of Mature Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator from Post-Golgi Compartments. *The Journal of Cell Biology*, Volume 153, Number 5, May 28, 2001 957–970
24. Julien Micoud, Sylvain Chauvet, Klaus Ernst Ludwig Scheckenbach, Nadia Alfaidy, Marc Chanson, Mohamed Benharouga. Involvement of the heterodimeric interface region of the nucleotide binding domain-2 (NBD2) in the CFTR quaternary structure and membrane stability. *Biochimica et Biophysica Acta* 1853 (2015) 2420–2431
25. Béatrice De Keukeleire, Julien Micoud, Julie Biard, Mohamed Benharouga. Endoplasmic reticulum-associated degradation of mutant CFTR requires a guanine nucleotide-sensitive step. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 40 (2008) 1729–1742.
26. *J Biol Chem*. 2002; 277:19276–80

27. Mol Interv. 2006; 6:330–8
28. Glia. 2018, 66(10): 2137–2157
29. Ee Von Moo, Jeffrey R. van Senten, Hans Bräuner-Osborne and Thor C. Møller. Arrestin-Dependent and -Independent Internalization of G Protein–Coupled Receptors: Methods, Mechanisms, and Implications on Cell Signaling. *Molecular Pharmacology* April 2021, 99 (4) 242-255; DOI: <https://doi.org/10.1124/molpharm.120.000192>
30. P O Seglen. Inhibitors of lysosomal function. *Methods Enzymol.* 1983;96:737-64. doi: 10.1016/s0076-6879(83)96063-9.
31. Hershko and Ciechanover, 1998;
32. Brodsky and McCracken, 1999
33. Fenteany et al., 1995
34. Lucia Negri and Napoleone Ferrara. THE PROKINETICINS: NEUROMODULATORS AND MEDIATORS OF INFLAMMATION AND MYELOID CELL-DEPENDENT ANGIOGENESIS. *Physiol Rev* 98: 1055–1082, 2018
35. Jissele A. Verdinez, and Julien A. Sebag. Role of N-Linked Glycosylation in PROKR2 Trafficking and Signaling. *Front Neurosci.* 2021 Aug 13;15:730417. doi: 10.3389/fnins.2021.730417.
36. Yong Bhum Songa , Seung-Yeol Parkc , Kunyou Park, Hayoung Hwang, Rona S. Carrola, Victor W. Hsuc, and Ursula B. Kaisera Trafficking-defective mutant PROKR2 cycles between endoplasmic reticulum and Golgi to attenuate endoplasmic reticulum stress., *PNAS* 2022 Vol. 119 No. 8 e2102248119.
37. Matthew Neal, Dan Luo, Dilshan S. Harischandra, Richard Gordon, Souvarish Sarkar, Huajun Jin, Vellareddy Anantharam, Laurent Désaubry, Anumantha Kanthasamy, and Arthi Kanthasamy. Prokineticin-2 promotes chemotaxis and alternative A2 reactivity of astrocytes. *Glia.* 2018 October ; 66(10): 2137–2157. doi:10.1002/glia.23467.
38. Kisliouk T, Friedman A, Klipper E, Zhou QY, Schams D, Alfaidy N, Meidan R. Expression pattern of prokineticin 1 and its receptors in bovine ovaries during the estrous 749–758, 2007. doi:10.1095/biolreprod.106.054734.
39. Luzio, J.P., P.R. Pryor, and N.A. Bright. 2007. Lysosomes: fusion and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8:622–632. <https://doi.org/10.1038/nrm2217>
40. Kamila Skieterska, Pieter Rondou, and Kathleen Van Craenenbroeck. Regulation of G Protein-Coupled Receptors by Ubiquitination. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18(5), 923; <https://doi.org/10.3390/ijms18050923>.

Figures Legend

Figure 1: steady state expression and glycosylation profile of PROKR1 and PROKR2.

(A, B) PROKR1 and PROKR2 expression in cell lysate (30 µg) prepared from stably and transiently transfected BHK-21 and COS-7 cells, respectively, was assessed by immunoblotting using the monoclonal anti-HA antibody (mAb). BHK-21 lane contains a lysate of the parental cells. The white and gray arrowheads indicate the highly (H, ~59-61 kDa) and the intermediate (I, ~46 kDa) glycosylated form, respectively. Expression of β-actin, used as load control, was monitored with anti-β-actin mAb.

(C) Glycosidase sensitivity of H- and I-glycosylated PROKR1 and PROKR2. Cell lysates were incubated in the presence or absence of endoglycosidase H (H), peptide-N-glycosidase F (F), and O-glycosidase (O) for 3 h at 37°C. Polypeptides were separated by SDS-PAGE and probed by the anti-HA mAb. H- and I-, and deglycosylated proteins are indicated by white and gray arrowheads, respectively.

(D, G) The level of expression of PROKR1 and PROKR2 at ER (I-form) and post-ER (H-form) compartments was determined by densitometry using Image J. Data represent means \pm SEM (n=3), and are expressed as a mean gray value in an arbitrary unit (A.U).

(E, F) PROKR1 and PROKR2 expression in cell lysates (30 µg) prepared from stably transfected BHK-21 cells was assessed by immunoblotting using the rabbit polyclonal anti-PROKR1 (E) and anti-PROKR2 (F) Ab. The white and gray arrowheads indicate the highly (H, ~61 kDa) and the intermediate (I, ~46 kDa) glycosylated form, respectively. Expression of β-actin, used as load control, was monitored with anti-β-actin mAb.

Figure 2: Cellular localization and cell surface expression of PROKR1 and PROKR2.

(A) PROKR1 or PROKR2 bearing a C-terminal influenza HA stably or transiently expressed in BHK or COS-7 cells, respectively, was visualized by immunostaining with anti-HA mAb and fluorescein-conjugated anti-mouse secondary antibody. Photographs were taken on a Zeiss Axiovert 100 inverted fluorescence microscope, using a Planachromat 63x/1.4 objective. For comparison, immunostaining of parental BHK and COS-7 is shown.

(B) Co-immunofluorescence localization of PROKR1 or PROKR2 with the ER-resident protein; calnexin (CNX) was performed as described in (A). Monoclonal anti-CN X Ab was used for endogenous CNX detection in BHK cells. Merge corresponds to the superposition of green (PROKR) and red color (CNX). The yellow color indicates the presence of co-localization.

(C) Cell surface targeting of PROKR1 and PROKR2. Plasma membrane proteins biotinylated with 1 mg/ml sulfo-NHS-SS-biotin for 60 min at 37°C were isolated by immunoprecipitation using Streptavidin-Sepharose. 10% of the immunoprecipitate was directly loaded. The sulfo-NHS-SS-biotin remains membrane impermeant during the labeling, indicated by the lack of biotinylated I-glycosylated forms. White and gray arrowheads indicate H- and I-glycosylated PROKR, respectively.

(D) The expression level of PROKR1 and PROKR2 at ER (I-form), post-ER (H-form), and cell surface was determined by densitometry using Image J. Data represent means \pm SEM (n=3), and are expressed as the percentage of the remaining H-form, non- and biotinylated PROKR1 designated as 100%.

(F) Different concentrations of PROK1 were used to stimulate the activity of PROKR1 or PROKR2 stably expressed in BHK cells. 96-well plates were used to seed cells for 24h and treat them for 1h30 at 37°C. The activity of PROKRs was evaluated by measuring the accumulation of inositol monophosphate (IP1), a metabolite produced following phospholipase C activation and used as a proxy of Gq activation, using IP-one assay. The ratio of absorbance 665/620 nm emissions was calculated after excitation at 326 nm.

The curve corresponding to the activity was plotted of Ratio 665/620 vs decimal logarithmic of PROK1 concentration.

Figure 3: Transcriptional expression and degradation profile of PROKR1 and PROKR2

(A) The copy number of PROKR1 and PROKR2 mRNAs were quantified by real-time RT-PCR, normalized to the 18S rRNA levels. Data are expressed as mean \pm SE (n = 3). ns; nonspecific.

(B, C) The *in vitro* stability of PROKR1 (B) and PROKR2 (C) was monitored in the presence of cycloheximide (CHX, 100 μ g/ml). Subsequent to the indicated chase, cells were solubilized and equal amounts of protein (30 μ g) were immunoblotted with anti-HA mAb. White and gray arrowheads indicate H- and I-glycosylated PROKRs, respectively.

(D, E) Determination of the half-lives of PROKR1 and PROKR2 H- and I-forms using Image J quantification from immunoblots shown in (B) and (C). Data are expressed as a percent of initial value (0 h).

Figure 4: The role of lysosomal proteases in the metabolism of PROKR1 and PROKR2

(A, C) BHK cells stably expressing PROKR1 or PROKR2 were chased in the presence of CHX (100 μ g/ml) for the indicated time. In parallel, similar experiment has been performed in the presence of NH₄Cl (15 mM), or chloroquine (10 μ M). Following the treatment, the cell extract has been immunoblotted and PROKR1 and PROKR2 detected as described in Figure 1.

(B, D) The remaining H- and I- forms of PROKR1 and PROKR2 after 8h of chase was quantified by densitometry analysis using Image J. Data are expressed as percentages of the initial complex-H- or I-form at 8 h of chase. Mean \pm S.E. (n= 3).

(E) Separation of subcellular organelles on Percoll density gradient. Postnuclear supernatants of PROKR1 and PROKR2-expressing BHK cells were fractionated on a 25% Percoll density gradient as described in Materials and Methods. Organellar distribution was established by the activity of specific marker enzymes (plasma membrane, alkaline phosphatase [A P]; Golgi, mannosidase II [Mann II]; lysosomes, β -glucuronidase [β -gluc], and endoplasmic reticulum, α -glucosidase [α -gluc] as described previously (Benharouga et al., 2001).

(F) Microsomes prepared from PROKR1 and PROKR2-expressing BHK cells were isolated on Percoll density gradient, and fractions 3–13 and 16–21, comprising the majority of endoplasmic reticulum RE) and lysosomes (Ly), respectively, were pooled. Equal amounts (50 μ g) of protein were loaded and probed with anti-HA mAb using ECL. Lys correspond to 10% of the homogenate, before fractionation. White and gray arrowheads indicate H- and I-glycosylated PROKRs, respectively.

Figure 5: The role of proteasome in the degradation of PROKR1 and PROKR2

(A, B) In vitro stability of PROKR1 or PROKR2 stably expressed in BHK cells was monitored in the presence of cycloheximide (CHX, 100 µg/ml) and lactacystin (Lac, 10 µM) or MG132 (MG, 10 µM). Following extraction, PROKR1 or PROKR2 was immunoblotted with anti-HA mAb and detected using ECL. White and gray arrowhead correspond to the H- and I-forms. Expression of beta (β)-actin was monitored with anti-β-actin mAb.

(C, D). Remaining H- and I-forms of PROKR1 and PROKR2 was evaluated using densitometry analysis of immunoblots. Data are expressed as percentages of the initial complex-glycosylated H- or I-form at 8 h of chase. Mean ± S.E. (n= 3).

Figure 6: Residence time of cell surface biotinylated PROKR1 and PROKR2

(A, C) After cycloheximide chase for the indicated time, cell surface resident proteins were biotinylated as described I, Figure 2C. Biotinylated proteins were isolated by immunoprecipitation using Streptavidin-Sepharose. The sulfo- NHS-SS-biotin remains membrane impermeant during the labeling, indicated by the lack of biotinylated I-glycosylated forms. White arrowhead indicate H-glycosylated PROKR2s.

(C) Determination of the half-lives of plasma membrane resident PROKR1 and PROKR2 H-form by densitometry using Image J quantification. Data are expressed as a percent of initial value (0 h). Mean ± S.E. (n= 3).

Figure 7: In situ protease susceptibility and thermoaggregation of PROKR1 and PROKR2

(A) Microsomes isolated using hypotonic buffer, were subjected to limited proteolysis at the indicated concentrations of trypsin for 15 min at 4 °C. Samples were immunoblotted with the anti-HA mAbs and visualized with ECL.

(B) PROKR1 and PROKR2-expressing cells were solubilized in 2× Laemmli sample buffer (LSB), and samples were incubated at the indicated temperature for 5 min. Aggregates were sedimented, and PROKR1 or PROKR2 remaining in the supernatant were visualized as indicated in Figure 5A. Where indicated, heat denaturation was performed in 2×LSB supplemented with 8M urea.

Figure 8: *In vitro* thermostability of the H- and I-forms of PROKR1 and PROKR2

(A, B) Temperature-dependent degradation of the H- and I-forms of PROKR1 and PROKR2 using cycloheximide chase for the indicated time and temperature (26° and 40°C). Samples were immunoblotted with the anti-HA mAbs and visualized with ECL.

(C, D) Remaining H- and I-forms of PROKR1 and PROKR2 was evaluated using densitometry analysis of immunoblots. Data are expressed as percentages of the initial complex-glycosylated H- or I-form at 8 h of chase. Mean ± S.E. (n= 3).

Supplementary figures

Figure S1: Antagonization of PROK1 effect using PKRA505

Different concentrations of PKRA505, a specific antagonist of PROKR2 receptor, were used to inhibit the activity of PROKR1 or PROKR2 in the presence of 25 nM of PROK1.

96-well plates were used to seed cells for 24h and treat them for 1h30 at 37°C with the indicated concentration. The activity of PROKR2s was evaluated by measuring the accumulation of inositol monophosphate (IP1), a metabolite produced following phospholipase C activation and used as a proxy of Gq activation, using IP-one assay. The ratio of absorbance 665/620 nm emissions was calculated after excitation at 326 nm. The curve corresponding to the activity was plotted of Ratio 665/620 vs decimal logarithmic of PKRA505 concentration.

Figure S2: PROKR1, but not PROKR2, is involved in cell migration

(A) Representative photographs of migration of BHK cells expressing PROKR1 or PROKR2. Parental BHK were used as a control. Photographs were taken at 0 and 24h. Migration was assessed in the absence and presence of 25nM of PROK1.

(B) Percentage of wound closure BHK cells in the presence and absence of 25nM of PROK1 for the indicated time. Data are expressed as mean \pm SE (n=4). Values with an asterisk are significantly different from the corresponding control (P < 0.05).

Figure S3: PROKR1, but not PROKR2, affect BHK cells proliferation in the presence of PROK1

Proliferation of BHK cells stably expressing PROKR1 or PROKR2 in the presence or absence of 25 nM of PROK1 are reported as an arbitrary unit (A.U) of the DAPI fluorescent positive cells. Data are expressed as mean \pm SE (n=4). Values with an asterisk are significantly different from the corresponding control (P < 0.05).

Figure S4: Cellular co-localization of Lamp1 with PROKR1 and PROKR2

Co-immunofluorescence localization of PROKR1 or PROKR2 with the lysosome-resident protein; Lamp1 was performed as described in Figure 2B. Monoclonal anti-Lamp1 Ab was used for endogenous Lamp1 detection in BHK cells. Merge corresponds to the superposition of green (PROKR2s) and red color (Lamp1). The yellow color indicates the presence of co-localization.

Photographs were taken on a Zeiss Axiovert 100 inverted fluorescence microscope, using a Planachromat 63x/1.4 objective.

Figure 1

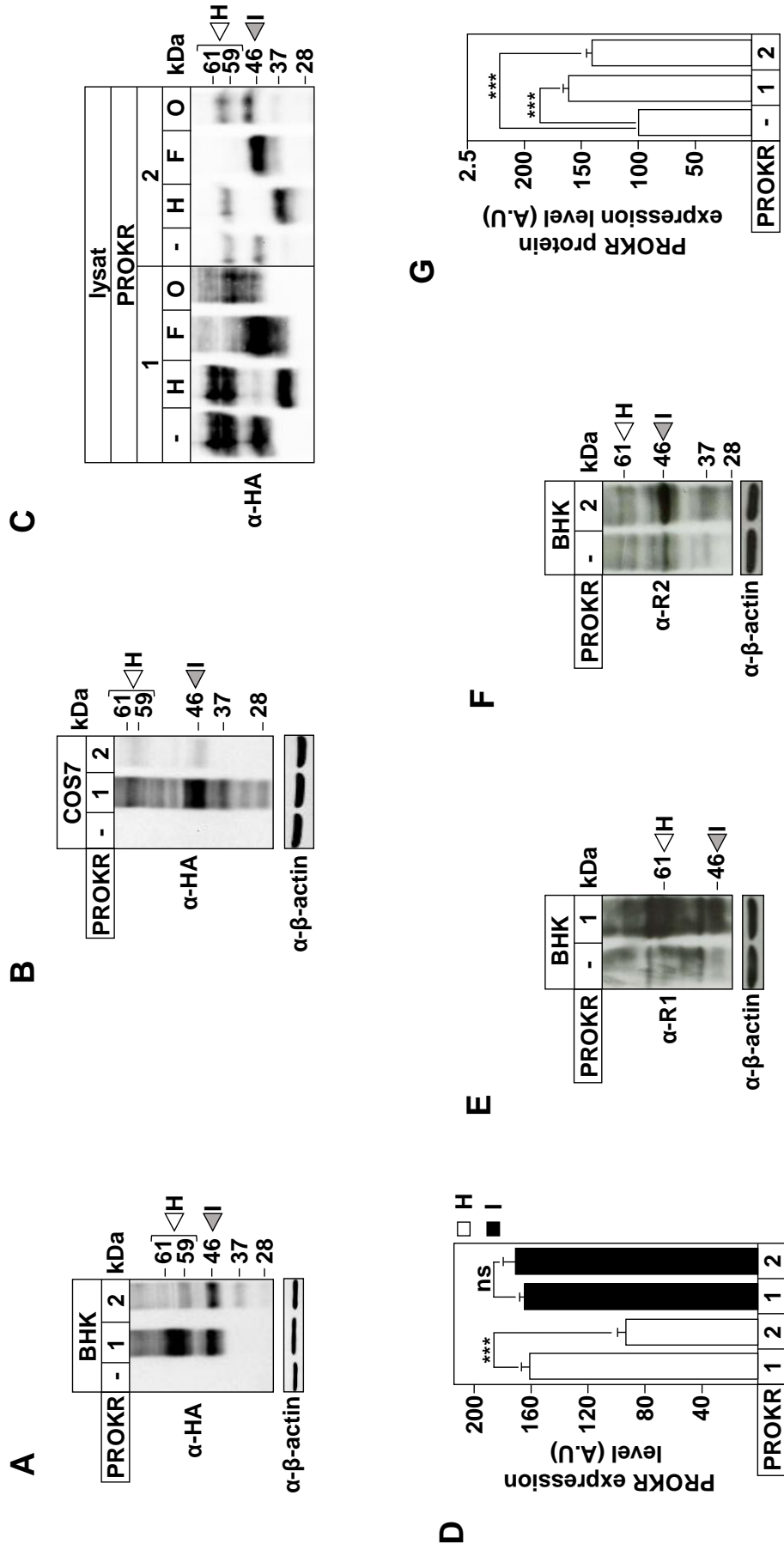


Figure 2

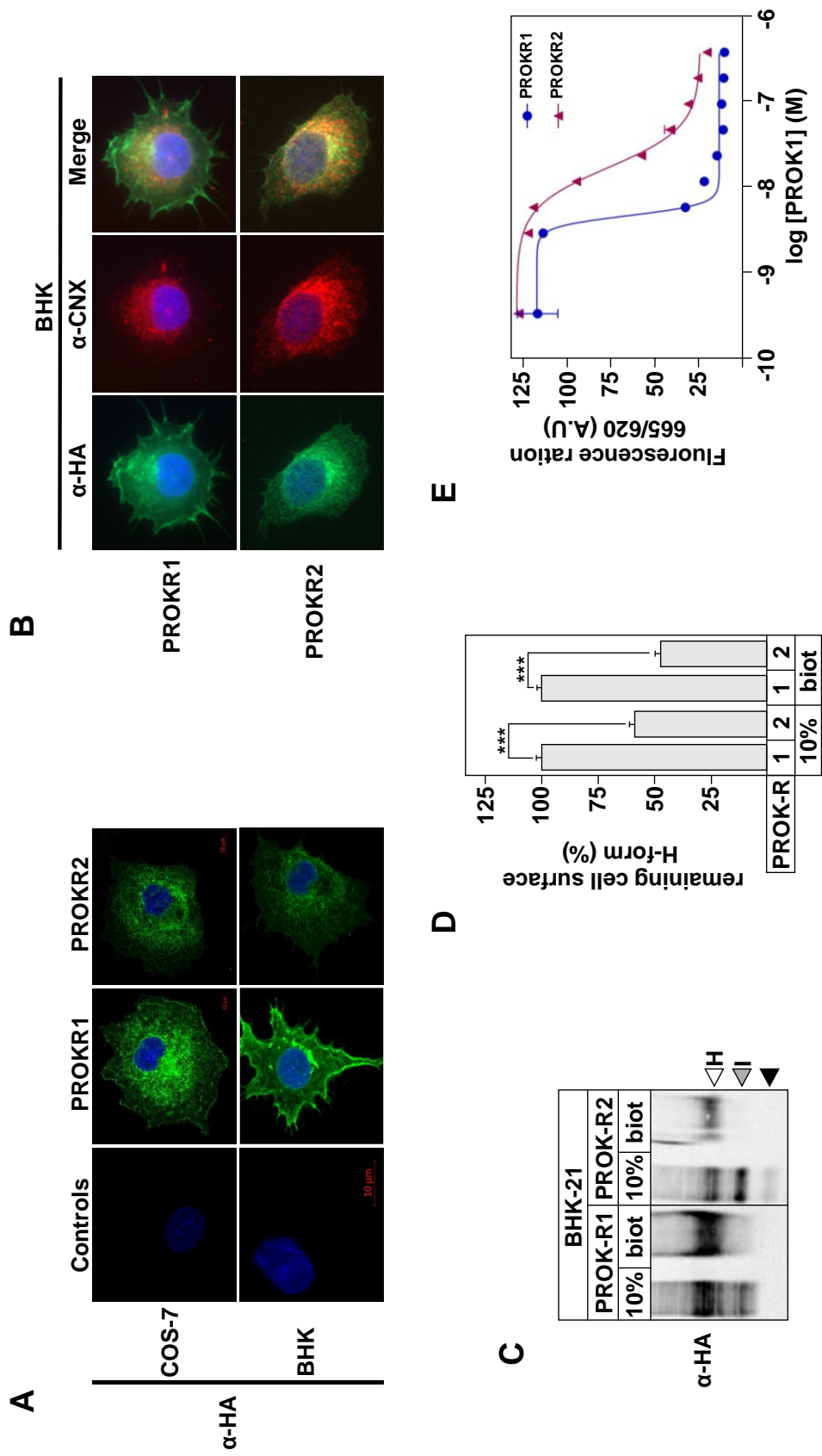


Figure 3

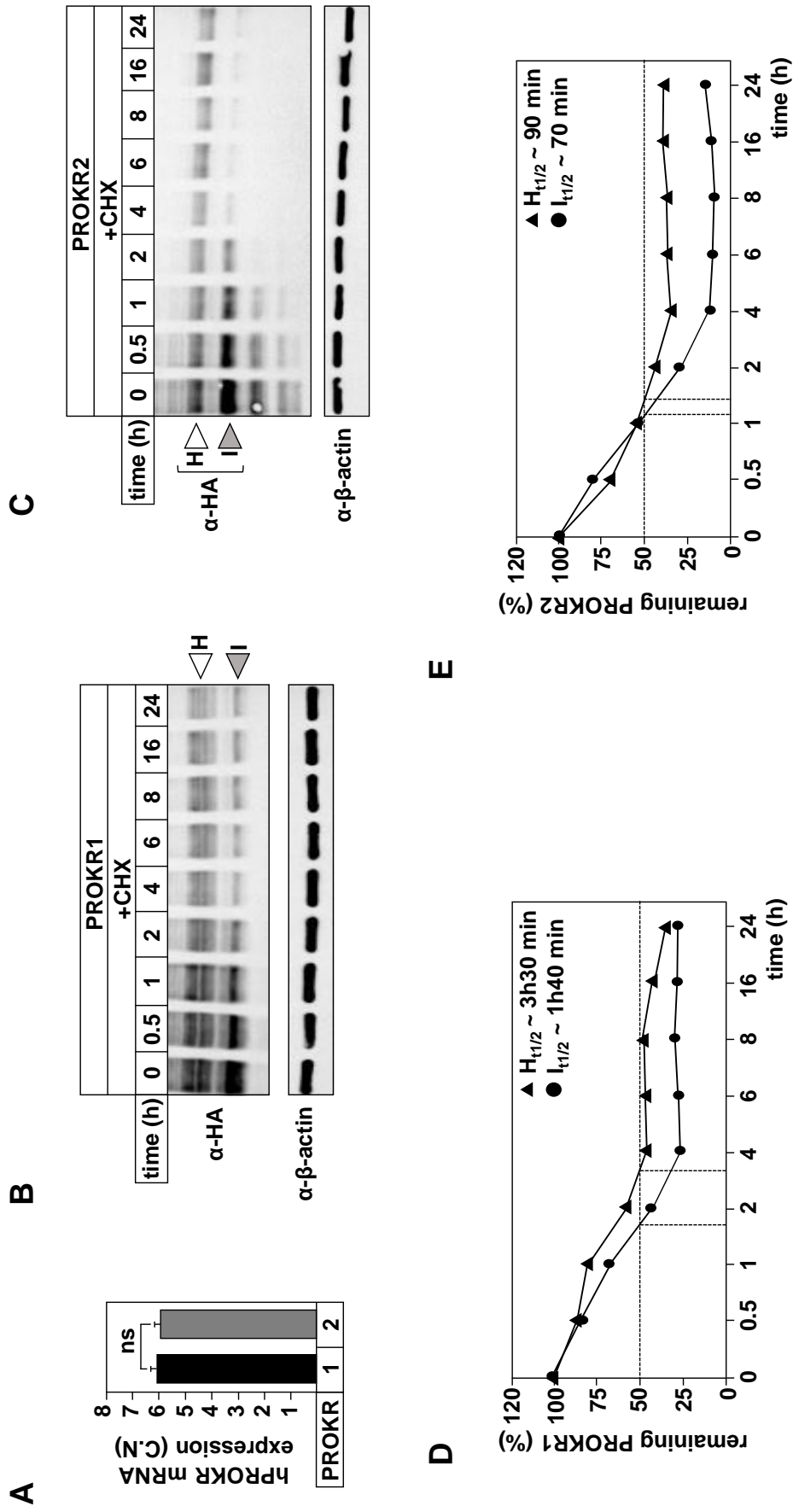


Figure 4

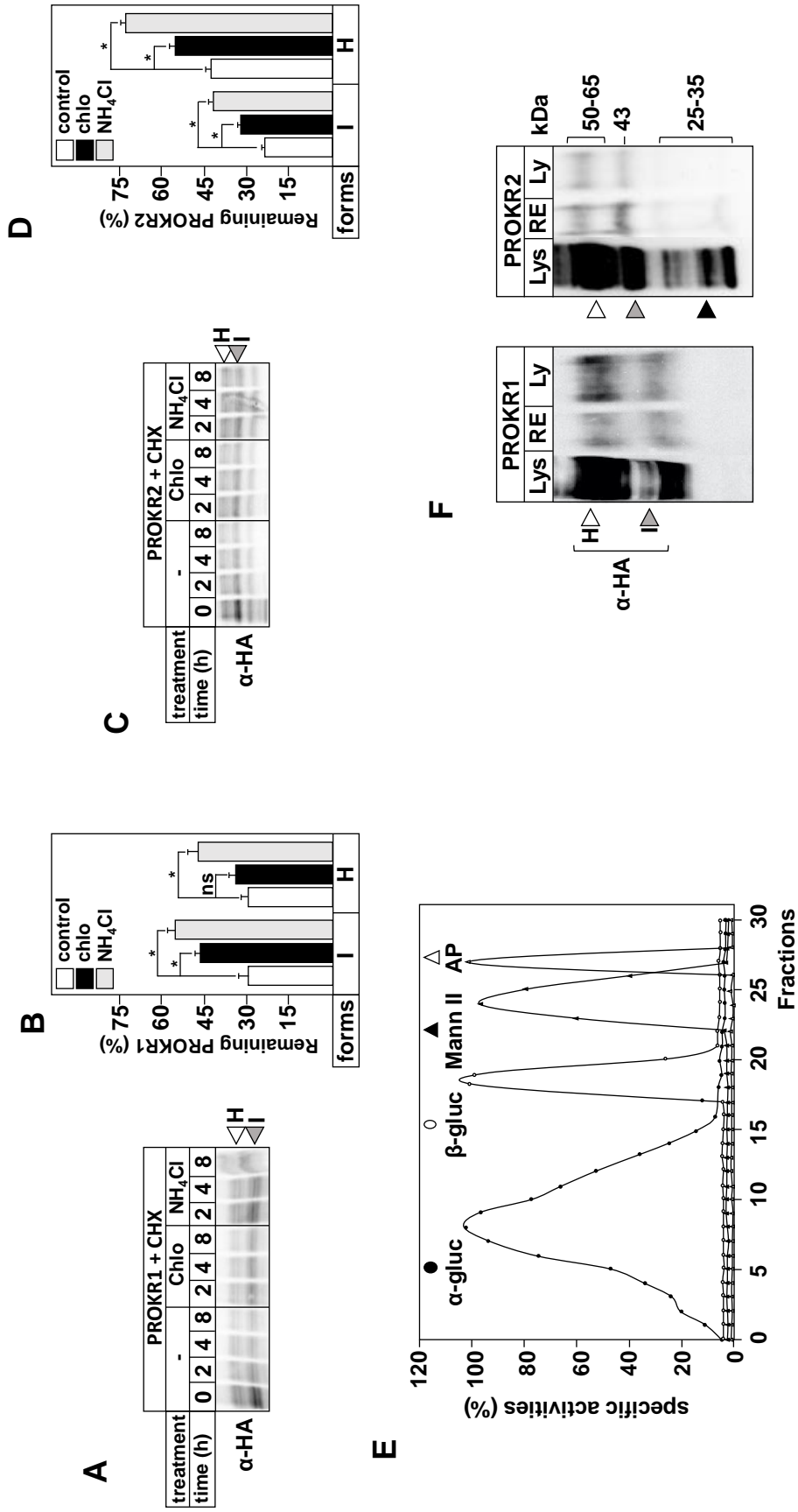
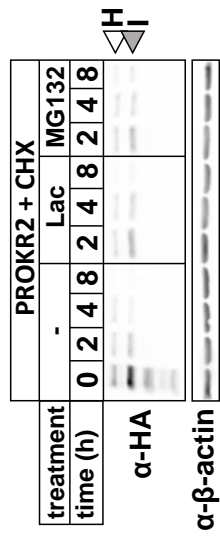


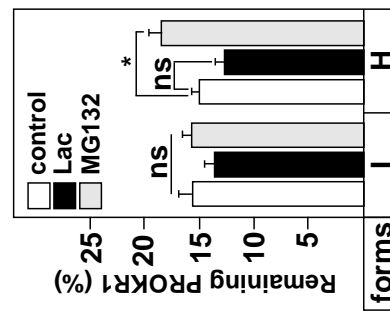
Figure 5



B



C



D

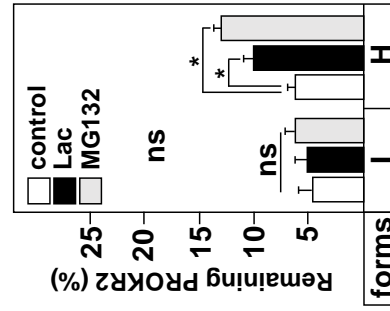


Figure 6

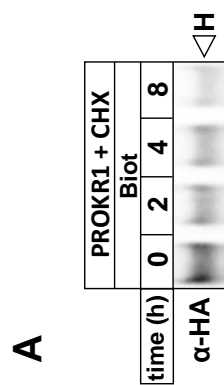
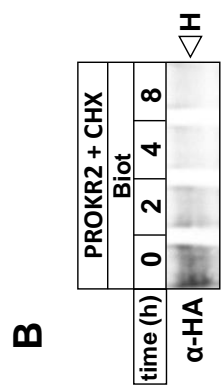
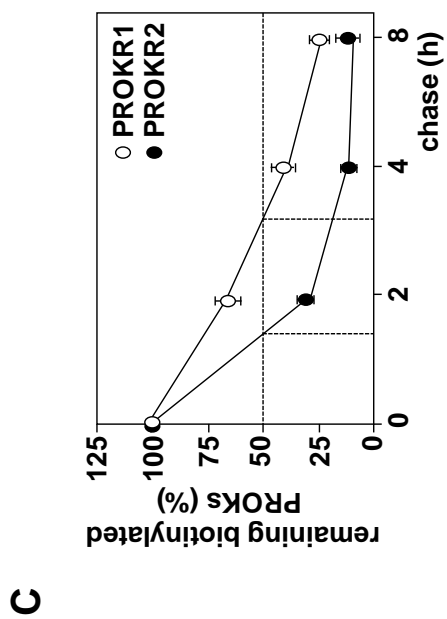


Figure 7

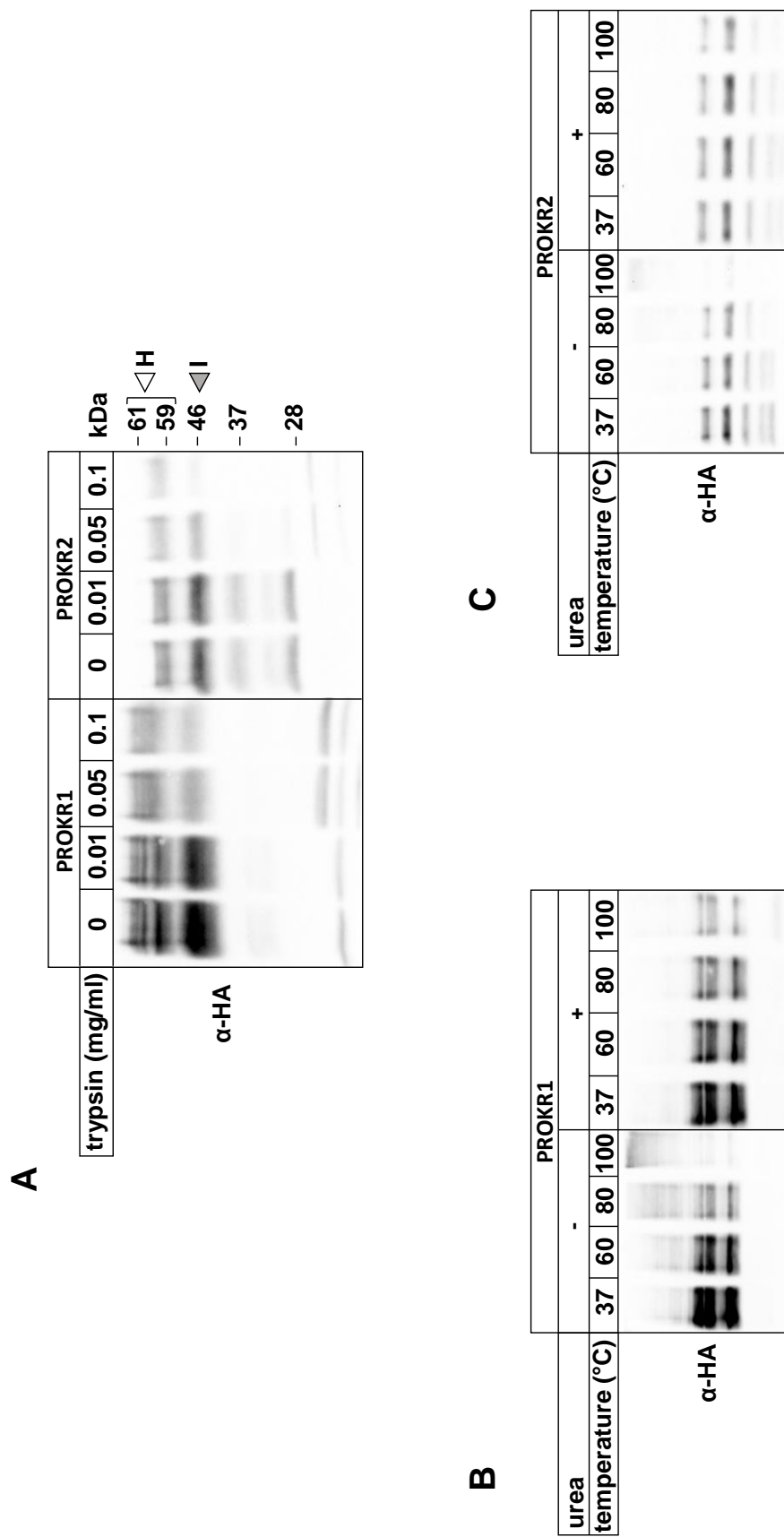


Figure 8



Figure S1

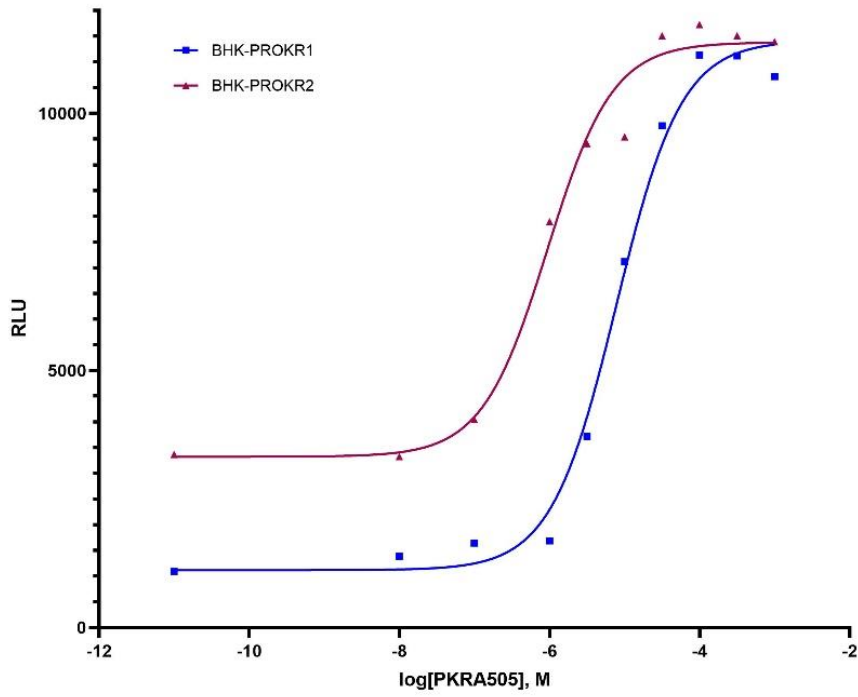
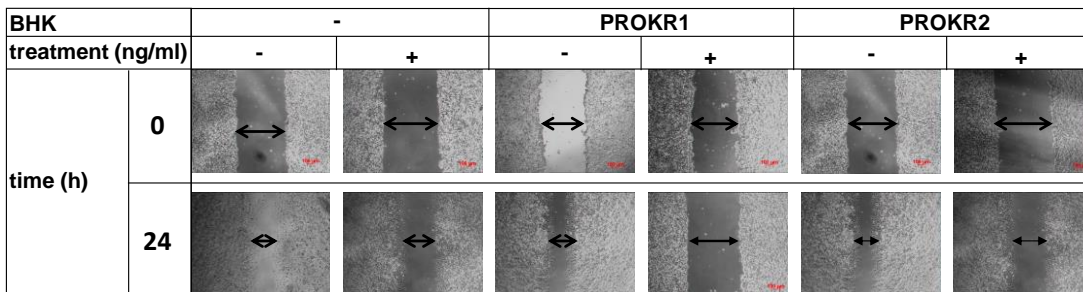


Figure S2

A



B

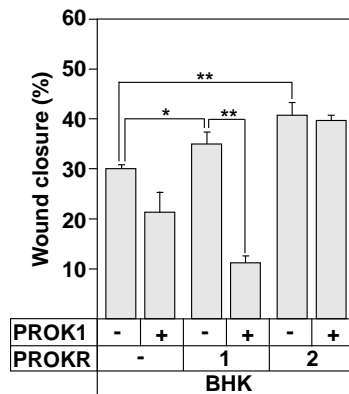


Figure S3

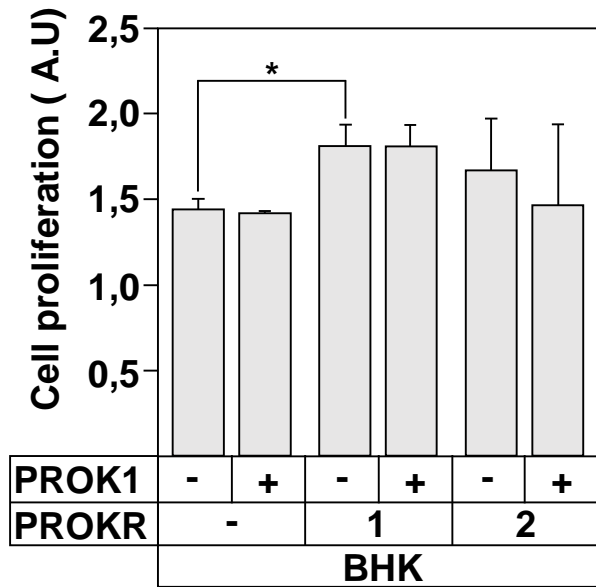
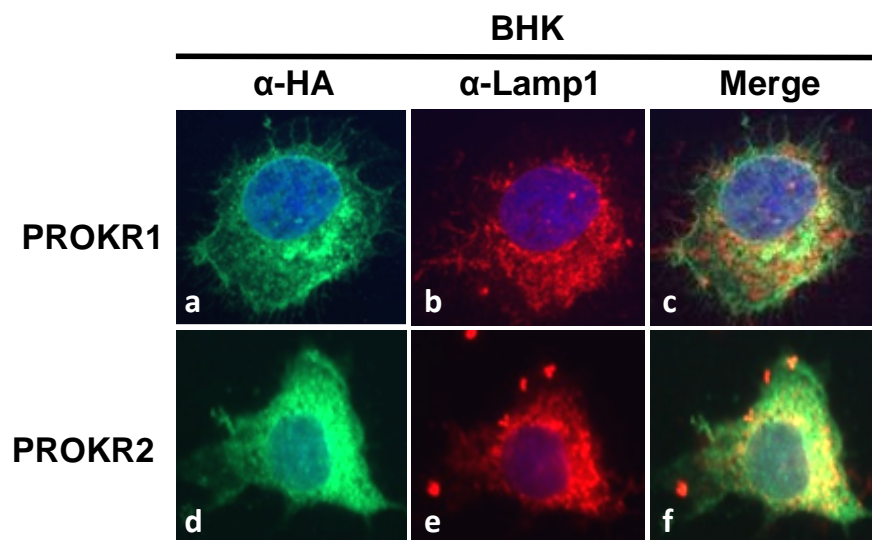


Figure S4



Discussion

Plusieurs groupes, y compris le nôtre, ont rapporté des modèles d'expression et de régulation différentiels entre PROKR1 et PROKR2, et ont supposé qu'ils résultaient de régulation transcriptionnelle, traductionnelle et/ou post-traductionnelle. Dans cette étude nous sommes intéressés à la caractérisation moléculaire et cellulaire de ces récepteurs en ne ciblant que les processus post-traductionnels.

