

## Thesis, COLLÉGIALITÉ

**Auteur** : Adam, Pierre

**Promoteur(s)** : Hanson, Julien

**Faculté** : Faculté de Médecine

**Diplôme** : Master en sciences biomédicales, à finalité approfondie

**Année académique** : 2020-2021

**URI/URL** : <http://hdl.handle.net/2268.2/12473>

---

### *Avertissement à l'attention des usagers :*

*Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.*

*Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.*

---

UNIVERSITÉ DE LIÈGE



---

# Analyse de l'impact de mutations induites sur la pharmacologie du récepteur GPR27

Laboratoire de pharmacologie moléculaire

---

**Pierre ADAM**

**Promoteur : Julien Hanson**

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Master en sciences biomédicales

---

Année académique 2020-2021

# Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble du laboratoire de pharmacologie moléculaire pour m'avoir permis de réaliser ce mémoire au sein de leur laboratoire. Je remercie mon promoteur Julien Hanson pour sa disponibilité et le partage de son expérience du milieu de la recherche. Je remercie également Dayana Abboud, Monika Wozniak, Alyssia Mesdagh et Jeremy Blavier pour leur soutien et leur aide ces derniers mois.

Je voudrais souligner l'investissement de Céline Laschet dans ce travail. Son expérience et ses conseils m'ont été d'une grande aide lors de la réalisation de ce mémoire.

Je tiens tout particulièrement à remercier Célia Lemoine qui m'aura épaulé durant ces dernières années d'étude. Je la remercie tant pour nos débats constructifs que pour son aide dans l'élaboration du manuscrit.

Je voudrais saluer l'entraide et la bonne volonté des étudiants de master 2. Notre courage a été mis à rude épreuve durant ce nouveau master malheureusement gâché par cette crise sanitaire.



## Résumé

Les GPCR (récepteurs couplés aux protéines G) constituent la plus grande famille des récepteurs membranaires. Leur caractéristique principale est que lorsqu'ils sont activés, la transduction du signal s'effectue via des protéines hétérotrimériques que sont les protéines G. Cependant, certains de ces GPCR n'activent pas ces protéines G et ont donc un caractère dit « atypique ».

Les GPCR sont impliqués dans de nombreux processus physio(patho)logiques et fixent des ligands de natures différentes. En revanche, une centaine de ces récepteurs n'ont actuellement pas de ligand endogène connu et sont donc appelés récepteurs « orphelins ». Le sujet de ce mémoire porte sur l'un de ces récepteurs orphelins qui est le GPR27. GPR27 fait partie de la famille des SREB (Super Conserved Receptor Expressed in Brain). L'hypothèse est que ce récepteur est atypique et donc que sa signalisation ne passe pas par l'activation de protéines G. Au sein de la famille des GPCR, certains motifs d'acides aminés sont très conservés au cours de l'évolution et sont impliqués dans le couplage aux protéines G. En ce qui concerne GPR27, la plupart de ceux-ci ne sont pas conservés, ce qui pourrait expliquer l'absence de couplage aux protéines G observé. L'objectif de ce mémoire est de déterminer si les motifs spécifiques de GPR27, différant des motifs conservés dans les autres GPCR de classe A, lui confèrent son caractère atypique de ne pas coupler aux protéines G.

Pour confirmer cette hypothèse, des mutants de GPR27 ont été générés via mutagenèse dirigée afin de restaurer les différents motifs conservés par les autres récepteurs. Ensuite, le couplage aux protéines G des mutants de GPR27 a été évalué dans un test de complémentation à la nanoluciférase. Ce test a nécessité une optimisation de plusieurs paramètres. Lors de l'analyse de l'interaction entre un mutant délété de son ECL<sub>2</sub> et la sous-unité G<sub>i</sub>, un signal significatif a été détecté. Cependant, lors d'une analyse en concentration-réponse en présence de PTX, l'interaction entre le mutant et G<sub>i1</sub> n'a pas pu être confirmée.

# Abstract

GPCR (G protein-coupled receptors) constitute the largest family of membrane receptors. Their main characteristic is that when they are activated, signal transduction takes place via heterotrimeric proteins which are G proteins. However, some of these GPCR do not activate these G proteins and therefore have a so-called "atypical" character.

GPCR are involved in many physio(patho)logical processes and bind ligands of different types. In contrast, around 100 of these receptors currently lack a known endogenous ligand and are therefore called "orphan" receptors. The subject of this thesis relates to one of these orphan receptors which is the GPR27. GPR27 is part of the SREB (Super Conserved Receptor Expressed in Brain) family. The hypothesis is that this receptor is atypical and therefore its signaling does not go through the activation of G proteins.

Within the GPCR family, certain amino acid motifs are very conserved during evolution and are involved in the coupling to G proteins. As regards GPR27, most of these are not conserved, which could explain the observed absence of coupling to the G proteins. The objective of this thesis was to determine whether the specific motifs of GPR27, differing from the motifs conserved in other class A GPCR, give it its atypical character of not coupling to G proteins.

To confirm this hypothesis, mutants of GPR27 were generated via site-directed mutagenesis in order to restore the various motifs retained by the other receptors. Next, the G-protein coupling of the GPR27 mutants was evaluated in a nanoluciferase complementation test. This test required optimization of several parameters. When analyzing the interaction between a mutant deleted from its ECL<sub>2</sub> and the G<sub>i</sub> subunit, a significant signal was detected. However, in a concentration-response analysis in the presence of PTX, the interaction between the mutant and G<sub>i1</sub> could not be confirmed.

## Table des abréviations

AMP <sub>c</sub>	Adénosine monophosphate cyclique
ATP	Adénosine triphosphate
BRET	« Bioluminescence Resonance Energy Transfer »
DAG	Diacylglycérol
DAPI	4,6-diamidino-2-phénylindole
DOS	« Diversity-oriented synthesis »
ECL	Boucle extracellulaire
ERK	« Extracellular signal-regulated kinases »
FRET	« Fluorescence Resonance Energy Transfer »
GDP	Guanosine diphosphate
GEF	« Guanine nucleotide exchange factor »
GIRK	« G-protein inwardly rectifying K <sup>+</sup> channel »
GPCR	Récepteur couplé aux protéines G
GRK	« G protein-coupled receptor kinase »
GTP	Guanosine triphosphate
ICL	Boucle intracellulaire
IP <sub>3</sub>	Inositol triphosphate
IUPHAR	« International Union of Basic and Clinical Pharmacology »
KO	« Knock-out »
MAPK	« Mitogen-activated protein kinase »
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PTX	Toxine pertussique
RGS	« Regulator of G protein signaling »
SOSA	« Selective Optimization of Side Activities »
SREB	« Super conserved Receptor Expressed in Brain »
TM	Domaine transmembranaire
WT	« Wild-type »

# Table des matières

<b>I. Introduction.....</b>	<b>1</b>
I.1 Caractéristiques générales des GPCR.....	1
I.2 Classification.....	2
I.3 Activité constitutive.....	3
I.4 La nomenclature Ballesteros-Weinstein.....	4
I.5 Modèle d'activation des GPCR.....	5
I.6 Signalisation des GPCR.....	5
I.6.1 Voies protéine G dépendantes.....	5
I.6.2 Voies protéine G indépendantes.....	12
I.7 Récepteurs atypiques.....	13
I.8 Ligand biaisé.....	13
I.9 Les récepteurs orphelins.....	14
I.9.1 Approches expérimentales pour désorpheliniser un récepteur.....	15
I.10 La famille SREB.....	17
I.10.1 GPR27.....	17
<b>II. Matériel et méthodes.....</b>	<b>19</b>
II.1 Mutagenèse dirigée.....	19
II.2 Culture cellulaire.....	19
II.3 Transfection.....	20
II.4 Immunofluorescence.....	20
II.5 Test de complémentation à la nanoluciférase.....	21
II.5.1 Principe.....	21
II.5.2 Méthodes.....	21
II.6 Test de complémentation à la luciférase firefly.....	22
II.6.1 Principe.....	22
II.6.2 Méthodes.....	22
<b>III. Objectifs et stratégie.....</b>	<b>23</b>

<b>IV.</b>	<b>Résultats.....</b>	<b>24</b>
<b>IV.1</b>	<b>Génération de mutants .....</b>	<b>24</b>
IV.1.1	Motif « PIF ».....	24
IV.1.2	L'ECL <sub>2</sub> .....	25
IV.1.3	Motif NPxxY.....	25
IV.1.4	Motif DRY.....	25
IV.1.5	NPxxY-DRY.....	26
IV.1.6	« Rotamer toggle switch » .....	26
IV.1.7	Mutation F6.37L.....	26
IV.1.8	Mutation V3.46I .....	26
<b>IV.2</b>	<b>Résultats séquençage.....</b>	<b>27</b>
<b>IV.3</b>	<b>Marquage par immunofluorescence des mutants .....</b>	<b>28</b>
<b>IV.4</b>	<b>Test des mutants.....</b>	<b>29</b>
IV.4.1	Mise au point du test de complémentation basé sur la nanoluciférase .....	30
IV.4.2	Etude du couplage aux protéines G .....	34
IV.4.3	Criblage du couplage aux protéines G des différents mutants de GPR27 .....	36
<b>V.</b>	<b>Discussion.....</b>	<b>40</b>
<b>VI.</b>	<b>Bibliographie .....</b>	<b>45</b>



# I. Introduction

Les GPCR sont les récepteurs membranaires les plus abondants au sein du corps humain. Cette famille de récepteurs est donc la plus large tant en nombre qu'en diversité fonctionnelle (Fredriksson, Lagerström, Lundin, & Schiöth, 2003). En effet, ces récepteurs jouent un rôle dans de nombreux processus physiologiques mais également pathologiques. Ils sont reliés à la neurotransmission mais d'autres fonctions leur sont également attribuées telles que la fonction visuelle, l'olfaction, la régulation de systèmes métaboliques, endocriniens ou encore neuromusculaires.