- ✓ **Pour s'affranchir de la régulation transcriptionnelle, nous avons cloné les deux ADNc codants pour PROKR1 et PROKR2 dans un plasmide recombinant sous promoteur pCMV (promoteur viral).**
- ✓ **Le modèle d'expression a montré deux bandes correspondantes aux formes de glycosylation suivantes : complexes (H) et intermédiaire (I).**
- ✓ **Nous avons démontré que PROKR1 et PROKR2 subissent une N-glycosylation. La O-glycosylation serait propre à PROKR1. Ceci s'explique par la présence des sites de N-glycosylation au niveau de la partie extracellulaire des deux récepteurs, alors que seul PROKR1 possède les sites de la O-glycosylation.**
- ✓ **Les résultats obtenus ont été validés dans une lignée cellulaire différente représentée par les COS-7 et en utilisant un plasmide d'expression transitoire : le pcDNA3.1.**
- ✓ **Dans notre système, les deux récepteurs étaient fonctionnels et répondaient au ligand de manière dose-dépendante. L'activité médiée par ces récepteurs était inhibée en présence de PKRA505, un antagoniste de PROKR1 et PROKR2.**
- ✓ **Le niveau d'expression de PROKR2 était 50% plus faible que celui de PROKR1, qui s'expliquerait par une instabilité membranaire de PROKR2.**
- ✓ **PROKR1 serait deux fois plus stable à la membrane plasmique ($t_{1/2} \sim 3h30$) que PROKR2 ($t_{1/2} \sim 1,5h$).**
- ✓ **La sensibilité de PROKR2 à la dégradation a également été mise en évidence pour la forme résidente à la membrane, confirmant que la baisse d'expression de PROKR2 par rapport à PROKR1 serait intrinsèque à la protéine.**
- ✓ **L'immunolocalisation a confirmé que l'expression de PROKR2 au niveau de la membrane plasmique est plus faible comparée à celle de PROKR1.**
- ✓ **La diminution de la demi-vie de PROKR2 par rapport à PROKR1 ne serait pas la conséquence d'une instabilité de son ARNm, ni d'un défaut de trafic de la protéine ou de son insertion à la membrane plasmique, mais résulterait d'une élimination plus rapide par une voie dépendante du lysosome.**

- ✓ Enfin, la déstabilisation de la structure de PROKR2 pourrait affecter son processus de repliement, ce qui augmenterait la proportion de molécules non natives, susceptibles d'être protéolysées.
- ✓ Sur la base de la sensibilité à la trypsine, du test de thermo-agrégation et de la diminution de la thermostabilité *in vitro* de PROKR1 et PROKR2, nous avons conclu que la déstabilisation structurelle de la forme native de PROKR2 serait induite par la perturbation des interactions inter et intra-domaines.

Conclusions

Dans ce travail, nous avons amené des preuves convaincantes indiquant que :

- La diminution des niveaux d'expression et du temps de résidence de la forme H de PROKR2 par rapport à PROKR1, pourraient expliquer la différence d'expression à la membrane et d'activation des deux récepteurs dans différents tissus.
- Le degré de repliement des deux récepteurs pourrait être à l'origine des différences observées.

Perspectives

- Les queues N- et C-terminales pourraient conférer de la stabilité aux PROKRs matures via plusieurs mécanismes ou une combinaison de ceux-ci qui restent à caractériser.
- L'oligomérisation pourrait constituer un processus important dans la stabilisation des PROKRs au niveau de la membrane.
- Les ligands PROK1 et PROK2 pourraient également jouer un rôle dans la stabilité membranaire des deux récepteurs.

ARTICLE 3

Introduction

La famille des prokinéticines est composée de quatre membres : 2 ligands (PROK1 et PROK2) et 2 récepteurs (PROKR1 et PROKR2). Ces derniers font partie de la famille des RCPGs et possèdent 87% d'identité¹. Leurs différences sont principalement localisées au niveau des parties N-ter et C-ter. Les parties N-ter des deux récepteurs possèdent uniquement 63% d'identité. PROKR1 possède 9 acides aminés de plus sur l'extrémité N-ter par rapport à PROKR2. Les parties C-ter quant à elles possèdent 76% d'identités (Tableau 1).

Domaine du récepteur	Identité	Similarité
N-ter	63%	74%
TMS	92%	94%
ICLs	91%	94%
ECLs	96%	96%
C-ter	76%	88%
Total	87%	92%

Tableau 1 : Identité et similarité des différents domaines de PROKR1 et PROKR2

Les pourcentages d'identités et de similarités ont été définis par Protein Blast (NCBI)

Les parties N-ter et C-ter permettent aux RCPGs d'interagir avec plusieurs protéines directement impliquées dans la médiation de la réponse physiologique finale. En effet, la partie N-ter est impliquée dans la liaison du ligand à son récepteur^{2,3}. Chez les PROKRs, et selon le modèle à deux sites développé chez les chimiokines, la partie N-ter semble déterminante dans la première phase de reconnaissance du ligand². De plus, elle permet la discrimination entre les ligands PROK1 et PROK2 β ^{4,5}. La partie C-ter, est plus impliquée dans l'interaction des RCPGs avec les différents partenaires de signalisation comme les protéines G ou la β -arrestine. Ces protéines sont essentielles à la signalisation intracellulaire et dans les processus d'internalisation. Chez les récepteurs aux prokinéticines, des mutations identifiées dans le syndrome de Kallmann impactent le repliement des PROKRs et empêchent soit la fixation du ligand (mutations en N-ter) soit la signalisation intracellulaire (mutations en C-ter)⁶. Par ailleurs, ces extrémités semblent porter plusieurs motifs impliqués dans le trafic du récepteur vers la membrane plasmique⁷. Cependant, peu de données sont disponibles quant aux rôles de ces motifs dans l'activation, le trafic intracellulaire et la stabilité membranaire. Par ailleurs, ces extrémités sont également impliquées dans le processus de l'oligomérisation des RCPGs, influençant ainsi la signalisation et l'adressage de ces protéines^{8,9}.

Pour les PROKRs, le rôle des parties N et C-ter dans ce processus est peu connu. Une homodimérisation de PROKR2 a été mise en évidence par une interaction de type échange de domaines mettant en jeu les TM5 et 4 et pas les extrémités N-ter et C-ter¹⁰. Dans une récente étude, nous avons démontré que malgré une forte identité (plus de 87% entre PROKR1 et PROKR2), il existe une différence d'expression post-traductionnelle de ces récepteurs. Cette différence est associée à une instabilité membranaire du PROKR2 qui est rapidement dégradé par la voie lysosomale (voir Article 2).

Nous avons ainsi émis l'hypothèse que les parties N- et C-ter, si différentes entre les deux récepteurs, peuvent être impliquées dans la différenciation des récepteurs sur un plan fonctionnel. Pour étudier l'implication de ces parties dans la biosynthèse, le trafic intracellulaire, l'insertion et la stabilité membranaire, l'activation et la signalisation intracellulaire, et dans le processus d'oligomérisation, nous avons réalisé plusieurs constructions moléculaires où les deux parties N- et C-ter ont été permutées au niveau des deux récepteurs. Dans ce travail, nous avons pu évaluer l'expression basale, la localisation cellulaire, la glycosylation et le niveau de dimérisation de nos constructions. Nos premiers résultats démontrent l'importance de ces deux parties dans les processus d'adressage et de dimérisation.

Matériels et Méthodes

Construction des plasmides

Les ADN codants pour nos différentes constructions ont été synthétisés et insérés dans le plasmide pcDNA-3.1 entre les sites de restriction Not-I et Xho-1 (Genscript).

Les régions 5' et 3' des différentes séquences correspondant à l'ADNc de PROKR1 ont été flanquées par les séquences codantes pour les étiquettes c-Myc et HA (hémagglutinine), respectivement. Pour les constructions PROKR2, les séquences codantes pour les deux étiquettes ont été inversées. Comme contrôle, nous avons utilisé des constructions PROKR1 et PROKR2 possédant uniquement l'étiquette HA du côté 3'.

Par la suite, l'ensemble de nos constructions ont été clonées dans le plasmide pNut pour les exprimer stablement dans les cellules BHK-21 après sélection au méthotrexate (200µM). Les différentes constructions sont décrites dans le Tableau 2 et Figure 1.

Tableau 2	
Nom complet	Abréviation
PROKR1-HA	R1HA
PROKR2-HA	R2HA
Myc-PROKR1-HA	R1dt
HA-PROKR2-Myc	R2dt
Myc-PROKR1 fused to N-terminal of PROKR2-HA	R1N2
Myc-PROKR1 fused to the C-terminal of PROKR2-HA	R1C2
HA-PROKR2 fused to N-terminal of PROKR1-Myc	R2N1
HA-PROKR2 fused to C-terminal of PROKR1-Myc	R2C1

Tableau 2: Nomenclature des différentes constructions de PROKR1 et PROKR2

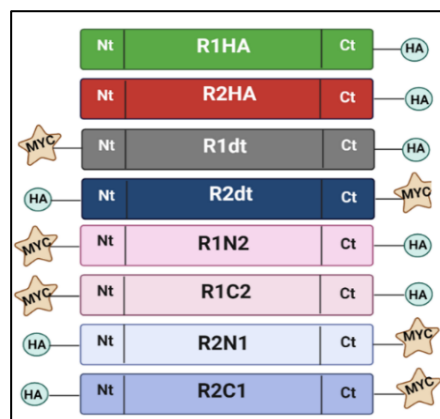


Figure 1 : Constructions PROKR1 et PROKR2

Lignées cellulaires

Nous avons utilisé la lignée cellulaire BHK-21 pour exprimer de manière stable les différentes constructions que nous avons générées. Les transfections ont été réalisées en utilisant le FuGENE6 (Promega, France). Les cellules BHK-21 ont été cultivées dans du DMEM/F-12 supplémenté avec 5% de sérum fœtal bovin (FBS) à 37°C sous 5% de CO₂. La sélection des clones a été réalisée avec 200µM de méthotrexate 48h après la transfection. Après deux semaines de sélection, les cellules résistantes ont formé ~100 clones individuels. Nous avons fait le choix de ne pas travailler sur des clones isolés pour éviter de potentiels effets sur la biosynthèse, le trafic, la stabilité de la membrane plasmique et la fonction de PROKR1 et PROKR2.

Anticorps et réactifs

Les anticorps (Abs) ont été obtenus auprès des sources suivantes : Ab monoclonal anti-HA (Biolegend, France (16B12)) et anti-Myc (Ozyme, France (9B11)). Les anticorps secondaires anti-souris et anti-lapin proviennent de la société Covalab (France). L'endoglycosidase H (Endo H), la peptide-N-(N-acétyl-β-glucosaminy) asparagine amidase (PNGase F), et la neuraminidase O-glycosidase ont été fournies auprès de New England Biolabs (France).

Immunolocalisation

La localisation par immunofluorescence des différentes constructions a été réalisée comme décrit précédemment¹¹ sur des cellules fixées par 4% paraformaldéhyde et ont été perméabilisées. Les récepteurs PROKR1 et PROKR2 marqués avec les étiquettes HA et Myc ont été visualisés en utilisant un anticorps monoclonal anti-HA ou anti-Myc. La réaction anticorps-antigène a été révélée par des anticorps anti-souris conjugués à Alexa Fluor 488 (ThermoFisher Scientific, France). Les images ont été obtenues à l'aide du microscope à fluorescence Zeiss confocal ou Zeiss apotome avec un objectif 63x à immersion à l'huile.

Dégradation métabolique de PROKR1 et PROKR2

Les taux de biosynthèse, de dégradation et de trafic intracellulaire de PROKR1 et PROKR2 exprimés de manière stable dans des cellules BHK-21 ont été évalués en utilisant 100µg/ml de cycloheximide (CHX), un inhibiteur de la traduction eucaryote, pendant le temps indiqué. Les extraits protéiques ont été préparés à l'aide du tampon RIPA (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 1% Triton X-100, 0,1% SDS, et 0,5% désoxycholate de sodium, pH 8.0) complété par des inhibiteurs de protéases (PMSF 100mM, Leupeptine/pepstaine 20 µM). Les protéines ont été séparées sur un gel 10% SDS-polyacrylamide et transférées sur une membrane de nitrocellulose. PROKR1 et PROKR2 ont été identifiées en utilisant l'anticorps anti-HA ou anti Myc et le kit ECL (Biorad, France).

Digestion par les glycosidases

Pour distinguer les modifications oligosaccharidiques liées à PROKR1 ou PROKR2, les lysats cellulaires ont été incubés à 37°C pendant 2 heures avec la O-glycosidase-Neuraminidase, l'endoglycosidase H ou la N-glycosidase F peptidique. Les digestions ont été réalisées selon les recommandations du fournisseur (New England Biolabs). Le déplacement des récepteurs déglycosylés a été visualisé par technique des immunoempreintes (Western blot) à l'aide d'Ab anti-HA.

ELISA de la surface cellulaire

Un ELISA sur cellules adhérentes, non fixées et non perméabilisées a été réalisé en utilisant les anticorps anti-HA ou anti-Myc selon la méthode décrite précédemment¹².

Test du phosphate d'inositol (IP1)

Les cellules BHK-21 parentales ou exprimant de manière stable les récepteurs PROKR1 ou PROKR2 ont été ensemencées dans les plaques 96 puits (~40 000 cellules). Une gamme de concentration de l'agoniste PROK2 a été constituée (Abcam, France). La PROK2 a été diluée dans le tampon de stimulation (inclus dans le kit) et a été ajoutée sur les cellules pendant 1h à 37°C.

Les cellules ont été ensuite lysées et l'IP1 accumulé a été mesuré à l'aide du kit IP-One (Cisbio) en suivant les instructions du fabricant. Les lectures ont été effectuées avec un lecteur de plaques TECAN Spark.

Électrophorèse et immunoempreintes

Les cellules BHK exprimant de manière stable les différentes constructions ont été lysées dans un tampon RIPA contenant des inhibiteurs de protéase (Sigma Aldrich). Les protéines ont été dénaturées dans du tampon Laemmli (LSB) et séparées sur gel SDS-acrylamide 10%.

L'immunoempreinte a été réalisée en utilisant un anticorps monoclonal anti-HA ou anti-Myc. Les Abs primaires ont été visualisés par des Abs secondaires anti-souris conjugués à la peroxydase (HRP) et par chimiluminescence (ECL).

La détection de la sous-unité β -actine a été réalisée avec les anticorps monoclonaux de souris (Covalab, France). L'acquisition et l'analyse des résultats ont été réalisées en utilisant le système d'imagerie iBright (Thermo Fisher Scientific, France) et ImageJ 1.53, respectivement.

Analyse statistique

Aucune analyse statistique n'a été effectuée dans ce travail. Le nombre d'expériences indépendantes ne dépassant pas 2.

Résultats

Profil électrophorétique et expression basale

L'expression de toutes les constructions et leur mobilité électrophorétique ont été évaluées par immunoempreintes (Fig. 3A). Les résultats ont été quantifiés par densitométrie après normalisation avec l'expression de la β -actine en utilisant Image J (Fig. 3B). Les premiers résultats montrent que toutes les constructions expriment une bande d'~43 kDa représentant le poids moléculaire de la protéine codée par les gènes *Prokr1* ou *Prokr2* (Fig. 3A). La bande de 43 kDa, indiquée par la flèche noire, correspond à la forme intermédiaire glycosylée (I) (Fig. 3A). De plus, les bandes exprimées entre 50-65kDa, indiquées par la flèche blanche, représentent la forme hautement glycosylée (H) alors que les bandes détectées entre 25-35kDa représentent les formes issues du processus de dégradation intermédiaire (Fig. 3A).

Comme observé précédemment (voir papier 2), la PROKR1 portant l'étiquette HA au niveau C-ter (R1-HA) est fortement exprimée par rapport à PROKR2-HA C-ter (R2-HA) (Fig. 3A, lignes 2 et 3). Aucun signal n'a été détecté dans les cellules BHK-21 parentales (Fig. 3A, ligne 1).

Les profils électrophorétiques de R1-HA et R2-HA semblent être différents. R1-HA présente une bande protéique de haut poids moléculaire autour de 65kDa, qui n'a pas été détectée dans R2-HA (figure 3A, lignes 2 et 3).

R2-HA exprime, par contre, des bandes plus basses entre 25-37kDa qui peuvent être générées par le processus de dégradation intracellulaire (Fig. 3A, lignes 2 et 3).

L'introduction de l'étiquette Myc dans la région flanquante 5' du récepteur HA-PROKR1 pour générer les constructions à double étiquette (R1dT) n'a pas affecté son profil électrophorétique (Fig. 3A, ligne 4). Par contre, l'insertion du tag Myc au niveau de la partie C-ter dans la construction PROKR2 (R2dT) a modifié le profil électrophorétique de ce récepteur (Fig. 3A, ligne 5). La forme H a été détectée, mais à un niveau très faible par rapport à PROKR2-HA (Fig. 3A, ligne 3). Par contre, la forme I est bien exprimée pour la construction R2dT (Fig. 3A, ligne 5). Pour les expériences de permutation, nous avons utilisé les PROKR1 et PROKR2 doublement étiquetées. La substitution de la partie N-ter de PROKR1 par celle de PROKR2 (R1N2) a montré que le récepteur devenait plus sensible à la dégradation en présentant le même profil électrophorétique que R2HA, mais sans la forme H (Fig. 3A, ligne 6). Par contre lorsqu'on a substitué la partie C-ter de PROKR1 avec celle de PROKR2 (R1C2), les formes H et I sont fortement exprimées (Figure 3A, ligne 7). Les mêmes expériences ont été réalisées

pour PROKR2 où sa partie N-ter et C-ter ont été substituées par celles du récepteur PROKR1 ; R2N1 et R2C1. Cette opération a impacté le niveau d'expression de la forme H du PROKR2, mais a permis d'augmenter celle de la forme I pour R2N1 (Fig. 3A, ligne 8 ; 9). La quantification par densitométrie en utilisant Image J nous a permis de confirmer les résultats d'immunoempreintes (Fig. 3B et 3C).

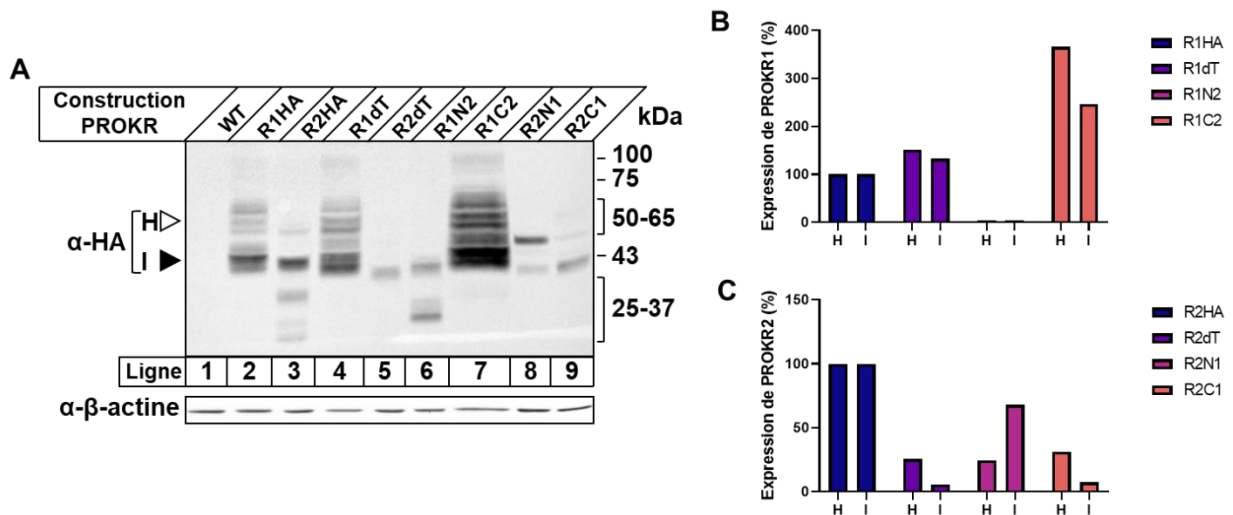


Figure 3 : Expression basale et profil électrophorétique des différentes constructions

(A) Des quantités égales de protéines extraites des cellules BHK-21 exprimant de manière stable les constructions PROKR1 ou PROKR2 (voir Matériaux et Méthodes) ont été séparées par un gel 10% SDS-PAGE, transférées sur la membrane de nitrocellulose, et immunodétectées en utilisant des anticorps anti-HA et anti-mouse-HRP. Les flèches blanches et noires correspondent aux formes hautement (H) et intermédiaire (I) glycosylées, respectivement. B et C. Quantification à l'aide du logiciel Image-J des formes H et I des constructions PROKR1 (B) et PROKR2 (C).

Nous avons émis l'hypothèse que l'instabilité des protéines pourrait expliquer les variations dans les niveaux d'expression entre les différentes constructions. Pour cela, nous avons comparé les demi-vies ($t_{1/2}$) des différentes constructions de PROKR1 et PROKR2 (Fig. 4).

L'incubation des cellules en présence de 100 μ g/ml de cycloheximide (CHX) pendant les temps indiqués, a permis d'observer une forte différence entre les demi-vies de R1dT et R1C2 (Fig. 4A). En effet, la forme H de R1C2 a une $t_{1/2}$ ~ 4,5h par rapport à R1dT ($t_{1/2}$ ~ 1,5h), expliquant ainsi la forte expression observée en Western blot (Fig. 3A, ligne 7). L'insertion de l'étiquette Myc dans les constructions PROKR2-HA (R2dT) impacte significativement la demi-vie de la forme H du récepteur PROKR2 ($t_{1/2}$ ~ 40min) par rapport à la construction R2HA ($t_{1/2}$ ~ 1,5h). Ces résultats confirment ceux obtenus par Western blot.

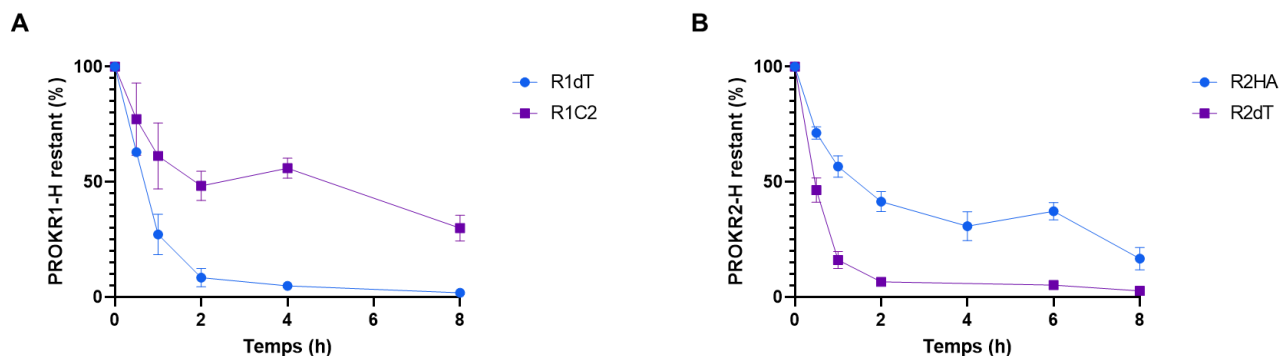


Figure 4 : Etude du profil de dégradation des constructions PROKR1 et PROKR2.

Les cellules BHK ont été traitées avec la CHX à différents temps (0, 0.5, 1, 2, 4, 8h) et leurs niveaux de dégradations ont été quantifiés (A) Quantification de la dégradation de la forme H de R1dT et R1C2 (B) Quantification de la dégradation de la forme H de R2HA et R2dT.

Glycosylation

Nous avons placé des étiquettes (HA ou Myc) au niveau de la partie N-ter du PROKR1 ou PROKR2. Connaissant l'importance de cette région dans le processus de glycosylation, nous avons entrepris la caractérisation du profil de glycosylation des constructions PROKR1 et PROKR2. Pour le test de déglycosylation, nous avons utilisé trois enzymes ; l'endoglycosidase H (endo H, H), la PNGase F (endoF, F) et la O-glycosidase (O). Toutes les constructions ont été traitées séparément avec les trois enzymes (Fig. 5A).

L'ensemble des constructions non traitées, sauf R1N2 (Fig. 5D), ont montré un profil de glycosylation identique avec une forme I- à ~43kDa et une forme H-glycosylée autour de 50-65kDa (Figures 5A-G). Lors du traitement avec EndoH (H), la forme I est déglycosylée pour donner naissance à une forme d'~37kDa (Fig. 5A).

Ce processus a été observé pour toutes les constructions sauf R1N2 (Figures 5D). Comme prévu, le traitement avec PNGaseF (F) a clivé le core-glycosylé engendrant la forme I pour toutes les constructions (Figs. 5A-G), sauf pour R1N2 (Fig. 5D). Pour la O-glycosidase (O), une très légère déglycosylation a pu être visualisée pour les récepteurs R1C2 (Fig. 5D).

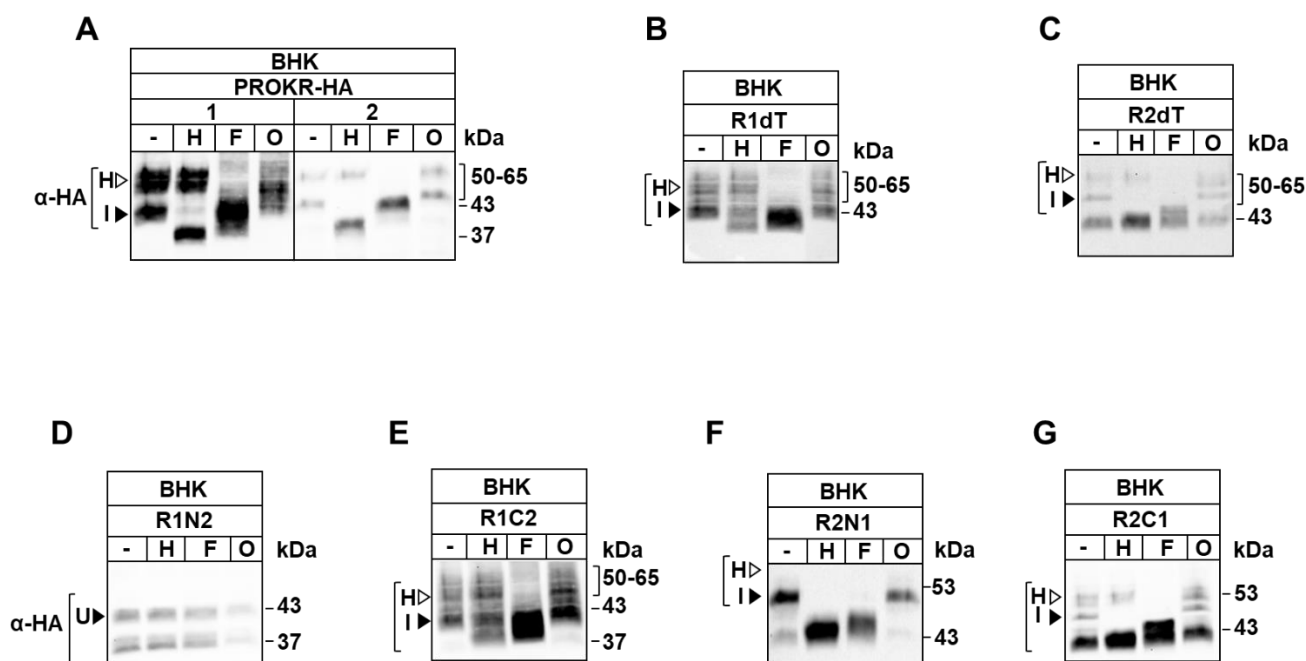


Figure 5 : Profil de glycosylation des constructions PROKR1 et PROKR2.

Le profil de glycosylation a été déterminé en utilisant l'endoglycosidase H (H), la peptide-N-glycosidase F ; PNGase F (F), et la O-glycosidase (O). Dans toutes nos expériences (A-G), les polypeptides ont été séparés par SDS-PAGE, transférés sur une membrane de nitrocellulose, sondés avec l'Ab anti-HA, et révélés par des tests de chimioluminescence (ECL, Covalab). Les flèches blanches et noires indiquent les formes H et I, respectivement.

Localisation

L'expression cellulaire des différentes constructions a été réalisée par immunofluorescence. Seule la localisation cellulaire détectée par l'anticorps anti-HA a pu être réalisée.

Dans les cellules BHK-21, R1-HA est principalement localisée sur la membrane plasmique, alors que R2-HA est faiblement localisée au niveau de la membrane plasmique, mais très exprimée dans le cytoplasme dans une région périnucléaire qui correspond au compartiment du réticulum endoplasmique (ER) (Figs. 6A et 6B). Ces résultats sont en accord avec ce que nous avons observé antérieurement (résultats partie II). Comme prévu, R1dT est détectée à la membrane plasmique (Fig. 6A), et R2dT est principalement localisée dans le cytoplasme, au niveau du RE (Fig. 6B). La partie C-ter de PROKR2 affecte le niveau d'expression de PROKR1 (R1C2). Elle est plus exprimée au niveau de la membrane plasmique tout en gardant le même profil de distribution cellulaire (Fig. 6A).

De façon intéressante, la présence de la partie N-ter de PROKR2 au niveau de PROKR1 (R1N2) bloque complètement le récepteur dans une région périnucléaire (Fig. 6A). R2dT portant la partie N-ter (R2N1) ou C-ter (R2C1) de PROKR1 présente un profil de localisation très différent par rapport à R2dT (Fig. 6B). En effet, R2N1 est localisée au niveau cytoplasmique avec un profil périnucléaire, alors que R2C1, en plus de sa localisation cytoplasmique, montre

une présence au niveau de la membrane plasmique (Fig. 6B). Ces résultats confirment ceux obtenus par Western blot (Fig. 3).

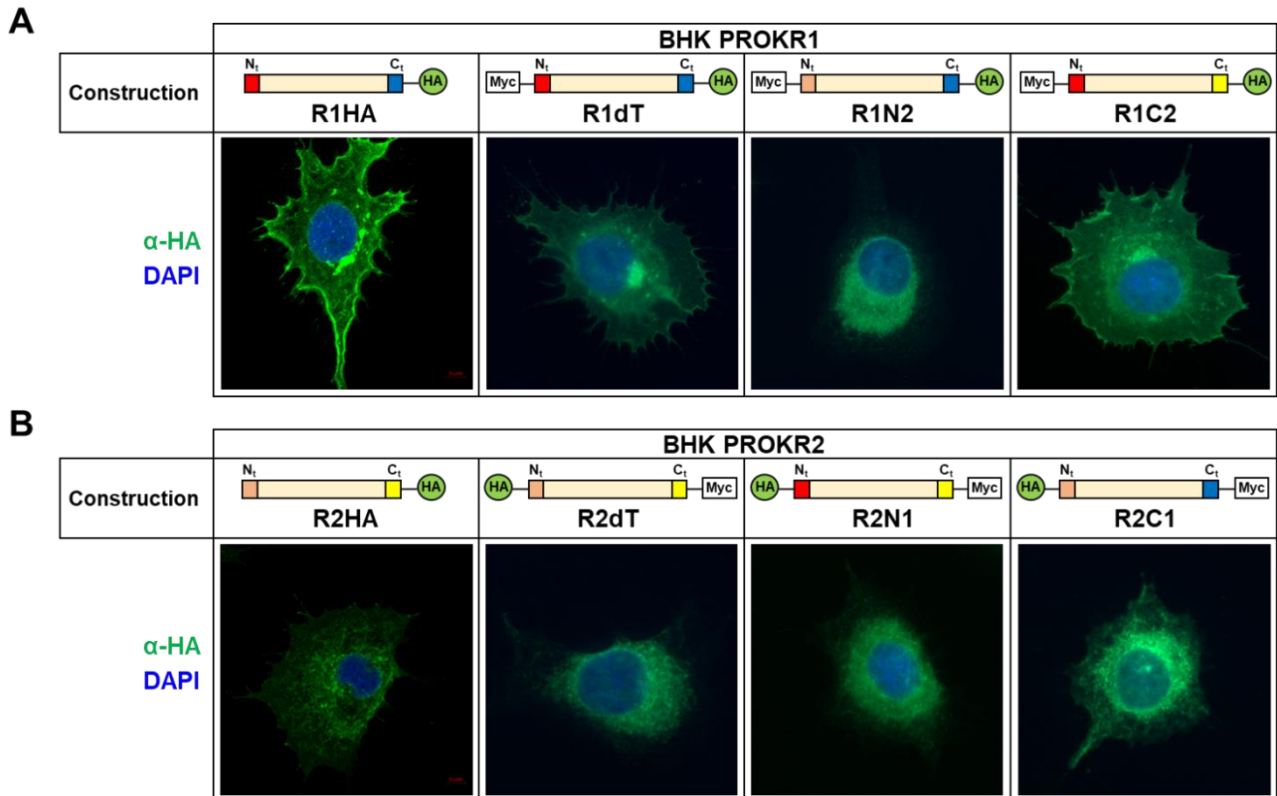


Figure 6 : Localisation cellulaire des différentes constructions PROKR1 et PROKR2

(A et B) Les cellules BHK-21 qui expriment stablement les différentes constructions, ont été fixées et les antigènes visualisés par immunofluorescence en utilisant des anticorps anti-HA reconnus par des anticorps secondaires conjugués à la fluorescéine (vert). Les photographies ont été obtenues avec le microscope Zeiss en utilisant un objectif à huile 63/1.4. Cellules BHK-21 (cellules parentales) marquées au DAPI pour la coloration nucléaire (bleu).

Localisation membranaire

La localisation membranaire peut être étudiée par la biotinylation de surface, technique encore fastidieuse à ce jour. Ainsi, nous avons réussi à adapter une nouvelle méthode pour détecter et quantifier, grâce à la fluorescence, les protéines membranaires, à condition qu'elles possèdent une étiquette extracellulaire. Cette technique utilise le principe du test ELISA. Pour réaliser cette partie de mon travail, nous avons placé au niveau de la partie N-ter des récepteurs soit étiquetés HA pour PROKR2 ou Myc pour PROKR1.

Cette quantification a été faite par ELISA sur cellules non fixées et non perméabilisées. On remarque tout d'abord une forte expression des récepteurs membranaires R1dT comparé à R2dT (Fig. 7A). Pour les constructions PROKR1, la permutation avec la partie N-ter de

PROKR2 (R1N2) induit une absence de récepteurs membranaires alors que la permutation du C-ter (R1C2) induit une forte présence du récepteur au niveau de la membrane (Fig. 7A). Concernant les constructions PROKR2, la permutation avec le N-ter de PROKR1 (R2N1) induit une forte baisse des récepteurs à la membrane alors que la permutation de la partie C-ter n'induit qu'une faible baisse du signal (Fig. 7B). Ces résultats confirment ceux observés en Western blot et en immunofluorescence (Figs. 3 et 6).

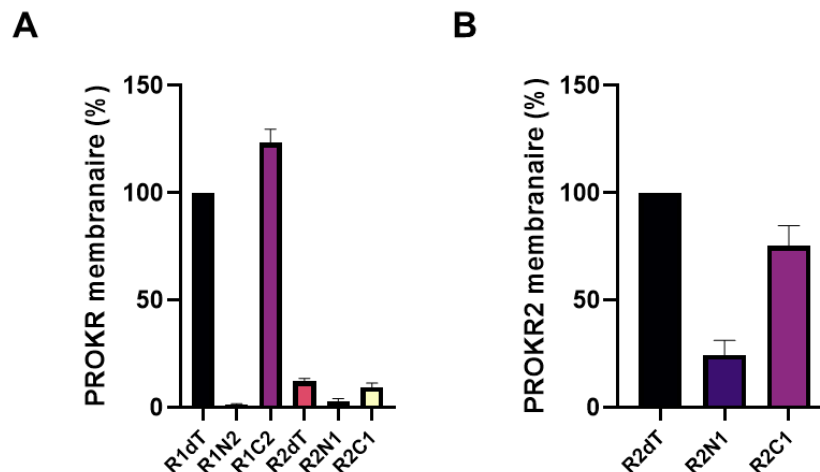


Figure 7 : PROKR1 et PROKR2 au niveau de la membrane plasmique

Un test ELISA-like est pratiqué sur cellules en condition native (non fixée et non perméabilisées) a été effectué sur les différentes constructions afin de déterminer la proportion de récepteurs présents à la membrane. (A) Quantification des récepteurs membranaires dans toutes les constructions PROKR1 et PROKR2. (B) Quantification des récepteurs membranaires dans les constructions PROKR2 uniquement. Le pourcentage est exprimé par rapport à R1dT (A) et R2dT (B) considéré comme 100%.

Test fonctionnel

Nous avons utilisé le test IP-one de chez PerkinElmer dans les conditions décrites précédemment (voir matériels et méthodes). Pour réaliser les tests, nous avons utilisé le ligand humain recombinant PROK2 pour stimuler nos différentes constructions (Fig. 8).

Le test fonctionnel a révélé que PROK2 stimule la mobilisation d'IP1 dans nos lignées cellulaires exprimant de manière stable PROKR1 ou PROKR2, validant la fonctionnalité de nos constructions (Tableau 3). L'efficacité de PROK2 pour stimuler PROKR1 et PROKR2, déterminée par la mesure de la concentration effective 50 (EC50), était de 2.85nM et 47.71nM, respectivement (Tableau 3). Nous avons par la suite utilisé ce test pour évaluer l'activité de nos constructions en mesurant leurs EC50.

Comme indiqué sur le tableau 3, la double étiquette présente sur PROKR1 ou PROKR2 n'affecte pas leurs stimulations par PROK2. Cependant, la permutation des régions Nt et Ct entre PROKR1 et PROKR2 a un impact sur les activités des récepteurs. La substitution de N1

par N2 dans les récepteurs PROKR1 (R1N2) abolit l'activité du récepteur (Tableau 3), alors que celle du C1 par C2 (R1C2) n'a pas d'effet significatif.

Pour PROKR2, la permutation de ses parties C- et N-ter par les mêmes parties du récepteur PROKR1 ; R2N1 et R2C1, n'affecte pas la fonction du récepteur PROKR2, mais réduit son activité d'~50% par rapport à R2HA (Tableau 3).

	R1HA	R1dT	R1N2	R1C2
EC50 (nM)	2.85±0.63	0.63±0.23	/	2.07±1.65

	R2HA	R2dT	R2N1	R2C1
EC50 (nM)	47.71±19.33	13.02±0.19	21.17	17.78±4.72

Tableau 3 : Test fonctionnel des différentes constructions PROKR1 et PROKR2.

Le test IP-1 a été réalisé comme indiqué dans la section Matériels et Méthodes. Dans toutes nos expériences, les cellules ont été traitées pendant 1h avec une gamme de concentration indiquée du ligand PROK2. L'EC50 pour toutes les constructions a été déterminée en utilisant le logiciel GraphPad.

Dimérisation des récepteurs

L'expression de toutes les constructions et leur profil électrophorétique ont ensuite été évalués en utilisant l'anticorps anti-Myc (Fig. 9A). Les résultats ont été quantifiés après normalisation avec la β -actine (Figure 9B).

En utilisant cet anticorps, les premiers résultats font apparaître des formes de haut poids moléculaire (entre 80 et 150 kDa) supposées être des formes dimériques. Ces formes ont été détectées dans toutes les constructions, mais à des niveaux d'expression très variables. Chez les récepteurs PROKR1, cette forme est très abondante pour la construction R1dT (Fig. 9A, ligne 2) et diminue de moitié lorsqu'une permutation du N-ter (R1N2) ou de C-ter (R1C2) est réalisée (Fig. 9A, ligne 3 et 4 and 9B). Les parties terminales de PROKR1 semblent avoir un rôle dans la dimérisation.

Chez les récepteurs PROKR2, la forme dimérique est quasiment inexistante chez la forme native (R2dT) (Fig. 9C, ligne 2) tandis qu'elle augmente lorsqu'une permutation du N-ter (R2N1) ou de C-ter (R2C1) (Fig. 9C, ligne 3 et 4). La forme dimérique est environ 10 fois plus abondante dans la construction R2N1 (Fig. 9D) laissant supposer un rôle important de la partie N-ter de PROKR1 dans la dimérisation.

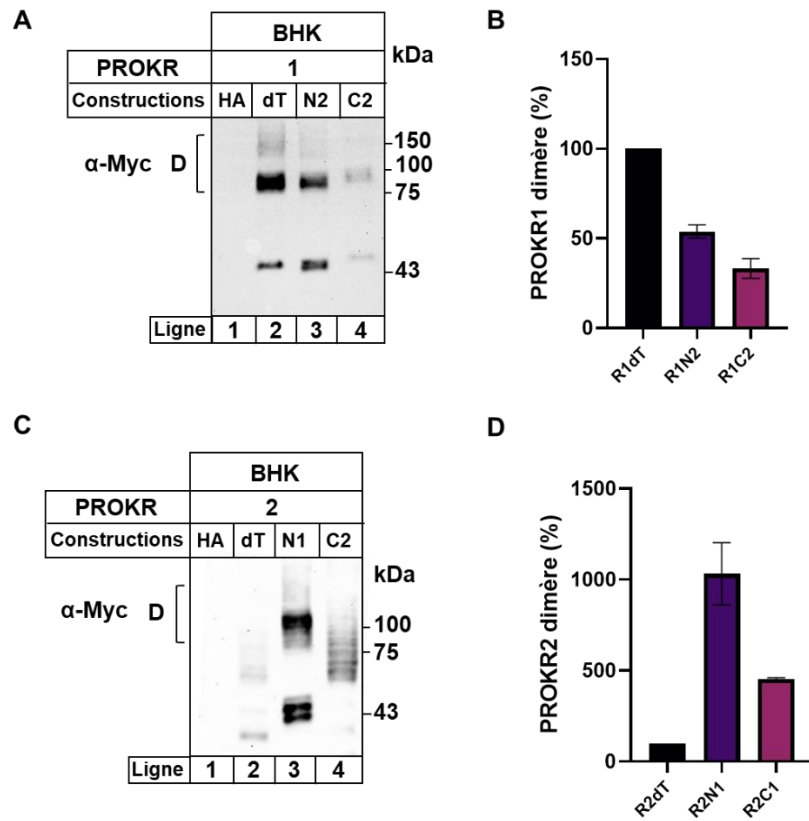


Figure 8 : Profil d'oligomérisation des différentes constructions PROKR1 et PROKR2

(A et C) Des quantités égales de protéines extraites de cellules BHK-21 exprimant de manière stable les constructions PROKR1 (A) ou PROKR2 (C) ont été séparées par un gel de SDS-PAGE à 10%, transférées sur la membrane de nitrocellulose, et immunodétectées en utilisant les anticorps anti-Myc et anti-mouse-HRP. Les crochets correspondent à la forme dimérique (d). Quantification à l'aide du logiciel Image-J des formes d des constructions PROKR1 et PROKR2.

Discussion

Les RCPG ont été étudiés de manière intensive en raison de leur mode d'action et de leurs rôles dans la physiopathologie humaine. Les récepteurs des prokinétines font partie de cette superfamille. Les deux récepteurs, PROKR1 et PROKR2 sont exprimés dans de nombreux organes de manière différentielle¹³. Récemment notre équipe a identifié une différence d'expression, de stabilité et d'adressage à la membrane de ces deux récepteurs surexprimés dans les BHK-21. Néanmoins, PROKR1 et PROKR2 possèdent 87% d'identité et leurs différences se localisent principalement dans les parties N-ter et C-ter.

Afin de tenter d'expliquer cette expression différentielle, l'hypothèse d'un rôle des parties terminales a été avancée. Les données concernant l'importance de ces parties dans l'export RE-Golgi, endocytose/recyclage, stabilité à la membrane des RCPGs est bien documenté^{7,14,15}. En effet, la partie C-ter contient plusieurs motifs d'export¹⁶⁻¹⁸ ou de rétention^{19,20} permettant ou non la sortie du RCPG du réticulum endoplasmique. La partie N-ter peut également posséder ce type de motif, mais dans une moindre mesure²¹.

Les extrémités C-ter et N-ter sont également le lieu de modifications post-traductionnelles (MPT), comme la glycosylation, la sumoylation, l'ubiquitination, la phosphorylation qui contrôle un grand nombre de processus comme le repliement, la maturation, la stabilité et la dégradation²². L'interaction avec de nombreux acteurs de ces processus s'effectuent également au niveau de la partie C-ter : kinases, protéines Rab²³⁻²⁶. La partie N-ter a également été rapportée comme directement impliquée dans l'interface de protomère dans le processus d'oligomérisation^{8,9}. Ce processus peut modifier de nombreux paramètres comme l'adressage à la membrane et le taux d'internalisation.^{27,28}

Afin d'évaluer l'importance des parties N-ter et C-ter dans les récepteurs aux prokinétines, des constructions ont été créées dans lesquelles nous avons permuté les parties N-ter et C-ter des deux récepteurs. Afin de réaliser des détections extra- et/ou intracellulaires, nos récepteurs ont été équipés par des étiquettes HA ou/et Myc. L'introduction des étiquettes n'a pas inhibé la biosynthèse des constructions. En utilisant l'anticorps anti-HA, nous détectons les formes H et I dans toutes nos constructions. L'emplacement du tag Myc sur la partie N-ter pouvait, néanmoins, perturber le repliement de PROKR2. Les tests des glycosidases confirment ces résultats et suggèrent que la permutation du N-ter de PROKR2 sur PROKR1 induit un blocage du trafic intracellulaire de la protéine. Cette conclusion a été confirmée par les résultats d'immunofluorescence où la protéine présente une localisation cytoplasmique et par le test ELISA de surface où aucune activité n'a été détectée à la membrane plasmique.

Enfin, la permutation du N-ter semble diminuer le taux de dimérisation du récepteur PROKR1. Plusieurs hypothèses ont été émises afin d'expliquer cette observation. La première étant les différences de sites de glycosylations présents sur la partie N-ter de PROKR1 et PROKR2. En effet, PROKR1 possèdent 3 sites de N-Glycosylation (positions 11,14 et 36) alors que PROKR2 n'en possède que deux (positions 7 et 27). De plus, PROKR1 possède 4 sites de O-Glycosylations qui sont absent chez PROKR2. Cette distribution de sites de glycosylation pourrait expliquer, du moins en partie, le défaut de trafic intracellulaire et d'expression à la membrane en lien avec le N-ter de PROKR2.

Une deuxième hypothèse étant la présence d'un motif de rétention présent sur la partie N-ter de PROKR2. Cependant, peu de motifs ont été identifiés au niveau de cette région.

Récemment un motif a été mis en évidence : le motif Tyrosine Serine (YS), jouant le rôle de motif d'export pour les récepteurs adrénergiques²¹. Après analyse de la partie N-ter des récepteurs PROKR1 et PROKR2, ce motif est présent uniquement chez PROKR1 et absent chez PROKR2 (Fig. 9).

R1	METTTMGFMDDNATNTSTSFSLSVLNPHGAHATSEFPFNFS	YS	DYDMPLDEDEDVTNSRTFFFAAK
R2	MAAQNGNTSFTPNFNPPQDHASSLSFNFS	YG	DYDLPMEDEDMTKTRTFFFAAK

Figure 9 : Alignement de séquence des parties N-ter de PROKR1 et PROKR2

La partie N-ter de PROKR1 ne semble pas être suffisante pour augmenter l'expression à la membrane de PROKR2. En effet, la permutation du N-ter de PROKR1 sur PROKR2 (R2N1) a induit une diminution du récepteur à la membrane. Par contre une augmentation de la forme I-glycosylée et de la forme dimérique ont été observées, suggérant l'importance de la partie N-ter dans le processus de dimérisation. De façon intéressante, la partie C-ter de PROKR2 semble augmenter le niveau d'expression, la stabilité et la proportion membranaire de PROKR1 (R1C2). Néanmoins, elle semble empêcher l'oligodimérisation du récepteur, suggérant une potentielle hétérodimerisation entre ces deux récepteurs qui restent encore à démontrer.

Pour la partie C-ter de PROKR1, sa présence dans PROKR2 (R2C1) influence aussi le processus de dimérisation. Les modifications post-traductionnelles, comme la phosphorylation ou l'ubiquitination, peuvent aussi participer à l'augmentation de la stabilité et du trafic intracellulaire de ces récepteurs.

Un autre mécanisme pourrait aussi être impliqué dans la régulation du trafic intracellulaire des PROKRs en lien avec leurs parties C-ter. En effet, les PROKRs sont capables d'interagir, via leur partie C-ter, avec les protéines MRAP2 (Melanocortin Receptor Accessory Protein 2) et

snapin²⁹⁻³². MRAP2 semble se lier aux deux récepteurs au niveau de la partie C-ter induisant leur séquestration dans le RE^{29,31,32}. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la séquence primaire de C-ter de PROKR1 est différente de celle de PROKR2 ce qui pourrait être à l'origine d'un changement de conformation structurale entre les deux récepteurs (Figure 10).

Pour la snapin, elle se lie au récepteur PROKR2 au niveau des motifs YFK (343-345) et HWR (351-353)³⁰. Le motif YFK est également présent chez PROKR1, mais le motif HWR ne l'est pas puisque l'arginine est remplacée par une lysine (HWK) (Fig. 10). La fixation de la snapin induit une augmentation de la dégradation des récepteurs. Le remplacement de l'arginine (R) par une lysine (K) au niveau du motif HWR pourrait être à l'origine de la différence du trafic et de stabilité observée entre les deux récepteurs.

R1	V	K	N	D	T	V	K	Y	F	K	I	M	L	L	H	W	K	A	S	Y	N	G	G	K	S	S	A	D	L	D	L	K	T	I	G	M	P	A	T	E	E	V	D	C	I	R	L	K
R2	V	K	N	N	T	M	K	Y	F	K	M	M	L	L	H	W	R	P	S	Q	R	G	S	K	S	S	A	D	L	D	L	R	T	N	G	V	P	T	E	E	V	D	C	I	R	L	K	

Figure 10 : Alignement de séquence de la partie C-ter de PROKR1 et PROKR2

Les acides aminés basiques : R et K sont respectivement en surbrillance jaune et vert. Les motifs essentiels à la fixation de la snapine sont en rouge.

En conclusion, cette étude apporte des démonstrations biochimiques et cellulaires qui pourraient expliquer les comportements différentiels entre deux récepteurs très identiques. Même si de nombreuses expériences sont attendues pour étayer ces observations, nous pensons avoir mis le doigt sur deux parties clés de ces protéines qui expliqueraient les différences que nous avons observées dans leur localisation, trafic intracellulaire, stabilité, et déstabilisation structurale.

Références

1. Reynaud, D. et al. Evidence-Based View of Safety and Effectiveness of Prokineticin Receptors Antagonists during Pregnancy. *Biomedicines* 9, (2021).
2. Kufareva, I., Salanga, C. L. & Handel, T. M. Chemokine and chemokine receptor structure and interactions: implications for therapeutic strategies. *Immunol. Cell Biol.* 93, 372–383 (2015).
3. Rajagopalan, L. & Rajarathnam, K. Structural Basis of Chemokine Receptor Function—A Model for Binding Affinity and Ligand Selectivity. *Biosci. Rep.* 26, 325–339 (2006).
4. Lattanzi, R., Maftai, D., Negri, L., Fusco, I. & Miele, R. PK2 β ligand, a splice variant of prokineticin 2, is able to modulate and drive signaling through PKR1 receptor. *Neuropeptides* 71, 32–42 (2018).
5. Fullone, M. R., Lattanzi, R., Maftai, D., Bonaccorsi, M. C. & Miele, R. Analysis of role of aromatic residues in extracellular loop 2 of Prokineticin receptor 2 in ligand binding probed with genetically encoded photo-crosslinkers. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1863, 183549 (2021).
6. Monnier, C. et al. PROKR2 missense mutations associated with Kallmann syndrome impair receptor signalling activity. *Hum. Mol. Genet.* 18, 75–81 (2009).
7. Young, B., Wertman, J. & Dupré, D. J. Regulation of GPCR Anterograde Trafficking by Molecular Chaperones and Motifs. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 132, 289–305 (2015).
8. Ray, K. et al. Identification of the cysteine residues in the amino-terminal extracellular domain of the human Ca(2+) receptor critical for dimerization. Implications for function of monomeric Ca(2+) receptor. *The Journal of biological chemistry* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10488104/> (1999) doi:10.1074/jbc.274.39.27642.
9. Overton, M. & Blumer, K. The extracellular N-terminal domain and transmembrane domains 1 and 2 mediate oligomerization of a yeast G protein-coupled receptor. *The Journal of biological chemistry* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12194975/> (2002) doi:10.1074/jbc.M205368200.
10. Sposini, S., Caltabiano, G., Hanyaloglu, A. C. & Miele, R. Identification of transmembrane domains that regulate spatial arrangements and activity of prokineticin receptor 2 dimers. *Mol. Cell. Endocrinol.* 399, 362–372 (2015).
11. Micoud, J. et al. Involvement of the heterodimeric interface region of the nucleotide binding domain-2 (NBD2) in the CFTR quaternary structure and membrane stability. *Biochim. Biophys. Acta* 1853, 2420–2431 (2015).
12. Kazan, J. M., Pollato-Blanco, A., Lukacs, G. L. & Pause, A. Measuring EGFR plasma membrane density, stability, internalization, and recycling in alive adherent cells by cell surface ELISA. *STAR Protoc.* 3, 101475 (2022).
13. Negri, L. & Ferrara, N. The Prokineticins: Neuromodulators and Mediators of Inflammation and Myeloid Cell-Dependent Angiogenesis. *Physiol. Rev.* 98, 1055–1082 (2018).

14. Magalhaes, A., Dunn, H. & Ferguson, S. Regulation of GPCR activity, trafficking and localization by GPCR-interacting proteins. *British journal of pharmacology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21699508/> (2012) doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01552.x.
15. Pavlos, N. & Friedman, P. GPCR Signaling and Trafficking: The Long and Short of It. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27889227/> (2017) doi:10.1016/j.tem.2016.10.007.
16. Schülein, R. et al. A dileucine sequence and an upstream glutamate residue in the intracellular carboxyl terminus of the vasopressin V2 receptor are essential for cell surface transport in COS.M6 cells. *Mol. Pharmacol.* 54, 525–535 (1998).
17. Bermak, J. C., Li, M., Bullock, C. & Zhou, Q. Y. Regulation of transport of the dopamine D1 receptor by a new membrane-associated ER protein. *Nat. Cell Biol.* 3, 492–498 (2001).
18. Robert, J., Clauser, E., Petit, P. X. & Ventura, M. A. A novel C-terminal motif is necessary for the export of the vasopressin V1b/V3 receptor to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 280, 2300–2308 (2005).
19. Hermosilla, R. & Schülein, R. Sorting functions of the individual cytoplasmic domains of the G protein-coupled vasopressin V(2) receptor in Madin Darby canine kidney epithelial cells. *Mol. Pharmacol.* 60, 1031–1039 (2001).
20. Achour, L., Labbé-Jullié, C., Scott, M. G. H. & Marullo, S. An escort for GPCRs: implications for regulation of receptor density at the cell surface. *Trends Pharmacol. Sci.* 29, 528–535 (2008).
21. Dong, C., Filipeanu, C. M., Duvernay, M. T. & Wu, G. Regulation of G protein-coupled receptor export trafficking. *Biochim. Biophys. Acta* 1768, 853–870 (2007).
22. Patwardhan, A., Cheng, N. & Trejo, J. Post-Translational Modifications of G Protein–Coupled Receptors Control Cellular Signaling Dynamics in Space and Time. *Pharmacol. Rev.* 73, 120–151 (2021).
23. Parent, A., Hamelin, E., Germain, P. & Parent, J. Rab11 regulates the recycling of the beta2-adrenergic receptor through a direct interaction. *The Biochemical journal* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18983266/> (2009) doi:10.1042/BJ20080867.
24. Seachrist, J. et al. Rab5 association with the angiotensin II type 1A receptor promotes Rab5 GTP binding and vesicular fusion. *The Journal of biological chemistry* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11682489/> (2002) doi:10.1074/jbc.M109022200.
25. Moore, C., Milano, S. & Benovic, J. Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annual review of physiology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17037978/> (2007) doi:10.1146/annurev.physiol.69.022405.154712.
26. Wolfe, B. & Trejo, J. Clathrin-dependent mechanisms of G protein-coupled receptor endocytosis. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17376169/> (2007) doi:10.1111/j.1600-0854.2007.00551.x.

27. Lohse, M. J. Dimerization in GPCR mobility and signaling. *Curr. Opin. Pharmacol.* 10, 53–58 (2010).
28. Rivero-Müller, A., Jonas, K. C., Hanyaloglu, A. C. & Huhtaniemi, I. Di/oligomerization of GPCRs-mechanisms and functional significance. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 117, 163–185 (2013).
29. Rouault, A. A. J., Lee, A. A. & Sebag, J. A. Regions of MRAP2 required for the inhibition of orexin and prokineticin receptor signaling. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 1864, 2322–2329 (2017).
30. Song, J. et al. Snapin interacts with G-protein coupled receptor PKR2. *Biochemical and biophysical research communications* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26687946/> (2016) doi:10.1016/j.bbrc.2015.12.023.
31. Chaly, A. L., Srisai, D., Gardner, E. E. & Sebag, J. A. The Melanocortin Receptor Accessory Protein 2 promotes food intake through inhibition of the Prokineticin Receptor-1. *eLife* 5,.
32. Fullone, M. R., Maftai, D., Vincenzi, M., Lattanzi, R. & Miele, R. Identification of Regions Involved in the Physical Interaction between Melanocortin Receptor Accessory Protein 2 and Prokineticin Receptor 2. *Biomolecules* 12, (2022).

DISCUSSION GENERALE

L'équipe ou j'ai réalisé mon stage de thèse travaille sur la famille des prokinétines depuis 15 ans et a démontré l'implication de ces membres, ligands (PROK1/PROK2) et récepteurs (PROKR1/PROKR2), dans plusieurs pathologies humaines. Un des axes de recherche dans l'équipe est le développement de stratégies thérapeutiques pour bloquer les effets pro-angiogéniques et pro-inflammatoires des ligands PROK1/PROK2 et de leurs récepteurs PROKR1/PROKR2. Deux stratégies ont été mises en place :

- **Développement d'anticorps monoclonaux bloquants dirigés contre PROKR1, PROKR2 ou PROK1. Ce travail est en cours de réalisation et est soutenu par Inserm Transfert pour une valorisation via deux brevets en cours de dépôt.**
- **Cibler chimiquement le ligand PROK1 afin d'inhiber son interaction avec PROKR1 et PROKR2.**

Ainsi, mon projet de thèse avait pour objectif d'identifier des molécules chimiques capables d'inhiber l'interaction du ligand PROK1 à ses récepteurs PROKR1 et PROKR2.

C'est la première fois que ce type de stratégie, utilisant des molécules chimiques pour cibler un ligand soluble, était utilisée. L'identification de ces molécules chimiques nécessitait une étape de docking moléculaire s'appuyant sur la structure tridimensionnelle (STD) de PROK1.

La structure de PROK1 n'existant pas, la première partie de mon projet de thèse consistait à déterminer la structure *in vitro* par RMN ou cristallographie. Nous avons donc entrepris les étapes de clonage, production et purification dans divers modèles cellulaires aussi bien procaryote qu'eucaryote. Devant la difficulté de produire et de purifier assez de protéines PROK1 pour réaliser les étapes de RMN ou de cristallographie, j'ai entrepris, en parallèle, la résolution *in silico* de la STD de PROK1. C'est ce modèle qui a été utilisé pour les étapes de docking moléculaire réalisé en collaboration avec le Dr. Franck Borel (IBS, Grenoble). La résolution *in silico* de la STD du récepteur PROKR1 nous a permis de vérifier que l'interface ciblée par le docking au niveau de PROK1 est celle qui interagit avec le récepteur. Plusieurs chimiothèques ont été criblées et 360 molécules ont été identifiées. Pour tester ces molécules, nous avons généré deux lignées stables exprimant les récepteurs PROKR1 ou PROKR2. Ces deux lignées nous ont permis de tester pour l'instant 15 molécules dont trois sont très prometteuses.

Lorsque nous avons entamé la caractérisation cellulaire et biochimique des récepteurs PROKR1 et PROKR2, une expression différentielle de leurs profils électrophorétique et de localisation cellulaire a pu être observée. En effet, par rapport à PROKR1, PROKR2 était bloquée au niveau du réticulum endoplasmique (RE) et par conséquent moins exprimée à la membrane.

La caractérisation de plusieurs paramètres moléculaires, biochimiques et cellulaires (stabilité de l'ARNm, biosynthèse, glycosylation, trafic intracellulaire, dégradation et repliement) a permis de conclure que PROKR2 est différent de PROKR1 malgré les 87 % d'identité. Les 15% de différence entre les deux récepteurs sont concentrées au niveau des parties N-ter et C-ter. Cela nous a encouragés à explorer les rôles de ces deux extrémités dans le comportement cellulaire de ces deux récepteurs, particulièrement l'oligomérisation.

Plusieurs hypothèses ont été émises :

- 1. La première hypothèse concerne la présence de motif au niveau des deux extrémités et qui peuvent induire la rétention de PROKR2 dans le RE. En effet, plusieurs motifs sont présents au niveau des deux récepteurs, à l'exception du motif d'export récemment mis en évidence chez les RCPGs « YS », et qui est présent uniquement chez PROKR1. Ce motif pourrait expliquer les différences d'expression observées.**
- 2. La deuxième hypothèse concerne les modifications post-traductionnelles (MPT) qui peuvent être différentes entre les deux récepteurs régulant ainsi leur expression et leur comportement intracellulaire. C'est le cas de l'extrémité N-ter qui possède trois sites de N-Glycosylation pour PROKR1 et seulement deux pour PROKR2. Dans cette partie on trouve également quatre sites de O-Glycosylation uniquement présents dans PROKR1. Au niveau de la partie C-ter, certains sites de phosphorylations sont spécifiques à l'un ou l'autre récepteur. Ces MPTs peuvent influencer tous les processus cellulaires et pharmacologiques des récepteurs.**
- 3. La dernière hypothèse serait liée à l'homo-dimérisation différentielle des récepteurs. En effet, un défaut d'homo-dimérisation a été suspecté comme étant responsable d'un défaut d'adressage de PROKR2. Ce défaut pourrait changer les propriétés structurales de la protéine et influencer sur les processus décrits précédemment. La dimérisation pourrait également induire un changement d'accessibilité de certains motifs. Un masquage de motifs de rétention induit par ce processus pourrait favoriser le trafic de la protéine à la membrane et dans le cas contraire entrainer sa rétention. Un masquage de motif permettant l'interaction avec des acteurs protéiques est également envisageable. Un exemple pourrait être l'interaction que les PROKRs ont avec MRAP2.**

Cette protéine régule négativement le trafic des récepteurs à la membrane. Une modification du site de reconnaissance de MRAP2, en raison d'une homo-dimérisation, pourrait moduler l'expression des PROKRs à la membrane.

Pour traiter ses différentes hypothèses, nous avons généré huit nouvelles lignées cellulaires exprimant de manière stable les protéines PROKR1 ou PROKR2 chimériques dans lesquelles nous avons interverti les extrémités N-ter ou C-ter. Une caractérisation complète de ces lignées est en cours.

CONCLUSION GENERALE

Production, purification PROK1

Les différentes expériences menées dans mon projet de thèse, nous ont permis de produire la protéine PROK1 dans différents modèles eucaryotes et procaryotes.

Le modèle procaryote, nous a permis de produire une grande quantité de la protéine PROK1. Cependant, la protéine produite était majoritairement sous forme de corps d'inclusions dans le cytoplasme ou sous forme d'agrégats solubles. Sous ces deux formes, il était difficile de procéder à la purification de PROK1 en condition native et de cliver l'étiquette His par la protéase TEV. L'adressage dans le périplasme n'a également pas fonctionné en utilisant le plasmide pet22b.

La production dans les trois modèles de cellules eucaryotes, nous a permis de produire une protéine soluble uniquement dans les cellules BHK et Pichia Pastoris. Le modèle des cellules d'insecte (Sf9) n'a permis la production que d'une protéine en corps d'inclusion. En dépit d'une production soluble de la protéine par les cellules BHK-21 et Pichia Pastoris, la quantité produite reste faible, malgré une optimisation des conditions de culture. En effet, on a réussi à produire 41ng/ml chez BHK-21 et seulement 6 ng/ml chez Pichia Pastoris. Cette faible production reste un frein pour l'étape de cristallisation, nécessaire pour la détermination de la structure tridimensionnelle de la protéine PROK1.

Des difficultés concernant l'étape de purification ont également été rencontrées dans nos différents modèles. En effet, pour les modèles BHK-21 et E. Coli, la purification a fonctionné uniquement en conditions dénaturantes (8M Urée) ce qui met en avant la non-accessibilité de l'étiquette His en C-ter. Ceci pourrait s'expliquer par un repliement de la protéine avec sa partie C-ter se retrouvant enfouie dans la protéine. Concernant le modèle Pichia Pastoris, l'étape de purification sur Ni-NTA nécessite un pH minimum de 7. Hors ce pH est responsable de la floculation du milieu, entraînant ainsi la perte d'~50% de la protéine produite. La précipitation par l'ammonium sulfate et les chromatographies à échange d'ions ont été testées sans succès.

Modèle *in silico*, docking moléculaire et test fonctionnel

Dans l'attente de résoudre *in vitro* la structure tridimensionnelle de PROK1, un modèle *in silico* de cette protéine a été généré par homologie à la protéine MIT-1. Un modèle *in silico* a également été produit pour le récepteur PROKR2.

Le docking moléculaire sur cette structure de PROK1 a été effectué et des molécules chimiques avec un bon score de docking ont été identifiées à partir de 5 chimiothèques.

Pour affiner notre criblage moléculaire, nous avons aussi modélisé l'interface d'interaction de PROK1 avec son récepteur PROKR2.

Pour pouvoir tester les molécules chimiques identifiées par docking moléculaire, nous avons mis en place un test fonctionnel. À ce jour, nous avons uniquement utilisé les molécules provenant de la chimiothèque nationale (ChemBio), parmi lesquelles seulement 3 molécules ont montré une inhibition significative de l'interaction de PROK1 avec son récepteur PROKR1.

Modèle cellulaire

Pour réaliser nos tests fonctionnels, nous avons établi deux modèles cellulaires exprimant les récepteurs PROKR1 ou PROKR2. À notre grande surprise, les deux récepteurs présentent une expression différentielle malgré 84% d'identité et 87% d'homologie.

PROKR1 est plus exprimé à la membrane comparé à PROKR2. Particulièrement, la bande hautement glycosylée (H), caractéristique de la membrane plasmique, est deux fois moins exprimée chez PROKR2. Cette disparité est due à un mécanisme post-traductionnel puisque le nombre de copies des deux ARNm est identique. La différence des niveaux d'expression semble associée à l'instabilité de la protéine PROKR2 ($t_{1/2} \sim 1h30$) par rapport à PROKR1 ($t_{1/2} \sim 1=3h30$). Cependant, les deux protéines sont éliminées par la voie lysosomale. Une dégradation protéasome-dépendante a également été mise en évidence, uniquement pour la forme H de PROKR2. L'instabilité de PROKR2 serait associée à un défaut de repliement démontré par sa sensibilité à la trypsine, son profil de thermo-agrégation et thermo-instabilité. Ce défaut de repliement pourrait résulter d'un défaut d'oligomérisation.

Implication des domaines N-ter et C-ter

Notre étude sur les parties N-ter et C-ter a pu mettre en évidence l'implication de la partie N-ter de PROKR2 dans la rétention cytoplasmique du récepteur et donc sa non-fonctionnalité, puisque non exprimé à la membrane plasmique. De plus, cette partie terminale de PROKR2 semble empêcher l'homo-dimérisation du récepteur. A contrario la partie N-ter de PROKR1 semble augmenter le phénomène d'homo-dimérisation. Néanmoins, une diminution à la membrane a été observée. La partie C-ter de PROKR2 semble impliquée dans la stabilité du récepteur et augmente la fraction membranaire. Cette partie semble promouvoir l'état monomérique du récepteur et diminue l'homo-dimérisation. La partie C-ter de PROKR1 semble augmenter la dimérisation, mais pas au même niveau que la partie N-ter.

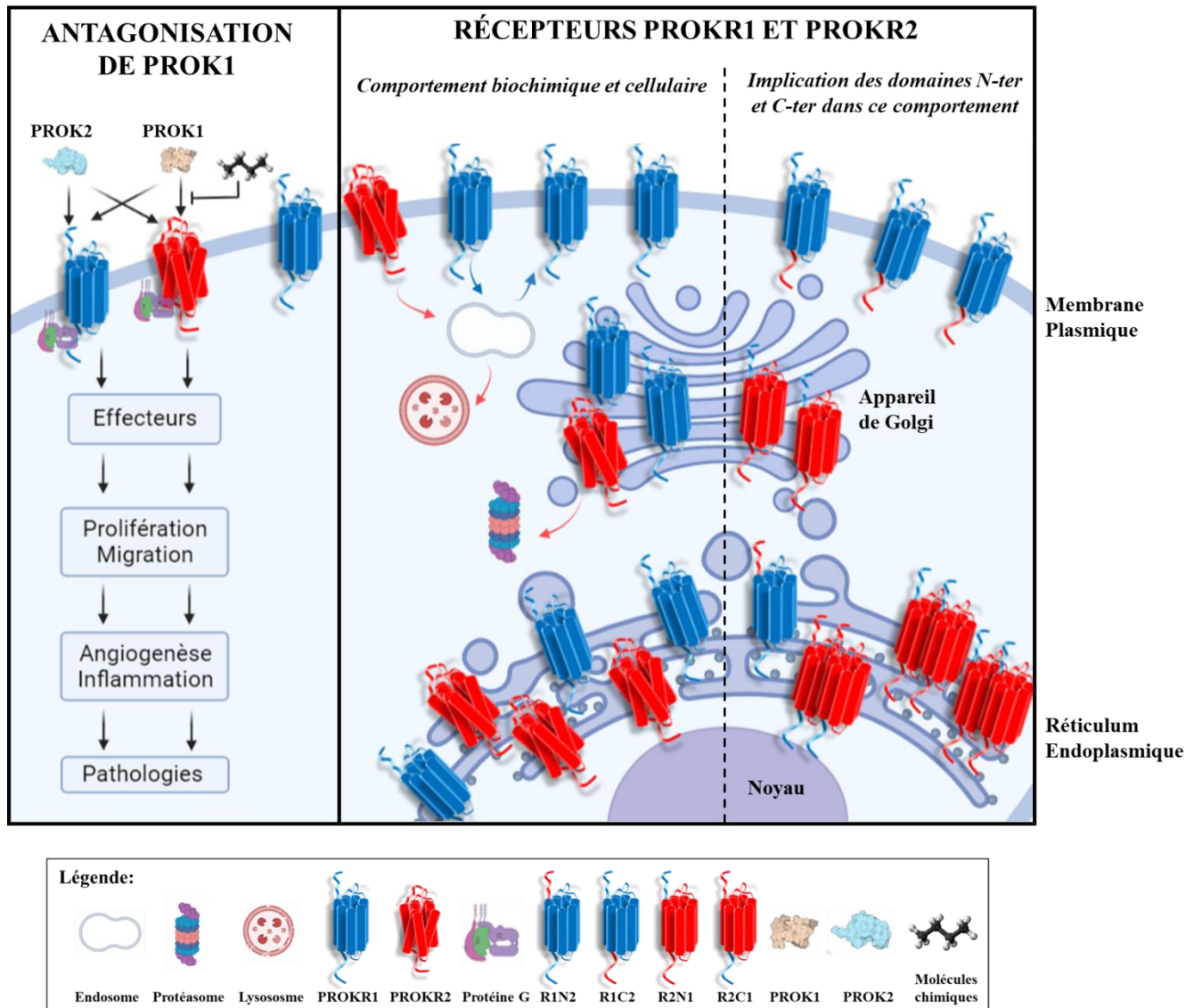


Schéma 2 : Schéma récapitulatif de mon projet de thèse

PERSPECTIVES

I. AMÉLIORATION DE LA PRODUCTION DE PROK1

A. Chez les procaryotes

Principal défi : éviter l'agrégation de PROK1

Afin de diriger la protéine PROK1 vers le périplasma, on propose de réduire le niveau d'expression de la protéine pour éviter la saturation des voies d'export vers ce compartiment. L'utilisation d'un autre promoteur, moins fort que le T7, pourrait constituer une piste prometteuse. Le cytoplasme d'E. Coli étant réducteur, rendant difficile l'expression de protéines possédant des ponts disulfures, nous envisageons d'utiliser des souches modifiées d'E. Coli. Deux systèmes sont responsables de la réduction des protéines, la voie thioredoxine et glutaredoxine. Il existe une souche où les deux voies ont été modifiées (Origami, Novagen). Il existe également une version améliorée de cette souche commercialisée par New England Biolabs sous le nom de SHuffle. La souche SHuffle a été modifiée pour les voies thioredoxine et glutaredoxine et surexprime la DsbC (Disulfide bond isomerase), une enzyme capable de catalyser la formation des ponts disulfures. L'utilisation de ces souches pourrait nous aider à obtenir une production cytoplasmique ou périplasmique.

B. Chez les eucaryotes

Principal défi : Augmentation de la production de PROK1 (Pichia Pastoris et BHK-21)

1. Système Pichia Pastoris:

Afin d'augmenter la production de PROK1, plusieurs méthodes sont à explorer. La première étant le criblage d'un plus grand nombre de clones afin d'identifier le clone ayant intégré le plus grand nombre de copies de la séquence de PROK1. Selon le fournisseur du plasmide pPICZ α (Invitrogen), un criblage jusqu'à 1000 clones serait nécessaire pour l'identification d'un clone « technique très hasardeuse ». En effet, l'insertion multiple est rare (1 à 10%). Dans notre cas, seulement une dizaine de clones ont été testés pour leurs niveaux de production. Une deuxième alternative serait la création *in vitro* d'un plasmide multimère comportant un nombre multiple de séquences de PROK1 comme indiqué dans le protocole du fournisseur Invitrogen.

2. Système BHK-21 :

Les BHK-21 sont des cellules adhérentes. Pour augmenter la production de PROK1 dans ce système, on propose d'augmenter le nombre de cellules cultivées. Pour cela nous utiliserons le système de culture en suspension. Les cellules seront cultivées dans un milieu de culture (CD BHK-21, Gibco) dédié à l'adaptation des cellules BHK adhérentes en cellules en suspension, sans l'ajout du FBS.

Cette méthode pourrait permettre d'augmenter la concentration des protéines produites et de s'affranchir de protéines contaminantes au moment de la purification.

3. Système SF9 :

Nous suspectons la non-reconnaissance du signal peptidique humain dans le système SF9, ce qui aurait empêché le repliement de la protéine recombinante et sa sécrétion. L'utilisation d'un signal peptidique endogène propre aux cellules d'insectes serait une alternative envisageable. Plusieurs signaux peptidiques ont été utilisés pour la production de protéines recombinantes, comme ceux utilisés pour les protéines GP67, GP64 ou HBM.

II. PURIFICATION DE PROK1

A. Chez les procaryotes

Une production sous forme de corps d'inclusions ne possédant pas de signal peptidique pour l'export dans le périplasme est envisageable. Elle peut être suivie d'une purification en conditions dénaturantes puis d'un repliement sur colonne ou en dialyse. Une nouvelle construction plasmidique a par ailleurs été réalisée dans ce but. Une production sous forme soluble pourrait résoudre les problèmes de purification rencontrés en utilisant les solutions énoncées précédemment.

B. Chez les eucaryotes

1. Pichia Pastoris

Afin d'éviter la floculation du milieu par augmentation du pH, nécessaire à l'étape de purification sur Ni-NTA, plusieurs méthodes sont envisageables :

- 1.** La production dans un milieu à pH 7, suivie de la purification à pH 6. La quantité de protéine PROK1 fixée au niveau de la colonne sera testée pour valider l'innocuité de la stratégie.
- 2.** Un changement de milieu par passage sur membrane d'ultracentrifugation. Cette méthode a été décrite par plusieurs groupes utilisant le modèle Pichia Pastoris.
- 3.** L'identification des molécules floculantes dans le milieu de culture lors du passage à pH 7 peut également être réalisée. Ceci nous permettra de les remplacer ou de les retirer en fonction de leur impact sur la production.

2. BHK-21 :

Le défi avec l'utilisation de ce modèle est que l'étiquette His ne semble pas être accessible pour se lier à la colonne Ni-NTA. En effet, on pense qu'elle est soit séquestrée à l'intérieur de la protéine soit qu'elle est en interaction avec la surface de la protéine.

On propose de placer l'étiquette His au niveau de la partie N-ter, avec le risque de perturber l'accès du ligand à son récepteur. En effet, pour éluer le ligand de la colonne Ni-NTA, on va devoir utiliser la protéase TEV qui va reconnaître son site d'action placé entre le His et le début de la partie N-ter de PROK1. Cette action va générer une extrémité N-ter avec quelques acides aminés en plus capables d'empêcher la liaison du ligand avec son récepteur.

Si l'on considère la deuxième hypothèse, l'addition d'un agent dénaturant de faible force comme le tween-20 ou de faible concentration comme l'Urée à 0,5M pourrait résoudre le problème d'accessibilité sans dénaturer la protéine.

III. MODÈLE *IN SILICO*, DOCKING MOLÉCULAIRE ET TEST FONCTIONNEL

L'ensemble des molécules chimiques provenant de la banque ChemBio ainsi que des autres chimiothèques, va être testé. Une nouvelle étape de docking moléculaire a également été effectuée récemment en criblant la banque ZINC1512. Cette étape a ciblé la zone d'interaction identifiée entre PROK1 et PROKR2. Plus de deux millions de composés ont été criblés et 200 molécules ont été identifiées sur la base de leur docking score ($DS < -7$). Ces résultats vont être analysés, les molécules commandées et ensuite testées.

Concernant les 3 molécules identifiées comme prometteuses, des tests de toxicité, prolifération et migration vont être entrepris. Par la suite ces molécules pourront être testées sur des modèles murins de pathologies PROK1-dépendantes

IV. MODÈLE CELLULAIRE

Une étude plus approfondie des systèmes de dégradation et d'endocytose/recyclage doit être menée. Tout d'abord, et afin de distinguer au mieux les lysosomes des endosomes de recyclage, un double marquage pourrait être réalisé avec les protéines Lamp1 et la cathepsine, par exemple. L'étude de la voie d'endocytose/recyclage doit être également décryptée par la technique de biotinylation de surface. Afin d'évaluer au mieux l'implication de l'ubiquitine-protéasome dans la dégradation du PROKR1 et PROKR2, une immunofluorescence pourrait être réalisée avec un marquage par PSMA1 ou PSMD1. En lien avec cette voie de dégradation, le profil d'ubiquitination va être recherché par western Blot après immunoprécipitation. Concernant l'état de glycosylation, une caractérisation de la bande à 37kDa après clivage à l'endoH est nécessaire. Cette caractérisation pourrait se faire par spectrométrie de masse après enrichissement en protéines correspondant à la bande 37kDa par immunoprécipitation.

Afin d'expliquer l'expression différentielle et la localisation des récepteurs PROKR1 et PROKR2, des études portant sur les rôles de motifs et de protéines régulatrices vont être réalisées.

Par exemple, l'implication du motif YS (uniquement présent en N-ter de PROKR1) va être étudiée par mutation du motif ou par permutation entre les deux récepteurs.

L'implication des modifications post-traductionnelles (MPTs), comme la N et O-Glycosylation au niveau N-ter, ou les phosphorylations au niveau C-ter, seront étudiées par mutation ou permutation entre les deux récepteurs. Les protéines régulatrices comme la Snapine ou MRAP2

connues chez les prokinétines comme protéines qui influencent le trafic des récepteurs vont être étudiées par immunoprécipitation, cross-linking, immunofluorescence ou par mutation des sites de reconnaissance.

L'expression et la localisation différentielles entre les deux récepteurs pourraient être également liées à leurs états oligomériques ; homo- ou hétéromérique. Ces mécanismes pourraient être étudiés par PLA (Proximity Ligation Assay), FRET/BRET, ou crosslinking par acides aminés photo-activables. Le rôle des N-ter et C-ter dans ces processus va également être recherché.

Enfin, l'ensemble des processus étudiés dans cette partie de mon projet, comme la stabilité, l'expression à la membrane, l'endocytose/recyclage, la dégradation, le trafic intracellulaire et la dimérisation vont être également réalisés, en présence des ligands PROK1 ou PROK2 pour évaluer leurs effets.

REFERENCES

1. Bernard, C. Introduction à l'étude de la médecine expérimentale. (Flammarion, 2013).
2. Le Roux, R. L'homéostasie sociale selon Norbert Wiener. *Rev. Hist. Sci. Hum.* 16, 113 (2007).
3. Miller, E. & Lappin, S. Physiology, Cellular Receptor. PubMed <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32119290/> (2022).
4. Fredriksson, R. & Schiöth, H. The repertoire of G-protein-coupled receptors in fully sequenced genomes. *Molecular pharmacology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15687224/> (2005) doi:10.1124/mol.104.009001.
5. Latorraca, N. R., Venkatakrishnan, A. J. & Dror, R. O. GPCR Dynamics: Structures in Motion. *Chem. Rev.* 117, 139–155 (2017).
6. Duc, N., Kim, H. & Chung, K. Structural mechanism of G protein activation by G protein-coupled receptor. *European journal of pharmacology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25981300/> (2015) doi:10.1016/j.ejphar.2015.05.016.
7. Hauser, A., Attwood, M., Rask-Andersen, M., Schiöth, H. & Gloriam, D. Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. *Nature reviews. Drug discovery* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29075003/> (2017) doi:10.1038/nrd.2017.178.
8. Pándy-Szekeres, G. et al. GPCRdb in 2018: adding GPCR structure models and ligands. *Nucleic Acids Res.* 46, D440–D446 (2018).
9. Bockaert, J. & Pin, J. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *The EMBO journal* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10202136/> (1999) doi:10.1093/emboj/18.7.1723.
10. Hill, S. G-protein-coupled receptors: past, present and future. *British journal of pharmacology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16402114/> (2006) doi:10.1038/sj.bjp.0706455.
11. Bar-Shavit, R. et al. G Protein-Coupled Receptors in Cancer. *International journal of molecular sciences* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27529230/> (2016) doi:10.3390/ijms17081320.
12. Heng, B., Aubel, D. & Fussenegger, M. An overview of the diverse roles of G-protein coupled receptors (GPCRs) in the pathophysiology of various human diseases. *Biotechnology advances* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23999358/> (2013) doi:10.1016/j.biotechadv.2013.08.017.
13. Conn, P., Ulloa-Aguirre, A., Ito, J. & Janovick, J. G protein-coupled receptor trafficking in health and disease: lessons learned to prepare for therapeutic mutant rescue in vivo. *Pharmacological reviews* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17878512/> (2007) doi:10.1124/pr.59.3.2.
14. Chung, S., Funakoshi, T. & Civelli, O. Orphan GPCR research. *British journal of pharmacology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18071299/> (2008) doi:10.1038/sj.bjp.0707606.
15. Schertler, G., Villa, C. & Henderson, R. Projection structure of rhodopsin. *Nature* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8469290/> (1993) doi:10.1038/362770a0.
16. Hibert, M., Trumpp-Kallmeyer, S., Hoflack, J. & Bruinvels, A. This is not a G protein-coupled receptor. *Trends in pharmacological sciences* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8095116/> (1993) doi:10.1016/0165-6147(93)90106-t.

17. Palczewski, K. et al. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* (New York, N.Y.) <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10926528/> (2000) doi:10.1126/science.289.5480.739.
18. GPCRdb. <https://gpcrdb.org/structure/statistics>.
19. Probst, W., Snyder, L., Schuster, D., Brosius, J. & Sealfon, S. Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily. *DNA and cell biology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1310857/> (1992) doi:10.1089/dna.1992.11.1.
20. Raingeval, C. Méthodes RMN pour la découverte de nouveaux ligands ciblant les récepteurs couplés aux protéines G. (Université de Lyon, 2019).
21. Kolakowski, L. GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors & channels* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8081729/> (1994).
22. Attwood, T. & Findlay, J. Fingerprinting G-protein-coupled receptors. *Protein engineering* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8170923/> (1994) doi:10.1093/protein/7.2.195.
23. Schiöth, H. & Fredriksson, R. The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. *General and comparative endocrinology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15862553/> (2005) doi:10.1016/j.ygcen.2004.12.018.
24. Munk, C. et al. GPCRdb: the G protein-coupled receptor database – an introduction. *Br. J. Pharmacol.* 173, 2195–2207 (2016).
25. Jeffrey Conn, P., Christopoulos, A. & Lindsley, C. W. Allosteric modulators of GPCRs: a novel approach for the treatment of CNS disorders. *Nat. Rev. Drug Discov.* 8, 41–54 (2009).
26. Rovati, G., Capra, V. & Neubig, R. The highly conserved DRY motif of class A G protein-coupled receptors: beyond the ground state. *Molecular pharmacology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17192495/> (2007) doi:10.1124/mol.106.029470.
27. Ceresa, B. & Limbird, L. 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. *The Journal of biological chemistry* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7961941/> (1994).
28. Hwang, J.-I. et al. Expansion of Secretin-Like G Protein-Coupled Receptors and Their Peptide Ligands via Local Duplications Before and After Two Rounds of Whole-Genome Duplication. *Mol. Biol. Evol.* 30, 1119–1130 (2013).
29. Bortolato, A. et al. Structure of Class B GPCRs: new horizons for drug discovery. *British journal of pharmacology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24628305/> (2014) doi:10.1111/bph.12689.
30. Poyner, D. R. & Hay, D. L. Secretin family (Class B) G protein-coupled receptors – from molecular to clinical perspectives. *Br. J. Pharmacol.* 166, 1–3 (2012).
31. Luo, R. et al. G protein-coupled receptor 56 and collagen III, a receptor-ligand pair, regulates cortical development and lamination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21768377/> (2011) doi:10.1073/pnas.1104821108.