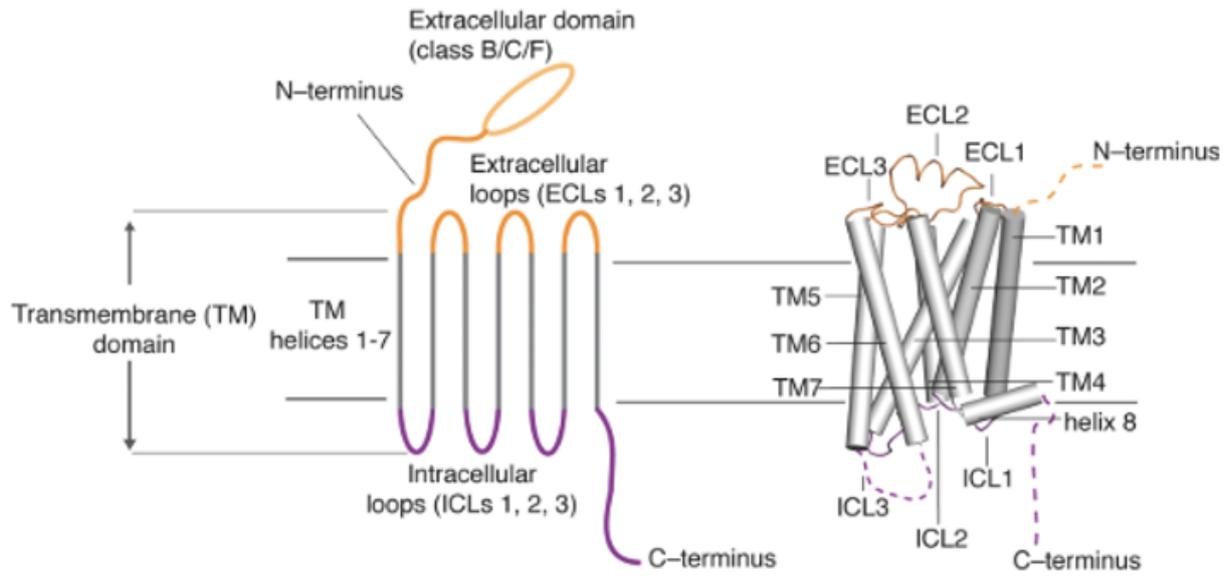
Malgré la diversité des fonctions que les GPCR couvrent, il existe certaines caractéristiques communes à ces récepteurs. Ils sont tous formés de 7 domaines transmembranaires et interagissent avec des protéines G. De plus, leur diversité fonctionnelle peut s'expliquer par la fixation de ligands de nature différente tels que des hormones, des peptides, des neurotransmetteurs ou encore des photons.

Leurs nombreuses implications physiologiques ainsi que leur facilité d'accès pharmacologique font qu'ils sont actuellement la cible de 30 à 40% des médicaments sur le marché (Salon, Lodowski, & Palczewski, 2011).

## I.1 Caractéristiques générales des GPCR

Les récepteurs couplés aux protéines G sont formés de 7 domaines transmembranaires contenant chacun 20 à 30 acides aminés. Ces segments sont sous forme d'hélice alpha de pas de rotation droite. Ces 7 segments hydrophobiques sont reliés par 3 chaînes d'acides aminés intracellulaires (ICL<sub>1</sub>, ICL<sub>2</sub>, ICL<sub>3</sub>) et 3 chaînes extracellulaires (ECL<sub>1</sub>, ECL<sub>2</sub>, ECL<sub>3</sub>) (**Figure 1**).

La partie N-terminale du récepteur se trouve exposée au milieu extracellulaire alors que la queue C-terminale se trouve dans la partie intracellulaire.



*Figure 1 : Structure d'un récepteur couplé aux protéines G. D'après Latorraca, Venkatakrishnan, & Dror, 2017.*

La deuxième caractéristique générale des GPCR est qu'ils interagissent avec les protéines G lors de la fixation du ligand. Cette interaction se fait via le pôle intracellulaire du récepteur et permet la transduction du signal (**Figure 2**). Cependant, certains GPCR ne semblent pas coupler à ces protéines G et ont donc un caractère dit « atypique ». La famille la plus connue de cette catégorie est la famille des récepteurs aux chémokines (Naumann et al., 2010) dont l'exemple le plus récent est le GPR182 (Le et al., 2021)

## 1.2 Classification

Pour classer les centaines de GPCR existants, plusieurs classifications ont été proposées durant ces dernières décennies. Une méthode de classification couramment utilisée, datant de 1994, organise les GPCR en différentes classes allant des lettres romanes A jusque F (Attwood & Findlay, 1994). Cette classification regroupe les GPCR en différentes classes selon leur homologie de séquence et leurs similarités fonctionnelles. Certaines de ces classes n'existent pas chez les vertébrés, comme par exemple, les classes D et E.

Un autre système de classification plus récent, nommé « GRAFS », a été proposé et est largement utilisé dans le domaine des GPCR. Celui-ci se base sur la classification créée par Fredriksson en 2003. Celui-ci propose une classification des GPCR en 5 grandes familles selon des analyses phylogénétiques. Ces 5 familles sont les suivantes : Glutamate-like, Rhodopsin family, Adhesion, Frizzled et Secretine (**Figure 3**). Dans le cadre de ce mémoire, seule la famille des rhodopsines sera détaillée.

La famille des rhodopsines compte près de 700 récepteurs. De ce fait, elle a été fragmentée en 4 sous-groupes allant des lettres grecques  $\alpha$  à  $\gamma$  (**Figure 4**).

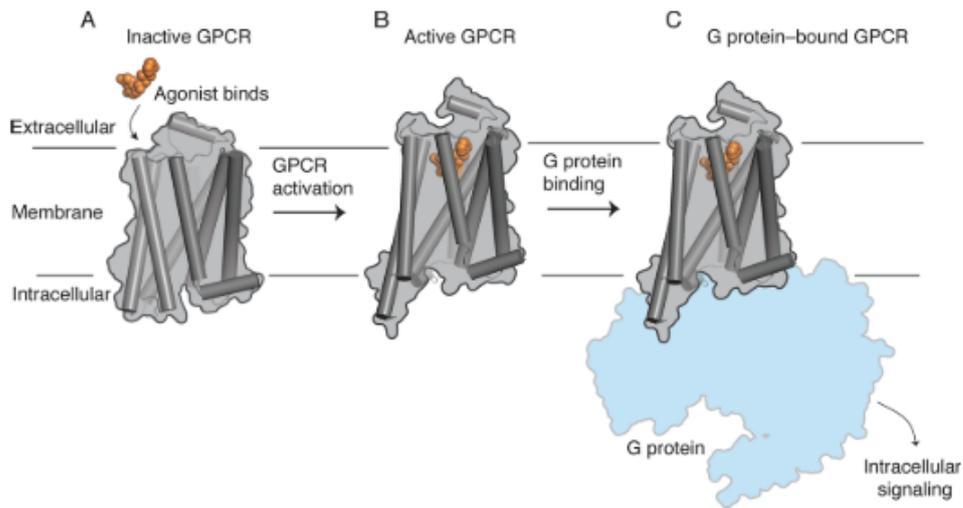
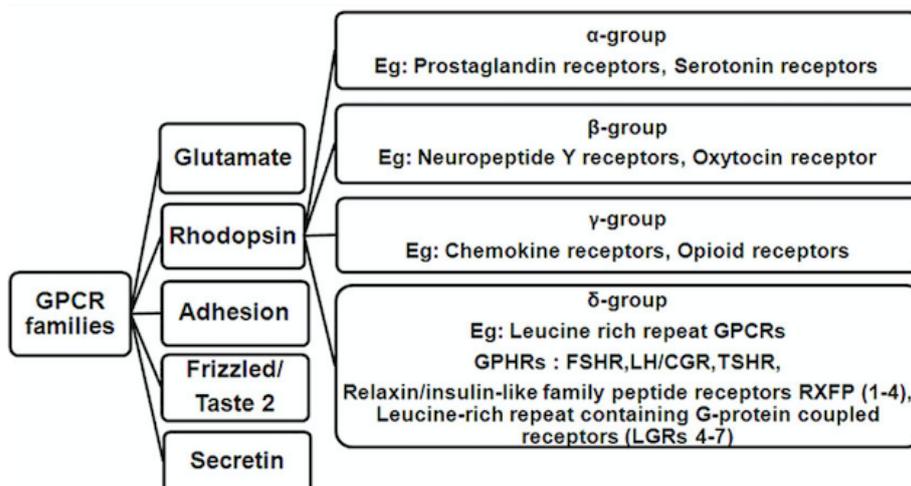


Figure 2 : Schéma classique d'activation d'un GPCR. D'après Latorraca et al., 2017

Receptor subfamily	Representative examples	Biological roles
Glutamate	Metabotropic glutamate receptors, GABA <sub>B</sub> receptor, taste1 receptors	Neurobiological roles, gustatory roles (sweet and savory tastes)
Rhodopsin	Adrenergic receptors, angiotensin receptors, cannabinoid receptors, chemokine receptors, histamine receptors, muscarinic acetylcholine receptors, opioid receptors, olfactory receptors, opsins	Senses of vision and olfaction, biogenic amine and neurotransmitter signaling, immunological functions, cardiovascular functions, many other roles
Adhesion	Latrophilins, CELSRs	Immunological functions, developmental biology of the central nervous system, likely many other unknown functions
Frizzled	Frizzled receptors, Smoothed receptors, taste2 receptors	Developmental biology, cancer, perception of bitter taste
Secretin	CGRP receptor, glucagon receptor, GLP-1 receptor, growth hormone releasing hormone receptor, parathyroid hormone receptor	Endocrine and metabolic roles

Figure 3 : Tableau représentant les différentes familles de la classification de Fredriksson. D'après Erlandson, McMahon, & Kruse, 2018.