32. Paavola, K. J. & Hall, R. A. Adhesion G Protein-Coupled Receptors: Signaling, Pharmacology, and Mechanisms of Activation. *Mol. Pharmacol.* 82, 777–783 (2012).
33. Chiang, N.-Y. et al. Disease-associated GPR56 Mutations Cause Bilateral Frontoparietal Polymicrogyria via Multiple Mechanisms. *J. Biol. Chem.* 286, 14215–14225 (2011).
34. Hanlon, C. & Andrew, D. Outside-in signaling--a brief review of GPCR signaling with a focus on the Drosophila GPCR family. *Journal of cell science* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26345366/> (2015) doi:10.1242/jcs.175158.
35. Pin, J., Galvez, T. & Prézeau, L. Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors. *Pharmacology & therapeutics* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12782243/> (2003) doi:10.1016/s0163-7258(03)00038-x.
36. Nakagawa, T., Sakurai, T., Nishioka, T. & Touhara, K. [Molecular mechanisms underlying sex-pheromone reception in insects]. *Tanpakushitsu kakusan koso. Protein, nucleic acid, enzyme* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16218457/> (2005).
37. Prabhu, Y. & Eichinger, L. The Dictyostelium repertoire of seven transmembrane domain receptors. *European journal of cell biology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16735079/> (2006) doi:10.1016/j.ejcb.2006.04.003.
38. GPCRdb. <https://gpcrdb.org/protein/>.
39. Malbon, C. Frizzleds: new members of the superfamily of G-protein-coupled receptors. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14977528/> (2004) doi:10.2741/1308.
40. Huang, H.-C. & Klein, P. S. The Frizzled family: receptors for multiple signal transduction pathways. *Genome Biol.* 5, 234 (2004).
41. Fredriksson, R., Lagerström, M., Lundin, L. & Schiöth, H. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Molecular pharmacology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12761335/> (2003) doi:10.1124/mol.63.6.1256.
42. Wang, H., Liu, T. & Malbon, C. Structure-function analysis of Frizzleds. *Cellular signalling* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16480852/> (2006) doi:10.1016/j.cellsig.2005.12.008.
43. Alfonso-Prieto, M., Giorgetti, A. & Carloni, P. Multiscale simulations on human Frizzled and Taste2 GPCRs. *Current opinion in structural biology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30933747/> (2019) doi:10.1016/j.sbi.2019.02.009.
44. Bolivar, J. et al. Interaction of lipids with the neurotensin receptor 1. *Biochimica et biophysica acta* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26926422/> (2016) doi:10.1016/j.bbamem.2016.02.032.
45. Luchetti, G. et al. Cholesterol activates the G-protein coupled receptor Smoothed to promote Hedgehog signaling. *eLife* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27705744/> (2016) doi:10.7554/eLife.20304.

46. Bhattarai, A., Wang, J. & Miao, Y. G-Protein-Coupled Receptor-Membrane Interactions Depend on the Receptor Activation state. *J. Comput. Chem.* 41, 460–471 (2020).
47. Manglik, A. & Kobilka, B. The role of protein dynamics in GPCR function: insights from the β 2AR and rhodopsin. *Current opinion in cell biology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24534489/> (2014) doi:10.1016/j.ceb.2014.01.008.
48. Sleno, R. & Hébert, T. The Dynamics of GPCR Oligomerization and Their Functional Consequences. *International review of cell and molecular biology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29699691/> (2018) doi:10.1016/bs.ircmb.2018.02.005.
49. Samama, P., Cotecchia, S., Costa, T. & Lefkowitz, R. J. A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. *J. Biol. Chem.* 268, 4625–4636 (1993).
50. Leff, P. The two-state model of receptor activation. *Trends Pharmacol. Sci.* 16, 89–97 (1995).
51. Gether, U. & Kobilka, B. K. G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation. *J. Biol. Chem.* 273, 17979–17982 (1998).
52. Alves, I. D. et al. Selectivity, cooperativity, and reciprocity in the interactions between the delta-opioid receptor, its ligands, and G-proteins. *J. Biol. Chem.* 279, 44673–44682 (2004).
53. Ghanouni, P. et al. Functionally different agonists induce distinct conformations in the G protein coupling domain of the beta 2 adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* 276, 24433–24436 (2001).
54. Bond, R. A. & Ijzerman, A. P. Recent developments in constitutive receptor activity and inverse agonism, and their potential for GPCR drug discovery. *Trends Pharmacol. Sci.* 27, 92–96 (2006).
55. Tate, C. G. A crystal clear solution for determining G-protein-coupled receptor structures. *Trends Biochem. Sci.* 37, 343–352 (2012).
56. Kenakin, T. Functional selectivity through protean and biased agonism: who steers the ship? *Mol. Pharmacol.* 72, 1393–1401 (2007).
57. DeWire, S. M. & Violin, J. D. Biased ligands for better cardiovascular drugs: dissecting G-protein-coupled receptor pharmacology. *Circ. Res.* 109, 205–216 (2011).
58. Manglik, A. et al. Structure-based discovery of opioid analgesics with reduced side effects. *Nature* 537, 185–190 (2016).
59. Smith, J. S., Lefkowitz, R. J. & Rajagopal, S. Biased signalling: from simple switches to allosteric microprocessors. *Nat. Rev. Drug Discov.* 17, 243–260 (2018).
60. Azzi, M. et al. Beta-arrestin-mediated activation of MAPK by inverse agonists reveals distinct active conformations for G protein-coupled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 11406–11411 (2003).
61. Burford, N. T., Watson, J., Bertekap, R. & Alt, A. Strategies for the identification of allosteric modulators of G-protein-coupled receptors. *Biochem. Pharmacol.* 81, 691–702 (2011).
62. Wild, C., Cunningham, K. A. & Zhou, J. Allosteric Modulation of G Protein-Coupled Receptors: An Emerging Approach of Drug Discovery. *Austin J. Pharmacol. Ther.* 2, 1101 (2014).

63. Congreve, M., Oswald, C. & Marshall, F. H. Applying Structure-Based Drug Design Approaches to Allosteric Modulators of GPCRs. *Trends Pharmacol. Sci.* 38, 837–847 (2017).
64. Slosky, L. M., Caron, M. G. & Barak, L. S. Biased Allosteric Modulators: New Frontiers in GPCR Drug Discovery. *Trends Pharmacol. Sci.* 42, 283–299 (2021).
65. Kamal, M. & Jockers, R. Bitopic ligands: all-in-one orthosteric and allosteric. *F1000 Biol. Rep.* 1, 77 (2009).
66. Fronik, P., Gaiser, B. I. & Sejer Pedersen, D. Bitopic Ligands and Metastable Binding Sites: Opportunities for G Protein-Coupled Receptor (GPCR) Medicinal Chemistry. *J. Med. Chem.* 60, 4126–4134 (2017).
67. Rajagopal, S., Rajagopal, K. & Lefkowitz, R. J. Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 373–386 (2010).
68. Oldham, W. M. & Hamm, H. E. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 60–71 (2008).
69. Milligan, G. & Kostenis, E. Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br. J. Pharmacol.* 147 Suppl 1, S46-55 (2006).
70. de Opakua, A. I. et al. Molecular mechanism of G α i activation by non-GPCR proteins with a G α -Binding and Activating motif. *Nat. Commun.* 8, 15163 (2017).
71. Denis, C., Saulière, A., Galandrin, S., Sénard, J.-M. & Galés, C. Probing heterotrimeric G protein activation: applications to biased ligands. *Curr. Pharm. Des.* 18, 128–144 (2012).
72. Pierre, S., Eschenhagen, T., Geisslinger, G. & Scholich, K. Capturing adenylyl cyclases as potential drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* 8, 321–335 (2009).
73. Waheed, A. & Freed, E. The Role of Lipids in Retrovirus Replication. *Viruses* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20740061/> (2010) doi:10.3390/v2051146.
74. Rosenzweig, D. H. et al. Subunit Dissociation and Diffusion Determine the Subcellular Localization of Rod and Cone Transducins. *J. Neurosci.* 27, 5484–5494 (2007).
75. Galés, C. et al. Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes. *Nature structural & molecular biology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16906158/> (2006) doi:10.1038/nsmb1134.
76. García-Nafria, J., Lee, Y., Bai, X., Carpenter, B. & Tate, C. G. Cryo-EM structure of the adenosine A2A receptor coupled to an engineered heterotrimeric G protein. *eLife* 7, (2018).
77. Koehl, A. et al. Structure of the μ -opioid receptor-G α i protein complex. *Nature* 558, 547–552 (2018).
78. Rasmussen, S. G. F. et al. Crystal Structure of the β 2Adrenergic Receptor-Gs protein complex. *Nature* 477, 549–555 (2011).
79. Liang, Y.-L. et al. Phase-plate cryo-EM structure of a class B GPCR-G protein complex. *Nature* 546, 118–123 (2017).

80. Zhang, Y. et al. Cryo-EM structure of the activated GLP-1 receptor in complex with G protein. *Nature* 546, 248–253 (2017).
81. Carpenter, B., Nehmé, R., Warne, T., Leslie, A. G. W. & Tate, C. G. Structure of the adenosine A(2A) receptor bound to an engineered G protein. *Nature* 536, 104–107 (2016).
82. Semack, A., Sandhu, M., Malik, R. U., Vaidehi, N. & Sivaramakrishnan, S. Structural Elements in the G α s and G α q C Termini That Mediate Selective G Protein-coupled Receptor (GPCR) Signaling. *J. Biol. Chem.* 291, 17929–17940 (2016).
83. Draper-Joyce, C. J. et al. Structure of the adenosine-bound human adenosine A1 receptor-Gi complex. *Nature* 558, 559–563 (2018).
84. Renault, P., Louet, M., Marie, J., Labesse, G. & Floquet, N. Molecular Dynamics Simulations of the Allosteric Modulation of the Adenosine A2a Receptor by a Mini-G Protein. *Sci. Rep.* 9, 1–12 (2019).
85. Hilger, D., Masureel, M. & Kobilka, B. K. Structure and dynamics of GPCR signaling complexes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 25, 4–12 (2018).
86. Dorsam, R. T. & Gutkind, J. S. G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 7, 79–94 (2007).
87. DiGiacomo, V., Marivin, A. & Garcia-Marcos, M. When Heterotrimeric G Proteins Are Not Activated by G Protein-Coupled Receptors: Structural Insights and Evolutionary Conservation. *Biochemistry (Mosc.)* 57, 255–257 (2018).
88. Luttrell, L. M. et al. Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* 283, 655–661 (1999).
89. Craft, C. M., Whitmore, D. H. & Wiechmann, A. F. Cone arrestin identified by targeting expression of a functional family. *J. Biol. Chem.* 269, 4613–4619 (1994).
90. Lohse, M. J., Benovic, J. L., Codina, J., Caron, M. G. & Lefkowitz, R. J. beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science* 248, 1547–1550 (1990).
91. Attramadal, H. et al. Beta-arrestin2, a novel member of the arrestin/beta-arrestin gene family. *J. Biol. Chem.* 267, 17882–17890 (1992).
92. Gurevich, V. V. & Gurevich, E. V. The structural basis of arrestin-mediated regulation of G-protein-coupled receptors. *Pharmacol. Ther.* 110, 465–502 (2006).
93. Song, Q., Ji, Q. & Li, Q. The role and mechanism of β -arrestins in cancer invasion and metastasis (Review). *Int. J. Mol. Med.* 41, 631–639 (2018).
94. Han, M., Gurevich, V. V., Vishnivetskiy, S. A., Sigler, P. B. & Schubert, C. Crystal structure of beta-arrestin at 1.9 Å: possible mechanism of receptor binding and membrane Translocation. *Struct. Lond. Engl.* 1993 9, 869–880 (2001).
95. Zhou, X. E. et al. Identification of Phosphorylation Codes for Arrestin Recruitment by G Protein-Coupled Receptors. *Cell* 170, 457–469.e13 (2017).

96. Lefkowitz, R. J. & Shenoy, S. K. Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science* 308, 512–517 (2005).
97. Tao, Y.-X. & Conn, P. M. Chaperoning G Protein-Coupled Receptors: From Cell Biology to Therapeutics. *Endocr. Rev.* 35, 602–647 (2014).
98. Chino, H. & Mizushima, N. ER-Phagy: Quality Control and Turnover of Endoplasmic Reticulum. *Trends Cell Biol.* 30, 384–398 (2020).
99. Rutz, C., Klein, W. & Schülein, R. N-Terminal Signal Peptides of G Protein-Coupled Receptors: Significance for Receptor Biosynthesis, Trafficking, and Signal Transduction. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 132, 267–287 (2015).
100. Jomaa, A. et al. Structure of the quaternary complex between SRP, SR, and translocon bound to the translating ribosome. *Nat. Commun.* 8, 15470 (2017).
101. Radons, J. The human HSP70 family of chaperones: where do we stand? *Cell Stress Chaperones* 21, 379–404 (2016).
102. Shiber, A. et al. Cotranslational assembly of protein complexes in eukaryotes revealed by ribosome profiling. *Nature* 561, 268–272 (2018).
103. Schülein, R., Westendorf, C., Krause, G. & Rosenthal, W. Functional significance of cleavable signal peptides of G protein-coupled receptors. *Eur. J. Cell Biol.* 91, 294–299 (2012).
104. Nanoff, C. & Freissmuth, M. ER-bound steps in the biosynthesis of G protein-coupled receptors. *Subcell. Biochem.* 63, 1–21 (2012).
105. Appenzeller-Herzog, C. & Hauri, H.-P. The ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC): in search of its identity and function. *J. Cell Sci.* 119, 2173–2183 (2006).
106. Arvan, P., Zhao, X., Ramos-Castaneda, J. & Chang, A. Secretory pathway quality control operating in Golgi, plasmalemmal, and endosomal systems. *Traffic Cph. Den.* 3, 771–780 (2002).
107. Lorente-Rodríguez, A. & Barlowe, C. Entry and Exit Mechanisms at the cis-Face of the Golgi Complex. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, a005207 (2011).
108. Tang, B. L., Wang, Y., Ong, Y. S. & Hong, W. COPII and exit from the endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta* 1744, 293–303 (2005).
109. Schülein, R. et al. A dileucine sequence and an upstream glutamate residue in the intracellular carboxyl terminus of the vasopressin V2 receptor are essential for cell surface transport in COS.M6 cells. *Mol. Pharmacol.* 54, 525–535 (1998).
110. Bermak, J. C., Li, M., Bullock, C. & Zhou, Q. Y. Regulation of transport of the dopamine D1 receptor by a new membrane-associated ER protein. *Nat. Cell Biol.* 3, 492–498 (2001).
111. Robert, J., Clauser, E., Petit, P. X. & Ventura, M. A. A novel C-terminal motif is necessary for the export of the vasopressin V1b/V3 receptor to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 280, 2300–2308 (2005).
112. Duvernay, M. T., Zhou, F. & Wu, G. A conserved motif for the transport of G protein-coupled receptors from the endoplasmic reticulum to the cell surface. *J. Biol. Chem.* 279, 30741–30750 (2004).

113. Dong, C. & Wu, G. Regulation of anterograde transport of alpha2-adrenergic receptors by the N termini at multiple intracellular compartments. *The Journal of biological chemistry* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17038316/> (2006) doi:10.1074/jbc.M605734200.
114. Dong, C., Filipeanu, C. M., Duvernay, M. T. & Wu, G. Regulation of G protein-coupled receptor export trafficking. *Biochim. Biophys. Acta* 1768, 853–870 (2007).
115. Hermosilla, R. & Schülein, R. Sorting functions of the individual cytoplasmic domains of the G protein-coupled vasopressin V(2) receptor in Madin Darby canine kidney epithelial cells. *Mol. Pharmacol.* 60, 1031–1039 (2001).
116. Jones, K. A. et al. GABA(B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA(B)R1 and GABA(B)R2. *Nature* 396, 674–679 (1998).
117. White, J. et al. Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor. *Nature* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9872316/> (1998) doi:10.1038/25354.
118. Ng, G. et al. Identification of a GABAB receptor subunit, gb2, required for functional GABAB receptor activity. *The Journal of biological chemistry* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10075644/> (1999) doi:10.1074/jbc.274.12.7607.
119. Robbins, M. et al. GABA(B2) is essential for g-protein coupling of the GABA(B) receptor heterodimer. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11588177/> (2001) doi:10.1523/JNEUROSCI.21-20-08043.2001.
120. Sullivan, R. et al. Coexpression of full-length gamma-aminobutyric acid(B) (GABA(B)) receptors with truncated receptors and metabotropic glutamate receptor 4 supports the GABA(B) heterodimer as the functional receptor. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10773016/> (2000).
121. Achour, L., Labbé-Jullié, C., Scott, M. G. H. & Marullo, S. An escort for GPCRs: implications for regulation of receptor density at the cell surface. *Trends Pharmacol. Sci.* 29, 528–535 (2008).
122. Jordens, I., Marsman, M., Kuijl, C. & Neefjes, J. Rab proteins, connecting transport and vesicle fusion. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16262719/> (2005) doi:10.1111/j.1600-0854.2005.00336.x.
123. Patwardhan, A., Cheng, N. & Trejo, J. Post-Translational Modifications of G Protein–Coupled Receptors Control Cellular Signaling Dynamics in Space and Time. *Pharmacol. Rev.* 73, 120–151 (2021).
124. Daaka, Y., Luttrell, L. & Lefkowitz, R. Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9363896/> (1997) doi:10.1038/36362.
125. Zamah, A., Delahunty, M., Luttrell, L. & Lefkowitz, R. Protein kinase A-mediated phosphorylation of the beta 2-adrenergic receptor regulates its coupling to Gs and Gi. Demonstration in a reconstituted system. *The Journal of biological chemistry* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12063255/> (2002) doi:10.1074/jbc.M202753200.

126. Does, M. & Trejo, J. Ubiquitination of G protein-coupled receptors: functional implications and drug discovery. *Molecular pharmacology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22700696/> (2012) doi:10.1124/mol.112.079418.
127. Petaja-Repo, U. et al. Newly synthesized human delta opioid receptors retained in the endoplasmic reticulum are retrotranslocated to the cytosol, deglycosylated, ubiquitinated, and degraded by the proteasome. *The Journal of biological chemistry* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11054417/> (2001) doi:10.1074/jbc.M007151200.
128. Katzmann, D., Babst, M. & Emr, S. Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11511343/> (2001) doi:10.1016/s0092-8674(01)00434-2.
129. Cook, L., Zhu, C. & Hinkle, P. Thyrotropin-releasing hormone receptor processing: role of ubiquitination and proteasomal degradation. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md.) <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12805411/> (2003) doi:10.1210/me.2003-0073.
130. Shenoy, S., McDonald, P., Kohout, T. & Lefkowitz, R. Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin. *Science* (New York, N.Y.) <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11588219/> (2001) doi:10.1126/science.1063866.
131. Trejo, J., Hammes, S. & Coughlin, S. Termination of signaling by protease-activated receptor-1 is linked to lysosomal sorting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9811863/> (1998) doi:10.1073/pnas.95.23.13698.
132. Trejo, J. & Coughlin, S. The cytoplasmic tails of protease-activated receptor-1 and substance P receptor specify sorting to lysosomes versus recycling. *The Journal of biological chemistry* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9890984/> (1999) doi:10.1074/jbc.274.4.2216.
133. Marchese, A. & Benovic, J. Agonist-promoted ubiquitination of the G protein-coupled receptor CXCR4 mediates lysosomal sorting. *The Journal of biological chemistry* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11641392/> (2001) doi:10.1074/jbc.C100527200.
134. Shenoy, S. et al. Nedd4 mediates agonist-dependent ubiquitination, lysosomal targeting, and degradation of the beta2-adrenergic receptor. *The Journal of biological chemistry* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18544533/> (2008) doi:10.1074/jbc.M709668200.
135. Wolfe, B., Marchese, A. & Trejo, J. Ubiquitination differentially regulates clathrin-dependent internalization of protease-activated receptor-1. *The Journal of cell biology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17535965/> (2007) doi:10.1083/jcb.200610154.
136. Canals, M. et al. Ubiquitination of CXCR7 controls receptor trafficking. *PloS one* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22457824/> (2012) doi:10.1371/journal.pone.0034192.
137. Schaeuble, K. et al. Ubiquitylation of the chemokine receptor CCR7 enables efficient receptor recycling and cell migration. *Journal of cell science* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22797918/> (2012) doi:10.1242/jcs.097519.

138. Lee, S. et al. Nedd4 E3 ligase and beta-arrestins regulate ubiquitination, trafficking, and stability of the mGlu7 receptor. *eLife* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31373553/> (2019) doi:10.7554/eLife.44502.
139. Leclair, H. et al. Control of CXCR2 activity through its ubiquitination on K327 residue. *BMC cell biology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25339290/> (2014) doi:10.1186/s12860-014-0038-0.
140. Zhang, Q. et al. Site-specific polyubiquitination differentially regulates parathyroid hormone receptor-initiated MAPK signaling and cell proliferation. *The Journal of biological chemistry* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29444827/> (2018) doi:10.1074/jbc.RA118.001737.
141. Lanctot, P. et al. Importance of N-glycosylation positioning for cell-surface expression, targeting, affinity and quality control of the human AT1 receptor. *The Biochemical journal* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15869468/> (2005) doi:10.1042/BJ20050189.
142. Wheatley, M. & Hawtin, S. Glycosylation of G-protein-coupled receptors for hormones central to normal reproductive functioning: its occurrence and role. *Human reproduction update* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10465525/> (1999) doi:10.1093/humupd/5.4.356.
143. Wheatley, M. et al. Lifting the lid on GPCRs: the role of extracellular loops. *British journal of pharmacology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21864311/> (2012) doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01629.x.
144. Stanley, P., Moremen, K. W., Lewis, N. E., Taniguchi, N. & Aebi, M. N-Glycans. in *Essentials of Glycobiology* (eds. Varki, A. et al.) (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2022).
145. van Koppen, C. & Nathanson, N. Site-directed mutagenesis of the m2 muscarinic acetylcholine receptor. Analysis of the role of N-glycosylation in receptor expression and function. *The Journal of biological chemistry* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2249995/> (1990).
146. Fukushima, Y. et al. Structural and functional analysis of the canine histamine H2 receptor by site-directed mutagenesis: N-glycosylation is not vital for its action. *The Biochemical journal* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7544576/> (1995) doi:10.1042/bj3100553.
147. Kozielwicz, P. et al. N-glycosylation and expression in human tissues of the orphan GPR61 receptor. *FEBS open bio* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29226084/> (2017) doi:10.1002/2211-5463.12339.
148. Karpa, K., Lidow, M., Pickering, M., Levenson, R. & Bergson, C. N-linked glycosylation is required for plasma membrane localization of D5, but not D1, dopamine receptors in transfected mammalian cells. *Molecular pharmacology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10531415/> (1999) doi:10.1124/mol.56.5.1071.
149. Lanctôt, P., Leclerc, P., Escher, E., Leduc, R. & Guillemette, G. Role of N-glycosylation in the expression and functional properties of human AT1 receptor. *Biochemistry* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10393537/> (1999) doi:10.1021/bi9830516.

150. Compton, S., Sandhu, S., Wijesuriya, S. & Hollenberg, M. Glycosylation of human proteinase-activated receptor-2 (hPAR2): role in cell surface expression and signalling. *The Biochemical journal* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12171601/> (2002) doi:10.1042/BJ20020706.
151. Michineau, S., Muller, L., Pizard, A., Alhenc-Gélas, F. & Rajerison, R. N-linked glycosylation of the human bradykinin B2 receptor is required for optimal cell-surface expression and coupling. *Biological chemistry* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14977046/> (2004) doi:10.1515/BC.2004.007.
152. Marada, S. et al. Functional Divergence in the Role of N-Linked Glycosylation in Smoothed Signaling. *PLoS genetics* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26291458/> (2015) doi:10.1371/journal.pgen.1005473.
153. Wang, T. et al. Identification and functional characterisation of N-linked glycosylation of the orphan G protein-coupled receptor Gpr176. *Scientific reports* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32157140/> (2020) doi:10.1038/s41598-020-61370-y.
154. Lackman, J. et al. Site-specific O-glycosylation of N-terminal serine residues by polypeptide GalNAc-transferase 2 modulates human δ -opioid receptor turnover at the plasma membrane. *Cellular signalling* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29097258/> (2018) doi:10.1016/j.cellsig.2017.10.016.
155. Guo, S. et al. Selectivity of commonly used inhibitors of clathrin-mediated and caveolae-dependent endocytosis of G protein-coupled receptors. *Biochimica et biophysica acta* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26055893/> (2015) doi:10.1016/j.bbamem.2015.05.024.
156. Russo, D., Chazenbalk, G., Nagayama, Y., Wadsworth, H. & Rapoport, B. Site-directed mutagenesis of the human thyrotropin receptor: role of asparagine-linked oligosaccharides in the expression of a functional receptor. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2017190/> (1991) doi:10.1210/mend-5-1-29.
157. Kaushal, S., Ridge, K. & Khorana, H. Structure and function in rhodopsin: the role of asparagine-linked glycosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8171029/> (1994) doi:10.1073/pnas.91.9.4024.
158. Nehring, R., D, R. & W, M. Glycosylation affects agonist binding and signal transduction of the rat somatostatin receptor subtype 3. *Journal of physiology, Paris* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11087995/> (2000) doi:10.1016/s0928-4257(00)00203-5.
159. Morii, H. & Watanabe, Y. A possible role of carbohydrate moieties in prostaglandin D2 and prostaglandin E2 receptor proteins from the porcine temporal cortex. *Archives of biochemistry and biophysics* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1309289/> (1992) doi:10.1016/0003-9861(92)90059-6.
160. Bannert, N. et al. Sialylated O-glycans and sulfated tyrosines in the NH2-terminal domain of CC chemokine receptor 5 contribute to high affinity binding of chemokines. *The Journal of experimental medicine* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11733580/> (2001) doi:10.1084/jem.194.11.1661.
161. Hauser, M. et al. Distinct CCR7 glycosylation pattern shapes receptor signaling and endocytosis to modulate chemotactic responses. *Journal of leukocyte biology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26819318/> (2016) doi:10.1189/jlb.2VMA0915-432RR.

162. Soto, A. & Trejo, J. N-linked glycosylation of protease-activated receptor-1 second extracellular loop: a critical determinant for ligand-induced receptor activation and internalization. *The Journal of biological chemistry* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20368337/> (2010) doi:10.1074/jbc.M110.111088.
163. He, J., Xu, J., Castleberry, A., Lau, A. & Hall, R. Glycosylation of beta(1)-adrenergic receptors regulates receptor surface expression and dimerization. *Biochemical and biophysical research communications* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12270132/> (2002) doi:10.1016/s0006-291x(02)02259-3.
164. Li, X., Zhou, M., Huang, W. & Yang, H. N-glycosylation of the β 2 adrenergic receptor regulates receptor function by modulating dimerization. *The FEBS journal* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28467637/> (2017) doi:10.1111/febs.14098.
165. Xu, J. et al. Heterodimerization of alpha 2A- and beta 1-adrenergic receptors. *The Journal of biological chemistry* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12529373/> (2003) doi:10.1074/jbc.M207968200.
166. Rondard, P. et al. Functioning of the dimeric GABA(B) receptor extracellular domain revealed by glycan wedge scanning. *The EMBO journal* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18388862/> (2008) doi:10.1038/emboj.2008.64.
167. Goth, C. et al. Site-specific O-Glycosylation by Polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferase 2 (GalNAc-transferase T2) Co-regulates β 1-Adrenergic Receptor N-terminal Cleavage. *The Journal of biological chemistry* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28167537/> (2017) doi:10.1074/jbc.M116.730614.
168. Goth, C., Vakhrushev, S., Joshi, H., Clausen, H. & Schjoldager, K. Fine-Tuning Limited Proteolysis: A Major Role for Regulated Site-Specific O-Glycosylation. *Trends in biochemical sciences* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29506880/> (2018) doi:10.1016/j.tibs.2018.02.005.
169. Park, M., Reddy, G., Wallukat, G., Xiang, Y. & Steinberg, S. β 1-adrenergic receptor O-glycosylation regulates N-terminal cleavage and signaling responses in cardiomyocytes. *Scientific reports* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28801655/> (2017) doi:10.1038/s41598-017-06607-z.
170. O'Brien, P. & Zatz, M. Acylation of bovine rhodopsin by [3H]palmitic acid. *The Journal of biological chemistry* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6715336/> (1984).
171. Korycka, J. et al. Human DHHC proteins: a spotlight on the hidden player of palmitoylation. *European journal of cell biology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22178113/> (2012) doi:10.1016/j.ejcb.2011.09.013.
172. Ohno, Y., Kihara, A., Sano, T. & Igarashi, Y. Intracellular localization and tissue-specific distribution of human and yeast DHHC cysteine-rich domain-containing proteins. *Biochimica et biophysica acta* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16647879/> (2006) doi:10.1016/j.bbali.2006.03.010.
173. Petäjä-Repo, U. et al. Distinct subcellular localization for constitutive and agonist-modulated palmitoylation of the human delta opioid receptor. *The Journal of biological chemistry* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16595649/> (2006) doi:10.1074/jbc.M602267200.

174. O'Dowd, B., Hnatowich, M., Caron, M., Lefkowitz, R. & Bouvier, M. Palmitoylation of the human beta 2-adrenergic receptor. Mutation of Cys341 in the carboxyl tail leads to an uncoupled nonpalmitoylated form of the receptor. *The Journal of biological chemistry* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2540197/> (1989).
175. Adachi, N., Hess, D., McLaughlin, P. & Stamlor, J. S-Palmitoylation of a Novel Site in the β 2-Adrenergic Receptor Associated with a Novel Intracellular Itinerary. *The Journal of biological chemistry* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27481942/> (2016) doi:10.1074/jbc.M116.725762.
176. Ponimaskin, E., Schmidt, M., Heine, M., Bickmeyer, U. & Richter, D. 5-Hydroxytryptamine 4(a) receptor expressed in Sf9 cells is palmitoylated in an agonist-dependent manner. *The Biochemical journal* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11171060/> (2001) doi:10.1042/0264-6021:3530627.
177. Badawy, S., Okada, T., Kajimoto, T., Ijuin, T. & Nakamura, S. DHHC5-mediated palmitoylation of S1P receptor subtype 1 determines G-protein coupling. *Scientific reports* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29185452/> (2017) doi:10.1038/s41598-017-16457-4.
178. Naumenko, V. & Ponimaskin, E. Palmitoylation as a Functional Regulator of Neurotransmitter Receptors. *Neural plasticity* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29849559/> (2018) doi:10.1155/2018/5701348.
179. Blanpain, C. et al. Palmitoylation of CCR5 is critical for receptor trafficking and efficient activation of intracellular signaling pathways. *The Journal of biological chemistry* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11323418/> (2001) doi:10.1074/jbc.M100583200.
180. Percherancier, Y. et al. Palmitoylation-dependent control of degradation, life span, and membrane expression of the CCR5 receptor. *The Journal of biological chemistry* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11390405/> (2001) doi:10.1074/jbc.M104013200.
181. Adams, M., Christensen, M., He, Y., Waterhouse, N. & Hooper, J. The role of palmitoylation in signalling, cellular trafficking and plasma membrane localization of protease-activated receptor-2. *PloS one* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22140500/> (2011) doi:10.1371/journal.pone.0028018.
182. Schülein, R., Liebenhoff, U., Müller, H., Birnbaumer, M. & Rosenthal, W. Properties of the human arginine vasopressin V2 receptor after site-directed mutagenesis of its putative palmitoylation site. *The Biochemical journal* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8573100/> (1996) doi:10.1042/bj3130611.
183. Sadeghi, H., Innamorati, G., Dagarag, M. & Birnbaumer, M. Palmitoylation of the V2 vasopressin receptor. *Molecular pharmacology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9224808/> (1997) doi:10.1124/mol.52.1.21.
184. Tanaka, K. et al. Palmitoylation of human thyrotropin receptor: slower intracellular trafficking of the palmitoylation-defective mutant. *Endocrinology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9449658/> (1998) doi:10.1210/endo.139.2.5911.

185. Fukushima, Y. et al. Palmitoylation of the canine histamine H2 receptor occurs at Cys(305) and is important for cell surface targeting. *Biochimica et biophysica acta* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11420116/> (2001) doi:10.1016/s0167-4889(01)00104-5.
186. Ebersole, B. et al. Effect of C-Terminal S-Palmitoylation on D2 Dopamine Receptor Trafficking and Stability. *PLoS one* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26535572/> (2015) doi:10.1371/journal.pone.0140661.
187. Gao, Z., Ni, Y., Szabo, G. & Linden, J. Palmitoylation of the recombinant human A1 adenosine receptor: enhanced proteolysis of palmitoylation-deficient mutant receptors. *The Biochemical journal* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10455026/> (1999).
188. Barnett-Norris, J., Lynch, D. & Reggio, P. Lipids, lipid rafts and caveolae: their importance for GPCR signaling and their centrality to the endocannabinoid system. *Life sciences* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15993425/> (2005) doi:10.1016/j.lfs.2005.05.040.
189. Villar, V., Cuevas, S., Zheng, X. & Jose, P. Localization and signaling of GPCRs in lipid rafts. *Methods in cell biology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26928536/> (2016) doi:10.1016/bs.mcb.2015.11.008.
190. Papoucheva, E., Dumuis, A., Sebben, M., Richter, D. & Ponimaskin, E. The 5-hydroxytryptamine(1A) receptor is stably palmitoylated, and acylation is critical for communication of receptor with Gi protein. *The Journal of biological chemistry* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14604995/> (2004) doi:10.1074/jbc.M308177200.
191. Renner, U. et al. Localization of the mouse 5-hydroxytryptamine(1A) receptor in lipid microdomains depends on its palmitoylation and is involved in receptor-mediated signaling. *Molecular pharmacology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17540717/> (2007) doi:10.1124/mol.107.037085.
192. Tiu, A. et al. Lipid rafts are required for effective renal D1 dopamine receptor function. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32259353/> (2020) doi:10.1096/fj.201902710RR.
193. Oddi, S. et al. Effects of palmitoylation of Cys(415) in helix 8 of the CB(1) cannabinoid receptor on membrane localization and signalling. *British journal of pharmacology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21895628/> (2012) doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01658.x.
194. Oddi, S. et al. Role of palmitoylation of cysteine 415 in functional coupling CB1 receptor to Gai2 protein. *Biotechnology and applied biochemistry* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28722168/> (2018) doi:10.1002/bab.1575.
195. Zheng, H. et al. Palmitoylation and membrane cholesterol stabilize μ -opioid receptor homodimerization and G protein coupling. *BMC cell biology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22429589/> (2012) doi:10.1186/1471-2121-13-6.
196. Seno, K. & Hayashi, F. Palmitoylation is a prerequisite for dimerization-dependent raftophilicity of rhodopsin. *The Journal of biological chemistry* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28747438/> (2017) doi:10.1074/jbc.M117.804880.

197. Kobe, F. et al. Stimulation- and palmitoylation-dependent changes in oligomeric conformation of serotonin 5-HT_{1A} receptors. *Biochimica et biophysica acta* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18381076/> (2008) doi:10.1016/j.bbamcr.2008.02.021.
198. Oddi, S. et al. Palmitoylation of cysteine 415 of CB₁ receptor affects ligand-stimulated internalization and selective interaction with membrane cholesterol and caveolin 1. *Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28215712/> (2017) doi:10.1016/j.bbalip.2017.02.004.
199. Reid, H. & Kinsella, B. Palmitoylation of the TPβ isoform of the human thromboxane A₂ receptor. Modulation of G protein: effector coupling and modes of receptor internalization. *Cellular signalling* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17229546/> (2007) doi:10.1016/j.cellsig.2006.12.001.
200. Hawtin, S., Tobin, A., Patel, S. & Wheatley, M. Palmitoylation of the vasopressin V_{1a} receptor reveals different conformational requirements for signaling, agonist-induced receptor phosphorylation, and sequestration. *The Journal of biological chemistry* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11466323/> (2001) doi:10.1074/jbc.M106142200.
201. Kong, M., Verma, V., O'Dowd, B. & George, S. The role of palmitoylation in directing dopamine D₁ receptor internalization through selective endocytic routes. *Biochemical and biophysical research communications* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21241663/> (2011) doi:10.1016/j.bbrc.2011.01.050.
202. Hukovic, N., Panetta, R., Kumar, U., Rocheville, M. & Patel, Y. The cytoplasmic tail of the human somatostatin receptor type 5 is crucial for interaction with adenylyl cyclase and in mediating desensitization and internalization. *The Journal of biological chemistry* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9694905/> (1998) doi:10.1074/jbc.273.33.21416.
203. Doi, T., Sugimoto, H., Arimoto, I., Hiroaki, Y. & Fujiyoshi, Y. Interactions of endothelin receptor subtypes A and B with Gi, Go, and Gq in reconstituted phospholipid vesicles. *Biochemistry* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10074362/> (1999) doi:10.1021/bi981919m.
204. Xiang, Y., Rybin, V., Steinberg, S. & Kobilka, B. Caveolar localization dictates physiologic signaling of beta 2-adrenoceptors in neonatal cardiac myocytes. *The Journal of biological chemistry* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12097322/> (2002) doi:10.1074/jbc.M201644200.
205. Whorton, M. R. et al. A monomeric G protein-coupled receptor isolated in a high-density lipoprotein particle efficiently activates its G protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 7682–7687 (2007).
206. Likhite, N. et al. The protein arginine methyltransferase PRMT5 promotes D₂-like dopamine receptor signaling. *Science signaling* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26554819/> (2015) doi:10.1126/scisignal.aad0872.
207. Bowitch, A., Michaels, K., Yu, M. & Ferkey, D. The Protein Arginine Methyltransferase PRMT-5 Regulates SER-2 Tyramine Receptor-Mediated Behaviors in *Caenorhabditis elegans*. *G3* (Bethesda, Md.) <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29760200/> (2018) doi:10.1534/g3.118.200360.

208. Geiss-Friedlander, R. & Melchior, F. Concepts in sumoylation: a decade on. *Nature reviews. Molecular cell biology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18000527/> (2007) doi:10.1038/nrm2293.
209. Xu, J. et al. Direct SUMOylation of M1 muscarinic acetylcholine receptor increases its ligand-binding affinity and signal transduction. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30407877/> (2019) doi:10.1096/fj.201800936R.
210. Li, Q. & Muma, N. Estradiol potentiates 8-OH-DPAT-induced sumoylation of 5-HT_{1A} receptor: characterization and subcellular distribution of sumoylated 5-HT_{1A} receptors. *Psychoneuroendocrinology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23786880/> (2013) doi:10.1016/j.psyneuen.2013.05.016.
211. Colvin, R., Campanella, G., Manice, L. & Luster, A. CXCR3 requires tyrosine sulfation for ligand binding and a second extracellular loop arginine residue for ligand-induced chemotaxis. *Molecular and cellular biology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16847335/> (2006) doi:10.1128/MCB.00556-06.
212. Liu, J. et al. Tyrosine sulfation is prevalent in human chemokine receptors important in lung disease. *American journal of respiratory cell and molecular biology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18218997/> (2008) doi:10.1165/rcmb.2007-0118OC.
213. Zhu, J. et al. Tyrosine sulfation influences the chemokine binding selectivity of peptides derived from chemokine receptor CCR3. *Biochemistry* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21235238/> (2011) doi:10.1021/bi101240v.
214. Ludeman, J. & Stone, M. The structural role of receptor tyrosine sulfation in chemokine recognition. *British journal of pharmacology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24116930/> (2014) doi:10.1111/bph.12455.
215. Stone, M., Hayward, J., Huang, C., E. Huma, Z. & Sanchez, J. Mechanisms of Regulation of the Chemokine-Receptor Network. *International journal of molecular sciences* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28178200/> (2017) doi:10.3390/ijms18020342.
216. Leclerc, P. et al. S-nitrosylation of cysteine 289 of the AT1 receptor decreases its binding affinity for angiotensin II. *British journal of pharmacology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16565729/> (2006) doi:10.1038/sj.bjp.0706725.
217. Hosey, M. M. What molecular events underlie heterologous desensitization? Focus on ‘receptor phosphorylation does not mediate cross talk between muscarinic M(3) and bradykinin B(2) receptors’. *Am. J. Physiol.* 277, C856-858 (1999).
218. Bouvier, M. et al. Removal of phosphorylation sites from the beta 2-adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization. *Nature* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2836733/> (1988) doi:10.1038/333370a0.

219. Tobin, A. G-protein-coupled receptor phosphorylation: where, when and by whom. *British journal of pharmacology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18193069/> (2008) doi:10.1038/sj.bjp.0707662.
220. Moore, C., Milano, S. & Benovic, J. Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annual review of physiology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17037978/> (2007) doi:10.1146/annurev.physiol.69.022405.154712.
221. Rodemer, C. & Haucke, V. Clathrin/AP-2-dependent endocytosis: a novel playground for the pharmacological toolbox? *Handbook of experimental pharmacology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18491050/> (2008) doi:10.1007/978-3-540-72843-6_5.
222. Kelly, B. et al. Clathrin adaptors. AP2 controls clathrin polymerization with a membrane-activated switch. *Science (New York, N.Y.)* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25061211/> (2014) doi:10.1126/science.1254836.
223. Volovyk, Z., Wolf, M., Prasad, S. & Rockman, H. Agonist-stimulated beta-adrenergic receptor internalization requires dynamic cytoskeletal actin turnover. *The Journal of biological chemistry* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16461348/> (2006) doi:10.1074/jbc.M511435200.
224. Moser, E., Kargl, J., Whistler, J., Waldhoer, M. & Tschische, P. G protein-coupled receptor-associated sorting protein 1 regulates the postendocytic sorting of seven-transmembrane-spanning G protein-coupled receptors. *Pharmacology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20693822/> (2010) doi:10.1159/000314161.
225. Wolfe, B. & Trejo, J. Clathrin-dependent mechanisms of G protein-coupled receptor endocytosis. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17376169/> (2007) doi:10.1111/j.1600-0854.2007.00551.x.
226. Kern, R., Kang, D. & Benovic, J. Arrestin2/clathrin interaction is regulated by key N- and C-terminal regions in arrestin2. *Biochemistry* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19555118/> (2009) doi:10.1021/bi900369c.
227. Xu, Z., Zhang, X. & Scott, L. Regulation of G protein-coupled receptor trafficking. *Acta physiologica (Oxford, England)* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17428231/> (2007) doi:10.1111/j.1365-201X.2007.01695.x.
228. Oakley, R., Laporte, S., Holt, J., Caron, M. & Barak, L. Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *The Journal of biological chemistry* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10748214/> (2000) doi:10.1074/jbc.M910348199.
229. Anborgh, P., Seachrist, J., Dale, L. & Ferguson, S. Receptor/beta-arrestin complex formation and the differential trafficking and resensitization of beta2-adrenergic and angiotensin II type 1A receptors. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11117533/> (2000) doi:10.1210/mend.14.12.0565.

230. Shenoy, S. & Lefkowitz, R. Trafficking patterns of beta-arrestin and G protein-coupled receptors determined by the kinetics of beta-arrestin deubiquitination. *The Journal of biological chemistry* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12574160/> (2003) doi:10.1074/jbc.M209626200.
231. Perroy, J., Pontier, S., Charest, P., Aubry, M. & Bouvier, M. Real-time monitoring of ubiquitination in living cells by BRET. *Nature methods* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15782195/> (2004) doi:10.1038/nmeth722.
232. Shenoy, S. et al. Beta-arrestin-dependent signaling and trafficking of 7-transmembrane receptors is reciprocally regulated by the deubiquitinase USP33 and the E3 ligase Mdm2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19363159/> (2009) doi:10.1073/pnas.0901083106.
233. Rapoport, I. et al. Regulatory interactions in the recognition of endocytic sorting signals by AP-2 complexes. *The EMBO journal* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9171339/> (1997) doi:10.1093/emboj/16.9.2240.
234. Chini, B. & Parenti, M. G-protein coupled receptors in lipid rafts and caveolae: how, when and why do they go there? *Journal of molecular endocrinology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15072542/> (2004) doi:10.1677/jme.0.0320325.
235. Sengupta, P., Philip, F. & Scarlata, S. Caveolin-1 alters Ca²⁺ signal duration through specific interaction with the Gαq family of G proteins. *J. Cell Sci.* 121, 1363–1372 (2008).
236. Calizo, R. & Scarlata, S. A role for G-proteins in directing G-protein-coupled receptor-caveolae localization. *Biochemistry* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23102276/> (2012) doi:10.1021/bi301107p.
237. Freedman, N. et al. Phosphorylation and desensitization of human endothelin A and B receptors. Evidence for G protein-coupled receptor kinase specificity. *The Journal of biological chemistry* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9211925/> (1997) doi:10.1074/jbc.272.28.17734.
238. Chun, M., Liyanage, U., Lisanti, M. & Lodish, H. Signal transduction of a G protein-coupled receptor in caveolae: colocalization of endothelin and its receptor with caveolin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7972131/> (1994) doi:10.1073/pnas.91.24.11728.
239. Scarselli, M. & Donaldson, J. Constitutive internalization of G protein-coupled receptors and G proteins via clathrin-independent endocytosis. *The Journal of biological chemistry* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19033440/> (2009) doi:10.1074/jbc.M806819200.
240. Kelly, E., Bailey, C. & Henderson, G. Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization. *British journal of pharmacology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18059321/> (2008) doi:10.1038/sj.bjp.0707604.
241. Boucrot, E. et al. Endophilin marks and controls a clathrin-independent endocytic pathway. *Nature* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25517094/?dopt=Abstract> (2015) doi:10.1038/nature14067.

242. Boucrot, E. et al. Membrane fission is promoted by insertion of amphipathic helices and is restricted by crescent BAR domains. *Cell* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22464325/> (2012) doi:10.1016/j.cell.2012.01.047.
243. Vehlow, A. et al. Endophilin, Lamellipodin, and Mena cooperate to regulate F-actin-dependent EGF-receptor endocytosis. *EMBO J.* 32, 2722–2734 (2013).
244. Tang, Y. et al. Identification of the endophilins (SH3p4/p8/p13) as novel binding partners for the beta1-adrenergic receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10535961/> (1999) doi:10.1073/pnas.96.22.12559.
245. Moo, E., van Senten, J., Bräuner-Osborne, H. & Møller, T. Arrestin-Dependent and -Independent Internalization of G Protein-Coupled Receptors: Methods, Mechanisms, and Implications on Cell Signaling. *Molecular pharmacology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33472843/> (2021) doi:10.1124/molpharm.120.000192.
246. Kühn, H. & Dreyer, W. Light dependent phosphorylation of rhodopsin by ATP. *FEBS letters* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11946367/> (1972) doi:10.1016/0014-5793(72)80002-4.
247. Kühn, H. Light-dependent phosphorylation of rhodopsin in living frogs. *Nature* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4546444/> (1974) doi:10.1038/250588a0.
248. Kühn, H. Light-regulated binding of rhodopsin kinase and other proteins to cattle photoreceptor membranes. *Biochemistry* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/718845/> (1978) doi:10.1021/bi00614a006.
249. Premont, R., Inglese, J. & Lefkowitz, R. Protein kinases that phosphorylate activated G protein-coupled receptors. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7781920/> (1995) doi:10.1096/fasebj.9.2.7781920.
250. Rajagopal, S. & Shenoy, S. GPCR desensitization: Acute and prolonged phases. *Cellular signalling* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28137506/> (2018) doi:10.1016/j.cellsig.2017.01.024.
251. Premont, R. & Gainetdinov, R. Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Annual review of physiology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17305472/> (2007) doi:10.1146/annurev.physiol.69.022405.154731.
252. Hausdorff, W. et al. Phosphorylation sites on two domains of the beta 2-adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization. *The Journal of biological chemistry* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2545714/> (1989).
253. Yang, J., Villar, V. A. M., Armando, I., Jose, P. A. & Zeng, C. G Protein-Coupled Receptor Kinases: Crucial Regulators of Blood Pressure. *J. Am. Heart Assoc.* 5, (2016).
254. Gurevich, V. & Gurevich, E. GPCR Signaling Regulation: The Role of GRKs and Arrestins. *Frontiers in pharmacology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30837883/> (2019) doi:10.3389/fphar.2019.00125.

255. Harlan, J., Yoon, H., Hajduk, P. & Fesik, S. Structural characterization of the interaction between a pleckstrin homology domain and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Biochemistry* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7632686/> (1995) doi:10.1021/bi00031a006.
256. Lodowski, D., Pitcher, J., Capel, W., Lefkowitz, R. & Tesmer, J. Keeping G proteins at bay: a complex between G protein-coupled receptor kinase 2 and Gbetagamma. *Science (New York, N.Y.)* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12764189/> (2003) doi:10.1126/science.1082348.
257. Gurevich, E., Tesmer, J., Mushegian, A. & Gurevich, V. G protein-coupled receptor kinases: more than just kinases and not only for GPCRs. *Pharmacology & therapeutics* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21903131/> (2012) doi:10.1016/j.pharmthera.2011.08.001.
258. Magalhaes, A., Dunn, H. & Ferguson, S. Regulation of GPCR activity, trafficking and localization by GPCR-interacting proteins. *British journal of pharmacology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21699508/> (2012) doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01552.x.
259. Gray, J. & Roth, B. Cell biology. A last GASP for GPCRs? *Science (New York, N.Y.)* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12142517/> (2002) doi:10.1126/science.1075453.
260. Raiborg, C. & Stenmark, H. The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19325624/> (2009) doi:10.1038/nature07961.
261. Whistler, J. et al. Modulation of postendocytic sorting of G protein-coupled receptors. *Science (New York, N.Y.)* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12142540/> (2002) doi:10.1126/science.1073308.
262. Tanowitz, M. & Von Zastrow, M. Ubiquitination-independent trafficking of G protein-coupled receptors to lysosomes. *The Journal of biological chemistry* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12401797/> (2002) doi:10.1074/jbc.C200536200.
263. Hurley, J. & Emr, S. The ESCRT complexes: structure and mechanism of a membrane-trafficking network. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16689637/> (2006) doi:10.1146/annurev.biophys.35.040405.102126.
264. Nabhan, J., Pan, H. & Lu, Q. Arrestin domain-containing protein 3 recruits the NEDD4 E3 ligase to mediate ubiquitination of the beta2-adrenergic receptor. *EMBO reports* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20559325/> (2010) doi:10.1038/embor.2010.80.
265. Wang, Y., Zhou, Y., Szabo, K., Haft, C. & Trejo, J. Down-regulation of protease-activated receptor-1 is regulated by sorting nexin 1. *Molecular biology of the cell* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12058063/> (2002) doi:10.1091/mbc.e01-11-0131.
266. McGarvey, J. et al. Actin-Sorting Nexin 27 (SNX27)-Retromer Complex Mediates Rapid Parathyroid Hormone Receptor Recycling. *The Journal of biological chemistry* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27008860/> (2016) doi:10.1074/jbc.M115.697045.
267. Temkin, P. et al. SNX27 mediates retromer tubule entry and endosome-to-plasma membrane trafficking of signalling receptors. *Nature cell biology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21602791/> (2011) doi:10.1038/ncb2252.

268. von Zastrow, M. Proteomic Approaches to Investigate Regulated Trafficking and Signaling of G Protein-Coupled Receptors. *Molecular pharmacology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33361190/> (2021) doi:10.1124/molpharm.120.000178.
269. Gage, R., Kim, K., Cao, T. & von Zastrow, M. A transplantable sorting signal that is sufficient to mediate rapid recycling of G protein-coupled receptors. *The Journal of biological chemistry* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11560936/> (2001) doi:10.1074/jbc.M107417200.
270. Gage, R., Matveeva, E., Whiteheart, S. & von Zastrow, M. Type I PDZ ligands are sufficient to promote rapid recycling of G Protein-coupled receptors independent of binding to N-ethylmaleimide-sensitive factor. *The Journal of biological chemistry* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15548537/> (2005) doi:10.1074/jbc.M406934200.
271. Pavlos, N. & Friedman, P. GPCR Signaling and Trafficking: The Long and Short of It. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27889227/> (2017) doi:10.1016/j.tem.2016.10.007.
272. Seachrist, J. & Ferguson, S. Regulation of G protein-coupled receptor endocytosis and trafficking by Rab GTPases. *Life sciences* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14607250/> (2003) doi:10.1016/j.lfs.2003.09.009.
273. Parent, A., Hamelin, E., Germain, P. & Parent, J. Rab11 regulates the recycling of the beta2-adrenergic receptor through a direct interaction. *The Biochemical journal* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18983266/> (2009) doi:10.1042/BJ20080867.
274. Seachrist, J. et al. Rab5 association with the angiotensin II type 1A receptor promotes Rab5 GTP binding and vesicular fusion. *The Journal of biological chemistry* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11682489/> (2002) doi:10.1074/jbc.M109022200.
275. Hamelin, E., Thériault, C., Laroche, G. & Parent, J. The intracellular trafficking of the G protein-coupled receptor TPbeta depends on a direct interaction with Rab11. *The Journal of biological chemistry* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16126723/> (2005) doi:10.1074/jbc.M503438200.
276. Zerial, M. & McBride, H. Rab proteins as membrane organizers. *Nature reviews. Molecular cell biology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11252952/> (2001) doi:10.1038/35052055.
277. Devi, L. A. & Brady, L. S. Dimerization of G-protein coupled receptors. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 23, S3-4 (2000).
278. Whorton, M. R. et al. Efficient coupling of transducin to monomeric rhodopsin in a phospholipid bilayer. *J. Biol. Chem.* 283, 4387–4394 (2008).
279. Wu, B. et al. Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science* 330, 1066–1071 (2010).
280. Wu, H. et al. Structure of the human kappa opioid receptor in complex with JDTic. *Nature* 485, 327–332 (2012).
281. Manglik, A. et al. Crystal structure of the μ -opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature* 485, 321–326 (2012).

282. Milligan, G., Ward, R. J. & Marsango, S. GPCR homo-oligomerization. *Curr. Opin. Cell Biol.* 57, 40–47 (2019).
283. Breitwieser, G. G protein-coupled receptor oligomerization: implications for G protein activation and cell signaling. *Circulation research* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14715532/> (2004) doi:10.1161/01.RES.0000110420.68526.19.
284. Ray, K. et al. Identification of the cysteine residues in the amino-terminal extracellular domain of the human Ca(2+) receptor critical for dimerization. Implications for function of monomeric Ca(2+) receptor. *The Journal of biological chemistry* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10488104/> (1999) doi:10.1074/jbc.274.39.27642.
285. Overton, M. & Blumer, K. The extracellular N-terminal domain and transmembrane domains 1 and 2 mediate oligomerization of a yeast G protein-coupled receptor. *The Journal of biological chemistry* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12194975/> (2002) doi:10.1074/jbc.M205368200.
286. Huang, J., Chen, S., Zhang, J. J. & Huang, X.-Y. Crystal structure of oligomeric β 1-adrenergic G protein-coupled receptors in ligand-free basal state. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 419–425 (2013).
287. Dupré, D. J. & Hébert, T. E. Biosynthesis and trafficking of seven transmembrane receptor signalling complexes. *Cell. Signal.* 18, 1549–1559 (2006).
288. Dupré, D. J. et al. Seven transmembrane receptor core signaling complexes are assembled prior to plasma membrane trafficking. *J. Biol. Chem.* 281, 34561–34573 (2006).
289. Lopez-Gimenez, J. F., Canals, M., Pediani, J. D. & Milligan, G. The α 1b-adrenoceptor exists as a higher-order oligomer: effective oligomerization is required for receptor maturation, surface delivery, and function. *Mol. Pharmacol.* 71, 1015–1029 (2007).
290. Rebois, R. V. et al. Heterotrimeric G proteins form stable complexes with adenylyl cyclase and Kir3.1 channels in living cells. *J. Cell Sci.* 119, 2807–2818 (2006).
291. Dupré, D. J., Baragli, A., Rebois, R. V., Ethier, N. & Hébert, T. E. Signalling complexes associated with adenylyl cyclase II are assembled during their biosynthesis. *Cell. Signal.* 19, 481–489 (2007).
292. David, M. et al. Interactions between GABA-B1 receptors and Kir 3 inwardly rectifying potassium channels. *Cell. Signal.* 18, 2172–2181 (2006).
293. Veya, L., Piguet, J. & Vogel, H. Single Molecule Imaging Deciphers the Relation between Mobility and Signaling of a Prototypical G Protein-coupled Receptor in Living Cells. *The Journal of biological chemistry* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26363070/> (2015) doi:10.1074/jbc.M115.666677.
294. Kasai, R., Ito, S., Awane, R., Fujiwara, T. & Kusumi, A. The Class-A GPCR Dopamine D2 Receptor Forms Transient Dimers Stabilized by Agonists: Detection by Single-Molecule Tracking. *Cell biochemistry and biophysics* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29116599/> (2018) doi:10.1007/s12013-017-0829-y.

295. Marsango, S. et al. A Molecular Basis for Selective Antagonist Destabilization of Dopamine D3 Receptor Quaternary Organization. *Sci. Rep.* 7, (2017).
296. Ward, R. J., Pediani, J. D., Godin, A. G. & Milligan, G. Regulation of Oligomeric Organization of the Serotonin 5-Hydroxytryptamine 2C (5-HT_{2C}) Receptor Observed by Spatial Intensity Distribution Analysis. *J. Biol. Chem.* 290, 12844–12857 (2015).
297. Walsh, S. M. et al. Single Proteoliposome High-Content Analysis Reveals Differences in the Homo-Oligomerization of GPCRs. *Biophys. J.* 115, 300–312 (2018).
298. Lohse, M. J. Dimerization in GPCR mobility and signaling. *Curr. Opin. Pharmacol.* 10, 53–58 (2010).
299. Rivero-Müller, A., Jonas, K. C., Hanyaloglu, A. C. & Huhtaniemi, I. Di/oligomerization of GPCRs-mechanisms and functional significance. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 117, 163–185 (2013).
300. Kaupmann, K. et al. GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature* 396, 683–687 (1998).
301. Kuner, R. et al. Role of heteromer formation in GABAB receptor function. *Science* 283, 74–77 (1999).
302. Lee, S. P. et al. Dopamine D1 and D2 receptor Co-activation generates a novel phospholipase C-mediated calcium signal. *J. Biol. Chem.* 279, 35671–35678 (2004).
303. Rozenfeld, R. & Devi, L. A. Receptor heterodimerization leads to a switch in signaling: beta-arrestin2-mediated ERK activation by mu-delta opioid receptor heterodimers. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 21, 2455–2465 (2007).
304. Wang, W., Qiao, Y. & Li, Z. New Insights into Modes of GPCR Activation. *Trends Pharmacol. Sci.* 39, 367–386 (2018).
305. Liu, W. et al. Serial femtosecond crystallography of G protein-coupled receptors. *Science* 342, (2013).
306. Strydom, D. J. Snake venom toxins. The amino acid sequences of two toxins from *Dendroaspis polylepis polylepis* (black mamba) venom. *J. Biol. Chem.* 247, 4029–4042 (1972).
307. Strydom, D. J. Snake venom toxins. Purification and properties of low-molecular-weight polypeptides of *Dendroaspis polylepis polylepis* (black mamba) venom. *Eur. J. Biochem.* 69, 169–176 (1976).
308. Joubert, F. J. & Strydom, D. J. Snake venom. The amino acid sequence of protein A from *Dendroaspis polylepis polylepis* (black mamba) venom. *Hoppe. Seylers Z. Physiol. Chem.* 361, 1787–1794 (1980).
309. Schweitz, H., Bidard, J. N. & Lazdunski, M. Purification and pharmacological characterization of peptide toxins from the black mamba (*Dendroaspis polylepis*) venom. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology* 28, 847–856 (1990).
310. Boisbouvier, J. et al. A structural homologue of colipase in black mamba venom revealed by NMR floating disulphide bridge analysis. *J. Mol. Biol.* 283, 205–219 (1998).

311. Schweitz, H., Pacaud, P., Diochot, S., Moinier, D. & Lazdunski, M. MIT(1), a black mamba toxin with a new and highly potent activity on intestinal contraction. *FEBS Lett.* 461, 183–188 (1999).
312. Mollay, C. et al. Bv8, a small protein from frog skin and its homologue from snake venom induce hyperalgesia in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 374, 189–196 (1999).
313. Nehls, M., Pfeifer, D., Micklem, G., Schmoor, C. & Boehm, T. The sequence complexity of exons trapped from the mouse genome. *Curr. Biol.* 4, 983–989 (1994).
314. Wechselberger, C. et al. The mammalian homologues of frog Bv8 are mainly expressed in spermatocytes. *FEBS Lett.* 462, 177–181 (1999).
315. Li, M., Bullock, C. M., Knauer, D. J., Ehlert, F. J. & Zhou, Q. Y. Identification of two prokineticin cDNAs: recombinant proteins potently contract gastrointestinal smooth muscle. *Mol. Pharmacol.* 59, 692–698 (2001).
316. LeCouter, J. et al. Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. *Nature* 412, 877–884 (2001).
317. Masuda, Y. et al. Isolation and identification of EG-VEGF/prokineticins as cognate ligands for two orphan G-protein-coupled receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293, 396–402 (2002).
318. Soga, T. et al. Molecular cloning and characterization of prokineticin receptors. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Genet. Struct. Membr.* 1579, 173–179 (2002).
319. Lin, D. C.-H. et al. Identification and Molecular Characterization of Two Closely Related G Protein-coupled Receptors Activated by Prokineticins/Endocrine Gland Vascular Endothelial Growth Factor. *J. Biol. Chem.* 277, 19276–19280 (2002).
320. Kaser, A., Winklmayr, M., Lepperdinger, G. & Kreil, G. The AVIT protein family: Secreted cysteine-rich vertebrate proteins with diverse functions. *EMBO Rep.* 4, 469–473 (2003).
321. Jilek, A., Engel, E., Beier, D. & Lepperdinger, G. Murine Bv8 gene maps near a synteny breakpoint of mouse chromosome 6 and human 3p21. *Gene* 256, 189–195 (2000).
322. Chen, J. et al. Identification and Pharmacological Characterization of Prokineticin 2 β as a Selective Ligand for Prokineticin Receptor 1. *Mol. Pharmacol.* 67, 2070–2076 (2005).
323. LeCouter, J. et al. The endocrine-gland-derived VEGF homologue Bv8 promotes angiogenesis in the testis: Localization of Bv8 receptors to endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 2685–2690 (2003).
324. Lattanzi, R., Maftai, D., Negri, L., Fusco, I. & Miele, R. PK2 β ligand, a splice variant of prokineticin 2, is able to modulate and drive signaling through PKR1 receptor. *Neuropeptides* 71, 32–42 (2018).
325. Lattanzi, R., Maftai, D., Vincenzi, M., Fullone, M. R. & Miele, R. Identification and Characterization of a New Splicing Variant of Prokineticin 2. *Life Basel Switz.* 12, (2022).
326. Zhang, C. et al. Prokineticin 2 is a target gene of proneural basic helix-loop-helix factors for olfactory bulb neurogenesis. *J. Biol. Chem.* 282, 6917–6921 (2007).

327. Cheng, M. Y. et al. Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus. *Nature* 417, 405–410 (2002).
328. Shojaei, F. et al. Bv8 regulates myeloid-cell-dependent tumour angiogenesis. *Nature* 450, 825–831 (2007).
329. Qu, X., Zhuang, G., Yu, L., Meng, G. & Ferrara, N. Induction of Bv8 expression by granulocyte colony-stimulating factor in CD11b+Gr1+ cells: key role of Stat3 signaling. *J. Biol. Chem.* 287, 19574–19584 (2012).
330. Zhong, C., Qu, X., Tan, M., Meng, Y. G. & Ferrara, N. Characterization and regulation of bv8 in human blood cells. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 15, 2675–2684 (2009).
331. Maftai, D. et al. Controlling the activation of the Bv8/prokineticin system reduces neuroinflammation and abolishes thermal and tactile hyperalgesia in neuropathic animals. *Br. J. Pharmacol.* 171, 4850–4865 (2014).
332. Caioli, S. et al. Prokineticin system modulation as a new target to counteract the amyloid beta toxicity induced by glutamatergic alterations in an in vitro model of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* 116, 82–97 (2017).
333. Meng, S. et al. TBX20 Regulates Angiogenesis Through the Prokineticin 2-Prokineticin Receptor 1 Pathway. *Circulation* 138, 913–928 (2018).
334. Lichtenauer, M. & Jung, C. TBX20 and the PROK2-PROKR1 pathway-new kid on the block in angiogenesis research. *Ann. Transl. Med.* 6, S8 (2018).
335. Long, J. E. et al. Dlx-dependent and -independent regulation of olfactory bulb interneuron differentiation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 3230–3243 (2007).
336. Long, J. E., Cobos, I., Potter, G. B. & Rubenstein, J. L. R. Dlx1&2 and Mash1 transcription factors control MGE and CGE patterning and differentiation through parallel and overlapping pathways. *Cereb. Cortex N. Y. N 1991* 19 Suppl 1, i96-106 (2009).
337. Li, J.-D., Burton, K. J., Zhang, C., Hu, S.-B. & Zhou, Q.-Y. Vasopressin receptor V1a regulates circadian rhythms of locomotor activity and expression of clock-controlled genes in the suprachiasmatic nuclei. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 296, R824-830 (2009).
338. LeCouter, J. et al. Mouse Endocrine Gland-Derived Vascular Endothelial Growth Factor: A Distinct Expression Pattern from Its Human Ortholog Suggests Different Roles as a Regulator of Organ-Specific Angiogenesis. *Endocrinology* 144, 2606–2616 (2003).
339. Ramji, D. P. & Foka, P. CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem. J.* 365, 561–575 (2002).
340. Ferrara, N., LeCouter, J., Lin, R. & Peale, F. EG-VEGF and Bv8: a novel family of tissue-restricted angiogenic factors. *Biochim. Biophys. Acta* 1654, 69–78 (2004).
341. Battersby, S., Critchley, H. O. D., Morgan, K., Millar, R. P. & Jabbour, H. N. Expression and regulation of the prokineticins (endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor and Bv8)

and their receptors in the human endometrium across the menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 2463–2469 (2004).

342. Kisliouk, T., Levy, N., Hurwitz, A. & Meidan, R. Presence and regulation of endocrine gland vascular endothelial growth factor/prokineticin-1 and its receptors in ovarian cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 3700–3707 (2003).

343. Ngan, E. S. W. et al. Endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor is expressed in human peri-implantation endometrium, but not in endometrial carcinoma. *Endocrinology* 147, 88–95 (2006).

344. Brouillet, S. et al. Revisiting the role of hCG: new regulation of the angiogenic factor EG-VEGF and its receptors. *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 1537–1550 (2012).

345. Hoffmann, P., Feige, J.-J. & Alfaidy, N. Expression and Oxygen Regulation of Endocrine Gland-Derived Vascular Endothelial Growth Factor/Prokineticin-1 and Its Receptors in Human Placenta during Early Pregnancy. *Endocrinology* 147, 1675–1684 (2006).

346. Ujvari, D. et al. Prokineticin 1 is up-regulated by insulin in decidualizing human endometrial stromal cells. *J. Cell. Mol. Med.* 22, 163–172 (2018).

347. Morales, A., Morimoto, S., Díaz, L., Robles, G. & Díaz-Sánchez, V. Endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor in rat pancreas: genetic expression and testosterone regulation. *J. Endocrinol.* 197, 309–314 (2008).

348. Lattanzi, R., Maftai, D., Fullone, M. R. & Miele, R. Identification and characterization of Prokineticin receptor 2 splicing variant and its modulation in an animal model of Alzheimer's disease. *Neuropeptides* 73, 49–56 (2019).

349. Lattanzi, R. & Miele, R. Prokineticin-Receptor Network: Mechanisms of Regulation. *Life* 12, 172 (2022).

350. Licht, P., Russu, V. & Wildt, L. On the role of human chorionic gonadotropin (hCG) in the embryo-endometrial microenvironment: implications for differentiation and implantation. *Semin. Reprod. Med.* 19, 37–47 (2001).

351. Ragancokova, D. et al. TSHZ1-dependent gene regulation is essential for olfactory bulb development and olfaction. *J. Clin. Invest.* 124, 1214–1227 (2014).

352. Morales, R. A. V. et al. Chemical synthesis and structure of the prokineticin Bv8. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* 11, 1882–1888 (2010).

353. Negri, L. & Ferrara, N. The Prokineticins: Neuromodulators and Mediators of Inflammation and Myeloid Cell-Dependent Angiogenesis. *Physiol. Rev.* 98, 1055–1082 (2018).

354. Zhou, Q.-Y. The Prokineticins: A Novel Pair of Regulatory Peptides. *Mol. Interv.* 6, 330–338 (2006).

355. Lagerström, M. C. & Schiöth, H. B. Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 339–357 (2008).

356. Monnier, C. et al. PROKR2 missense mutations associated with Kallmann syndrome impair receptor signalling activity. *Hum. Mol. Genet.* 18, 75–81 (2009).
357. Levit, A., Yarnitzky, T., Wiener, A., Meidan, R. & Niv, M. Y. Modeling of human prokineticin receptors: interactions with novel small-molecule binders and potential off-target drugs. *PLoS One* 6, e27990 (2011).
358. Kufareva, I., Salanga, C. L. & Handel, T. M. Chemokine and chemokine receptor structure and interactions: implications for therapeutic strategies. *Immunol. Cell Biol.* 93, 372–383 (2015).
359. Marsango, S., Bonaccorsi di Patti, M. C., Barra, D. & Miele, R. Evidence that prokineticin receptor 2 exists as a dimer in vivo. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 68, 2919–2929 (2011).
360. Fullone, M. R., Lattanzi, R., Maftai, D., Bonaccorsi, M. C. & Miele, R. Analysis of role of aromatic residues in extracellular loop 2 of Prokineticin receptor 2 in ligand binding probed with genetically encoded photo-crosslinkers. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1863, 183549 (2021).
361. Lattanzi, R. et al. Pharmacological activity of a Bv8 analogue modified in position 24. *Br. J. Pharmacol.* 166, 950–963 (2012).
362. Ngan, E. S. W. & Tam, P. K. H. Prokineticin-signaling pathway. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 1679–1684 (2008).
363. Casella, I. & Ambrosio, C. Prokineticin receptors interact unselectively with several G protein subtypes but bind selectively to β -arrestin 2. *Cell. Signal.* 83, 110000 (2021).
364. Peng, Z. et al. Disease-causing mutation in PKR2 receptor reveals a critical role of positive charges in the second intracellular loop for G-protein coupling and receptor trafficking. *J. Biol. Chem.* 286, 16615–16622 (2011).
365. Yin, W. et al. Mechanisms that underlie the internalization and extracellular signal regulated kinase 1/2 activation by PKR2 receptor. *Cell. Signal.* 26, 1118–1124 (2014).
366. Zhao, Y. et al. PROKR2 mutations in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism: selective disruption of the binding to a $G\alpha$ -protein leads to biased signaling. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 33, 4538–4546 (2019).
367. Negri, L., Lattanzi, R., Giannini, E. & Melchiorri, P. Bv8/Prokineticin proteins and their receptors. *Life Sci.* 81, 1103–1116 (2007).
368. Verdinez, J. A. & Sebag, J. A. Role of N-Linked Glycosylation in PKR2 Trafficking and Signaling. *Front. Neurosci.* 15, 730417 (2021).
369. Chaly, A. L., Srisai, D., Gardner, E. E. & Sebag, J. A. The Melanocortin Receptor Accessory Protein 2 promotes food intake through inhibition of the Prokineticin Receptor-1. *eLife* 5, e12397.
370. Rouault, A. A. J., Lee, A. A. & Sebag, J. A. Regions of MRAP2 required for the inhibition of orexin and prokineticin receptor signaling. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 1864, 2322–2329 (2017).

371. Fullone, M. R., Maftai, D., Vincenzi, M., Lattanzi, R. & Miele, R. Identification of Regions Involved in the Physical Interaction between Melanocortin Receptor Accessory Protein 2 and Prokineticin Receptor 2. *Biomolecules* 12, (2022).
372. Song, J. et al. Snapin interacts with G-protein coupled receptor PKR2. *Biochemical and biophysical research communications* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26687946/> (2016) doi:10.1016/j.bbrc.2015.12.023.
373. Guilini, C. et al. Divergent roles of prokineticin receptors in the endothelial cells: angiogenesis and fenestration. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 298, H844-852 (2010).
374. Sposini, S., Caltabiano, G., Hanyaloglu, A. C. & Miele, R. Identification of transmembrane domains that regulate spatial arrangements and activity of prokineticin receptor 2 dimers. *Mol. Cell. Endocrinol.* 399, 362–372 (2015).
375. Podlovni, H. et al. Differential expression of prokineticin receptors by endothelial cells derived from different vascular beds: a physiological basis for distinct endothelial function. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 18, 315–326 (2006).
376. Boulberdaa, M., Urayama, K. & Nebigil, C. G. Prokineticin receptor 1 (PKR1) signalling in cardiovascular and kidney functions. *Cardiovasc. Res.* 92, 191–198 (2011).
377. Qureshi, R. et al. Prokineticin receptor-1-dependent paracrine and autocrine pathways control cardiac tcf21+ fibroblast progenitor cell transformation into adipocytes and vascular cells. *Sci. Rep.* 7, 12804 (2017).
378. Qureshi, R. et al. A Prokineticin-Driven Epigenetic Switch Regulates Human Epicardial Cell Stemness and Fate. *Stem Cells Dayt. Ohio* 36, 1589–1602 (2018).
379. Arora, H. et al. Prokineticin receptor-1 signaling promotes Epicardial to Mesenchymal Transition during heart development. *Sci. Rep.* 6, 25541 (2016).
380. Gasser, A. et al. Discovery and Cardioprotective Effects of the First Non-Peptide Agonists of the G Protein-Coupled Prokineticin Receptor-1. *PLoS ONE* 10, e0121027 (2015).
381. Audebrand, A., Désaubry, L. & Nebigil, C. G. Targeting GPCRs Against Cardiotoxicity Induced by Anticancer Treatments. *Front. Cardiovasc. Med.* 6, 194 (2020).
382. Urayama, K. et al. Prokineticin receptor-1 induces neovascularization and epicardial-derived progenitor cell differentiation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 841–849 (2008).
383. Urayama, K. et al. The prokineticin receptor-1 (GPR73) promotes cardiomyocyte survival and angiogenesis. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 21, 2980–2993 (2007).
384. Su, G. et al. Prokineticin 2 relieves hypoxia/reoxygenation-induced injury through activation of Akt/mTOR pathway in H9c2 cardiomyocytes. *Artif. Cells Nanomedicine Biotechnol.* 48, 345–352 (2020).
385. Gardiner, J. V. et al. Prokineticin 2 Is a Hypothalamic Neuropeptide That Potently Inhibits Food Intake. *Diabetes* 59, 397–406 (2010).

386. Beale, K. et al. Peripheral administration of prokineticin 2 potently reduces food intake and body weight in mice via the brainstem. *Br. J. Pharmacol.* 168, 403–410 (2013).
387. Sarfati, J. et al. A comparative phenotypic study of kallmann syndrome patients carrying monoallelic and biallelic mutations in the prokineticin 2 or prokineticin receptor 2 genes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20022991/> (2010) doi:10.1210/jc.2009-0843.
388. Szatkowski, C. et al. Prokineticin Receptor 1 as a Novel Suppressor of Preadipocyte Proliferation and Differentiation to Control Obesity. *PLoS ONE* 8, (2013).
389. Mortreux, M. et al. New roles for prokineticin 2 in feeding behavior, insulin resistance and type 2 diabetes: Studies in mice and humans. *Molecular metabolism* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31668389/> (2019) doi:10.1016/j.molmet.2019.08.016.
390. Genders, A. J., Frison, V., Abramson, S. R. & Barrett, E. J. Endothelial cells actively concentrate insulin during its transendothelial transport. *Microcirc. N. Y. N* 1994 20, 434–439 (2013).
391. Dormishian, M. et al. Prokineticin Receptor-1 Is a New Regulator of Endothelial Insulin Uptake and Capillary Formation to Control Insulin Sensitivity and Cardiovascular and Kidney Functions. *J. Am. Heart Assoc. Cardiovasc. Cerebrovasc. Dis.* 2, (2013).
392. Von Hunolstein, J. & Nebigil, C. Can prokineticin prevent obesity and insulin resistance? Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26196851/> (2015) doi:10.1097/MED.000000000000185.
393. Arora, H. et al. Prokineticin receptor 1 is required for mesenchymal-epithelial transition in kidney development. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27084889/> (2016) doi:10.1096/fj.201600181R.
394. Nebigil, C. G. Prokineticin Is a New Linker between Obesity and Cardiovascular Diseases. *Front. Cardiovasc. Med.* 4, (2017).
395. Prosser, H. M., Bradley, A. & Caldwell, M. A. Olfactory bulb hypoplasia in Prokr2 null mice stems from defective neuronal progenitor migration and differentiation. *Eur. J. Neurosci.* 26, 3339–3344 (2007).
396. Bassi, I. et al. Knocking-down of the Prokineticin receptor 2 affects reveals its complex role in the regulation of the hypothalamus-pituitary-gonadal axis in the zebrafish model. *Sci. Rep.* 10, (2020).
397. Dodé, C. et al. Kallmann Syndrome: Mutations in the Genes Encoding Prokineticin-2 and Prokineticin Receptor-2. *PLoS Genet.* 2, (2006).
398. Dodé, C. & Rondard, P. PROK2/PROKR2 Signaling and Kallmann Syndrome. *Front. Endocrinol.* 4, (2013).
399. Ng, K. et al. Dependence of olfactory bulb neurogenesis on prokineticin 2 signaling. *Science (New York, N.Y.)* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15976302/> (2005) doi:10.1126/science.1112103.
400. Ngan, E. et al. Prokineticin-1 (Prok-1) works coordinately with glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) to mediate proliferation and differentiation of enteric neural crest cells.

- Biochimica et biophysica acta <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18006159/> (2008)
doi:10.1016/j.bbamcr.2007.09.005.
401. Ngan, E. et al. Prokineticin-1 modulates proliferation and differentiation of enteric neural crest cells. *Biochimica et biophysica acta* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17324478/> (2007)
doi:10.1016/j.bbamcr.2007.01.013.
402. Ruiz-Ferrer, M. et al. Expression of PROKR1 and PROKR2 in Human Enteric Neural Precursor Cells and Identification of Sequence Variants Suggest a Role in HSCR. *PLoS ONE* 6, (2011).
403. Landucci, E. et al. Prokineticins are neuroprotective in models of cerebral ischemia and ischemic tolerance in vitro. *Neuropharmacology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27140692/> (2016)
doi:10.1016/j.neuropharm.2016.04.043.
404. Cheng, M. Y. et al. Prokineticin 2 is an endangering mediator of cerebral ischemic injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 5475–5480 (2012).
405. Désaubry, L., Kanthasamy, A. G. & Nebigi, C. G. Prokineticin signaling in heart-brain developmental axis: Therapeutic options for heart and brain injuries. *Pharmacol. Res.* 160, 105190 (2020).
406. Mundim, M. et al. A new function for Prokineticin 2: Recruitment of SVZ-derived neuroblasts to the injured cortex in a mouse model of traumatic brain injury. *Molecular and cellular neurosciences* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30391355/> (2019) doi:10.1016/j.mcn.2018.10.004.
407. Gordon, R. et al. Prokineticin-2 upregulation during neuronal injury mediates a compensatory protective response against dopaminergic neuronal degeneration. *Nat. Commun.* 7, (2016).
408. Severini, C. et al. Bv8/prokineticin 2 is involved in A β -induced neurotoxicity. *Scientific reports* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26477583/> (2015) doi:10.1038/srep15301.
409. Zuena, A. R., Casolini, P., Lattanzi, R. & Maftai, D. Chemokines in Alzheimer's Disease: New Insights Into Prokineticins, Chemokine-Like Proteins. *Front. Pharmacol.* 10, (2019).
410. Cole, L. W. et al. Mutations in Prokineticin 2 and Prokineticin receptor 2 genes in Human Gonadotrophin-Releasing Hormone Deficiency: Molecular Genetics and Clinical Spectrum. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93, 3551–3559 (2008).
411. Abreu, A., Kaiser, U. & Latronico, A. The role of prokineticins in the pathogenesis of hypogonadotropic hypogonadism. *Neuroendocrinology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20502053/> (2010) doi:10.1159/000308880.
412. Franchi, S., Sacerdote, P. & Panerai, A. The prokineticin system: an interface between neural inflammation and pain. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28527062/> (2017)
doi:10.1007/s10072-017-2875-z.
413. Negri, L. et al. Impaired nociception and inflammatory pain sensation in mice lacking the prokineticin receptor PKR1: focus on interaction between PKR1 and the capsaicin receptor TRPV1 in

pain behavior. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16793879/> (2006) doi:10.1523/JNEUROSCI.5403-05.2006.

414. Abou-Hamdan, M. et al. Critical role for prokineticin 2 in CNS autoimmunity. *Neurology(R) neuroimmunology & neuroinflammation* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25884014/> (2015) doi:10.1212/NXI.0000000000000095.

415. Wechselberger, C. et al. The mammalian homologues of frog Bv8 are mainly expressed in spermatocytes. *FEBS Lett.* 462, 177–181 (1999).

416. Samson, M. et al. Human endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor: expression early in development and in Leydig cell tumors suggests roles in normal and pathological testis angiogenesis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15292351/> (2004) doi:10.1210/jc.2003-032024.

417. Li, Y. et al. Prokineticin 2 overexpression induces spermatocyte apoptosis in varicocele in rats. *Asian journal of andrology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31744994/> (2020) doi:10.4103/aja.aja_109_19.

418. Tu, L., Yu, L., Xiong, C. & Zhang, H. Potential role of prokineticin 2 in experimental varicocele-induced rat testes. *Urology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22840859/> (2012) doi:10.1016/j.urology.2012.05.033.

419. Li, Y. et al. Activation of the NLRP3 Inflammasome Pathway by Prokineticin 2 in Testicular Macrophages of Uropathogenic *Escherichia coli*- Induced Orchitis. *Frontiers in immunology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31474981/> (2019) doi:10.3389/fimmu.2019.01872.

420. Su, Y. et al. Prokineticin 2 via Calcium-Sensing Receptor Activated NLRP3 Inflammasome Pathway in the Testicular Macrophages of Uropathogenic *Escherichia coli*- Induced Orchitis. *Frontiers in immunology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33193351/> (2020) doi:10.3389/fimmu.2020.570872.

421. Fiore, M. et al. Serum prokineticin-2 in prepubertal and adult Klinefelter individuals. *Canadian journal of physiology and pharmacology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34614364/> (2022) doi:10.1139/cjpp-2021-0457.

422. Fraser, H. et al. Localization and quantification of cyclic changes in the expression of endocrine gland vascular endothelial growth factor in the human corpus luteum. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15483093/> (2005) doi:10.1210/jc.2004-0843.

423. Gao, M., Zhao, X., Lin, Y., Sun, Z. & Zhang, H. Effects of EG-VEGF, VEGF and TGF- β 1 on pregnancy outcome in patients undergoing IVF-ET treatment. *J. Assist. Reprod. Genet.* 29, 1091 (2012).

424. Ferrara, N. et al. Differential expression of the angiogenic factor genes vascular endothelial growth factor (VEGF) and endocrine gland-derived VEGF in normal and polycystic human ovaries. *The American journal of pathology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12759245/> (2003) doi:10.1016/S0002-9440(10)64322-2.

425. Alfaidy, N. Prokineticin1 and pregnancy. *Annales d'endocrinologie* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27172869/> (2016) doi:10.1016/j.ando.2016.04.014.
426. Alfaidy, N. et al. The Emerging Role of the Prokineticins and Homeobox Genes in the Vascularization of the Placenta: Physiological and Pathological Aspects. *Frontiers in physiology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33281622/> (2020) doi:10.3389/fphys.2020.591850.
427. Alfaidy, N. et al. PROK1 Level in the Follicular Microenvironment: A New Noninvasive Predictive Biomarker of Embryo Implantation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26401590/> (2016) doi:10.1210/jc.2015-1988.
428. Hoffmann, P., Feige, J. & Alfaidy, N. Placental expression of EG-VEGF and its receptors PKR1 (prokineticin receptor-1) and PKR2 throughout mouse gestation. *Placenta* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17531315/> (2007) doi:10.1016/j.placenta.2007.03.008.
429. Karaer, A., Cigremis, Y., Celik, E. & Urhan Gonullu, R. Prokineticin 1 and leukemia inhibitory factor mRNA expression in the endometrium of women with idiopathic recurrent pregnancy loss. *Fertility and sterility* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25128195/> (2014) doi:10.1016/j.fertnstert.2014.07.010.
430. Su, M. et al. Polymorphisms of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor gene and its receptor genes are associated with recurrent pregnancy loss. *Human reproduction (Oxford, England)* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20847187/> (2010) doi:10.1093/humrep/deq256.
431. Ito, H. et al. Prokineticin 2 antagonist, PKRA7 suppresses arthritis in mice with collagen-induced arthritis. *BMC musculoskeletal disorders* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27609223/> (2016) doi:10.1186/s12891-016-1243-0.
432. He, X. et al. Prokineticin 2 Plays a Pivotal Role in Psoriasis. *EBioMedicine* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27887936/> (2016) doi:10.1016/j.ebiom.2016.10.022.
433. Wade, P. et al. Prokineticin-1 evokes secretory and contractile activity in rat small intestine. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19930539/> (2010) doi:10.1111/j.1365-2982.2009.01426.x.
434. Watson, R. et al. Increased prokineticin 2 expression in gut inflammation: role in visceral pain and intestinal ion transport. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22050240/> (2012) doi:10.1111/j.1365-2982.2011.01804.x.
435. Petrella, C. et al. Maternal exposure to low levels of corticosterone during lactation protects against experimental inflammatory colitis-induced damage in adult rat offspring. *PloS one* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25405993/> (2014) doi:10.1371/journal.pone.0113389.
436. Zinni, M. et al. Maternal exposure to low levels of corticosterone during lactation protects adult rat progeny against TNBS-induced colitis: A study on GR-mediated anti-inflammatory effect and prokineticin system. *PloS one* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28267767/> (2017) doi:10.1371/journal.pone.0173484.

437. Chauvet, S. et al. EG-VEGF, BV8, and their receptor expression in human bronchi and their modification in cystic fibrosis: Impact of CFTR mutation (delF508). *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26047640/> (2015) doi:10.1152/ajplung.00382.2014.
438. Goi, T. et al. Angiogenesis and tumor proliferation/metastasis of human colorectal cancer cell line SW620 transfected with endocrine glands-derived-vascular endothelial growth factor, as a new angiogenic factor. *Cancer research* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15026321/> (2004) doi:10.1158/0008-5472.can-3696-2.
439. Yoshida, Y. et al. Prokineticin 2 expression as a novel prognostic biomarker for human colorectal cancer. *Oncotarget* 9, 30079–30091 (2018).
440. Kurebayashi, H. et al. Prokineticin 2 (PROK2) is an important factor for angiogenesis in colorectal cancer. *Oncotarget* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26317645/> (2015) doi:10.18632/oncotarget.4385.
441. Itatani, Y. et al. Suppressing neutrophil-dependent angiogenesis abrogates resistance to anti-VEGF antibody in a genetic model of colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 117, 21598–21608 (2020).
442. Nagano, H. et al. Endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor (EG-VEGF) expression in colorectal cancer. *J. Surg. Oncol.* 96, 605–610 (2007).
443. Goi, T., Nakazawa, T., Hirono, Y. & Yamaguchi, A. The anti-tumor effect is enhanced by simultaneously targeting VEGF and PROK1 in colorectal cancer. *Oncotarget* 6, 6053–6061 (2015).
444. Goi, T., Nakazawa, T., Hirono, Y. & Yamaguchi, A. The prognosis was poorer in colorectal cancers that expressed both VEGF and PROK1 (No correlation coefficient between VEGF and PROK1). *Oncotarget* 6, 28790–28799 (2015).
445. Tagai, N., Goi, T., Shimada, M. & Kurebayashi, H. Plasma Prokineticin 1, a prognostic biomarker in colorectal cancer patients with curative resection: a retrospective cohort study. *World J. Surg. Oncol.* 19, 302–302 (2021).
446. Llovet, J. et al. Immunotherapies for hepatocellular carcinoma. *Nature reviews. Clinical oncology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34764464/> (2022) doi:10.1038/s41571-021-00573-2.
447. Monnier, J. et al. Prokineticin 2/Bv8 is expressed in Kupffer cells in liver and is down regulated in human hepatocellular carcinoma. *World journal of gastroenterology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18300343/> (2008) doi:10.3748/wjg.14.1182.
448. Korc, M. Pancreatic cancer associated stroma production. *Am. J. Surg.* 194, s84–s86 (2007).
449. Curtis, V. et al. A PK2/Bv8/PROK2 antagonist suppresses tumorigenic processes by inhibiting angiogenesis in glioma and blocking myeloid cell infiltration in pancreatic cancer. *PLoS one* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23372791/> (2013) doi:10.1371/journal.pone.0054916.