Figures 4 : Schéma représentant les sous-groupes composant la famille des rhodopsines. D'après Banerjee & Mahale, 2015.

La classification GRAFS met en évidence certaines structures et motifs communs aux récepteurs d'une même famille. C'est ainsi que, par exemple pour la famille des rhodopsines, des motifs d'acides aminés «D(E)-R-Y» au niveau du segment transmembranaire 3 (TM3) ou encore des motifs «NPxxY» sur le TM7 sont retrouvés dans la majorité des récepteurs de cette famille.

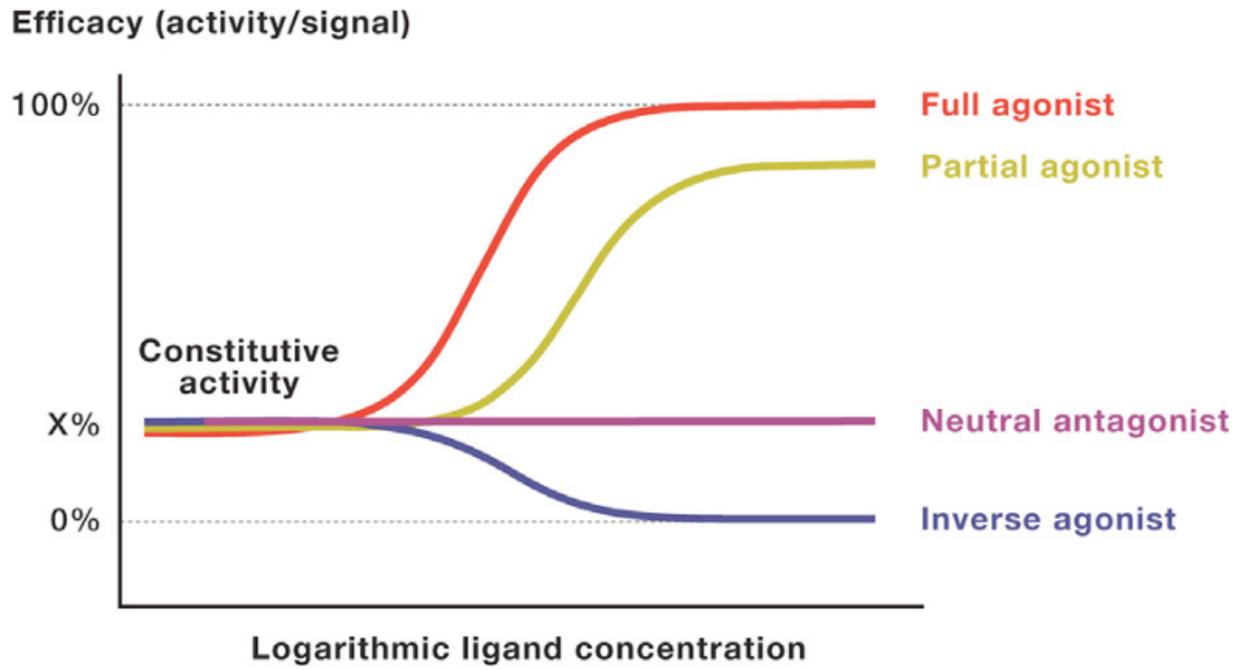
D'autres éléments permettent de discriminer les familles entre elles, comme par exemple, la taille du segment N-terminal ou encore le type de ligand que le récepteur lie.

### 1.3 Activité constitutive

L'activité constitutive d'un récepteur est une notion très importante en pharmacologie. Elle peut se définir comme la stabilisation de la conformation active d'un récepteur en absence de ligand. Le récepteur caractérisé par une activité constitutive produit donc une signalisation basale (en l'absence de ligand) significative.

Ce phénomène a son importance notamment en physiopathologie. De nombreuses maladies peuvent s'expliquer par une activité constitutive anormale d'un récepteur due à des mutations. Ainsi, certains adénomes thyroïdiens ou encore certaines tumeurs carcinoïdes gastriques peuvent s'expliquer par une augmentation de l'activité constitutive du récepteur due à ces mutations (Seifert & Wenzel-Seifert, 2002).

Avant la découverte de ce concept, il existait 2 grandes catégories d'agonistes : les agonistes partiels et les agonistes pleins. Les agonistes permettent la stabilisation de la conformation active du récepteur induisant un effet biologique maximal (agoniste plein) ou suboptimal (agoniste partiel). Les antagonistes, eux, ne permettent pas cette stabilisation de l'état actif. D'autre part, la découverte de la notion d'activité constitutive a impliqué la création d'un concept dit « d'agoniste inverse » (**Figure 5**).



*Figure 5 : Courbe concentration-réponse théorique de l'effet des différents types de ligands en fonction de leur concentration. D'après Wacker, Stevens, & Roth, 2017*

Un agoniste inverse induit la stabilisation à l'état inactif d'un récepteur tandis qu'un antagoniste neutre n'a pas d'affinité préférentielle pour l'état actif ou inactif du récepteur.

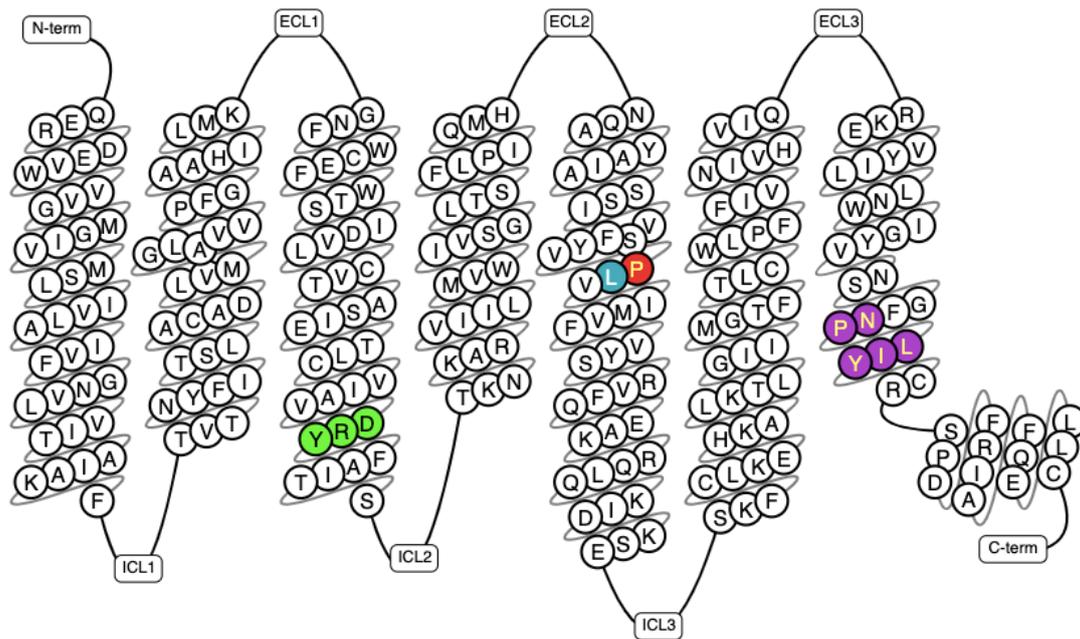
Lors de la découverte d'activités constitutives au sein de nombreux GPCR, une investigation fonctionnelle de leurs antagonistes a eu lieu. C'est ainsi que de nombreux « antagonistes » ont été reclassés en agonistes inverses. Cela a permis de mieux caractériser des mécanismes physio(patho)logiques ainsi que l'activité de certains médicaments. Un exemple classique sont les antihistaminiques qui ont été presque tous reclassés comme agonistes inverses pour les récepteurs H<sub>1</sub> et H<sub>2</sub>. (Khilnani & Khilnani, 2011)

Il est important de noter que certains récepteurs peuvent afficher une activité constitutive fictive lors de certains tests *in vitro* due à la présence du ligand endogène dans le milieu ou encore via la présence du ligand attaché à la queue N-terminale du récepteur.

#### 1.4 La nomenclature Ballesteros-Weinstein

Pour faciliter la comparaison des récepteurs, la nomenclature *Ballesteros-Weinstein* est utilisée. L'acide aminé le plus conservé dans chaque domaine transmembranaire au sein de la famille A des GPCR se voit assigner le numéro « x.50 ». Ainsi, tous les autres résidus se trouvant dans le même domaine transmembranaire sont numérotés par rapport au résidu « x.50 » qui sert de repère. Un résidu est représenté sous la forme x.yy, où x représente le domaine transmembranaire et « yy » la position relative du résidu par rapport au résidu le plus conservé du domaine transmembranaire (résidu 50). Ainsi, le résidu 5.51 du récepteur adrénergique  $\beta_2$  fait référence à la leucine se trouvant juste après la proline, l'acide aminé le plus conservé du cinquième domaine transmembranaire de la famille des GPCR A (**Figure 6**). Grâce à la nomenclature de *Ballesteros-Weinstein*, il est possible de mettre en évidence les positions de motifs d'acides aminés importants pour le fonctionnement d'un récepteur et de permettre la comparaison de ces motifs avec d'autres récepteurs.

Ainsi, plusieurs motifs conservés dans la famille des rhodopsines sont en lien avec l'activation des GPCR. Les deux motifs les plus conservés sont les motifs DRY<sup>3.49</sup> et NPxxY<sup>7.53</sup> qui jouent un rôle essentiel dans l'activation des GPCR, permettant ainsi l'interaction avec les protéines G et la transduction du signal (Weis & Kobilka, 2018) (**Figure 6**).



**Figure 6 :** Diagramme en serpent du récepteur adrénergique  $\beta_2$ . Chaque cercle représente un acide aminé désigné par son abréviation en une seule lettre. L'acide aminé rouge représente la proline 5.50, l'acide aminé bleu la leucine 5.51. Le motif d'acide aminé « DRY » est représenté en vert et le motif NPxxY en mauve. D'après le site « GPCRdb.com »

## 1.5 Modèle d'activation des GPCR

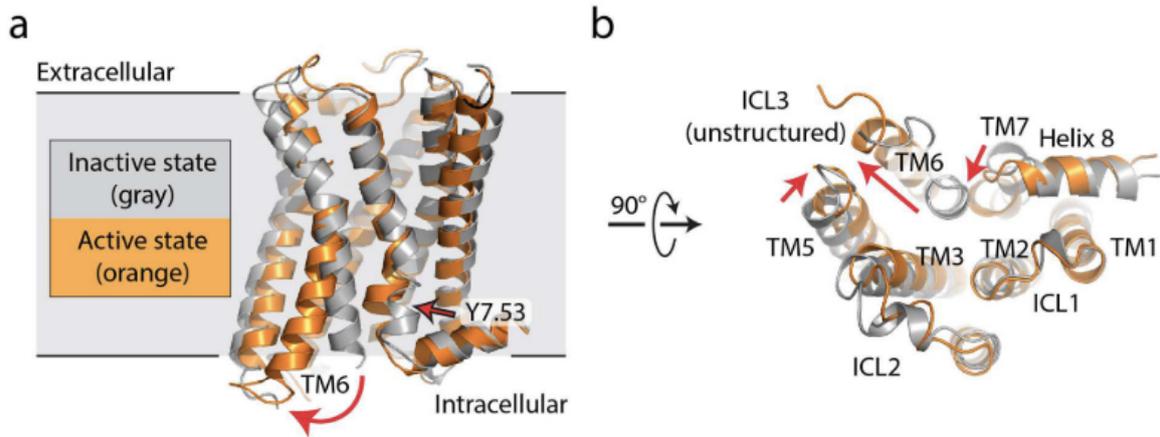
Avant la découverte de l'activité basale des GPCR, un modèle nommé « two-state model » ne considérait que 2 conformations dans lesquelles pouvaient se trouver le récepteur : l'état actif ou inactif. Par la suite, une complexification de ce modèle s'est établie (Rajagopal, Rajagopal, & Lefkowitz, 2010). En effet, les GPCR sont extrêmement plastiques. Comprendre la dynamique de leurs changements conformationnels lors de leur activation est le principal défi. Pour relever ce défi, les outils utilisés sont la résonance magnétique nucléaire, la cristallographie ou encore la cryo-microscopie électronique. D'autres technologies plus récentes, comme les simulations dynamiques moléculaires, ont également permis une meilleure compréhension de cette dynamique. (Latorraca et al., 2017)

L'analyse cristallographique du récepteur adrénergique  $\beta_2$  a permis de servir de point de comparaison entre l'état inactif d'un récepteur et son état actif (Cherezov et al., 2007; Rasmussen et al., 2011). Cela a permis de mettre en évidence certains mécanismes d'activation communs aux GPCR de la famille des rhodopsines. Le mécanisme majeur est l'écartement du TM6 lorsque le ligand se fixe et active le récepteur. Une fois le TM6 écarté, cela forme une poche dans laquelle la protéine G va pouvoir venir s'engouffrer et interagir avec les acides aminés des TM 3, 5 et 7 (Ibrahim, Wifling, & Clark, 2019) (**Figure 7**).

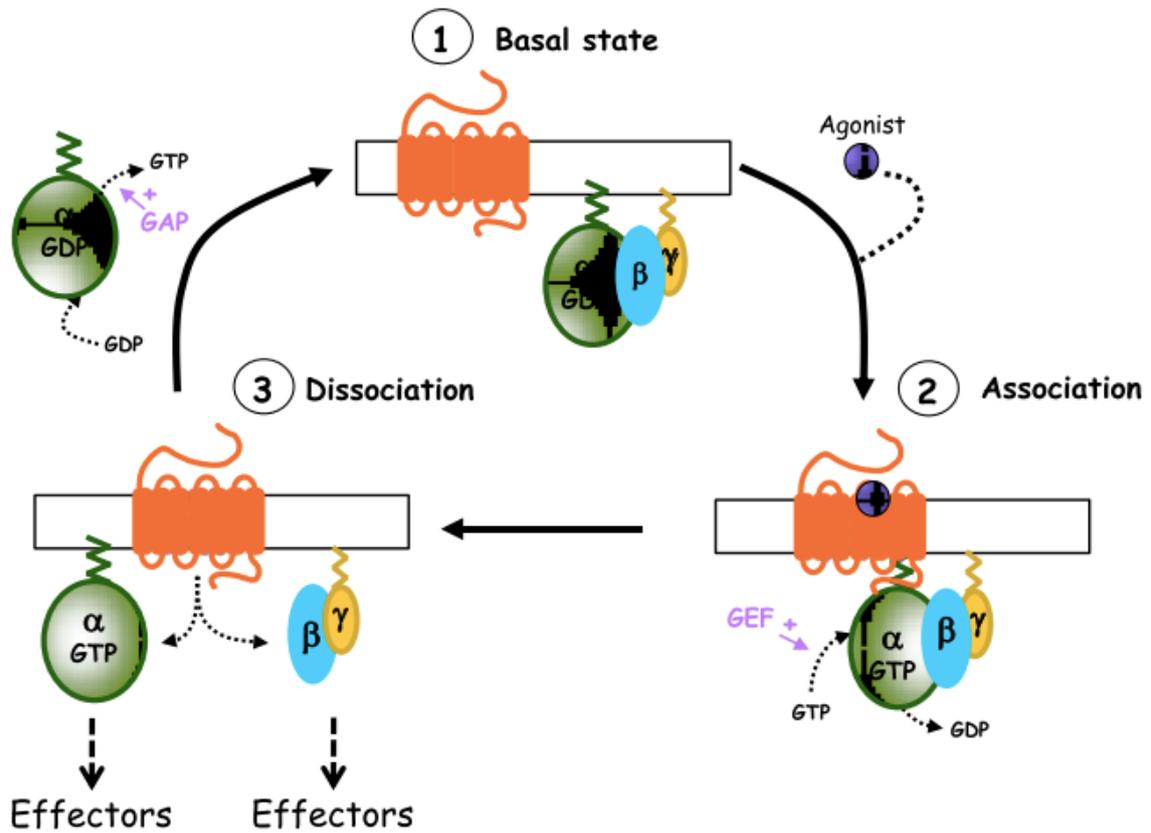
## 1.6 Signalisation des GPCR

### 1.6.1 Voies protéine G dépendantes

La voie classique de transduction du signal des récepteurs couplés aux protéines G passe par des protéines G. Les protéines G sont hétérotrimériques et comportent 3 sous-unités : une sous-unité  $\alpha$ , une  $\beta$  et une  $\gamma$ . La sous-unité  $\alpha$  est composée d'un domaine GTPase et d'un domaine « hélice alpha ». C'est cette sous-unité  $\alpha$  qui permet en grande partie la transduction du signal. Cette dernière est liée à une molécule de GDP (guanosine diphosphate), via son domaine GTPase, lorsqu'elle est inactive. Suite à la fixation du ligand sur le récepteur, celui-ci va changer sa conformation, permettant d'agir comme un GEF (« guanine nucleotide exchange factors ») auprès de la sous-unité  $\alpha$  et d'échanger son GDP en GTP (guanosine triphosphate). Une fois activée, la sous-unité  $\alpha$  se dissocie du complexe  $\beta/\gamma$  et active des effecteurs nécessaires à la transduction du signal. La protéine G est ensuite inactivée par hydrolyse du GTP de la sous-unité  $\alpha$  en GDP et reformation du complexe  $\alpha/\beta/\gamma$  (**Figure 8**). Le couplage entre le récepteur et le ligand est bidirectionnel. En effet, l'activation de la protéine G favorise l'état actif du récepteur.



**Figure 7 :** A. Etat inactif (gris) et état actif (rouge) du récepteur  $M_2$  par diffraction aux rayons X. Les flèches rouges indiquent les changements conformationnels lors de l'activation. B. La même structure du point de vue intracellulaire. D'après Manglik & Kruse, 2017.



**Figure 8 :** Schéma général d'un cycle d'activation d'une protéine G. D'après Denis, Sauliere, Galandrin, Senard, & Gales, 2012

#### 1.6.1.1.1 Transduction du signal

Les voies effectrices nécessaires à la transduction du signal dépendent, en grande partie, du type de protéine G qui est activé. En effet, il existe différentes sous-unité  $\alpha$  qui ont une affinité pour des récepteurs et effecteurs qui leur sont propres (Flock et al., 2015).

Il existe 6 familles de sous-unités alpha :  $G_{\alpha s}$ ,  $G_{\alpha i/o}$ ,  $G_{\alpha 12/13}$ ,  $G_{\alpha olph}$  et  $G_t$ . Les familles  $G_{\alpha olph}$  et  $G_t$ , étant impliquées dans l'olfaction et la vision, celles-ci ne seront pas abordées.