450. Hasnis, E. et al. Anti-Bv8 antibody and metronomic gemcitabine improve pancreatic adenocarcinoma treatment outcome following weekly gemcitabine therapy. *Neoplasia N. Y. N* 16, (2014).
451. Frezzetti, D. et al. VEGF as a potential target in lung cancer. *Expert Opin. Ther. Targets* 21, (2017).
452. Jiang, K., Kwak, H. & Tosato, G. GRANULOCYTE INFILTRATION AND EXPRESSION OF THE PRO-ANGIOGENIC BV8 PROTEIN IN EXPERIMENTAL EL4 AND LEWIS LUNG CARCINOMA TUMORS. *Cureus* 5, 82–82 (2013).
453. Campbell, S. Advances in angiogenesis research: relevance to urological oncology. *The Journal of urology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9334575/> (1997) doi:10.1016/s0022-5347(01)64090-4.
454. Pasquali, D. et al. The endocrine-gland-derived vascular endothelial growth factor (EG-VEGF)/prokineticin 1 and 2 and receptor expression in human prostate: Up-regulation of EG-VEGF/prokineticin 1 with malignancy. *Endocrinology* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16763065/> (2006) doi:10.1210/en.2006-0614.
455. Lauttia, S. et al. Prokineticins and Merkel cell polyomavirus infection in Merkel cell carcinoma. *British journal of cancer* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24496457/> (2014) doi:10.1038/bjc.2014.20.
456. Kowanetz, M. et al. Granulocyte-colony stimulating factor promotes lung metastasis through mobilization of Ly6G+Ly6C+ granulocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21081700/> (2010) doi:10.1073/pnas.1015855107.
457. Sasaki, S. et al. Involvement of Prokineticin 2–expressing Neutrophil Infiltration in 5-Fluorouracil–induced Aggravation of Breast Cancer Metastasis to Lung. *Mol. Cancer Ther.* 17, 1515–1525 (2018).
458. Wu, M. et al. Silencing PROK2 Inhibits Invasion of Human Cervical Cancer Cells by Targeting MMP15 Expression. *International journal of molecular sciences* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32887509/> (2020) doi:10.3390/ijms21176391.
459. Bălu, S., Pirtea, L., Gaje, P., Cimpean, A. M. & Raica, M. The immunohistochemical expression of endocrine gland-derived-VEGF (EG-VEGF) as a prognostic marker in ovarian cancer. *Rom J Morphol Embryol* 53, 479–83 (2012).
460. Zhang, X. et al. Ovarian cancer derived PKR1 positive exosomes promote angiogenesis by promoting migration and tube formation in vitro. *Cell Biochem. Funct.* 39, 308–316 (2021).
461. Traboulsi, W. et al. Antagonism of EG-VEGF Receptors as Targeted Therapy for Choriocarcinoma Progression In Vitro and In Vivo. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 23, 7130–7140 (2017).
462. [Choriocarcinoma in Senegal: epidemiology, prognosis and prevention]. *ResearchGate* https://www.researchgate.net/publication/10995071_Choriocarcinoma_in_Senegal_epidemiology_prognosis_and_prevention.

463. Altieri, A., Franceschi, S., Ferlay, J., Smith, J. & La Vecchia, C. Epidemiology and aetiology of gestational trophoblastic diseases. *Lancet Oncol.* 4, 670–678 (2003).
464. Smith, H. O. Gestational trophoblastic disease epidemiology and trends. *Clin. Obstet. Gynecol.* 46, 541–556 (2003).
465. Cagayan, M. S. & Lu-Lasala, L. R. Management of gestational trophoblastic neoplasia with metastasis to the central nervous system: A 12-year review at the Philippine General Hospital. *J. Reprod. Med.* 51, 785–792 (2006).

ANNEXES

Production scientifique

Publication 1

Publication 2

Curriculum vitae

Production scientifique

Communications à des congrès

- Participation en novembre 2022 au CRCL symposium international à Lyon, présentation d'un poster

Articles publiés

1) Multifaceted Functions of Prokineticins in Reproductive Cancers and Proposed Associated Therapies – 2020

Constance Collet, Roland Abi Nahed, KEVIN GEMY, Wael Traboulsi, Nicolas Lemaitre, Pierre-Adrien Bolze, Pascale Hoffmann, Mohamed Benharouga, Nadia Alfaidy

Journal of Cancer Science and Clinical Therapeutics

2) Copper-Associated Oxidative Stress Contributes to Cellular Inflammatory Responses in Cystic Fibrosis – 2021

Amal Kouadri, Johanna Cormenier, KEVIN GEMY, Laurence Macari, Peggy Charbonnier, Pierre Richaud, Isabelle Michaud-Soret, Nadia Alfaidy and Mohamed Benharouga

Biomedecines

PUBLICATION 1

Review Article

Multifaceted Functions of Prokineticins in Reproductive Cancers and Proposed Associated Therapies

Constance Collet^{1,2,3#}, Roland Abi Nahed^{1,2,3#}, Kevin Gemy^{1,2,3,4}, Wael Traboulsi⁵, Nicolas Lemaitre^{1,2,3}, Pierre-Adrien Bolze^{6,7}, Pascale Hoffmann⁸, Mohamed Benharouga^{2,3,4}, Nadia Alfaidy^{1,2,3*}

#Authors contributed equally

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 1036, Grenoble, France

²University Grenoble-Alpes, 38000, Grenoble, France

³Commissariat à l’Energie Atomique et aux Energies Alternatives (CEA), Biosciences and Biotechnology Institute of Grenoble, Grenoble, France

⁴Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 5249, Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, Grenoble, France

⁵Georgetown University Medical Center, Pre-Clinical Science Building, GD01/office number, 3900 Reservoir Rd NW, Washington DC 20007

⁶University of Lyon 1, University Hospital Lyon Sud, Department of Gynecological Surgery and Oncology, France

⁷French Reference Center for Gestational Trophoblastic Diseases, University Hospital Lyon Sud, 165, Chemin du Grand Revoyet, 69495 Pierre Bénite, France

⁸University Hospital of Grenoble, Department of Obstetrics and Gynaecology, and Laboratoire d’Aide à la Procréation-CECOS, La Tronche, France

***Corresponding Author:** Dr. Nadia Alfaidy, Unité INSERM U1036. Laboratoire BCI –Biosanté, CEA Grenoble 17, rue des Martyrs, 38054 Grenoble cedex 9, France, Tel: 0438783501; Fax: 0438785058; E-mail: nadia.alfaidy-benharouga@cea.fr

Received: 29 June 2020; **Accepted:** 17 August 2020; **Published:** 02 October 2020

Citation: Constance Collet, Roland Abi Nahed, Kevin Gemy, Wael Traboulsi, Nicolas Lemaitre, Pierre-Adrien Bolze, Pascale Hoffmann, Mohamed Benharouga, Nadia Alfaidy. Multifaceted Functions of Prokineticins in Reproductive Cancers and Proposed Associated Therapies. Journal of Cancer Science and Clinical Therapeutics 4 (2020): 408-423.

Abstract

Prokineticin 1 and prokineticin 2 are two secreted proteins that belong to the prokineticin family. The two ligands act via two G protein-coupled receptors, PROKR1 and PROKR2 to induce cell's proliferation, migration, invasion and permeability. They mostly act on epithelial, endothelial and immune cells. Deregulations in the expression of the ligands and/or the receptors of this family have been associated with both tumor and non-tumor pathologies of the reproductive system. In these pathologies, prokineticins have been reported to be associated with strong angiogenic and inflammatory activities. While their direct involvement in some threatening reproductive non-tumor pathologies such as kallmann syndrome, polycystic ovaries, preeclampsia and fetal growth restriction are well established, their role and their consideration as potential targets in the tumors of the reproductive system are still debated. This review will address the multifaceted roles of prokineticins and their receptors in reproductive cancers. Especially, the review will address the role of the prokineticin system in two female cancers, the ovarian cancer and the gestational cancer, Choriocarcinoma. The two types of cancer differentially express the prokineticin ligands at their early developmental stages, leading to different overall responses to be adapted when antagonisation of the prokineticin system is proposed. The review will summarize recent advances in the understanding of the prokineticin system's involvement in the reproductive cancers, discuss its multifaceted roles in relation to prokineticin's actions and proposes associated therapies.

Keywords: Prokineticin; Reproductive cancer; Targeted therapies; Immune system; Prokineticin antagonists

1. Prokineticin Family

In mammals, the prokineticin family is composed of two members, the prokineticin 1 (PROK1) also called EG-VEGF (Endocrine Gland-derived Vascular Endothelial Growth Factor) and the prokineticin 2 (PROK2) also called Bv8 [1, 2]. EG-VEGF is transcribed from the *prok1* gene composed of three exons located on chromosome 1 in 1p21 [3, 4]. The gene that transcribes PROK2 is located on the chromosome 3 at 3p13.

Prokineticins and their receptors are expressed in various tissues such as ovary, testis, adrenal gland, placenta, uterus, brain, digestive tract and bone marrow [5-7]. In many organs prokineticin's expression has been shown to be dynamic throughout physiological processes such as, circadian rhythm [8] menstrual cycle [9] and throughout pregnancy [10, 11]. In these systems, prokineticins have been shown to be regulated by local effectors and/or endocrine hormones. In the ovaries PROK1 is regulated by β -hCG (human Chorionic Gonadotropin), estrogen and FSH [12-14]. In the placenta PROK1 has been shown to be regulated by hypoxia, hCG and PPAR γ [10, 15, 16].

The prokineticins are secreted protein that act through their binding to two G protein-coupled receptors (GPCRs) [1, 2], the prokineticin receptor 1 (PROKR1) and the prokineticin receptor 2 (PROKR2). The prokineticin receptors were discovered simultaneously by three research teams [1, 2]. They belong to the GPCR family, with seven transmembrane domains that interact with heterotrimeric G proteins. PROKR1 and PROKR2 were initially called GPR73A and B, then receptors of prokineticin 1 and prokineticin 2, respectively. They share 85% homology in their amino acid sequence, but differ in their N-terminal parts [1, 2, 17].

Strong similarities were found in their transmembrane domains, suggesting similarities in their mechanisms of activation [17]. In human, the *prokr1* and *prokr2* genes include two exons and are located on two different chromosomes. The *prokr2* gene is located on chromosome 2 at 2q14 and *prokr1* gene is located on chromosome 20 at 20p13 [1]. The two prokineticins act as powerful ligands for both PROKR1 and PROKR2 receptors. Interestingly, differential and tissue-specific expressions were reported for the two receptors. PROKR2 is abundantly expressed in the brain and testes, while PROKR1 is mainly expressed in peripheral tissues such as the spleen, prostate, pancreas, heart and blood cells. In the reproductive system, high levels of both receptors have been reported in the testis, ovary, endometrium and placenta [6, 9, 12, 18, 19].

Several studies have been carried out to determine the affinity of the two ligands to their receptors. It clearly appears that PROK2 exhibits higher affinity for PROKRs (EC₅₀ of 4.5 ± 0.8 nmol/L for PROKR1 and 6.4 ± 1.3 nmol/L for PROKR2) [20], whereas PROK1 exhibits a moderate affinity for both receptors (EC₅₀ of 27.6 ± 8.2 nmol/L for PROKR1 and 52.2 ± 16.4 nmol/L for PROKR2). Distinct expression patterns of the prokineticins and their receptors have been reported in various tissues, providing the cue for their tissue-specific biological functions [5-7]. In addition, the differential pattern of expression of G-proteins plus the multiple types of G-proteins that can couple to these receptors further increase the functional complexity of the system. PROK1 and PROK2 bind to PROKR1 and PROKR2, which can be coupled to Gi, Gs and Gq to activate MAPK/Akt, induce cAMP accumulation and calcium mobilization [20].

2. Prokineticins and Diseases

Prokineticins were first identified as potent agents stimulating the muscle contraction of the gastrointestinal tract [14, 21]. Later, PROK1 was shown to mediate proliferation and differentiation of the enteric neural crest cells during the enteric nervous system (ENS) development [22]. Since their discovery, prokineticin proteins have been associated with two key biological functions, angiogenesis, including vascular remodeling, and inflammation [6, 23, 24]. Over the last two decades, research articles on the prokineticins have either studied their role in angiogenesis and neovascularization or in inflammation [6, 23, 24]. However, few studies have addressed combined actions of the prokineticins in a given physiological or pathological process.

A determinant factor that links the biology of prokineticins with vascular remodeling is the hypoxic environment which develops upon a vascular damage and which is known to up-regulate prokineticins. Importantly, both PROK1 and PROK2 promoter regions have response elements for the hypoxia inducible factor (HIF-1) [6, 23, 24]. In several studies, prokineticins have been reported as potent angiogenic factors and their receptors are highly expressed in both microvascular and macrovascular endothelial cells [6, 23].

PROK1 was reported as a potent angiogenic factor that promotes angiogenesis in various steroidogenic glands [4, 8, 10]. In relation to inflammatory processes, both ligands were reported to activate this process. However, unlike PROK1, PROK2 is more associated with this process as it is expressed in the bone marrow. PROK2 is also reported as the preferential prokineticin expressed by immune cells as it acts as a potent chemoattractant for monocytes and

neutrophils [24, 25]. It also induces survival, differentiation and activation of the granulocytic and monocytic lineages [26]. To fulfil the angiogenic and inflammatory functions, prokineticins and their receptors have been reported to be involved in the control of multiple processes including proliferation, differentiation, invasion and migration of the target cells. These effects are mainly represented by endothelial and epithelial cells for the angiogenic processes and by immune cells such as monocytes, macrophages and neutrophils for the inflammatory processes [26, 27].

While, the prokineticin system has been reported to be associated with numerous diseases, its association with the reproduction-associated pathologies is the most investigated [13, 28-30]. Since their discovery, multiple studies highlighted the direct involvement of the prokineticin system in the development of severe reproduction pathologies, such as the polycystic ovarian syndrome (PCOS), the congenital diseases, named Kallmann syndrome, the Hirschsprung disease [30-32] and multiple pregnancy-associated pathologies [6, 10, 16, 33-35]. Nevertheless, the majority of the studies in relation to the reproductive system emanated from their involvement in placental development, during pregnancy. In relation to pregnancy pathologies, PROK1 constitutes the master member. In fact, strong evidences established the direct involvement of PROK1/PROKR system in physiological and pathophysiological aspects of pregnancy; these include

clinical, *in vitro*, *ex vivo*, and *in vivo* studies [6, 10, 16, 33-36]. Through its receptors PROKR1 and PROKR2, PROK1 controls the proliferation and invasion of trophoblast cells to ensure the establishment of the fetomaternal circulation, along with direct effect on intravillous vasculature to ensure vascular branching and angiogenesis [6, 10, 11]. Beside its physiological effect, PROK1 and its receptors have been reported to be causative and/or compensatory factors in most of the threatening pathologies of pregnancy, such as preeclampsia and fetal growth restriction [37,38]. Also, PROK1 has been designated as a new noninvasive biomarker of successful embryo implantation and oocyte competence in conventional *in vitro* fertilization-embryo transfer [34, 39, 40].

2.1 Prokineticin's and Reproductive Tumor Diseases

Due to their wide spectrum of actions, notably as potent angiogenic and immunoregulatory factors and to the fact that both PROK1 and PROK2 are activated by the most potent environmental cue of angiogenesis and tumorigenesis, the oxygen tension; investigators have searched for the PROKs/PROKR system involvement in cancer development in a variety of tissues [4, 22, 36, 41-49]. While numerous studies reported deregulations of PROK1, PROK2 and/or their receptors in a wide range of cancers, few studies brought evidences for their direct involvement in cancer development and progression [22, 36, 41, 46, 50].

Cancer Type	Prokineticin involved	Origin	Role in tumor progression	Prokineticin-targeted therapies	References
Neuroblastoma	PROK1, PROKR1, PROKR2	Neuroblastoma cells	Cancer progression	Not tested	22
Colorectal cancer	PROK1, PROK2, PROKR1, PROKR2	Cancer cells	Increased with malignancy	Tested: anti-PROK1 antibody	42, 68
Head and neck cancer	PROKR1, PROKR2	Epithelial cells	Decreased with malignancy	Not tested	43
Adrenocortical Tumor	PROKR1, PROKR2	Adrenal cortex	Correlation with malignancy	Not tested	44
Pancreatic cancer	PROK1	Islets, cancer-associated stromal cells, endothelial cells	Increased with malignancy, survival factor	Not tested	45
Myeloid cell tumor	PROK2	Myeloid cell, Granulocytes	Tumoral angiogenesis, immune cells mobilization	Tested: anti-PROK2 antibody & antagonist	50, 57
Testis cancer	PROK1	Leydig cell	Increased vessel density angiogenesis	Not tested	4, 48
Prostate cancer	PROK1, PROK2, PROKR1, PROKR2	Epithelial cells	Increased expression with malignancy	Not tested	47
Choriocarcinoma	PROK1, PROKR1, PROKR2	Trophoblast cells	Contribution into cancer progression	Tested: PROKR1 and PROKR2 antagonists	36
Ovarian carcinoma	PROK1	Cancer cells, stromal cell, leukocytes	Increased with malignancy but still a debate	Not tested	41, 46, 49

Table 1: Reports an updated list of the different type of tumors that were investigated in relation to the potential involvement of the prokineticin family in their growth, progression and/or aggressiveness.

As exemplified through this listing, the prokineticin system appears to be deregulated in many types of cancers. However the involvement of the ligands and/or their receptors is tightly dependent on the type of cancer, on its

severity and its localization within the affected tissue. Because most of the examined cancers in relation to the prokineticin system emanate from descriptive studies involving cohorts enrolled at advanced stages of cancer, it

is difficult to conclude on whether the deregulation of PROK system is a cause or consequence of the cancer. Nevertheless, most of the data confirmed the deregulation of prokineticins at these stages, suggesting their tight association with cancer's aggravation. In these cases, their deregulations should rather be considered as consequences of the disease.

Because most advanced and far-reaching studies on prokineticins and cancer have been investigated in the reproductive system, the following sections will report the updated investigations on prokineticins in relation to prostate, testis, ovarian and placental cancers. These subsections will report the associated deregulated member, its role in the development and /or progression of the related cancer and will propose associated therapies, when applicable.

2.1.1 Prokineticins in the prostate and testicular cancers

PROKs and their receptors are expressed in the testis and the prostate. In the prostate, PROK1 is localized in the glandular epithelial cells and PROK2 as well, as the two receptors are expressed in the prostate epithelial cells [47]. In the testis, PROK1 is predominantly expressed in testosterone-producing Leydig cells, whereas PROK2 expression is restricted to primary spermatocytes [4, 6, 10]. The PROKRs are also expressed in vascular endothelial cells in the testis [4, 13]. Importantly, adenoviral delivery of PROK1 or PROK2 to the mouse testis resulted in a potent angiogenic response [4], suggesting that PROKs contribute with other factors, such as VEGF-A, in the maintenance of the integrity and the proliferation of the blood vessels in this organ. The exact role of each of these receptors and their implication in the physiology of prostate and testis functions remain to be elucidated.

In relation to prostate cancer, the PROK1 expression has been reported to be elevated in the prostate compared to healthy individuals. These levels were correlated to the cancer's malignancy [47]. Thus, the levels of PROK1 could be useful for prostate cancer outcome evaluations and can be used as a target for prostate cancer treatment in the future. Regarding the testis cancer, few studies investigated prokineticins involvement in the development and or progression of this cancer. In a study comparing PROK1 levels of expression in different testicular tumors, including Leydig cell tumors, seminomas and non-seminomatous germ cell tumors, it has been reported that PROK1 is predominantly expressed in Leydig cell tumors. The PROKRs have also been reported to be expressed in the testicular endothelium, suggesting an involvement of the PROKs/PROKR system in neoplastic testicular angiogenesis [48].

2.1.2 Prokineticins in the ovarian cancer

In the ovary, the representative and most abundant member is the PROK1, as numerous studies demonstrated that PROK2 is weakly or not expressed in the female reproductive organs [51]. PROK1, as well as its receptors have been reported to be strongly involved in physiological and pathophysiological processes of the ovary. In this organ, the expression of PROK1 fluctuates according to the ovarian cycle and is mainly associated with the secretory phase with a direct role in the maintenance of corpus luteum vascularization [12]. PROK1 is secreted during the follicular phase by granulosa cells of the primordial and primary follicles. Upon ovulation, PROK1 is secreted by granulosa lutein cells and its expression rises throughout the luteal phase with a peak during the very late stage [12]. Interestingly, PROK1 mRNA levels are also elevated in apoptotic tissues, especially during the corpus luteum regression or in the atretic follicles [18]. To fulfil this

pattern of expression in the ovary, PROK1 has been reported to be controlled by a panel of key ovarian regulatory factors, such as hCG, estrogen, FSH, oxygen tension and thrombin [12]. These events being associated with inflammation, it has been demonstrated that PROK1 triggers an onsite recruitment and activation of monocytes [18]. Study of gene expression profiles comparing VEGF, the major factor of the ovarian angiogenesis, and EG-VEGF revealed that their profiles rarely overlapped and seem to exhibit complementary type of functions during the ovarian cycle [18].

Given the above-described roles for PROK1 in the angiogenic and in the inflammatory processes in the ovaries, it was expected that deregulations in the PROK/PROKR system could be associated with the development of severe ovarian diseases. In this context, several studies reported prokineticins deregulation in the Polycystic ovarian syndrome (PCOS) [53]. Moreover, implication of prokineticins has also been investigated in ovarian cancer.

Ovarian cancer is the 5th cause of cancer deaths in women and it has the highest rate of death among gynecological cancers [54]. Malignant tumors that originate from the epithelium account for more than 90% of ovarian cancers. Among these is the high grade serous ovarian cancer; it accounts for nearly 70% of all ovarian cancers and is considered as the most threatening one [55]. Despite substantial survival benefits, chemotherapies are highly toxic and numerous patients develop resistance within few months after the first treatment. Therefore, there is still a need for efficient and less harmful treatment for this cancer [55].

Despite the fact that PROK1 is no longer detectable after menopause in the ovaries, some studies reported PROK1 positive cells at the tumors' periphery [56]. Two other studies reported significant correlations between PROK1 increased expression and the aggressiveness of the cancer, suggesting its potential consideration as a therapeutic target for this cancer [41,46]. On the contrary, Zhang et al. 2003 demonstrated that PROK1 mRNA levels decreased in the later stages of ovarian tumor development compared to premenopausal ovaries or early stages carcinomas [49]. Furthermore, in the same study, it was reported that PROK1 was secreted by the tumor microenvironment and especially by tumor-infiltrating T cells [49]. Importantly, the observation that PROK1 was mainly expressed by immune infiltrating cells in the ovary has been substantiated by other studies demonstrating that prokineticins could not only be expressed by tumor cells but also by immune cells in the tumor microenvironment [57]. Altogether, these findings strongly suggest that the balance between the angiogenic and the pro-inflammatory functions of the prokineticins in a given cancer may grandly contribute to the development and or progression of that cancer. While the role of the PROKs in the angiogenic process that accompany the early stages of ovarian cancer is strongly proposed, their expression by the local immune cells suggests that these proteins could be considered as specific targets to attenuate inflammatory associated reactions in the ovarian cancer.

2.1.3 Prokineticins in the placental cancer

Since the first ontology study on prokineticins, published by Ferrara et al in 2001, the human placenta appeared as a strong site of PROK1/PROKR expression [3]. Publications following this first identification confirmed the strong expression of the PROKs, especially that of PROK1 and its receptors in the human placenta [13, 29, 58]. However,

most of these studies considered one gestational age that often corresponded to placentas collected at term pregnancies [29, 58]. Since 2006, more comprehensive studies [6, 10, 11, 23, 30, 33, 36, 37] reported complete profile, pattern, and regulations of the prokineticins during human pregnancy. Also, these studies investigated their involvement in the development of the most threatening pathologies of pregnancy [6, 10, 11, 30, 36, 37]. Briefly, those findings demonstrated that PROK1 was highly expressed during the first trimester of pregnancy, with the strongest localization in the syncytiotrophoblast and Hofbauer cells (placental macrophages). PROKR1 was mainly expressed in non-differentiated cells, while PROKR2 prevails in the differentiated cells, such as the syncytiotrophoblast and the extravillous trophoblasts (EVT). These studies also demonstrated that both PROKR1 and PROKR2 were expressed by placental micro- and macro-vascular endothelial cells [23]. Through its actions on PROKR1 and PROKR2, PROK1 has been reported to control trophoblast proliferation, migration and invasion. Its actions on the endothelial cells mainly concerned its effect on their proliferation and permeability [10, 11].

Because PROK1 is a circulating protein, its levels were examined throughout pregnancy and used to compare normal and pathological pregnancies. Circulating levels of PROK1 in non-pregnant women are about 50 pg/ml. These amounts increase five times during the first trimester of pregnancy to reach 250 pg/ml and significantly fall during the second and third trimesters of pregnancy to reach 70 pg/ml [23]. Importantly, deregulated PROK1 levels were observed in threatening pathologies of pregnancy such as preeclampsia and fetal growth restriction [11, 37]. In relation to these conditions, PROK1 is proposed as a new diagnostic and/or prognostic biomarker [11, 37].

Given the direct involvement of PROK1 and its receptors in the control of key aspects of placental development during the first trimester of pregnancy and its deregulation in pregnancy pathologies, the PROK1/PROKRs appeared as potential targeted proteins. While no study has yet addressed this topic in relation to pregnancy pathologies, such as preeclampsia and FGR, a recent study reported the involvement of PROK1 and its receptors in the development and progression of gestational choriocarcinoma (CC) and proposed therapeutic options through the targeting of the receptors [36].

Gestational CC is a malignant trophoblastic tumor that can develop from a normal or abnormal pregnancy [59]. Most often, this malignant lesion appears following complete (CHM) or partial hydatidiform mole (PHM), a spontaneous abortion, or an ectopic pregnancy [59]. Patients who acquire CHM or PHM have a high risk of developing CC. However, this risk is much higher for CHM (20%) compared to PHM (1.5%). It is well established that the progression of MHC towards a CC is governed by the acquisition by trophoblastic cells of a hyperproliferative character [60]. This phenomenon is reflected in a second step by the appearance of cellular clusters, which acquire a migratory and invasive phenotype. CC is a very metastatic tumor due to the invasive and intrinsic property of trophoblastic cells. Diagnosis and monitoring of CC progression are currently based on the measurement of circulating levels of β -hCG (human chorionic gonadotropin), secreted by syncytiotrophoblast cells [61].

As reported above, PROK1 acts as a novel placental growth factor which controls trophoblast proliferation, invasion and is upregulated by hypoxia and by hCG, two key parameters of tumorigenesis. Altogether, these data suggested that the PROK system might be involved in the development and or

progression of this cancer. In this context our laboratory recently deciphered the role of PROK1 and its receptors in the development of this cancer through, a clinical study using a distinctive cohort of CHM and CC patients; an *in vitro* study using the human choriocarcinoma cell line, the JEG-3; and an *in vivo* study using a recent animal model of CC. This study demonstrated that both placenta and circulating PROK1 levels were significantly increased in CHM and CC; that PROK1 increased JEG-3 proliferation, migration and invasion in 2D and 3D culture systems and that these observations were substantiated using the developed animal model [36]. To better characterize the type of receptor involved in these effects, non-peptide specific antagonists for PROKR1 and PROKR2 were employed [8, 62]. Importantly, our data showed that the antagonization of PROK1 receptors reduced JEG-3 tumorigenesis *in vitro* and *in vivo* and that the PROKR2 antagonist was more potent in mediating these effects [36]. Because, the actual measurements of circulating β -hCG have been reported to be associated with the generation of false positives, requiring some patients to undergo invasive and unnecessary therapeutic procedures such as chemotherapy, hysterectomy, and other surgeries [50], the study by Traboulsi & al offers the possibility to consider circulating PROK1 as potential diagnostic biomarker for CC progression. Also, this study proposes the antagonization of its receptors as potential therapy to treat gestational CC. This may provide safe and less toxic therapeutic option compared with the currently used multi-agent chemotherapies.

3. Antagonisation of the Prokineticin System as a Therapeutic Opportunity for Reproductive Cancers

The prokineticin system is equally involved in angiogenic and inflammatory processes, which are two key routes that

drive cancer development and progression. In relation to angiogenesis, PROKs and especially PROK1 inhibition has been proposed as combinatory option of therapies that target the most angiogenic factor, the VEGF. This was very attempting, because the effects of both factors in regards to the angiogenic processes were somewhat complementary. Beyond this important aspect, patients treated with anti-VEGF therapies show strong refractoriness [63], suggesting that exploration of new anti-angiogenic therapies that target less ubiquitous and more tissue-specific factors such as prokineticins might lead to better results. This can be applicable for reproductive cancers that affect the ovary and the placenta.

In regards to the prokineticin system involvement in inflammation, growing literature is addressing their local role in regulating immune responses. To date, these studies mainly reported the involvement of PROK2 in these functions [64]. In the case of ovarian cancer, PROK2 was shown to be expressed by components of the immune system, especially the myeloid cells and macrophages [49, 63]. These cells have been reported to represent a crucial cell subpopulation responsible for the refractoriness to anti-VEGF treatment [49, 63]. These data strongly suggest that therapies targeting not only PROK1 for its pro-angiogenic effects, but also PROK2 for its mediated refractoriness responses can advance the treatment of cancers that overexpress these proteins, such as the ovarian cancer. Figure 1 reports a cartoon that illustrates these conclusions. The panel A shows an active vascularized tumor secreting, among other angiogenic and pro-inflammatory factors, the prokineticin ligands (PROK1 and PROK2) and expressing their receptors. The increased secretion of prokineticin is potentiated by the tumor hypoxic environment. The secreted prokineticins are part of the first signals that allow immune cells mobilization towards the tumor's

microenvironment. Once at the tumor site, the immune cells will in turn, contribute to the exacerbation of prokineticins secretion, inducing tumor cells proliferation, migration and invasion. Panel B shows the same phenomenon but in the presence of PROKR1 and /or PROKR2 antagonists. In this case, the prokineticin receptors will be occupied by the

antagonists, which consequently leads to a significant decrease in all prokineticins' mediated effects. In this schematic, blocking antibodies are also proposed as targeted therapy.

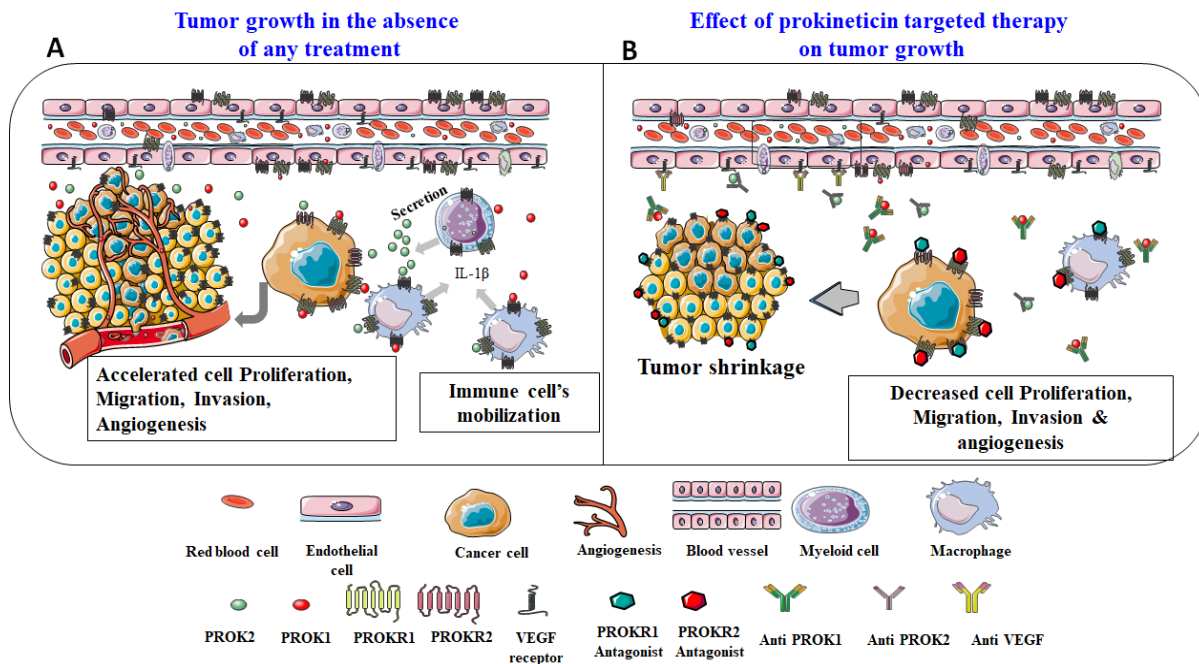


Figure 1: Reports a proposed model for tumor development in the absence or presence of targeting molecules (antagonists or antibodies) of PROK receptors.

Importantly, several studies have shown that the use of antagonists or antibodies against PROK2 *in vivo*, significantly decreased tumor growth in poorly and highly vascularized cancers [49, 63]. These effects were similar to those obtained with anti-VEGF treatments and the combination of both treatments was sometimes even more efficient [49, 63]. Through the inhibition of the prokineticin signaling, the tumor vasculature is no longer expanding; it acquires necrotic properties and exhibits a decrease in the production and secretion of pro-inflammatory cytokines.

Altogether these findings, strongly propose that therapies targeting prokineticins will not only be efficient to attenuate their pro-angiogenic activities but also to decrease their exacerbation of inflammatory responses within the tumor.

4. Conclusion and Perspectives

To date, the proposed therapies that target the prokineticin system are mainly based on the antagonization of its receptors and have only been used *in vitro*, *ex vivo* and in

animal models [30, 65, 66]. Although more *in vivo* and translational studies are still needed to consider the use of these antagonists in human, they have shown beneficial effects in *in vivo* models. In fact, both antagonists exhibit analgesic effects and control the nociceptive process that is mediated by inflammatory pathologies [67]. More importantly, the treatment of the gravid CC mice with antagonists allowed the maintenance of the gestation with fewer resorbed fetuses compared to non-treated mice [36]. Altogether, these data advocate a strong therapeutic potential for these two antagonists when used solely or in combination with actual anti-angiogenic or anti-inflammatory molecules.

Because growing literature demonstrate that angiogenic factors are often involved in local immunosuppressive effects in the tumor microenvironment, one can speculate that this can also be the case for prokineticins as they are strong angiogenic factors and are highly expressed by monocytes that generate myeloid dendritic cells, involved in immunosuppressive effects. Thus, the antagonism of the prokineticin signaling can serve to control two arms of tumor development, angiogenesis and immunosuppression.

Financial Support

We acknowledge the following sources of funding: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (U1036), University Grenoble-Alpes, Commissariat à l’Energie Atomique (DSV/iRTSV/BCI), Région Auvergne-Rhône-Alpes “CLARA, Oncostarter”, Ligue Nationale contre le Cancer and Ligue Départementale (Savoie) contre le Cancer, Inserm Transfert.

Conflicts of Interest

The authors declare no potential conflicts of interest.

References

1. Lin DC, Bullock CM, Ehlert FJ, et al. Identification and molecular characterization of two closely related G protein-coupled receptors activated by prokineticins/endocrine gland vascular endothelial growth factor. *The Journal of biological chemistry* 277 (2002): 19276-19280.
2. Masuda Y, Takatsu Y, Terao Y, et al. Isolation and identification of EG-VEGF/prokineticins as cognate ligands for two orphan G-protein-coupled receptors. *Biochemical and biophysical research communications* 293 (2002): 396-402.
3. LeCouter J, Kowalski J, Foster J, et al. Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. *Nature* 412 (2001): 877-884.
4. LeCouter J, Lin R, Tejada M, et al. The endocrine-gland-derived VEGF homologue Bv8 promotes angiogenesis in the testis: Localization of Bv8 receptors to endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (2003): 2685-2690.
5. Boulberdaa M, Urayama K, Nebigil CG. Prokineticin receptor 1 (PKR1) signalling in cardiovascular and kidney functions. *Cardiovascular research* 92 (2011): 191-198.
6. Brouillet S, Hoffmann P, Feige JJ, Alfaidy N. EG-VEGF: a key endocrine factor in placental development. *Trends in endocrinology and metabolism*: TEM 23 (2012): 501-508.
7. Ferrara N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nature reviews Cancer* 2 (2002): 795-803.
8. Cheng MY, Lee AG, Culbertson C, et al. Prokineticin 2 is an endangering mediator of cerebral ischemic injury. *Proceedings of the National Academy of*

- Sciences of the United States of America 109 (2012): 5475-5480.
9. Battersby S, Critchley HO, Morgan K, et al. Expression and regulation of the prokineticins (endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor and Bv8) and their receptors in the human endometrium across the menstrual cycle. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 89 (2004): 2463-2469.
 10. Hoffmann P, Feige JJ, Alfaidy N. Expression and oxygen regulation of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor/prokineticin-1 and its receptors in human placenta during early pregnancy. *Endocrinology* 147 (2006): 1675-1684.
 11. Hoffmann P, Saoudi Y, Benharouga M, et al. Role of EG-VEGF in human placentation: Physiological and pathological implications. *Journal of cellular and molecular medicine* 13 (2009): 2224-2235.
 12. Fraser HM, Bell J, Wilson H, et al. Localization and quantification of cyclic changes in the expression of endocrine gland vascular endothelial growth factor in the human corpus luteum. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 90 (2005): 427-434.
 13. Maldonado-Perez D, Evans J, Denison F, et al. Potential roles of the prokineticins in reproduction. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 18 (2007): 66-72.
 14. Ngan ES, Tam PK. Prokineticin-signaling pathway. *The international journal of biochemistry and cell biology* 40 (2008): 1679-1684.
 15. Brouillet S, Hoffmann P, Chauvet S, et al. Revisiting the role of hCG: new regulation of the angiogenic factor EG-VEGF and its receptors. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 69 (2012): 1537-1550.
 16. Garnier V, Traboulsi W, Salomon A, et al. PPARgamma controls pregnancy outcome through activation of EG-VEGF: new insights into the mechanism of placental development. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 309 (2015): E357-E369.
 17. Soga T, Matsumoto S, Oda T, Saito T, et al. Molecular cloning and characterization of prokineticin receptors. *Biochimica et biophysica acta* 1579 (2002): 173-179.
 18. Kisliouk T, Friedman A, Klipper E, et al. Expression pattern of prokineticin 1 and its receptors in bovine ovaries during the estrous cycle: involvement in corpus luteum regression and follicular atresia. *Biology of reproduction* 76 (2007): 749-758.
 19. Tiberi F, Tropea A, Apa R, et al. Prokineticin 1 mRNA expression in the endometrium of healthy women and in the eutopic endometrium of women with endometriosis. *Fertility and sterility* 93 (2010): 2145-2149.
 20. Chen GY, Nunez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nature reviews Immunology* 10 (2010): 826-837.
 21. Wade PR, Palmer JM, Mabus J, et al. Prokineticin-1 evokes secretory and contractile activity in rat small intestine. *Neurogastroenterology and motility: the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 22 (2010): e152-e161.
 22. Ngan ES, Lee KY, Sit FY, Poon HC, Chan JK, Sham MH, Lui VC, Tam PK. Prokineticin-1 modulates proliferation and differentiation of enteric neural crest cells. *Biochimica et biophysica acta* 1773 (2007): 536-545.
 23. Brouillet S, Hoffmann P, Benharouga M, et al. Molecular characterization of EG-VEGF-mediated angiogenesis: differential effects on microvascular and macrovascular endothelial cells. *Molecular biology of the cell* 21 (2010): 2832-2843.

24. Negri L, Ferrara N. The Prokineticins: Neuromodulators and Mediators of Inflammation and Myeloid Cell-Dependent Angiogenesis. *Physiological reviews* 98 (2018): 1055-1082.
25. Giannini E, Lattanzi R, Nicotra A, et al. The chemokine Bv8/prokineticin 2 is up-regulated in inflammatory granulocytes and modulates inflammatory pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (2009): 14646-14651.
26. Monnier J, Piquet-Pellorce C, Feige JJ, et al. Prokineticin 2/Bv8 is expressed in Kupffer cells in liver and is down regulated in human hepatocellular carcinoma. *World journal of gastroenterology* 14 (2008): 1182-1191.
27. Monnier J, Samson M. Prokineticins in angiogenesis and cancer. *Cancer letters* 296 (2010): 144-149.
28. Alfaidy N, Baron C, Antoine Y, et al. Prokineticin 1 is a new biomarker of human oocyte competence: expression and hormonal regulation throughout late folliculogenesis. *Biology of reproduction* 101 (2019): 832-841.
29. Catalano RD, Lannagan TR, Gorowiec M, et al. Prokineticins: novel mediators of inflammatory and contractile pathways at parturition? *Molecular human reproduction* 16 (2010): 311-319.
30. Traboulsi W, Brouillet S, Sergent F, et al. Prokineticins in central and peripheral control of human reproduction. *Hormone molecular biology and clinical investigation* 24 (2015): 73-81.
31. Cole LW, Sidis Y, Zhang C, et al. Mutations in prokineticin 2 and prokineticin receptor 2 genes in human gonadotrophin-releasing hormone deficiency: molecular genetics and clinical spectrum. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 93 (2008): 3551-3559.
32. Matsumoto S, Yamazaki C, Masumoto KH, et al. Abnormal development of the olfactory bulb and reproductive system in mice lacking prokineticin receptor PKR2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (2006): 4140-4145.
33. Alfaidy N, Hoffmann P, Boufettal H, et al. The multiple roles of EG-VEGF/PROK1 in normal and pathological placental angiogenesis. *BioMed research international* (2014): 451906.
34. Brouillet S, Hoffmann P, Thomas-Cadi C, et al. [PROK1, prognostic marker of embryo implantation?]. *Gynecologie, obstetrique & fertilité* 41 (2013): 562-565.
35. Evans J, Catalano RD, Morgan K, et al. Prokineticin 1 signaling and gene regulation in early human pregnancy. *Endocrinology* 149 (2008): 2877-2887.
36. Traboulsi W, Sergent F, Boufettal H, et al. Antagonism of EG-VEGF Receptors as Targeted Therapy for CC Progression In Vitro and In Vivo. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 23 (2017): 7130-7140.
37. Brouillet S, Murthi P, Hoffmann P, et al. EG-VEGF controls placental growth and survival in normal and pathological pregnancies: case of fetal growth restriction (FGR). *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 70 (2013): 511-525.
38. Holloway AC, Salomon A, Soares MJ, et al. Characterization of the adverse effects of nicotine on placental development: in vivo and in vitro studies. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 306 (2014): E443-E456.