Chacune de ces familles activent des voies de signalisation distinctes. (**Figure 9**)

#### **Famille $G_{\alpha s}$**

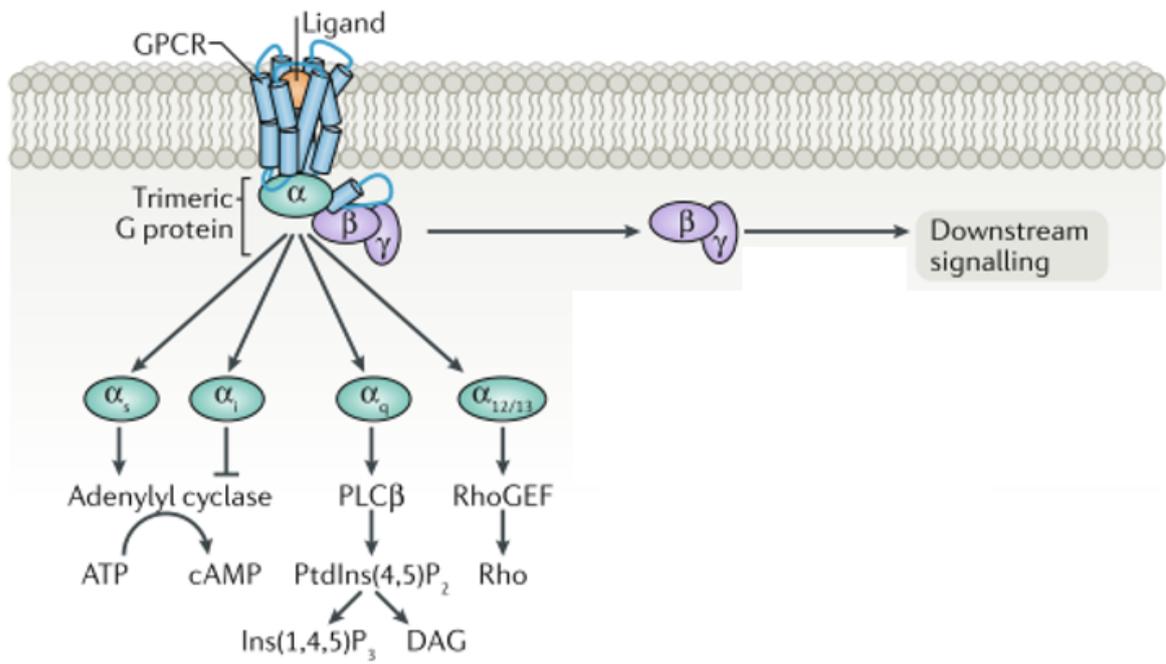
Cette famille de sous-unité  $\alpha$  est exprimée de manière ubiquitaire dans l'organisme. Elle comporte certains variants plus longs appelés  $G_{\alpha s}$  XL qui eux, sont surtout exprimés au niveau du système nerveux central. (Abramowitz, Grenet, Birnbaumer, Torres, & Birnbaumer, 2004)

Les  $G_{\alpha s}$  activent directement l'adénylate cyclase qui convertit l'ATP (adénosine triphosphate) en AMPc (adénosine monophosphate cyclique). L'augmentation en AMPc active, ensuite, la protéine kinase A (PKA) qui est, elle-même, impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires.

#### **Famille $G_{\alpha i/o}$**

Cette famille regroupe plusieurs sous-unités comme la  $G_{\alpha i}$  (comprenant plusieurs formes), la  $G_{\alpha o}$  et la  $G_{\alpha z}$ . Ces sous-unités inhibent l'adénylate cyclase et diminuent, donc, le taux d'AMPc intracellulaire. Les  $G_{i/o}$  sont les plus abondamment exprimées. Elles permettent d'induire la signalisation des sous-unités  $\beta/\gamma$  de la protéine G. La sous-unité  $G_{\alpha o}$  a une expression plus spécifique, principalement au niveau du système nerveux.

La particularité de la famille  $G_{\alpha i/o}$  est l'inhibition sélective par la toxine pertussique (PTX) secrétée par la bactérie *Bordetella pertussis*, l'agent infectieux de la coqueluche. Il faut, cependant, noter que la sous-unité  $G_{\alpha z}$ , membre de la famille des  $G_{\alpha i/o}$ , n'est pas inhibée par cette toxine.



**Figure 9** : Schéma général de la transduction du signal médiée par les protéines G. Adapté de Pflieger, Gresham, & Koch, 2019

### **Famille $G_{\alpha q/11}$**

$G_{\alpha q}$  et  $G_{\alpha 11}$  sont deux sous-unités exprimées de manière ubiquitaire. D'autres sous-unités de cette famille telles que  $G_{\alpha 14}$  et  $G_{\alpha 15/16}$  sont exprimées de manière plus spécifique dans différents organes. L'effecteur principalement activé par cette famille est la phospholipase C $\beta$ . Cette enzyme provoque le clivage du phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) résultant en la formation de diacylglycérol (DAG) et d'inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>). L'IP<sub>3</sub> agit, alors, sur les calciosomes permettant de relarguer massivement des ions calcium au niveau intracellulaire. Le rôle principal du DAG est le recrutement, à la membrane, de la protéine kinase C (PKC) qui, en présence de Ca<sup>2+</sup>, sera activée.

### **Famille $G_{\alpha 12/13}$**

$G_{\alpha 12}$  et  $G_{\alpha 13}$  sont impliquées dans l'activation des GEF. Ceux-ci permettent le switch moléculaire de la protéine RhoA par l'échange de son GDP en GTP. La RhoA est une GTPase impliquée, notamment, dans les processus d'adhésion et de migration cellulaire via la régulation de la contractilité de l'actomyosine.

Il est à souligner que les récepteurs qui couplent à  $G_{\alpha 12/13}$  peuvent être, dans certains cas, activés par  $G_{q/11}$ .

### **Le complexe $G_{\beta/\gamma}$**

Lorsque la sous-unité  $\alpha$  se dissocie du complexe hétérotrimérique, les sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  restent associées entre elles à la membrane. Pendant de nombreuses années, la sous-unité  $\beta/\gamma$  était considérée comme une simple protéine servant d'échafaudage sans rôle particulier. Après de plus amples investigations, ce complexe a été corrélé à l'activation des « G-protein inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel » (GIRKs)(Lüscher & Slesinger, 2010).

Le complexe  $\beta/\gamma$  peut également activer la MAPK (« mitogen-activated protein kinase ») ERK1/2 (« extracellular signal-regulated kinases ») lorsqu'il est associé à la sous-unité  $G_i$ , qui, comme cité précédemment, est associée majoritairement à sa signalisation.

### *1.6.1.2 Régulation de la voie de signalisation protéine G dépendante*

Lors de l'activation des GPCR via la voie protéine G dépendante, une régulation à de multiples niveaux affine et complexifie les mécanismes de transduction du signal. Il existe 2 grands niveaux de régulation : au niveau du récepteur lui-même et au niveau de la protéine G.

#### *1.6.1.2.1 Régulation au niveau de la protéine G*

La modulation de l'activité des protéines G est assurée par différentes familles de protéines.

La première protéine permettant la modulation de leur activité est le récepteur lui-même.

En effet, comme dit précédemment, le récepteur possède une activité de GEF. L'échange de GDP en GTP exercé sur la protéine G permet son activation.

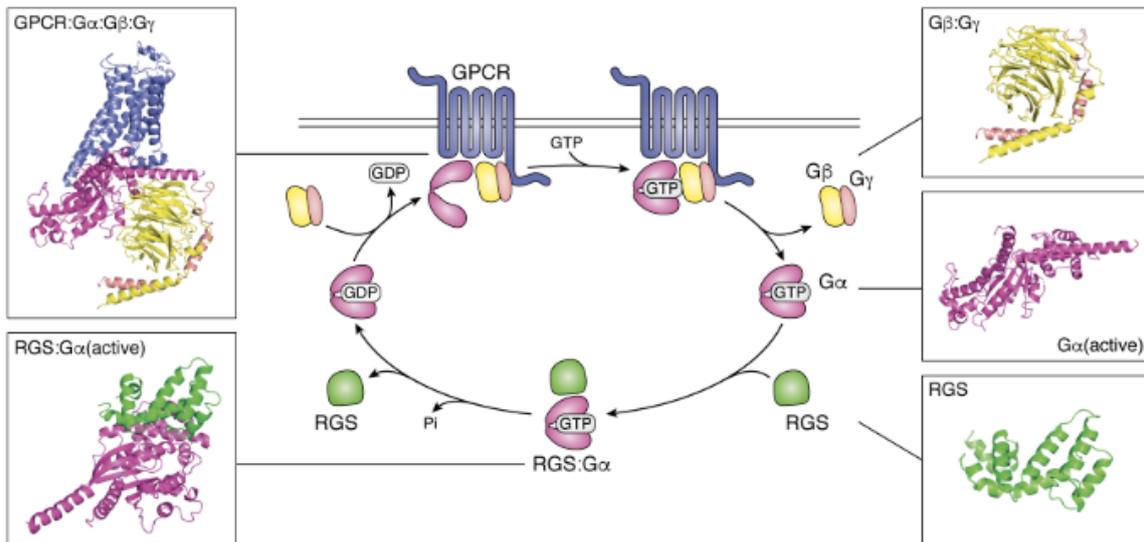
A l'inverse, d'autres protéines telles que les RGS (Regulator of G protein signaling) induisent l'hydrolyse du GTP en GDP sur la sous-unité  $\alpha$ , diminuant leur activation (Masuho et al., 2020).

**(Figure 10)**

#### *1.6.1.2.2 Régulation au niveau du récepteur*

Une fois le récepteur activé, plusieurs mécanismes de régulation assurent l'extinction du signal.

Les premiers mécanismes mis en place par la cellule sont la désensibilisation ainsi que l'internalisation du récepteur. D'autres mécanismes plus lents, comme une diminution transcriptomique du récepteur, peuvent survenir.



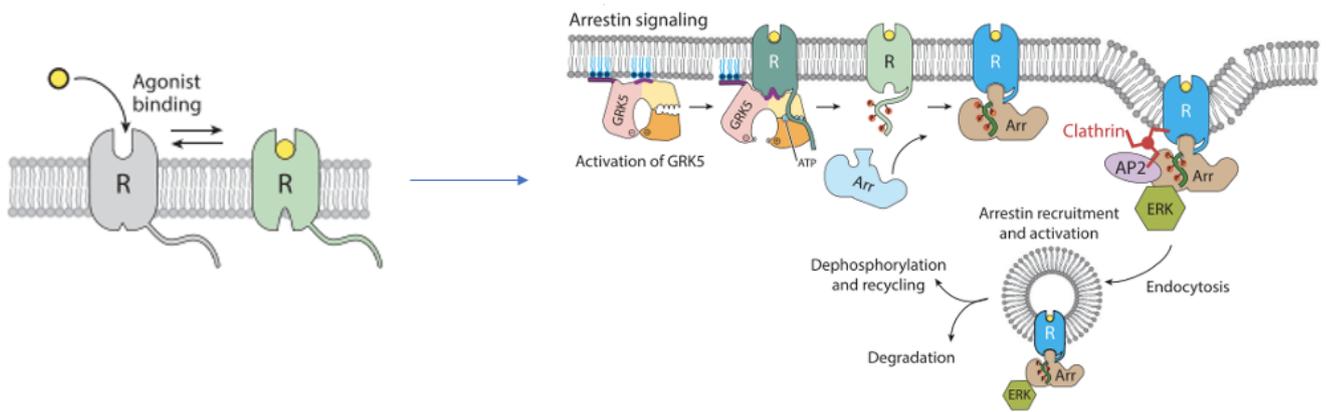
*Figure 10 : Cycle d'activation d'une protéine G régulé par les protéines RGS. D'après (O'Brien, Wilkinson, & Roman, 2019)*

#### 1.6.1.2.2.1 La désensibilisation

La désensibilisation d'un récepteur se définit comme la diminution de la réponse d'un stimulus lorsque celui-ci est continu. En d'autres termes, à une concentration en ligand constante, un récepteur verra son activation diminuée au fil du temps. Ce phénomène est, principalement, médié par le recrutement de l'arrestine, une protéine d'échafaudage.

Lorsque le récepteur est activé par son ligand, un changement conformationnel est induit. Cette conformation active permet l'interaction avec des protéines G mais également avec des protéines sérine/thréonine kinases nommées GRK (« G protein-coupled receptor kinase »). Ces protéines ont une affinité accrue pour les GPCR activés. Lors de son interaction avec le récepteur, la GRK est activée par un mécanisme allostérique. Une fois la protéine activée, les sérines/thréonines présentes à la queue C-terminale du récepteur seront phosphorylées. Ces phosphorylations permettent le recrutement de l'arrestine qui vient se fixer à la partie C-terminale du récepteur. L'arrestine crée alors un encombrement stérique qui empêche le couplage du récepteur avec les protéines G. (**Figure 11**)

Cependant, cette régulation est complexe. En effet, pour un même récepteur, la GRK ne phosphoryle pas toujours les mêmes résidus. Cela s'explique par une théorie dite de « code-barres ». Cette théorie explique ces différences de sites de phosphorylation par la plasticité conformationnelle des GPCR. En fonction du ligand, le GPCR n'aura pas la même conformation active. Ces différentes conformations actives entraîneront différentes phosphorylations par la GRK. Ces différentes phosphorylations formeront différents « code-barres » qui, *in fine*, favoriseront différentes voies de signalisation (Seyedabadi, Gharghabi, Gurevich, & Gurevich, 2021).



**Figure 11** : Schéma représentant le recrutement de l'arrestine suite à l'activation du récepteur. L'arrestine est recrutée grâce aux phosphorylations au niveau C-terminal d'une GRK. Le récepteur est ensuite endocyté et sera soit dégradé soit recyclé à la membrane. Adapté depuis Weis & Kobilka, 2018.

#### 1.6.1.2.2.2 L'internalisation

Une fois l'arrestine fixée au récepteur activé, une internalisation de celui-ci aura lieu. Il s'en suivra donc une diminution du nombre de récepteurs à la surface due à cette internalisation. A ce stade, le nombre de récepteurs total sera inchangé car il s'agit d'une simple redistribution des récepteurs membranaires au niveau intracellulaire par endocytose.

##### *1.6.1.2.2.2.1 Voie de signalisation moléculaire*

Lors du processus d'internalisation, l'arrestine sert principalement d'échafaudage pour recruter les acteurs clés de cette internalisation. Ces acteurs sont le complexe AP-2 ainsi que la clathrine. La clathrine est recrutée et se polymérise grâce à la protéine AP-2, ce qui va former une cage de clathrine. Cette cage déforme la membrane et permet la formation d'un puits. Ensuite, une enzyme, nommée dynamine, permet l'incision de la vésicule et ainsi l'internalisation du récepteur (Scott, Benmerah, & Marullo, 2004) (Boucrot & McMahon, 2011) (**Figure 12**).

Il faut noter qu'il existe d'autres voies alternatives d'internalisation indépendantes de l'arrestine telles que la cavéolisation. (Guo et al., 2015)

##### *1.6.1.2.2.2.2 Destin du récepteur internalisé*

Lorsque le récepteur est endocyté, celui-ci a deux destins. Le premier est le recyclage. Le recyclage consiste en la dissociation du complexe ligand/récepteur et à la déphosphorylation des résidus phosphorylés par la GRK. Ensuite, le récepteur est re-sensibilisé à la membrane.

Le deuxième destin possible est une dégradation du récepteur. Celui-ci est transporté vers les lysosomes où il est protéolysé.

Cette internalisation est déclenchée classiquement par les mêmes acteurs que la désensibilisation, c'est-à-dire une GRK et l'arrestine.

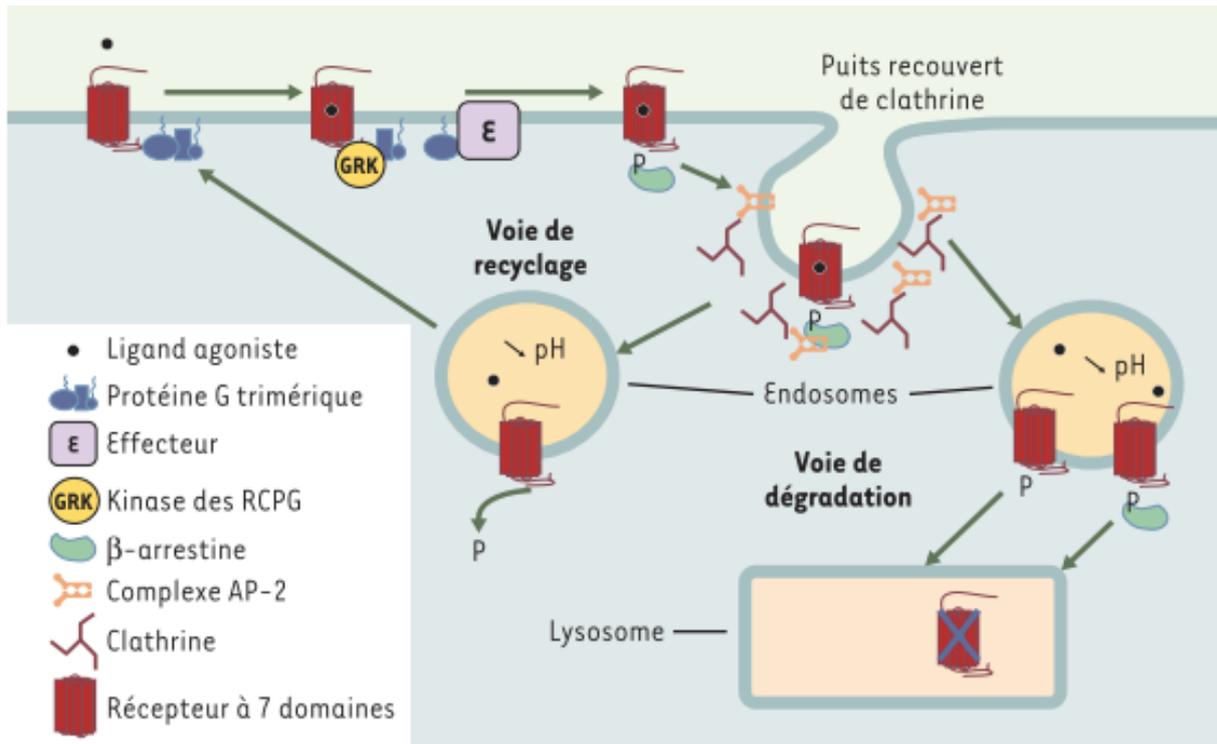


Figure 12 : Endocytose et devenir d'un GPCR après son activation. D'après Scott et al., 2004.