39. Alfaidy N, Baron C, Antoine Y, et al. Prokineticin 1 is a new biomarker of human oocyte competence: expression and hormonal regulation throughout late folliculogenesis. *Biology of reproduction* 101 (2019): 832-841.
40. Alfaidy N, Hoffmann P, Gillois P, et al. PROK1 Level in the Follicular Microenvironment: A New Noninvasive Predictive Biomarker of Embryo Implantation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 101 (2016): 435-444.
41. Balu S, Pirtea L, Gaje P, et al. The immunohistochemical expression of endocrine gland-derived-VEGF (EG-VEGF) as a prognostic marker in ovarian cancer. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie* 53 (2012): 479-483.
42. Benlahfid M, Traboulsi W, Sergent F, et al. Endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor (EG-VEGF) and its receptor PROKR2 are associated to human colorectal cancer progression and peritoneal carcinomatosis. *Cancer biomarkers: section A of Disease markers* 21 (2018): 345-354.
43. Bouzoubaa M, Benlahfid M, Sidqui M, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and Endocrine gland-VEGF (EG-VEGF) are down regulated in head and neck cancer. *Clinical otolaryngology: official journal of ENT-UK; official journal of Netherlands Society for Oto-Rhino-Laryngology & Cervico-Facial Surgery* (2020).
44. Heck D, Wortmann S, Kraus L, et al. Role of Endocrine Gland-Derived Vascular Endothelial Growth Factor (EG-VEGF) and Its Receptors in Adrenocortical Tumors. *Hormones & cancer* 6 (2015): 225-236.
45. Jiang X, Abiatari I, Kong B, et al. Pancreatic islet and stellate cells are the main sources of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor/prokineticin-1 in pancreatic cancer. *Pancreatology: official journal of the International Association of Pancreatology* 9 (2009): 165-172.
46. Lozneau L, Avadanei R, Cimpean AM, et al. Relationship between the Proangiogenic Role of Eg-Vegf, Clinicopathological Characteristics and Survival in Tumoral Ovary. *Revista medico-chirurgicala a Societati de Medici si Naturalisti din Iasi* 119 (2015): 461-465.
47. Pasquali D, Rossi V, Staibano S, et al. The endocrine-gland-derived vascular endothelial growth factor (EG-VEGF)/prokineticin 1 and 2 and receptor expression in human prostate: Up-regulation of EG-VEGF/prokineticin 1 with malignancy. *Endocrinology* 147 (2006): 4245-4251.
48. Samson M, Peale FV, Frantz G, et al. Human endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor: expression early in development and in Leydig cell tumors suggests roles in normal and pathological testis angiogenesis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 89 (2004): 4078-4088.
49. Zhang L, Yang N, Conejo-Garcia JR, et al. Expression of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor in ovarian carcinoma. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 9 (2003): 264-272.
50. Sasaki S, Sasaki Y, Iino K. Recurrent gestational trophoblastic disease in a case of suspected quiescent gestational trophoblastic disease: a case report. *The Journal of reproductive medicine* 55 (2010): 317-320.

51. Ferrara N, LeCouter J, Lin R, et al. EG-VEGF and Bv8: a novel family of tissue-restricted angiogenic factors. *Biochimica et biophysica acta* 1654 (2004): 69-78.
52. Gao MZ, Zhao XM, Sun ZG, et al. Endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor concentrations in follicular fluid and serum may predict ovarian hyperstimulation syndrome in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation. *Fertility and sterility* 95 (2011): 673-678.
53. Meng L, Yang H, Jin C, et al. miR285p suppresses cell proliferation and weakens the progression of polycystic ovary syndrome by targeting prokineticin1. *Molecular medicine reports* 20 (2019): 2468-2475.
54. Kurian AW, Ward KC, Howlander N, et al. Genetic Testing and Results in a Population-Based Cohort of Breast Cancer Patients and Ovarian Cancer Patients. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 37 (2019): 1305-1315.
55. Matulonis UA, Sood AK, Fallowfield L, et al. Ovarian cancer. *Nature reviews Disease primers* 2 (2016): 160-161.
56. Maldonado-Perez D, Brown P, Morgan K, et al. Prokineticin 1 modulates IL-8 expression via the calcineurin/NFAT signaling pathway. *Biochimica et biophysica acta* 1793 (2009): 1315-1324.
57. Shojaei F, Wu X, Zhong C, et al. Bv8 regulates myeloid-cell-dependent tumour angiogenesis. *Nature* 450 (2007): 825-831.
58. Denison FC, Battersby S, King AE, et al. Prokineticin-1: a novel mediator of the inflammatory response in third-trimester human placenta. *Endocrinology* 149 (2008): 3470-3477.
59. Froeling FE, Seckl MJ. Gestational trophoblastic tumours: an update for 2014. *Current oncology reports* 16 (2014): 408.
60. Louwen F, Muschol-Steinmetz C, Reinhard J, et al. A lesson for cancer research: placental microarray gene analysis in preeclampsia. *Oncotarget* 3 (2012): 759-773.
61. Esfandiari N, Goldberg JM. Heterophile antibody blocking agent to confirm false positive serum human chorionic gonadotropin assay. *Obstetrics and gynecology* 101 (2003): 1144-1146.
62. Balboni G, Lazzari I, Trapella C, et al. Triazine compounds as antagonists at Bv8-prokineticin receptors. *Journal of medicinal chemistry* 51 (2008): 7635-7639.
63. Shojaei F, Wu X, Qu X, et al. G-CSF-initiated myeloid cell mobilization and angiogenesis mediate tumor refractoriness to anti-VEGF therapy in mouse models. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (2009): 6742-7747.
64. LeCouter J, Zlot C, Tejada M, et al. Bv8 and endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor stimulate hematopoiesis and hematopoietic cell mobilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (2004): 16813-16818.
65. Jacobson O, Weiss ID, Niu G, et al. Prokineticin receptor 1 antagonist PC-10 as a biomarker for imaging inflammatory pain. *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine* 52 (2011): 600-607.
66. Negri L, Maftai D. Targeting the Prokineticin System to Control Chronic Pain and Inflammation. *Current medicinal chemistry* 25 (2018): 3883-3894.

67. Negri L, Lattanzi R. Bv8-prokineticins and their receptors: modulators of pain. *Current pharmaceutical biotechnology* 12 (2011): 1720-1727.
68. Goi T, Nakazawa T, Hirono Y, et al. Antiprokineticin (PROKR1) monoclonal antibody suppresses angiogenesis and tumor growth in colorectal cancer Suppl 4 (2014): S665-S671.



This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the [Creative Commons Attribution \(CC-BY\) license 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

PUBLICATION 2



Article

Copper-Associated Oxidative Stress Contributes to Cellular Inflammatory Responses in Cystic Fibrosis

Amal Kouadri ^{1,2,3,†}, Johanna Cormenier ^{1,2,3,†}, Kevin Gemy ^{1,2,3}, Laurence Macari ^{2,3,4}, Peggy Charbonnier ^{2,3,4}, Pierre Richaud ⁵, Isabelle Michaud-Soret ^{2,3,4}, Nadia Alfaidy ^{1,2,3,*}  and Mohamed Benharouga ^{1,2,3,*} 

¹ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1292, Biologie et Biotechnologie Pour la Santé, 38000 Grenoble, France; amal.kouadri.phd@gmail.com (A.K.); cormenierj@gmail.com (J.C.); Kevin.GEMY@cea.fr (K.G.)

² Commissariat à l'Energie Atomique et Aux Energies Alternatives (CEA), 38000 Grenoble, France; laurence.macari@cea.fr (L.M.); peggy.charbonnier@cea.fr (P.C.); isabelle.michaud-soret@cea.fr (I.M.-S.)

³ Université Grenoble Alpes (UGA), 38043 Grenoble, France

⁴ Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), LCBM-UMR 5249, 38000 Grenoble, France

⁵ CEA, CNRS, Institut de Biosciences et Biotechnologies d'Aix-Marseille (BIAM), Université Aix-Marseille, UMR 7265, CEA Cadarache, 13108 Saint-Paul-lez Durance, France; richaudp@gmail.fr

* Correspondance: nadia.alfaidy-benharouga@cea.fr (N.A.); mohamed.benharouga@cea.fr (M.B.); Tel.: +4-3878-010117 (M.B.); Fax: +4-3878-5058 (M.B.)

† These authors contributed equally to this study.

‡ These authors contributed equally to this work.



Citation: Kouadri, A.; Cormenier, J.; Gemy, K.; Macari, L.; Charbonnier, P.; Richaud, P.; Michaud-Soret, I.; Alfaidy, N.; Benharouga, M. Copper-Associated Oxidative Stress Contributes to Cellular Inflammatory Responses in Cystic Fibrosis.

Biomedicines **2021**, *9*, 329. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9040329>

Academic Editor: Francesco B. Blasi

Received: 4 February 2021

Accepted: 19 March 2021

Published: 24 March 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Cystic fibrosis (CF) is caused by mutations in the gene encoding the CF Transmembrane Conductance Regulator (CFTR), an apical chloride channel. An early inflammation (EI) in the lung of CF patients occurring in the absence of any bacterial infection has been reported. This EI has been proposed to be associated with oxidative stress (OX-S), generated by deregulations of the oxidant/antioxidant status. Recently, we demonstrated that copper (Cu), an essential trace element, mediates OX-S in bronchial cells. However, the role of this element in the development of CF-EI, in association with OX-S, has never been investigated. Using healthy (16HBE14o-; HBE), CF (CFBE14o-; CFBE), and corrected-wild type CFTR CF (CFBE-wt) bronchial cells, we characterized the inflammation and OX-S profiles in relation to the copper status and CFTR expression and function. We demonstrated that CFBE cells exhibited a CFTR-independent intrinsic inflammation. These cells also exhibited an alteration in mitochondria, UPR (Unfolded Protein Response), catalase, Cu/Zn- and Mn-SOD activities, and an increase in the intracellular content of iron, zinc, and Cu. The increase in Cu concentration was associated with OX-S and inflammatory responses. These data identify cellular Cu as a key factor in the generation of CF-associated OX-S and opens new areas of investigation to better understand CF-associated EI.

Keywords: inflammation; cystic fibrosis; oxidative stress; CFTR; copper; lung

1. Introduction

Cystic fibrosis (CF) is an autosomal recessive disease characterized by viscous mucus [1] and abnormal ion transport across the apical plasma membrane (PM) of the gastrointestinal and the pulmonary epithelia [1]. CF is caused by mutations in the *CFTR* gene that encodes for CF Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) protein, an apical transmembrane cAMP-regulated chloride (Cl⁻) channel [2]. Currently, there are more than 2000 mutations identified in the *CFTR* gene and classified according to their consequences on the CFTR activity, expression, or localization (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>, accessed on 14 January 2021).

The most common CF mutation corresponds to a deletion of a phenylalanine (F) at position 508, F508del-CFTR. This mutation causes an abnormal conformation to F508-del-CFTR, leading to its recognition, retention, and degradation at the endoplasmic reticulum

(ER) compartment [3]. However, even if the gating of the channel is affected by the F508 deletion, the mutated protein retains some functionality as a Cl^- channel [4]. The absence of a functional CFTR at the plasma membrane deregulates ions and water flux, leading to dehydrated secretion, thick mucus, reduced clearance of inhaled particles, including bacteria. This also leads to persistent infection and chronic inflammation, two major causes of the severe morbidity and mortality in CF population [1,5]. The CF airway contains large concentrations of several pro-inflammatory mediators, including tumor necrosis- α (TNF α), interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-8, and IL-17 [5,6]. Importantly, secretion of these inflammatory mediators has been reported to be influenced by alterations in CFTR function [7]. An activation of the pro-inflammatory nuclear factor- κ B (NF- κ B) has also been reported in CF-Knockout mice [8]. The CF airway epithelium is also characterized by a decrease in the secretion of anti-inflammatory mediators, such as IL-10 [9]. Importantly, even in the absence of bacterial or viral pathogens, exacerbated inflammation has been observed in the respiratory tract of CF infants [10–14]. The origin of this inflammation has been a matter of debate and appeared to be the consequence of a hyperactivation of the NF- κ B transcription factor and an ER retention of the CFTR-F508del [15].

Nevertheless, CFTR correction in CF epithelial cells did not reverse the levels of secreted cytokines, suggesting an intrinsic activation of inflammatory processes in these cells [16,17].

The inflammatory response in CF is complex, and involved different stimuli, including oxidative stress (OX-S) [18,19]. OX-S is defined as a disequilibrium in the balance between pro- and anti-oxidative factors [20]. The prominent of the pro-oxidants responses manifests by an increase in the levels of the reactive oxygen species (ROS) [20]. In CF, ROS levels are increased and participate in the injury of the lung by overwhelming endogenous antioxidant defenses [21,22].

The disequilibrium between pro- and anti-oxidant response causes the release of inflammatory mediators that damage the epithelial cell surface, along with an impairment of bacterial clearance [21,22]. The link between CF-associated OX-S and CFTR defects has previously been reported [22]. ER retention of unfolded CFTR-delF508 protein has been associated with the activation of the UPR (Unfolded Protein Response), and ER calcium expansion [23]. Additionally, CFTR dysfunction has been associated with an innate defect in the metabolism of glutathione (GSH), characterized by low GSH levels in the bronchial epithelial liquid [24]. Moreover, low activity of copper-(Cu) and zinc-(Zn) dependent superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD) and mitochondrial dysfunction have been observed in cells with abnormal CFTR expression [25,26]. Importantly, all these systems are sensitive to copper homeostasis. This metal acts as an activator for Cu/Zn-SOD, as a natural substrate for the chelation by GSH, and as an electron source for mitochondrial activity [27]. In addition, copper is also an important trace element for numerous cell functions. However, it becomes toxic when its cellular homeostasis is disrupted. Copper-induced oxidative stress has been documented *in vitro* and *in vivo* [27], yet *in vitro* investigations on metal-induced oxidative stress, in relation to CF inflammation and CFTR expression and activity, have not been conducted in bronchial epithelial cells.

In the present study, we characterized three major processes of the development of the inflammation in CF bronchial cells, namely (i) oxidant and antioxidant statuses in healthy bronchial epithelial (HBE), CF bronchial epithelial (CFBE), and CFBE-wt cells; (ii) the inflammation profiles, and (iii) the role of CFTR and copper in redox balance and inflammation.

We demonstrated that CF bronchial epithelial cells exhibit, (i) elevated levels of ROS and catalase activity, (ii) decreased Cu/Zn- and Mn-SOD activity, and (iii) increased copper, iron, and zinc concentrations. Furthermore, we characterized the relationship between inflammation and the OX-S and unmasked the role of copper in CF-associated inflammatory processes.

2. Material and Methods

2.1. Cell Culture

The experiments were performed using human bronchiolar epithelial cell lines: 16HBE14o- (abbreviated as HBE), expressing wild-type CFTR; CFBE41o-derived from a CF patient (abbreviated as CFBE), homozygous for the $\Delta F508$ mutation ($\Delta F508/\Delta F508$); CFBE-wtCFTR (abbreviated as CFBE-wt), CFBE41o-cells stably transfected with wt-CFTR protein (a generous gift from Dieter Gruenert, University of California at San Francisco, CA, USA). The HBE cells were used in this study because they have the capacity to form monolayer cells that are similar to the bronchial tissue [28].

The cells were grown in Eagle's minimal essential medium (EMEM) (ThermoFisher, France) supplemented with 10% fetal bovine serum (Biowest, France) at 37 °C under 5% CO₂. The cells were grown in plastic dishes coated with an extracellular matrix containing fibronectin, collagen, and bovine serum albumin. Where indicated, cells were treated with a vehicle; with different concentrations of copper sulfate (CuSO₄); of bathocuproine disulphonate (BCS), a copper chelator; or with the CFTR chloride channel inhibitor, CFTRinh-172 [29] for the indicated times. Copper was tested from 50–150 µM. The concentration 100 µM was used in our experiments as it led to a significant increase in the intracellular copper concentration after 24 h, without causing significant harmful effects [28].

2.2. Measurement of the cAMP-Stimulated Iodide Conductance of the Plasma Membrane

The plasma membrane cAMP-dependent halide conductance of tested cells was determined using iodide efflux technique, as previously described [30]. Iodide efflux was initiated by replacing the loading buffer with efflux medium (composed of 136 mM nitrate). The extracellular medium was replaced every minute with the efflux buffer (1 mL). After a steady state was reached, the intracellular cAMP level was raised by agonists (10 µM forskolin, 0.2 mM CTP-cAMP, and 0.2 mM isobutyl-methyl xanthane) to achieve maximal phosphorylation of the CFTR protein. The collection of the efflux medium resumed for an additional 6–9 min. The amount of iodide in each sample was determined with an iodide-selective electrode (Orion), and the cAMP-I efflux peaks were plotted.

2.3. Extraction of Total RNA and Reverse Transcription

Total RNA was extracted from the cells according to the manufacturer's protocol (RNAagents; Promega, Charbonnières-les-Bains, Marnes-la-Coquette, France). An amount of 1 µg of total RNA was reverse transcribed under conditions recommended by the manufacturer (Agilent technologies).

2.4. Quantitative Polymerase Chain Reaction

The level of mRNA of UPR target genes, IRE1, ATF6, PERK, and XBP-1, has been assessed using real-time RT-PCR (Biorad, Marnes-la-Coquette, Charbonnières-les-Bains France). The PCR was performed using the primers shown in Table 1 and SYBR green PCR core reagents according to the manufacturer's instructions (Biorad, Marnes-la-Coquette, Charbonnières-les-Bains, France). PCR conditions were as described previously [31].

The results were normalized to 18S rRNA expression levels [28]. Relative expression was evaluated with $\Delta\Delta CT$ method.

Table 1. Primers used for real-time RT-PCR. FW: Forward, BW: Backward (reverse primer).

Gene	Primer Sequence 5'→3'	Size
PERK	FW: TCTGTTTCAGCTCTGGGTTG TBW: CCGAAGTTCAAAGTGGCCAA	158 bp
XBP-1	FW: TGTCACCCCTCCAGAACATC BW: AAGGGAGGCTGGTAAGGAAC	196 bp
IRE1	FW: AGCAAGAGGACAGGCTCAAT BW: CATCTGAACTTCGGCATGGG	205 pb
ATF6	FW: GTGTCAGAGAACCAGAGGCT BW: GGTGCCTCCTTTGATTGCA	166 bp

2.5. Cells Lysates

For immunoblot and ELISA assays, cells were washed twice with ice-cold phosphate buffer saline (PBS) and lysed at 4 °C for 20 min in PBS containing 1% NP40, 0.5% deoxycholic acid, and 0.1% SDS added with protease inhibitors (10 mM PMSF, 1 µM leupeptin/pepstatin A, and 1 mg/mL of iodoacetamide). Protein concentrations were determined using the Micro BCA protein assay kit (Thermo Scientific, France).

2.6. Electrophoresis and Immunoblotting

Total cell extracts were prepared as described [30]. Protein samples were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. The blots were probed using monoclonal anti-CFTR antibody (1 µg/mL), L12B4 (Millipore, France). Primary antibodies were visualized by horseradish peroxidase-conjugated sheep anti-mouse IgG and ECL detection Kit (Covalab, France). Immunoblotting of Na⁺/K⁺-ATPase α1-subunit was performed with the mouse monoclonal antibody (0.5 µg/mL; α6F, DSHB, University of Iowa).

2.7. Cell Viability Using MTT Test

Cells were cultured in 96-well plates upon confluency. Following the treatments, cells were incubated 4 h in phenol red free medium containing 10% of MTT ([4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; Sigma). The MTT solution was finally replaced by MTT lysis solution (10% Triton X-100 and 0.1 N HCl in anhydrous isopropanol), and the resulting optical density (DO) was determined after measurement of the difference between 570 nm and 690 nm absorbance.

2.8. Intracellular Copper Determination

To evaluate the intracellular copper concentration, cells were collected and stored at room temperature (RT), for at least 48 h, to allow them to completely dry and be used for ICP-AES analysis. Samples were then vacuum-dried and mineralized in 70% nitric acid before analysis. The Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry (ICP-AES) with a Variant, Vista MPX instrument was used. The copper (Cu), iron (Fe), and zinc (Zn) contents were reported in relation to the cells number (nmol/10⁶ cells).

2.9. ROS Measurements

Cells (10⁶ cells/well) were seeded in a 24-well plate and cultured for 24 h. The cells were washed and changed to serum-free media and incubated with 50 µM 5-(and 6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester (H2DCFDA; ThermoFisher, Saclay, Charbonnières-les-Bains, France) for 45 min. The conversion of H2DCFDA to fluorescent DCF was measured using a plate reader Infinite M200 (TECAN, France). DCF fluorescence was measured at λ_{ex}/λ_{em} of 495/527 nm.

2.10. Catalase Enzyme Activity Assays

The catalase activity was determined using a spectrophotometer at 240 nm, by measuring the decomposition of hydrogen peroxide (H₂O₂). The Beers and Sizer method was used [32]. Specific enzyme activity (SA) was expressed as units per mg of protein.

2.11. Cu/Zn- and Mn-Superoxide Dismutase (SOD) Activities

The total SOD activities, including Cu/Zn- and Mn-SOD, was measured according to the method of S. Marklund and G. Marklund based on the inhibition of pyrogallol (1,2,3-trihydroxybenzene, C₆H₆O₃) autoxidation [33]. Absorbance was measured at 420 nm for 5 min. One unit of SOD activity is defined as the amount of enzyme that inhibits the rate of pyrogallol autoxidation by 50%. To determine Mn-SOD activity, the potassium cyanide (KCN) was added to inhibit the Cu/Zn-SOD reaction.

2.12. Glutathione Peroxidase (GPx) Activity

The GPx activity was determined according to the method of Flohe and Gunzler [34]. The reaction is based on the reduction of organic hydroperoxides to alcohols by GPx, along with the oxidation of reduced glutathione (GSH) to oxidized glutathione (GSSG). GSSG is then reduced by glutathione reductase (GR), in the presence of NADPH. The GPx activity in the samples is determined through a follow-up of the decrease in NADPH absorption at 340 nm for 3 min.

2.13. Mitochondrial Isolation

Isolation of mitochondria from cell pellets was achieved using a differential centrifugation procedure [35]. The pellet of bronchial cells was resuspended in 250 µL of mitochondrial isolation buffer (210 mM mannitol, 70 mM sucrose, 5 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) and homogenized with 15 strokes in a Dounce homogenizer (Fisher Scientific, France) on ice. To obtain mitochondria, the homogenate was subjected to differential centrifugation steps as described previously [35].

Mitochondrial purity and efficacy of isolation were assessed by the determination of lactate dehydrogenase (LDH) and glutamate dehydrogenase (GDH) activities.

2.14. GDH and LDH Activities

To assess mitochondrial fraction contamination by cytosolic components, we measured LDH and GDH activities in the mitochondrial and cytosolic fractions [36]. LDH and GDH are two enzymes that are exclusively found in the cytosol and mitochondria, respectively. Before LDH and GDH analyses, the mitochondrial pellets were resuspended in PBS and lysed by the addition of lauryl dimethylamine *N*-oxide to a final concentration of 0.3% (vol/vol). LDH activity in both fractions was determined kinetically by monitoring the loss of NADH at 340 nm for 10 min. GDH activity was determined as previously reported [37]. The assay quantified GDH activity based on the consumption of NADH in the transamination of α -ketoglutarate (oxoglutarate) monitored at 340 nm. Purity and isolation efficiency were expressed as the percentage of the total activity of LDH and GDH in the samples.

2.15. Aconitase and Fumarase Activity Assays

Before the determination of the aconitase activity, freshly isolated mitochondria were suspended in 0.5 mL of buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) and 0.6 mM MnCl₂ and sonicated for 2 s. Aconitase activity was measured using a spectrophotometer by monitoring the formation of *cis*-aconitate from added *iso*-citrate (20 mM) at 240 nm and 25 °C. Fumarase activity was determined by measuring the increase in absorbance at 240 nm at 25 °C in the reaction mixture to which 30 mM potassium phosphate (pH 7.4), and 0.1 mM L-malate were added. Aconitase and fumarase activities were expressed as units per µg of protein.

2.16. Cytokine Secretion by Sandwich ELISA

Interleukins (IL) 1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-17 (A, E, F) and tumor necrosis factor-alpha (TNF α) released into the culture media and present in proteins extract were assayed using a quantitative sandwich enzyme-linked immunoassay kit (R&D Systems). According to the manufacturer, the sensitivity of this assay system is less than 10 pg/mL.

For ELISA assays used of this study, very low auto-fluorescence was detected in the absence of any treatment. The value of this auto-fluorescence was systematically subtracted from the experimental values.

2.17. Statistical Analysis

Differences between mean values were compared by Student's unpaired two-tailed *t*-tests using SigmaStat (Jandel Scientific Software, SanRafael, CA, USA). Data are expressed as mean \pm SEM, unless otherwise indicated. Significance was set at a two-tailed *p* value of 0.05.

3. Results

3.1. Bronchial Epithelial ROS Production Is Independent of CFTR Expression and Function

CF airway epithelial cells and neutrophils exhibit constitutive oxygen-derived reactive oxygen species (ROS) generation that leads to irreversible lung damage [38,39]. However, the role of CFTR in bronchial epithelial ROS generation is still not clear. Using the well-characterized transformed healthy (HBE) and CF (CFBE) bronchial epithelial cells, we determined the role of CFTR in ROS production.

First, we characterized the CFTR expression and function in the bronchial epithelial cell model. Using Western blot analysis (Figure 1A) and image J quantification (Figure S1A), we detected CFTR protein in HBE, CFBE, and CFBE-wt protein extracts. The analysis showed the presence of the complex- (black arrow) and the core- (white arrow) glycosylated forms. Our results also confirmed the presence of the complex-glycosylated CFTR in CFBE-wt cells resulting from the stable expression of wt-CFTR (Figure 1A). Compared to HBE and CFBE-wt cells, the CFBE express only the core-glycosylated form (Figure 1A, white arrow). Functional assays confirmed the presence of CFTR at the plasma membrane of HBE and CFBE-wt cells (Figure 1B). CFTR Cl⁻ activity, measured using cAMP-activated I efflux, was inhibited in both cell lines in the presence of CFTR-inh-172 (inh-172), a potent and very specific inhibitor of CFTR Cl⁻ channel [29] (Figure 1B).

To further analyze the relationship between ROS production, CFTR expression, and CFTR Cl⁻ function, the intracellular ROS variations were monitored. Using a ROS-sensitive fluorescent probe (H2DCFDA), we observed that the intracellular levels of ROS were higher (~two fold) in CFBE cells compared to HBE (Figure 1C). Correction upon the expression of wt-CFTR (CFBE-wt) did not attenuate the level of ROS in CFBE cells (Figure 1C). In addition, the inhibition of the CFTR Cl⁻ activity, using the CFTRinh-172 (inh-172) did not affect ROS levels neither in HBE nor in CFBE-wt cells (Figure 1D), suggesting that CFTR channel's activity is not involved in ROS production.

Our results showed that ROS levels in CFBE cells are not influenced by the expression or the activation of CFTR Cl⁻ channel. These observations also suggested that CFTR-independent mechanisms might participate in the CF-associated oxidative stress (OX-S).

To better evaluate the OX-S in CFBE compared to HBE and CFBE-wt cells, we assessed various causes that have been associated with cell OX-S, including ER stress, mitochondria metabolism, antioxidant enzymes activities, and deregulations in the status of essential trace elements such as copper (Cu), iron (Fe), and zinc (Zn), [24–27].

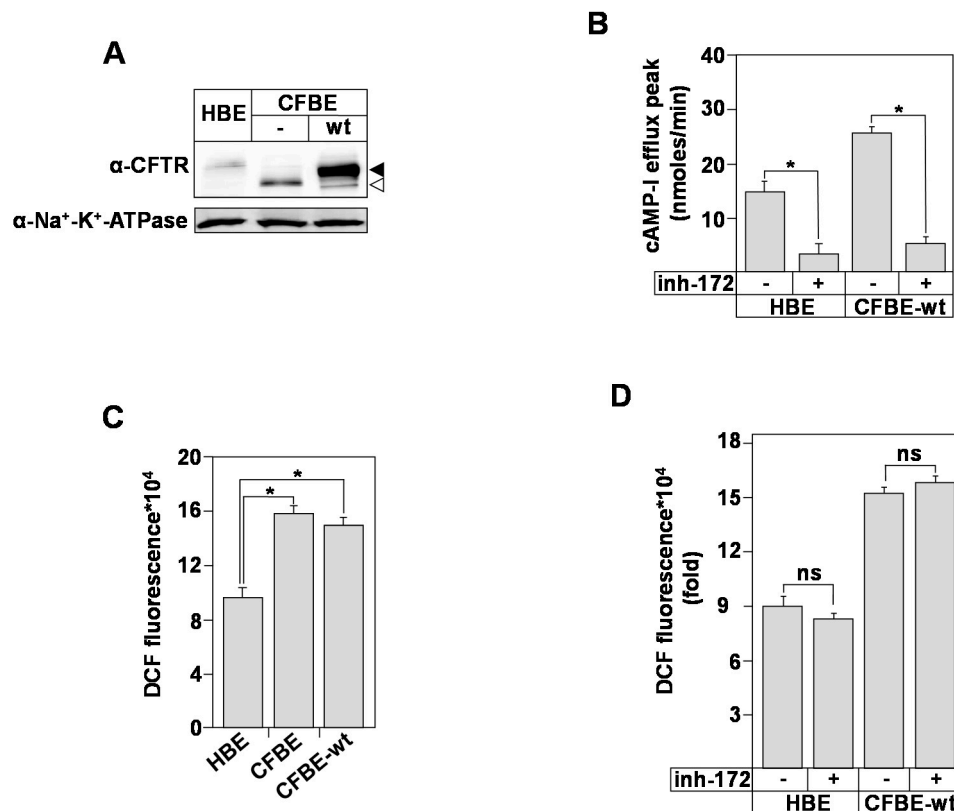


Figure 1. Characterization of CF Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) expression and reactive oxygen species (ROS) production. (A) Expression of CFTR protein normalized to Na⁺/K⁺-ATPase in human bronchial epithelial cells; control (healthy bronchial epithelial) (HBE), cystic fibrosis (CFBE), and CFBE stably transfected with wild (wt) type CFTR (CFBE-wt). Black arrow corresponds to fully glycosylated mature CFTR form (band C). White arrow corresponds to core-glycosylated CFTR (band B). (B) Iodide efflux used as a functional assay to determine the activity of CFTR chloride channel in HBE, CFBE, and CFBE-wt cells, in the absence or presence of 10 μ M of inh-172. (C) Measurement of ROS concentration in HBE, CFBE, and CFBE-wt cells using dichlorodihydrofluorescein (DCF) fluorescent probe. Cells were incubated with 50 μ M dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester (H2DCFDA) for 45 min. The conversion of H2DCFDA to fluorescent DCF was measured at $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ of 495/527 nm. (D) Measurement of ROS concentration in HBE and CFBE-wt, in the absence or presence of inh-172 using the DCF fluorescent probe. Values with an asterisk are significantly different from their corresponding controls ($p < 0.05$). ns: nonspecific. Data are expressed as mean \pm SEM ($n = 6$).

3.2. Antioxidants Enzymes Activities in the Bronchial Epithelial Cells

First, we measured the activities of the cytosolic superoxide dismutases (SOD) Cu/Zn form (Cu/Zn-SOD) and the mitochondrial SOD manganese form (Mn-SOD).

Both enzymes are the first line of defense against the deleterious effects of ROS [33]. Our results demonstrate that both activities are decreased in CFBE compared to HBE cells (Figure 2A,B). Interestingly, the stable expression of wt-CFTR in CFBE cells did not correct this defect, suggesting that both activities are independent from CFTR expression. Because SOD activity scavenges superoxide anions (O_2^-) and converts them to hydrogen peroxide (H_2O_2) [32,40], a molecule that is transformed by the catalase and glutathione peroxidase (GPx) enzymes, we measured the activity of both enzymes in our cell model.

The catalase activity was almost two-fold higher in CFBE compared to HBE cells, confirming the over-production of CF-associated ROS (Figure 2C). However, the catalase activity did not decrease following the correction by wt-CFTR protein (Figure 2C). No change in GPx activity was depicted in CFBE cells compared to HBE and CFBE-wt (Figure 2D), suggesting a limited role of GPx in CF-associated OX-S.

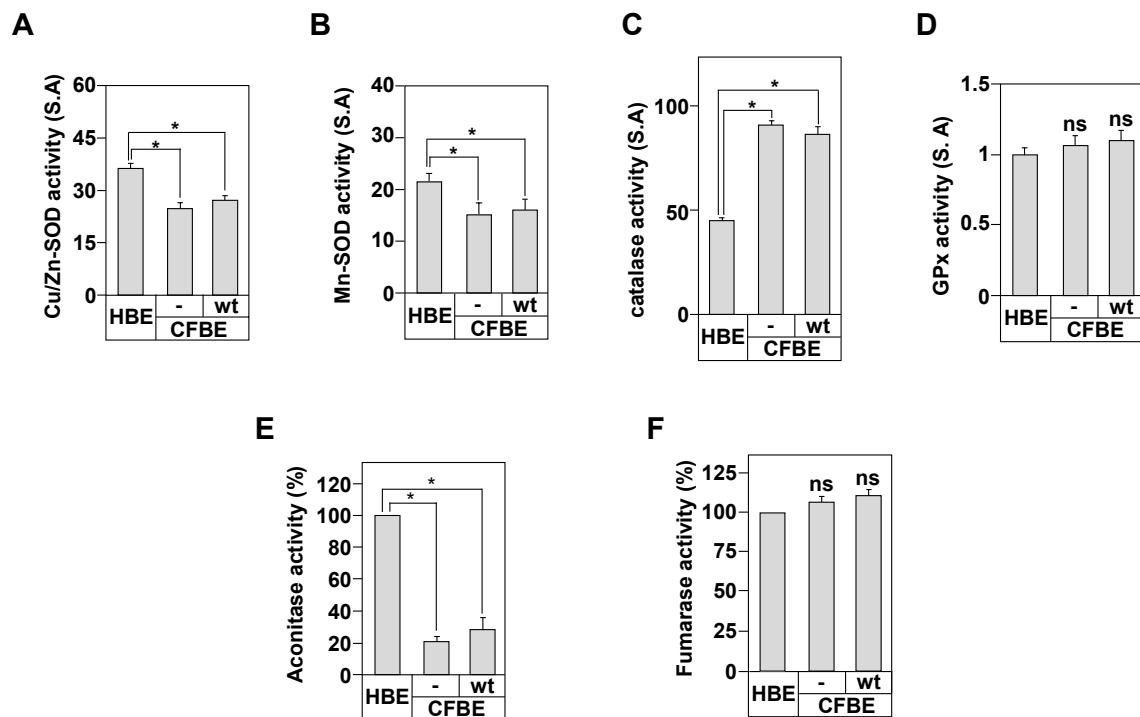


Figure 2. Characterization of the oxidant/antioxidant system in CF bronchial cells. Cu/Zn-SOD (A), Mn-SOD (B), catalase (C), glutathione superoxydase (GPx) (D), aconitase (E), and fumarase (F) activities were measured in HBE, CFBE, and CFBE-wt cells as described in Materials and Methods. One unit of the total SOD activity was defined as the amount of enzyme that inhibits the rate of pyrogallol autoxidation by 50%. The absorbance was measured at 420 nm for 5 min. Catalase activity was determined at 240 nm by measuring the decomposition of hydrogen peroxide (H₂O₂). GPx activity in the samples was determined by monitoring the decrease in NADPH absorption at 340 nm for 3 min. Aconitase activity was measured by monitoring the formation of cis-aconitate upon addition of iso-citrate (20 mM), at 240 nm and 25 °C. Fumarase activity was determined by measuring the increase in the absorbance at 240 nm at 25 °C. Values with an asterisk are significantly different from their corresponding controls ($p < 0.05$). Data are expressed as mean \pm SE ($n = 6$).

3.3. In Vitro Markers of Mitochondrial Oxidative Stress

Mitochondria are the primary site of H₂O₂ generation by aerobic metabolism [40]. At the mitochondrial level, the Mn-SOD is responsible of the elimination of H₂O₂ generated by the electron transport chain, which protects the mitochondria from oxidative damage [40].

Because the activity of Mn-SOD was reduced in CFBE cells (Figure 2B), we determined the mitochondria function in the context of CF disease and in relation to CFTR protein.

First, we determined the purity of our mitochondrial fraction prepared from HBE, CFBE, and CFBE-wt cells by measuring LDH and GDH activities, indicators of the cytosol contamination and mitochondrial enrichment, respectively [35]. We could recover up to $\sim 85.7 \pm 2.5\%$ of the total GDH activity detected in HBE, CFBE, and CFBE-wt homogenates (Figure S1B). The remaining activity was present in the cytosolic fraction. For LDH, only $\sim 5.7 \pm 0.8\%$ of the total activity was detected in the mitochondrial fractions (Figure S1C). These results indicate that the mitochondrial fractions are relatively free of cytosolic contamination. The mitochondrial fraction was then used to measure the oxidative stress through the assessment of the activity of two enzymes, the aconitase that is inactivated by oxidant molecules and fumarase, an enzyme that is unaffected by such stimuli [35]. Our results show that mitochondria from CFBE cells exhibited 80% lower aconitase activity compared to HBE cells (Figure 2E). The loss of aconitase activity in CFBE cells was independent of CFTR expression since similar loss in CFBE-wt cells was observed (Figure 2E). Mitochondrial fumarase activity in CFBE, CFBE-wt, and HBE cells was unchanged (Figure 2F).

These results support the conclusion that CF bronchial epithelial cells have an intrinsic OX-S that appears to be independent from the CFTR expression and function.

3.4. In Vitro Indicators of Endoplasmic Reticulum (ER) Stress

ER stress and UPR (Unfolded Protein Response) activation are central to the stimulation of cellular inflammation [41,42]. Yet, the relationship between CFTR expression in bronchial cells and ROS production is unknown.

UPR is mediated by the activation of three ER transmembrane stress sensors: IRE1 (inositol-requiring transmembrane kinase/endonuclease-1); PERK (PKR-like ER kinase); and ATF6 (activating transcription factor) [41,42]. We compared the levels of expression of IRE1, PERK, ATF6, and XBP-1 (X-box binding protein 1). The latter is a transcription factor that regulates the expression of genes important for the cellular inflammation and stress responses [42]. Figure 3A,D show that the levels of the three proteins were significantly elevated in CFBE cells compared to HBE.

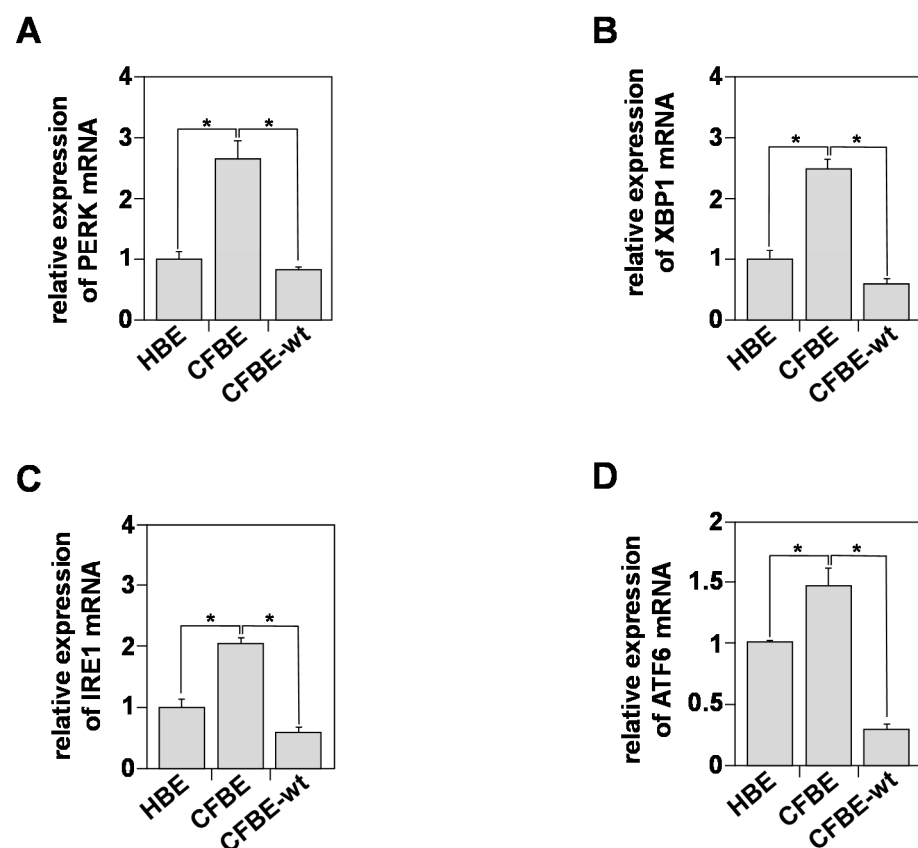


Figure 3. Unfolded Protein Response (UPR) characterization in healthy and CF bronchial cells. Relative mRNAs expression of PERK (A), XBP1 (B), IRE1 (C), and ATF6 (D) in HBE, CFBE, and CFBE-wt cells using real-time RT-qPCR. 18S rRNA expression was used as an internal control. Values overwritten with stars are significantly different from the control ($p < 0.05$). Data are expressed as mean \pm SE ($n = 6$).

The levels of PERK (Figure 3A), XBP-1 (Figure 3B), IRE1 (Figure 3C), and ATF6 (Figure 3D) were ~2.5, ~2.3, ~2, and ~0.5 fold higher in CFBE compared to HBE cells, respectively. These results demonstrate the presence of an intrinsic UPR activation process in CFBE cells that is independent of exogenous stimuli, such as infection or inflammation. Interestingly, restoring plasma membrane CFTR expression and Cl^- secretion reversed the activation of UPR, suggesting a relationship between CFTR and UPR in bronchial epithelial cells.

3.5. Inflammatory Profile of Healthy and CF Bronchial Epithelial Cells

Because exacerbated ROS production in CFBE cells (Figure 1C) may activate various signaling pathways that increase the production and secretion of pro-inflammatory cytokines, in the absence of any bacterial or viral infections, we analyzed the steady state inflammatory profiles of healthy (HBE) and CF (CFBE) bronchial epithelial cells. Using ELISA assays, we evaluated both the production (C; for cell) and secretion (M; for medium) of the pro- (IL-1 β , IL-8, IL-6, IL-17A, IL-17F, IL-17E, TNF α) and the anti-inflammatory (IL-10) cytokines. All these cytokines were reported to be deregulated in CF, particularly in the bronchoalveolar lavages (BAL), fluids collected from CF patients [17]. Compared to HBE, the CFBE cells showed a significant increase in the production and the secretion of IL-1 β , IL-6, IL-17A, IL-17F, and IL-17E (Figure 4A–E). However, compared to HBE cells, CFBE exhibited a significant decrease in IL-8 secretion despite its capacity to produce it at high levels (Figure 4F). These results suggest that the CFBE cells may have a defective secretion/exocytosis system linked to the delF508 mutation.