#### *1.6.1.2.2.3 Structure et isoforme de l'arrestine*

Il existe 4 isoformes de l'arrestine : deux isoformes impliquées dans la vision (arrestine-1 et arrestine-4) et deux dans les phénomènes non visuels (l'isoforme  $\beta$ -arrestine 1 et  $\beta$ -arrestine 2). Les arrestines visuelles sont exprimées uniquement au niveau rétinien tandis que les arrestines  $\beta$ 1/ $\beta$ 2 sont ubiquitaires (Seyedabadi et al., 2021). Seules les arrestines non visuelles seront abordées dans ce mémoire.

Les arrestines non visuelles sont principalement constituées de deux domaines : un corps polaire appelé « senseur de phosphate » qui permet notamment la reconnaissance des phosphorylations induites par GRK. Le deuxième domaine, lui, permet d'interagir avec le récepteur activé par le ligand. Ce sont donc ces deux domaines qui permettent le recrutement de la  $\beta$ -arrestine 1 et 2 au sein d'un récepteur activé.

Il est important de noter que certains récepteurs n'ont pas la même affinité pour la  $\beta$ -arrestine 1 et 2. Cette différence d'affinité dépend, principalement, de la structure du récepteur et conditionne le destin du récepteur lors de son internalisation. (Peterson & Luttrell, 2017)

En effet, il existe deux grandes classes de récepteurs en fonction de leur affinité pour les isoformes d'arrestine : la classe A et la classe B.

La classe A se caractérise par une affinité préférentielle pour la  $\beta$ 2 et ne fixe pas les arrestines visuelles. Ces récepteurs sont caractérisés généralement par une queue C-terminale ne contenant pas beaucoup de sérines ni de thréonines. Il en résulte une interaction transitoire avec la  $\beta$ -arrestine 2 lors des phénomènes de désensibilisation/internalisation, ce qui conduit généralement à un recyclage du récepteur plutôt qu'à sa dégradation.

A l'inverse, la classe B n'a pas d'affinité préférentielle pour la  $\beta$ 1 ou la  $\beta$ 2 et fixe les arrestines visuelles. Ces récepteurs possèdent généralement un nombre relativement élevé de sites de phosphorylation, ce qui permet une stabilisation du complexe avec l'arrestine. Cette stabilisation du complexe entraîne généralement la dégradation du récepteur internalisé plutôt que son recyclage. (Böttke et al., 2020)

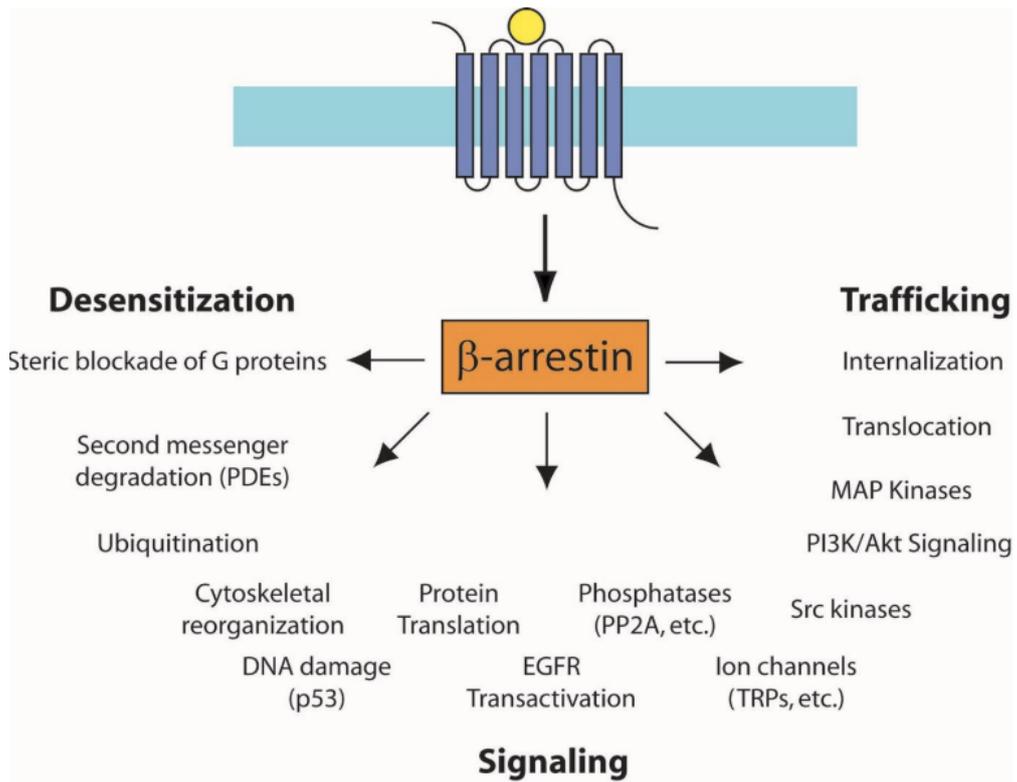
## 1.6.2 Voies protéine G indépendantes

Le dogme central que la signalisation des GPCR passe uniquement par les protéines G a rapidement été remis en cause. De plus en plus d'évidences quant à une signalisation indépendante des protéines G ont été mises en lumière (Heuss & Gerber, 2000). Certains auteurs préfèrent même utiliser le terme « récepteurs aux 7 domaines transmembranaires » plutôt que le terme « récepteurs couplés aux protéines G » (Brzostowski & Kimmel, 2001).

De nombreuses protéines interagissent avec les GPCR. Certaines d'entre elles vont avoir une activité enzymatique et d'autres auront plus le rôle de protéines adaptatrices permettant le recrutement de diverses protéines. Il semblerait que les interactions avec des partenaires atypiques se déroulent majoritairement au niveau C-terminal du récepteur ainsi qu'au niveau de l'ICL<sub>3</sub> (Heuss & Gerber, 2000).

Une des voies protéine G-indépendantes la plus connue est celle de la protéine tyrosine kinase c-SRC avec le récepteur adrénergique  $\beta$ 2. Il a été démontré que la  $\beta$ -arrestine pouvait servir de protéine échafaudage pour permettre le recrutement de la kinase c-SRC. Cette kinase pourra, par la suite, activer la voie des MAPK. Ce mécanisme n'est pas spécifique au récepteur  $\beta$ 2. On peut citer comme exemple le récepteur au glutamate mGluR1 qui, tout comme le récepteur  $\beta$ 2, recrute la protéine SRC potentiellement via l'arrestine. (Heuss & Gerber, 2000)

Ces mécanismes permettent également de remettre en cause le paradigme stipulant que la  $\beta$ -arrestine n'est qu'une protéine permettant la désensibilisation et l'internalisation du récepteur. Effectivement, il a été démontré que la  $\beta$ -arrestine servait de protéine échafaudage pour un nombre impressionnant de partenaires différents tels que ERK1/2, p38 ou encore c-jun (Peterson & Luttrell, 2017). L'arrestine peut donc intervenir dans différents processus cellulaires importants telles que l'activation des MAPK, le trafic cellulaire ou encore la régulation transcriptomique du récepteur (**Figure 13**). Cette diversité de partenaires peut s'expliquer par la plasticité des conformations que l'arrestine peut adopter en fonction du type de récepteur et des résidus phosphorylés, ce qui fait référence à la théorie du code-barres.



*Figure 13 : Spectre de fonctions médiées par la  $\beta$ -arrestine. D'après Smith & Rajagopal, 2016.*

## 1.7 Récepteurs atypiques

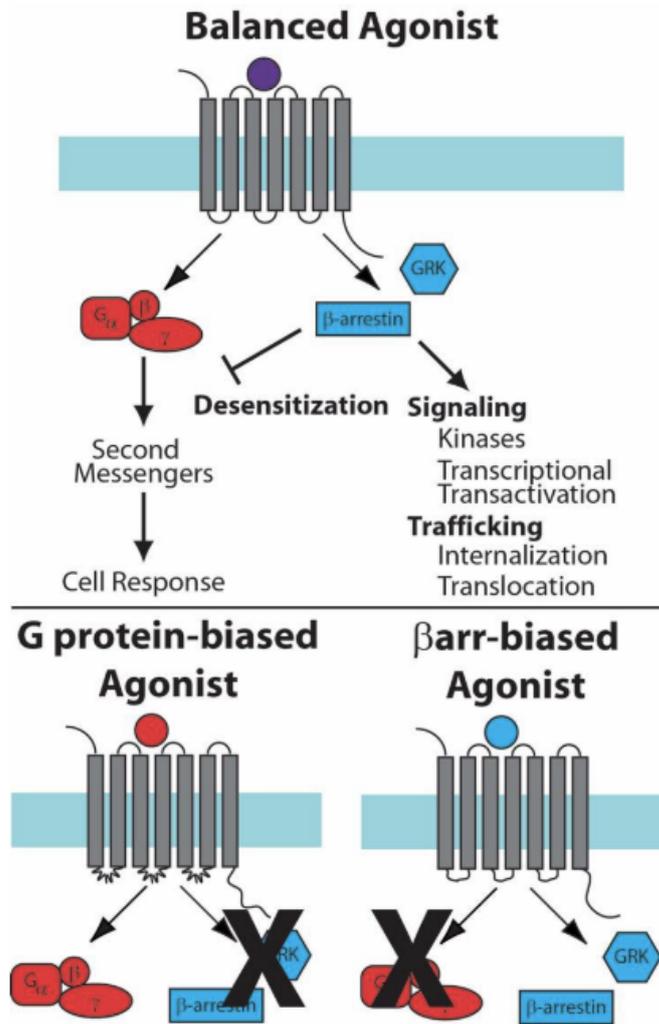
Comme expliqué précédemment, les partenaires du modèle d'activation classique des GPCR font intervenir les protéines G pour l'activation des effecteurs et l'arrestine pour la désensibilisation. Cependant, certains « GPCR » ne couplent pas aux protéines G et auront donc exclusivement des voies de signalisation protéine G-indépendante. Ce type de récepteur est nommé « atypique ». Certains récepteurs aux chémokines sont des récepteurs atypiques bien connus. Il a été mis en évidence par différents tests que ceux-ci ne couplent pas aux protéines G. Leur action se base essentiellement sur l'interaction du récepteur avec l'arrestine. (Meyrath et al., 2020)

A l'inverse il existe également des récepteurs qui sont couplés aux protéines G mais pas du tout à l'arrestine. Un exemple est le récepteur adrénergique  $\beta_3$  (Liggett, Freedman, Schwinn, & Lefkowitz, 1993).