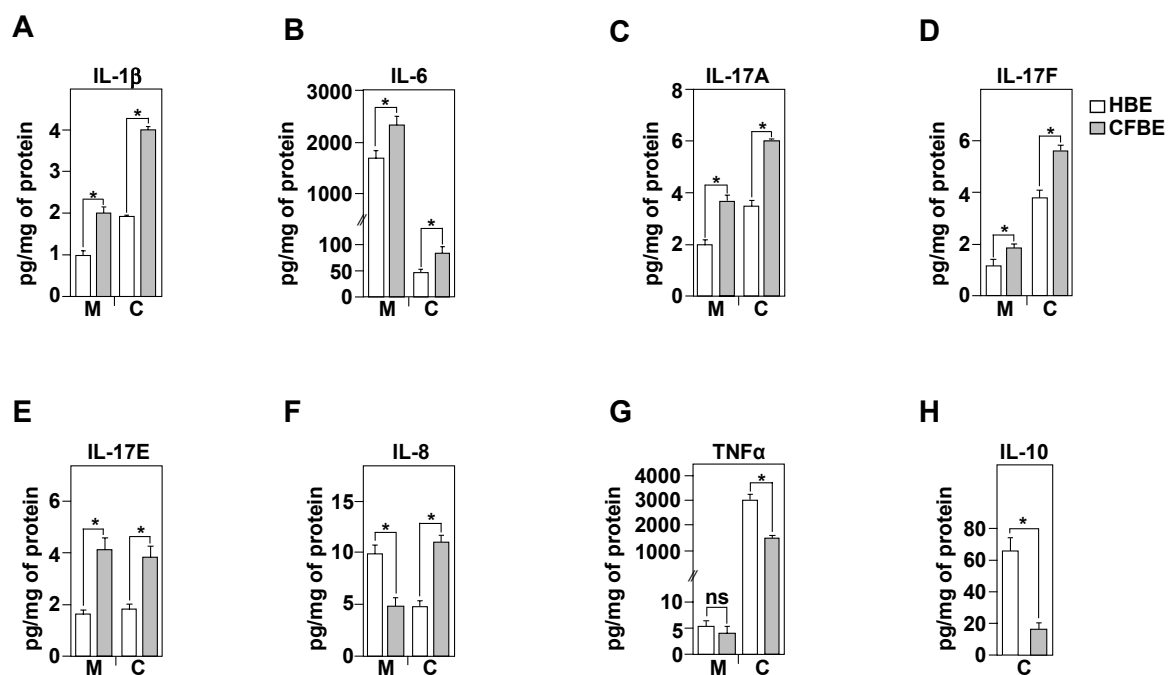


Figure 4. Evaluation of inflammatory profile in healthy and CF bronchial cells. Measurements of IL-1 β (A), IL-6 (B), IL-17A (C), IL-17F (D), IL-17E (E), IL-8 (F), TNF α (G), and IL-10 (H), released in the culture media (M), or present in protein extracts (C). The cytokines were assayed using a quantitative sandwich enzyme-linked immunoassay (ELISA) in HBE (white charts) and CFBE (black charts). Concentrations are in pg/mg of extracted proteins. Values overwritten with asterisk are different from the control ($p < 0.05$). Data are expressed as mean \pm SE ($n = 6$).

Compared to HBE cells, our results also demonstrate a significant decrease in the production of the TNF α in CFBE cells, while its levels of secretion remained unchanged (Figure 4G). Finally, no IL-10 secretion was detected in the culture medium. This was not due to a limitation in the detection as we could measure this cytokine within the cells at value around 10 pg/mL in CFBE and ~63 pg/mg of protein in HBE cells (Figure 4H).

3.6. IL-8 Secretion Is Associated with CFTR Function

The data regarding the role of CFTR function in the control of the inflammatory profile of CF lung epithelial cells is very conflicting and depends on the protocol, on the cell types used, and on culture conditions [17]. In our study, we used HBE cells known for their ability to develop a highly polarized cell layer. To determine the effect of CFTR inhibition on the secretion of pro-inflammatory cytokines, HBE cells were treated with CFTRinh-172 (Figure 5). We first tested the effect of the drugs on the cell viability, since CFTRinh-172 was reported to disturb the mitochondrial function in HELA cells [43]. Dose- and time-dependent experiments are reported (Figure S2). The summary of these results is reported on Figure 5A. Compared to untreated HBE cells, even 100 μM of CFTRinh-172 was without effect on cell viability, excluding any apoptotic effect of this molecule (Figure 5A). The inflammatory profile was therefore evaluated, in the absence and in the presence of CFTRinh-172. The results show that a treatment for 24 h did not affect the levels of secretion of IL-1 β , IL-6, IL-17F, and TNF α (Figure 5B–E). However, the secretion of the pro-inflammatory cytokine, IL-8, was significantly increased from 9.7 ± 0.2 (control) to 13.3 ± 0.4 pg/mg of protein (Figure 5F).

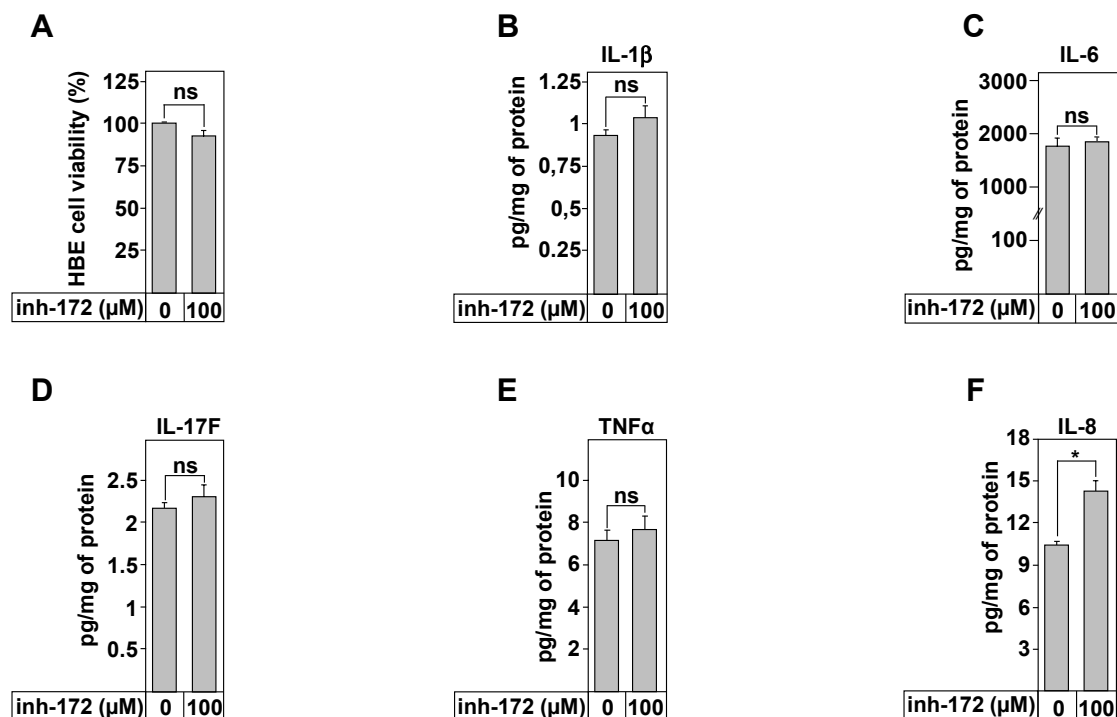


Figure 5. Effect of CFTR inhibition on cytokines secretion in HBE cells. (A) Evaluation of HBE viability using MTT assays following 24 h incubation with 100 μM of inh-172, a CFTR chloride channel inhibitor. ELISA tests were used to measure IL-1 β (B), IL-6 (C), IL-17F (D), TNF α (E), and IL-8 (F) secretion in the culture media of HBE cells treated during 24 h with 100 μM of inh-172. Values overwritten with stars are significantly different from the control ($p < 0.05$). Data are expressed as mean \pm SE ($n = 6$).

3.7. Homeostasis of Bioactive Trace Metals Is Dysregulated in CF Bronchial Epithelial Cells

In addition to UPR and mitochondria dysfunction, intracellular biometals, such as zinc (Zn), copper (Cu), and iron (Fe), may contribute to cellular ROS production [44]. Increased metal levels may undergo a Fenton reaction and form highly toxic hydroxyl radicals ($\bullet\text{OH}$) that induce an OX-S [44]. To compare the intracellular concentration of Cu, Zn, and Fe in HBE, CFBE, and CFBE-wt cells, we used the ICP-AES analysis. Hepatocyte cell line HepG2 was used as a positive control to validate the measurement, as these cells are known to participate in metal detoxification [45]. Compared to HBE cells, the intracellular

concentrations of Cu (Figure 6A), Fe (Figure 6B), and Zn (Figure 6C) were significantly increased. The introduction of wt-CFTR did not correct the biometals deregulation in CFBE cells (Figure 6A–C), suggesting that other mechanisms or other proteins might be involved in the CF trace elements dyshomeostasis.

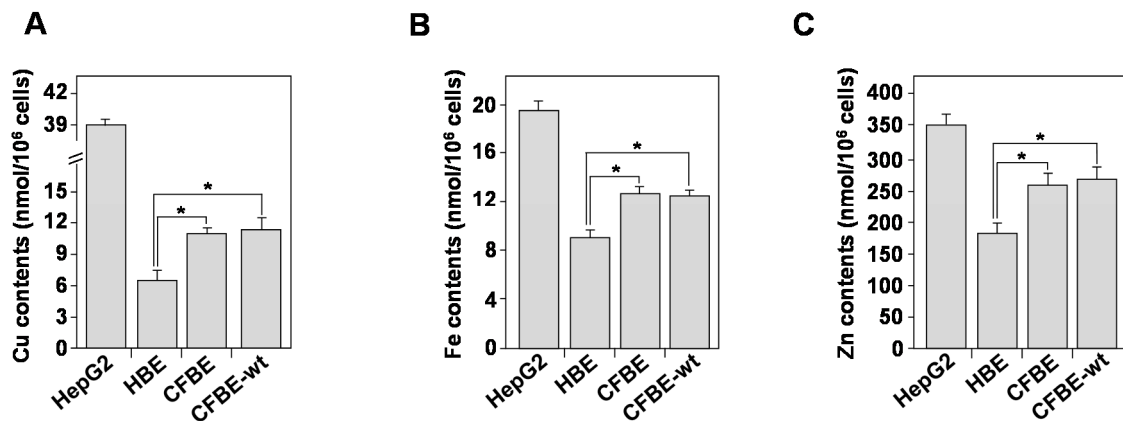


Figure 6. Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry (ICP-AES) determination of biometals concentrations in healthy and CF bronchial cells. (A) Copper (Cu), (B) Iron (Fe), and (C) Zinc (Zn) content was assessed in HBE, CFBE, and CFBE-wt cells. For the control, the hepatocyte cell line (HepG2) was used as a positive control. Values overwritten with stars are significantly different from the control ($p < 0.05$). Data are expressed as mean \pm SE ($n = 6$).

The increase in the intracellular concentration of Cu, Fe, and Zn in CFBE cells may be the consequence of the retention of CFTR-dF508 in the ER compartment. To verify this hypothesis, we measured the intracellular concentration of these elements in BHK (baby hamster kidney) and BHK cells overexpressing CFTR-dF508 (BHK-dF). Figure S3 shows that CFTR-dF508 did not affect the intracellular levels of Cu, Fe, and Zn. Additionally, the overexpression of wild type CFTR in CF-IB3 cells to generate SF9-cell line did not affect the levels of these elements (Figure S3).

3.8. Effect of Copper Treatment on Healthy and CF Inflammation Responses

The above results demonstrated that numerous processes that are linked to copper homeostasis were deregulated in CF cells; these include decreased Cu/Zn- and Mn-SOD activities, deregulated mitochondrial activity, and increased intracellular Cu contents. Additionally, previous data showed decreased cytoplasmic and mitochondrial concentration of glutathione, a potent Cu chelator in CF lung epithelial cells [21]. Based on these findings, we hypothesized that Cu is a biometal that may play a critical role in CF, particularly in relation to OX-S and inflammation.

To verify this hypothesis, we incubated HBE cells for 24 h in the presence of copper. First, we showed that copper treatment increased intracellular copper concentration (data not shown, [28]). We then measured ROS production following copper treatment. Figure 7A shows that incubation with Cu increased ROS production in a dose-dependent manner. This finding suggests that elevated extracellular copper levels, as reported in BAL of CF patients [46], may induce OX-S, one of the triggers of local inflammation.

We then determined the inflammatory responses of HBE cells, in the absence or presence of copper (100 μ M). Figure 7B,C show that copper treatment increased IL-6 and IL-8 secretion and IL-10 production (Figure 7E). Secretion of TNF α was significantly decreased (Figure 7D) and no change was observed in the levels of IL-1 β and IL-17 inflammatory cytokines (Figure S4). These data strongly suggest that copper is involved in OX-S-mediated inflammation in CF cells.

Previous data from our group demonstrated that lower concentrations of intracellular copper in trophoblast cells also increased ROS production [31]. To test this hypothesis in lung cells, we treated HBE cells with the specific extracellular copper chelator,

bathocuproine sulphonate (BCS), and determined their viability; the levels of intracellular copper concentration; and ROS production and the levels of secreted cytokines.

No changes in these parameters were observed, Figures S5 and S6, suggesting that the chelation of the extracellular copper using BCS does not influence the intracellular copper concentrations, most of which is in a bounded form.

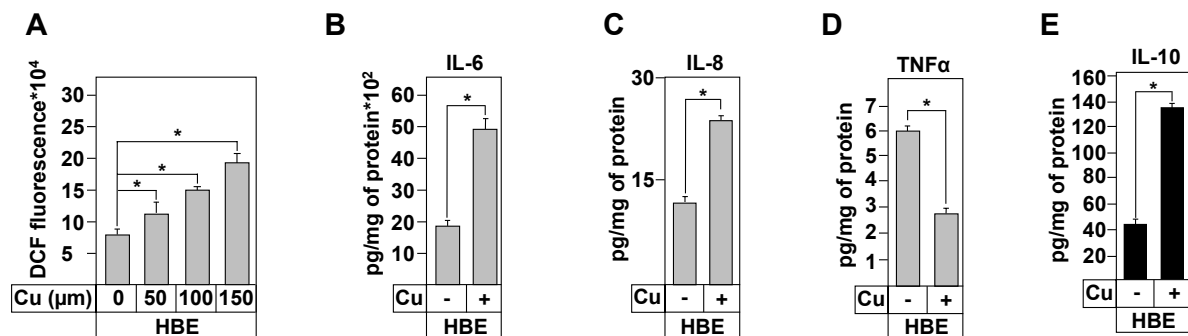


Figure 7. Effect of copper treatment on the inflammation profile of healthy and CF bronchial cells. (A) Measurement of ROS levels in HBE cells following treatment with the indicated copper (Cu^{2+}) concentrations. Cells were incubated with 50 μM H2DCFDA for 45 min. The conversion of H2DCFDA to fluorescent DCF was measured at $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ of 495/527 nm. Measurement of IL-6 (B), IL-8 (C), TNF α (D), and IL-10 (E) concentrations in the culture media (grey chart) and in protein extracts (black chart) of HBE cells after treatment with 100 μM of Cu, during 24 h. Cytokine levels were assayed using ELISA tests. Concentrations are in pg/mg of protein extracts. Values overwritten with stars are significantly different from the control ($p < 0.05$). Data are expressed as mean \pm SE ($n = 6$).

4. Discussion

In the present study, we demonstrate that bronchial epithelial cells homozygous for the delF508 mutation exhibit a constitutive secretion of pro-inflammatory cytokines and an intrinsic oxidative stress response. These two processes were evaluated in the absence of bacterial infection, a process thought to be the earliest step in CF development [10–12]. While the study was based on in vitro findings that mainly used the HBE cell model, it allowed advancing our understanding on the CF disease. In fact, this cell type represents the first line of defense against the external infections [47] and has the advantage of developing a highly polarized cell layer compared to other previously used cell lines [28]. ROS production in CF cells was independent of CFTR mutation, expression, or function, confirming previously reported data that used other cellular models [48,49]. Our results also demonstrate the decrease in the antioxidant response that was not corrected by the expression of CFTR-wt protein.

For the first time, we demonstrate that the activity of Mn-SOD, an important enzyme of mitochondrial function, was decreased in CF bronchial cells in a CFTR-independent manner. This result is in line with the decrease in the aconitase activity, an enzyme associated with mitochondrial function, suggesting that the local production of H_2O_2 may not be eliminated by Mn-SOD, which may contribute in the long-term accumulation of the intracellular ROS in CF cells.

Another parameter involved in the production of ROS is the UPR system [50]. We demonstrated that the UPR activity is detected in CF bronchial epithelial cells in a CFTR-dependent manner. This finding is in line with previously published studies, showing that correction of CFTR-delF508 trafficking decreased UPR activation [51].

We also provided evidences that the OX-S is responsible for the inflammation responses that characterize CFBE cells. However, some discrepancies were observed for IL-8, as these cells only produced IL-8 but could not secrete this cytokine. This lack of secretion has also been observed in other studies using primary culture models [52]. Importantly, IL-8 was increased upon the inhibition of CFTR, suggesting a potential side effect of the inh-172 molecule as previously observed in Hela and IB3 cells [43]. The most intriguing

result was the loss of the production and secretion of the anti-inflammatory cytokine IL-10 by CFBE cells, suggesting that other processes may be involved in the bronchial intrinsic CF inflammatory responses.

In addition to UPR and mitochondria dysfunction, intracellular biometals such as zinc (Zn), copper (Cu), and iron (Fe) may undergo a Fenton reaction that contributes to cellular ROS production [44]. For the first time, we demonstrate that CF cells exhibit high intracellular concentrations of copper, iron, and zinc that were independent from CFTR.

The existence of such deregulations was also documented in the BAL of CF patients [53]. However, the underlying mechanisms are still to be demonstrated. Because the CF OX-S has been associated with alterations in oxidant/antioxidant actors [25,26], which are mainly related to copper for their activities, [27,46], we only focused on copper effect on the inflammation responses. Upon copper treatment, only pro-inflammatory cytokines secretion was disturbed, suggesting that copper deregulations in CF patients might trigger the inflammatory responses through the activation of OX-S. Nevertheless, a link between the cupric status in CF and the activation of the master regulator of the pro-inflammatory cytokines [13], the NF κ B, is still missing.

The link between copper and inflammation and the correlation between oxidative stress and ROS production provide strong evidence that support the idea that ROS production by the CFBE cells may contribute to the activation of inflammatory process.

This work uncovers the intrinsic inflammatory and oxidative stress responses that are activated at the onset of the CF disease, in the absence of any infection and/or pro-inflammatory stimuli. The identification of cellular copper as a key factor in the generation of CF-associated OX-S opens new areas of investigation to better understand CF-associated early inflammation.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/2227-9059/9/4/329/s1>.

Author Contributions: Conceptualization: N.A. and M.B.; methodology: A.K., J.C., K.G., L.M., P.C., and P.R.; validation: M.B.; formal analysis: A.K., I.M.-S., and M.B.; investigation: A.K. and M.B.; writing—original draft preparation, A.K.; editing: N.A. and M.B.; supervision: N.A. and M.B.; funding acquisition: M.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Financial support: We acknowledge the following sources of fundings: Vaincre la mucoviscidose (VLM), ABCF Foundation, University Grenoble-Alpes (AGIR program), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM). Ms Amal Kouadri was supported by AGIR program, Ms Johanna Cormenier was supported by VLM, and Mr Kevin Gemy was supported by la Ligue Contre le Cancer.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data available in a publicly accessible repository.

Acknowledgments: We would like to thank the LCBM members for their assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Boucher, R.C. An overview of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54*, 1359–1371. [[CrossRef](#)]
2. Riordan, J.R.; Chang, X.B. CFTR, a channel with the structure of a transporter. *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1101*, 221–222. [[CrossRef](#)]
3. Lukacs, G.L.; Mohamed, A.; Kartner, N.; Chang, X.B.; Riordan, J.R.; Grinstein, S. Conformational maturation of CFTR but not its mutant counterpart (delta F508) occurs in the endoplasmic reticulum and requires ATP. *EMBO J.* **1994**, *13*, 6076–6086. [[CrossRef](#)]
4. Sharma, M.; Pampinella, F.; Nemes, C.; Benharouga, M.; So, J.; Du, K.; Bache, K.G.; Papsin, B.; Zerangue, N.; Stenmark, H.; et al. Misfolding diverts CFTR from recycling to degradation: Quality control at early endosomes. *J. Cell. Biol.* **2004**, *164*, 923–933. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Heijerman, H. Infection and inflammation in cystic fibrosis: A short review. *J. Cyst. Fibros.* **2005**, *4* (Suppl. 2), 3–5. [[CrossRef](#)]

6. Kube, D.; Sontich, U.; Fletcher, D.; Davis, P.B. Proinflammatory cytokine responses to *P. aeruginosa* infection in human airway epithelial cell lines. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2001**, *280*, L493–L502. [[CrossRef](#)]
7. Perez, A.; Issler, A.C.; Cotton, C.U.; Kelley, T.J.; Verkman, A.S.; Davis, P.B. CFTR inhibition mimics the cystic fibrosis inflammatory profile. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2007**, *292*, L383–L395. [[CrossRef](#)]
8. Saadane, A.; Soltys, J.; Berger, M. Role of IL-10 deficiency in excessive nuclear factor-kappaB activation and lung inflammation in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator knockout mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2005**, *115*, 405–411. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Tabary, O.; Escotte, S.; Couetil, J.P.; Hubert, D.; Dusser, D.; Puchelle, E.; Jacquot, J. High susceptibility for cystic fibrosis human airway gland cells to produce IL-8 through the I kappa B kinase alpha pathway in response to extracellular NaCl content. *J. Immunol.* **2000**, *164*, 3377–3384. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Muhlebach, M.S.; Stewart, P.W.; Leigh, M.W.; Noah, T.L. Quantitation of inflammatory responses to bacteria in young cystic fibrosis and control patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **1999**, *160*, 186–191. [[CrossRef](#)]
11. Dakin, C.J.; Numa, A.H.; Wang, H.; Morton, J.R.; Vertzyas, C.C.; Henry, R.L. Inflammation, infection, and pulmonary function in infants and young children with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2002**, *165*, 904–910. [[CrossRef](#)]
12. Bergoin, C.; Gosset, P.; Lamblin, C.; Bolard, F.; Turck, D.; Tonnel, A.B.; Wallaert, B. Cell and cytokine profile in nasal secretions in cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* **2002**, *1*, 110–115. [[CrossRef](#)]
13. Venkatakrishnan, A.; Stecenko, A.A.; King, G.; Blackwell, T.R.; Brigham, K.L.; Christman, J.W.; Blackwell, T.S. Exaggerated activation of nuclear factor-kappaB and altered IkappaB-beta processing in cystic fibrosis bronchial epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **2000**, *23*, 396–403. [[CrossRef](#)]
14. Escotte, S.; Tabary, O.; Dusser, D.; Majer-Teboul, C.; Puchelle, E.; Jacquot, J. Fluticasone reduces IL-6 and IL-8 production of cystic fibrosis bronchial epithelial cells via IKK-beta kinase pathway. *Eur. Respir. J.* **2003**, *21*, 574–581. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Rottner, M.; Freyssinet, J.M.; Martinez, M.C. Mechanisms of the noxious inflammatory cycle in cystic fibrosis. *Respir. Res.* **2009**, *10*, 23. [[CrossRef](#)]
16. Tabary, O.; Boncoeur, E.; de Martin, R.; Pepperkok, R.; Clement, A.; Schultz, C.; Jacquot, J. Calcium-dependent regulation of NF-(kappa)B activation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Cell. Signal.* **2006**, *18*, 652–660. [[CrossRef](#)]
17. Courtney, J.M.; Ennis, M.; Elborn, J.S. Cytokines and inflammatory mediators in cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* **2004**, *3*, 223–231. [[CrossRef](#)]
18. van der Vliet, A.; Eiserich, J.P.; Marelich, G.P.; Halliwell, B.; Cross, C.E. Oxidative stress in cystic fibrosis: Does it occur and does it matter? *Adv. Pharmacol.* **1997**, *38*, 491–513. [[CrossRef](#)]
19. Brown, R.K.; Kelly, F.J. Evidence for increased oxidative damage in patients with cystic fibrosis. *Pediatr. Res.* **1994**, *36*, 487–493. [[CrossRef](#)]
20. Haleng, J.; Pincemail, J.; Defraigne, J.O.; Charlier, C.; Chapelle, J.P. Oxidative stress. *Rev. Med. Liege* **2007**, *62*, 628–638.
21. Galli, F.; Battistoni, A.; Gambari, R.; Pompella, A.; Bragonzi, A.; Pilolli, F.; Iuliano, L.; Piroddi, M.; Dehecchi, M.C.; Cabrini, G.; et al. Oxidative stress and antioxidant therapy in cystic fibrosis. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1822*, 690–713. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Cantin, A.M.; White, T.B.; Cross, C.E.; Forman, H.J.; Sokol, R.J.; Borowitz, D. Antioxidants in cystic fibrosis. Conclusions from the CF antioxidant workshop, Bethesda, Maryland, November 11–12, 2003. *Free Radic. Biol. Med.* **2007**, *42*, 15–31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Ribeiro, C.M.; Lubamba, B.A. Role of IRE1alpha/XBP-1 in Cystic Fibrosis Airway Inflammation. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 118. [[CrossRef](#)]
24. Day, B.J.; van Heeckeren, A.M.; Min, E.; Velsor, L.W. Role for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein in a glutathione response to bronchopulmonary pseudomonas infection. *Infect. Immun.* **2004**, *72*, 2045–2051. [[CrossRef](#)]
25. Back, E.I.; Frindt, C.; Nohr, D.; Frank, J.; Ziebach, R.; Stern, M.; Ranke, M.; Biesalski, H.K. Antioxidant deficiency in cystic fibrosis: When is the right time to take action? *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, *80*, 374–384. [[CrossRef](#)]
26. Velsor, L.W.; Kariya, C.; Kachadourian, R.; Day, B.J. Mitochondrial oxidative stress in the lungs of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein mutant mice. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **2006**, *35*, 579–586. [[CrossRef](#)]
27. Valko, M.; Jomova, K.; Rhodes, C.J.; Kuca, K.; Musilek, K. Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Arch. Toxicol.* **2016**, *90*, 1–37. [[CrossRef](#)]
28. Kouadri, A.; El Khatib, M.; Cormenier, J.; Chauvet, S.; Zeinyeh, W.; El Khoury, M.; Macari, L.; Richaud, P.; Coraux, C.; Michaud-Soret, I.; et al. Involvement of the Prion Protein in the Protection of the Human Bronchial Epithelial Barrier against Oxidative Stress. *Antioxid. Redox Signal.* **2019**, *31*, 59–74. [[CrossRef](#)]
29. Ma, T.; Thiagarajah, J.R.; Yang, H.; Sonawane, N.D.; Folli, C.; Galletta, L.J.; Verkman, A.S. Thiazolidinone CFTR inhibitor identified by high-throughput screening blocks cholera toxin-induced intestinal fluid secretion. *J. Clin. Investig.* **2002**, *110*, 1651–1658. [[CrossRef](#)]
30. Benharouga, M.; Haardt, M.; Kartner, N.; Lukacs, G.L. COOH-terminal truncations promote proteasome-dependent degradation of mature cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from post-Golgi compartments. *J. Cell. Biol.* **2001**, *153*, 957–970. [[CrossRef](#)]
31. Alfaidy, N.; Chauvet, S.; Donadio-Andrei, S.; Salomon, A.; Saoudi, Y.; Richaud, P.; Aude-Garcia, C.; Hoffmann, P.; Andrieux, A.; Moulis, J.M.; et al. Prion protein expression and functional importance in developmental angiogenesis: Role in oxidative stress and copper homeostasis. *Antioxid. Redox Signal.* **2013**, *18*, 400–411. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

32. Beers, R.F., Jr.; Sizer, I.W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* **1952**, *195*, 133–140. [[CrossRef](#)]
33. Marklund, S.; Marklund, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* **1974**, *47*, 469–474. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Flohe, L.; Gunzler, W.A. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* **1984**, *105*, 114–121. [[CrossRef](#)]
35. Fernandez-Vizarra, E.; Lopez-Perez, M.J.; Enriquez, J.A. Isolation of biogenetically competent mitochondria from mammalian tissues and cultured cells. *Methods* **2002**, *26*, 292–297. [[CrossRef](#)]
36. Andersson, B.S.; Jones, D.P. Use of digitonin fractionation to determine mitochondrial transmembrane ion distribution in cells during anoxia. *Anal. Biochem.* **1985**, *146*, 164–172. [[CrossRef](#)]
37. Schmidt, E.; Schmidt, F.W. Methods and value of determination of glutamic acid dehydrogenase activity in the serum. A contribution to the importance of examination of enzyme relations in the serum. *Klin. Wochenschr.* **1962**, *40*, 962–969. [[CrossRef](#)]
38. Moskwa, P.; Lorentzen, D.; Excoffon, K.J.; Zabner, J.; McCray, P.B., Jr.; Nauseef, W.M.; Dupuy, C.; Banfi, B. A novel host defense system of airways is defective in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2007**, *175*, 174–183. [[CrossRef](#)]
39. Boncoeur, E.; Criq, V.S.; Bonvin, E.; Roque, T.; Henrion-Caude, A.; Gruenert, D.C.; Clement, A.; Jacquot, J.; Tabary, O. Oxidative stress induces extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase in cystic fibrosis lung epithelial cells: Potential mechanism for excessive IL-8 expression. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **2008**, *40*, 432–446. [[CrossRef](#)]
40. Ambrosio, G.; Zweier, J.L.; Duilio, C.; Kuppasamy, P.; Santoro, G.; Elia, P.P.; Tritto, I.; Cirillo, P.; Condorelli, M.; Chiariello, M.; et al. Evidence that mitochondrial respiration is a source of potentially toxic oxygen free radicals in intact rabbit hearts subjected to ischemia and reflow. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 18532–18541. [[CrossRef](#)]
41. Walter, P.; Ron, D. The unfolded protein response: From stress pathway to homeostatic regulation. *Science* **2011**, *334*, 1081–1086. [[CrossRef](#)]
42. Martino, M.E.; Olsen, J.C.; Fulcher, N.B.; Wolfgang, M.C.; O’Neal, W.K.; Ribeiro, C.M. Airway epithelial inflammation-induced endoplasmic reticulum Ca²⁺ store expansion is mediated by X-box binding protein-1. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 14904–14913. [[CrossRef](#)]
43. Kelly, M.; Trudel, S.; Brouillard, F.; Bouillaud, F.; Colas, J.; Nguyen-Khoa, T.; Ollero, M.; Edelman, A.; Fritsch, J. Cystic fibrosis transmembrane regulator inhibitors CFTR(inh)-172 and GlyH-101 target mitochondrial functions, independently of chloride channel inhibition. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2010**, *333*, 60–69. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Thomas, C.; Mackey, M.M.; Diaz, A.A.; Cox, D.P. Hydroxyl radical is produced via the Fenton reaction in submitochondrial particles under oxidative stress: Implications for diseases associated with iron accumulation. *Redox Rep.* **2009**, *14*, 102–108. [[CrossRef](#)]
45. Zwolak, I. The Role of Selenium in Arsenic and Cadmium Toxicity: An Updated Review of Scientific Literature. *Biol. Trace Elem. Res.* **2020**, *193*, 44–63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Smith, D.J.; Anderson, G.J.; Bell, S.C.; Reid, D.W. Elevated metal concentrations in the CF airway correlate with cellular injury and disease severity. *J. Cyst. Fibros.* **2014**, *13*, 289–295. [[CrossRef](#)]
47. Cantin, A.M.; Hartl, D.; Konstan, M.W.; Chmiel, J.F. Inflammation in cystic fibrosis lung disease: Pathogenesis and therapy. *J. Cyst. Fibros.* **2015**, *14*, 419–430. [[CrossRef](#)]
48. Voisin, G.; Bouvet, G.F.; Legendre, P.; Dagenais, A.; Masse, C.; Berthiaume, Y. Oxidative stress modulates the expression of genes involved in cell survival in DeltaF508 cystic fibrosis airway epithelial cells. *Physiol. Genom.* **2014**, *46*, 634–646. [[CrossRef](#)]
49. Valdivieso, A.G.; Santa-Coloma, T.A. CFTR activity and mitochondrial function. *Redox Biol.* **2013**, *1*, 190–202. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Bartoszewski, R.; Rab, A.; Jurkuvenaite, A.; Mazur, M.; Wakefield, J.; Collawn, J.F.; Bebok, Z. Activation of the unfolded protein response by deltaF508 CFTR. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **2008**, *39*, 448–457. [[CrossRef](#)]
51. Ribeiro, C.M.; Boucher, R.C. Role of endoplasmic reticulum stress in cystic fibrosis-related airway inflammatory responses. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **2010**, *7*, 387–394. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Tabary, O.; Zahm, J.M.; Hinnrasky, J.; Couetil, J.P.; Cornillet, P.; Guenounou, M.; Gaillard, D.; Puchelle, E.; Jacquot, J. Selective up-regulation of chemokine IL-8 expression in cystic fibrosis bronchial gland cells in vivo and in vitro. *Am. J. Pathol.* **1998**, *153*, 921–930. [[CrossRef](#)]
53. Bargagli, E.; Lavorini, F.; Pistolesi, M.; Rosi, E.; Prasse, A.; Rota, E.; Voltolini, L. Trace metals in fluids lining the respiratory system of patients with idiopathic pulmonary fibrosis and diffuse lung diseases. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2017**, *42*, 39–44. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Kévin Gemy

Ingénieur R&D



ME CONNAÎTRE



Fort d'une expérience de 3 ans en tant que chercheur junior en biologie cellulaire, je suis à la recherche d'une entreprise à laquelle je pourrais apporter mes compétences.

D'un tempérament compétitif, j'aime me challenger pour atteindre mes objectifs.

FORMATION



Doctorat en biologie Cellulaire 2020 – 2023 – UGA

Master 2: Physiology, Epigenetics, Differentiation and Cancer 2018 – 2019 – UGA

Enseignement spécialisé en biologie cellulaire (identité et devenir des cellules) et physio/pathologie. Analyse des données expérimentales et présentation orale et écrite

Master 1: Molecular and Cellular Biology 2017 – 2018 – UGA

Enseignement théorique et pratique en biologie ainsi qu'en gestion de projet, analyse des données expérimentales et présentation orale et écrite

Licence: Chimie – Biologie 2014 – 2017 – UGA

Enseignement théorique et pratique en chimie organique/inorganique, physico-chimie et en biologie cellulaire, moléculaire, structurale, biochimie, génétique

COORDONNÉES



 kevin.gemy@outlook.fr

 06 20 54 74 50

 Grenoble

SOFT SKILLS



Passion



Détermination



Organisation



Autonomie

LANGUES



Anglais

Niveau B2

Espagnol

Niveau A1/A2

CENTRES D'INTÉRÊTS



Powerlifting



Impression 3D



Gastronomie -
compléments alimentaires

EXPÉRIENCE PROFESSIONNELLE



Chercheur Junior 2020 – 2023 – CEA Grenoble / BioSanté

Sujet: Caractérisation biochimique et cellulaire de récepteurs et criblage structural de leur ligand dans le cas de pathologies ligand-dépendantes

Stage validation Master 2 6 mois (2019) – CEA Grenoble / LCBM

Sujet: Production d'une protéine recombinante pour en déterminer sa structure 3D

Stage validation Master 1 2 mois (2018) – CEA Grenoble / LCBM

Sujet: Criblage de molécules chimiques sur la correction de la protéine mutée responsable de la mucoviscidose

COMPÉTENCES



Scientifiques et Techniques

Biologie Cellulaire

Biochimie

Biologie moléculaire

Production et purification
protéine recombinante

Biologie structurale

Logiciels

Serial Cloner – SnapGene viewer

Visual Molecular Dynamics

DataWarrior

GraphPad Prism

Biorender

RÉFÉRENCES

Dr. Mohamed Benharouga, Mohamed.benharouga@cea.fr : **Directeur de thèse**

Dr. Nadia Alfaidy, Nadia.alfaidy-benharouga@cea.fr : **Co-Encadrante**

Dr. Patrice Catty, Patrice.Catty@cea.fr : **Collaborateur**

Résumé

Le facteur, PROK1 aussi dénommé EG-VEGF appartient à la famille des prokinétines (PROK), dont les membres sont directement impliqués dans le contrôle de l'inflammation et l'angiogenèse. Ces facteurs agissent via deux récepteurs de la famille des RCPG, PROKR1 et PROKR2 et régulent plusieurs processus physiologiques et pathologiques, y compris le cancer. Mon équipe de recherche a récemment démontré que l'expression de PROK1 et PROKR2 était augmentée dans le cancer du système reproducteur féminin, le choriocarcinome gestationnel (CG), et dans la mucoviscidose. L'antagonisation de PROKR2 dans un modèle animal de CG diminue le développement et la progression de ce cancer et réduit la réponse inflammatoire, suggérant que l'inhibition du système PROK1/PROKR2 pourrait constituer une cible thérapeutique prometteuse pour les cancers et les pathologies pro-inflammatoires PROK1-dépendantes. Cependant, les antagonistes anti-PROKR2 ne sont pas spécifiques pour ce récepteur, présentent une toxicité à long terme et peuvent être associés au développement d'effets secondaires, car ils bloquent un récepteur partagé avec d'autres membres de la famille des PROKs. Ainsi, les objectifs de ma thèse étaient, *i*) de développer une nouvelle stratégie d'inhibition de ce système en ciblant le ligand, PROK1, et *ii*) de mettre en évidence les différences moléculaires et cellulaires qui caractérisent les récepteurs PROKR1 et PROKR2 afin de proposer, à long terme, des stratégies thérapeutiques ciblant spécifiquement l'un ou l'autre récepteur. Le développement de la stratégie du blocage du ligand PROK1 a nécessité, le clonage de la séquence humaine de *prok1* dans différents plasmides, la mise en place de plusieurs systèmes « eucaryotes ou procaryotes » d'expression et de production, et le développement de nombreuses techniques de purification afin de résoudre sa structure tridimensionnelle (STD). Des analyses *in silico* ont également été réalisées : pour accélérer la résolution de sa STD, caractériser les interfaces de son interaction avec PROKR2, et réaliser le docking moléculaire dans le but d'identifier des molécules chimiques capables d'inhiber l'interaction PROK1-PROKR2. Un test fonctionnel a aussi été développé pour évaluer *in vitro* les molécules les plus prometteuses. Pour la réalisation de ce test fonctionnel, nous avons généré deux lignées stables exprimant PROKR1 ou PROKR2. La caractérisation cellulaire et moléculaire de PROKR1 et PROKR2 a mis en évidence l'existence de différences post-traductionnelles concernant les demi-vies des récepteurs, leur stabilité, leur mode d'adressage à la membrane et leurs niveaux de repliement. Partant de ce constat, nous avons débuté l'étude des mécanismes sous-jacents à ces différences en ciblant prioritairement les extrémités N- et C-ter et leurs implications dans le processus de dimérisation potentielle de PROKR1 et PROKR2. L'ensemble des résultats de ma thèse ont permis de produire la protéine PROK1, de résoudre sa structure et d'identifier les acides aminés impliqués dans son interaction avec le PROKR2. Le développement des lignées exprimant PROKR1 ou PROKR2 a permis, *i*) de mettre en place un test fonctionnel de l'activité des prokinétines, *ii*) d'identifier trois molécules inhibitrices du ligand PROK1 et *iii*) de démontrer qu'en dépit de la faible différence d'identité entre PROKR1 et PROKR2, que PROKR1 serait plus stable au niveau de la membrane, subirait moins de dégradation au niveau du lysosome, et que sa partie C-ter conférerait la dimérisation entre récepteurs PROKR1 et PROKR2. En conclusion, ma thèse a apporté des outils moléculaires pour l'étude des prokinétines, a permis d'identifier de nouvelles molécules inhibitrices du ligand PROK1 et de son interaction avec PROKR2 et à comparer pour la première fois les deux récepteurs de cette famille. L'ensemble de ces données nous permettra de mieux cibler les récepteurs PROKR1 et leurs ligands afin de proposer une pharmacothérapie plus spécifique des cancers PROK-dépendants et des maladies inflammatoires dans lesquelles ils sont dérégulés, comme la prééclampsie et la mucoviscidose.

Abstract

Prokineticin-1 (PROK1) protein, also known as EG-VEGF (Endocrine gland derived-vascular endothelial growth factor) belongs to the prokineticin (PROK) family, whose members are directly involved in the control of key processes such as inflammation and angiogenesis. PROK1 acts via two GPCR receptors, PROKR1 and PROKR2 and regulates several physiological and pathological processes, including cancer and cystic fibrosis (CF). My research team recently demonstrated that the expression of PROK1 and PROKR2 were increased in the female reproductive cancer, gestational choriocarcinoma (GC) and in CF. The antagonization of PROKR2 in an animal model of GC decreased tumor growth and its progression, suggesting that inhibition of the PROK1/PROKR2 system may constitute a promising therapeutic target for all PROK1-dependent cancers and pro-inflammatory diseases. However, anti-PROKR2 antagonists are not specific for this receptor, exhibit long-term toxicity and may be associated with the development of side effects as they block a shared receptor with other members of the PROKs family.

The objectives of my thesis project aimed at *i*) developing a new strategy that targets the inhibition of the ligand, PROK1, and *ii*) characterizing the molecular and cellular features that differentiate PROKR1 from PROKR2 in order to propose new therapeutic strategies that will specifically target one or the other receptor.

The development of the PROK1 blocking strategy required the cloning of the human *Prok1* sequence in different plasmids, the implementation of several eukaryotic or prokaryotic expression and production systems, and the development of numerous purification techniques in order to resolve its three-dimensional structure (STD). *In silico* analyses were also performed to accelerate the STD resolution of PROK1, to characterize the sites of its interaction with PROKR2, and to perform molecular docking in order to identify chemical molecules able to inhibit the PROK1-PROKR2 interaction. A functional assay was also developed to test *in vitro* the most promising molecules. The functional test required the development of two stable cell lines expressing PROKR1 or PROKR2.

The cellular and molecular characterization of PROKR1 and PROKR2 revealed post-translational differences regarding the receptor's half-life, its stability, trafficking and folding levels. Based on these observations, we initiate the investigation of the mechanisms behind these differences, firstly by targeting the roles of N- and C-terminus in these processes, particularly in the dimerizations of PROKR1 and PROKR2. Altogether my thesis project allowed the production of a recombinant PROK1 protein, the resolution of its structure and the identification of the amino acids that are involved in its interaction with PROKR2. The development of cell lines expressing PROKR1 or PROKR2 allowed, *i*) the set-up of a functional test of the activity of prokineticins, *ii*) the identification of three inhibiting molecules of the PROK1 ligand and *iii*) the demonstration that, in spite of the existence of a huge identity between PROKR1 and PROKR2, PROKR1 would be more stable at the plasma membrane; undergo less degradation at the lysosome level and its C-terminal part may confer the dimerization between PROKR1 receptors.

In conclusion, my thesis project established new molecular tools for the study of the prokineticins system; identified new inhibiting molecules of the PROK1-PROKR2 interaction, and compared for the first time PROKR1 cellular and biochemical features. All these data will allow better targeting of PROKR1 and their ligands in order to propose more specific pharmacotherapies for PROK-dependent cancers and inflammatory diseases, such as preeclampsia and cystic fibrosis.