## 1.8 Ligand biaisé

Un mécanisme important à prendre en compte en pharmacologie est le phénomène de « ligand biaisé » ou, autrement appelé, sélectivité fonctionnelle. Un ligand biaisé est caractérisé par une activation/efficacité préférentielle pour une voie de signalisation donnée d'un récepteur. En d'autres mots, un ligand pourra activer préférentiellement une voie de signalisation plutôt qu'une autre pour un récepteur donné (**Figure 14**). Cette notion peut paraître anodine mais est très utile pour le développement de médicaments. Il est possible, en théorie, d'utiliser des ligands biaisés comme médicaments pour permettre de cibler une voie spécifique impliquée dans une pathologie tout en réduisant le risque d'effets secondaires.

Un exemple parfait pour illustrer ce concept est le récepteur aux opiacés  $\mu$ . Les ligands de ce récepteur tels que la morphine permettent une action analgésique. Cette action est médiée par le couplage du récepteur à la sous-unité  $G_{\alpha i}$ . En revanche, il est connu que lors de la prise d'agonistes aux récepteurs opioïdes, des effets secondaires tels qu'une constipation, une dépression respiratoire ou encore des phénomènes de tolérance peuvent survenir. Ces effets secondaires sont principalement médiés par le recrutement de la  $\beta$ -arrestine 2. De ce fait, les firmes pharmaceutiques ont optimisé des ligands pour activer sélectivement la voie  $G_i$  pour réduire au maximum les effets secondaires. (Schann, Neuville, & Bouvier, 2014)



*Figure 14* : Principe du mécanisme d'action d'un ligand biaisé. Un ligand non biaisé activera les protéines G et en parallèle le recrutement de l'arrestine. En revanche, pour un ligand biaisé, une seule voie sera activée. D'après Smith & Rajagopal, 2016.

## 1.9 Les récepteurs orphelins

Un récepteur orphelin est un GPCR pour lequel aucun ligand endogène ainsi qu'aucune fonction physiologique n'ont pu lui être assignés. On en recense actuellement une centaine dans la classe des GPCR non visuels et principalement dans la classe des rhodopsines (Lin et al., 2020).

Selon l'«International Union of Basic and Clinical Pharmacology » (IUPHAR), un récepteur peut être retiré de la liste des orphelins seulement si au moins 2 laboratoires indépendants mettent en évidence un ligand qui active le récepteur et que celui-ci est présent en quantité suffisante dans les tissus humains. De plus, ce ligand doit être compatible avec une fonction physiologique (Davenport et al., 2013; Laschet, Dupuis, & Hanson, 2018).

La question légitime qui peut se poser est la suivante : pourquoi est-ce que ces récepteurs sont encore orphelins ?

C'est une question complexe comportant plusieurs éléments de réponses. La première raison est que certains GPCR peuvent exercer leur fonction sans nécessairement avoir besoin de ligand. Cette activation ligand-indépendante peut passer par une activité constitutive importante ou encore par des mécanismes d'hétérodimérisation avec d'autres récepteurs.

Une autre raison peut être que le ligand endogène est très instable ou difficile à extraire de son milieu, ce qui apporte une vraie difficulté pour le caractériser (Davenport et al., 2013). Un autre mécanisme peut être que la fixation du ligand sur le récepteur n'induit pas d'activation de celui-ci (exemple : GPR182).

L'élément le plus probable réside dans la conception des expériences destinées à caractériser le récepteur. Ces expériences analysent les voies d'activation classiques des GPCR. Ces stratégies expérimentales pourraient s'avérer peu fructueuses car des mécanismes plus exceptionnels ou non décrits pourraient passer inaperçu avec ce genre d'approches.

Il est donc important de développer des techniques permettant d'élucider ces voies atypiques (Laschet et al., 2018).

### 1.9.1 Approches expérimentales pour désorphaniser un récepteur

Les 4 grandes catégories d'outils permettant de caractériser un récepteur orphelin sont les suivantes :

- Les ligands de substitution
- Les mutants constitutivement actifs
- L'analyse d'interactions protéiques
- Les animaux transgéniques

Naturellement, ces techniques peuvent et doivent être complémentaires.

#### *1.9.1.1 Les ligands de substitution*

A défaut d'avoir découvert un ligand endogène au récepteur, des ligands synthétiques peuvent être utilisés. Cette stratégie est très intéressante pour permettre l'identification de la signalisation du récepteur voire même de sa fonction *in vivo*. De plus, la découverte de ligands synthétiques lors de campagnes de screening permet de mettre en évidence un pharmacophore qui, potentiellement, permettra la découverte du ligand endogène.

La clé du succès de cette stratégie réside dans la campagne de screening. De nombreuses bibliothèques de ligands sont disponibles. Les bibliothèques les plus connues sont les bibliothèques « SOSA » (« Selective Optimization of Side Activities ») et « DOS » (« Diversity-Oriented Synthesis ») basées respectivement sur le screening d'anciens médicaments et sur le balayage de la plus grande diversité de molécules possible.

En dehors de ces approches traditionnelles, d'autres approches prometteuses basées sur l'homologie, la structure 3D ou encore le screening virtuel sont à envisager. (Laschet et al., 2018)

### *1.9.1.2 L'analyse d'interactions protéiques*

Des méthodes de screening à haut débit permettent d'identifier les interactions protéiques d'un récepteur d'intérêt. La technique souvent utilisée est le « yeast two hybrid ». D'autres approches plus robustes telles que la co-précipitation et le BRET /FRET permettent également la mise en évidence de complexes protéiques mais ne sont pas compatibles avec une approche à haut débit. L'intérêt d'identifier des partenaires protéiques dans le cadre de récepteurs orphelins est très important. Étant donné que ces récepteurs sont orphelins, il est probable que ceux-ci utilisent une voie de signalisation atypique faisant intervenir des partenaires non-conventionnels. Cette analyse d'interaction protéique permet donc d'investiguer les voies classiques de signalisation mais également d'ouvrir le champ de possibilités avec d'autres interactions atypiques.

### *1.9.1.3 L'activité constitutive*

Pour s'affranchir de la découverte d'un ligand endogène ou synthétique, l'obtention de récepteurs mutants ayant une haute activité constitutive peut être envisagée. Il s'agit d'induire des mutations stabilisant la conformation active du récepteur. De ce fait, il sera possible de mimer l'activation du récepteur et donc de mieux caractériser ses voies de signalisation ainsi que sa fonction. Cette approche a déjà porté ses fruits par le passé, notamment avec le GPR83 (Müller et al., 2013).

### *1.9.1.4 Les animaux transgéniques*

Les animaux transgéniques sont un outil extrêmement puissant dans la détermination de la fonction d'une protéine. Cependant l'exploitation du phénotype peut être assez complexe. En effet, il n'est pas rare qu'une souris KO (« knock-out ») pour un récepteur semble bien portante, fertile et sans processus pathologique. Cependant, l'impact du génotype ne doit pas être minimisé. Le phénotype de la souris peut être délétère dans une condition bien particulière. Le plus complexe est de déterminer ces conditions. Un exemple peut être le récepteur  $\beta_2$ . Le phénotype d'une souris KO pour ce récepteur semble être normal jusqu'à ce qu'on challenge celle-ci via une exposition à une activité physique.

## I.10 La famille SREB

La famille SREB est une famille de GPCR comprenant trois membres : GPR27, GPR85 et GPR172. Ils ont été découverts par séquençage aléatoire d'ADN complémentaire en 1996 (Matsumoto et al., 1996, 2000).

Les SREB ont la particularité d'avoir environ 60% de similarité entre eux et ont été classés dans le groupe  $\alpha$  des récepteurs rhodopsines. En revanche, les SREB se distinguent de cette famille par l'absence de motifs conservés d'acides aminés tels que le motif D(E)RY ou encore Np<sub>x</sub>Y. Comme l'acronyme le sous-entend, ce sont des récepteurs extrêmement conservés au sein de l'évolution. Cette famille partage une similarité d'acides aminés de 94% entre les mammifères et le zebrafish. Ces récepteurs sont majoritairement exprimés au niveau du système nerveux central et au niveau des appareils reproducteurs (Matsumoto et al., 2000).

### I.10.1 GPR27

GPR27 est un membre de la famille des SREB et est un récepteur orphelin. Ce récepteur est constitué de 374 acides aminés et a la particularité d'avoir une ICL<sub>3</sub> très longue (**Figure 15**). Comme sa famille en général, ce récepteur a la particularité d'être extrêmement conservé au sein de l'évolution (97% de similarité d'acides aminés entre l'homme et la souris). L'ARN messenger de ce récepteur est détecté principalement au niveau du cerveau et plus particulièrement au niveau du noyau caudé, du putamen, de l'hippocampe et du noyau subthalamique. L'expression de l'ARNm a été également mise en évidence dans les organes sexuels tels que les ovaires, les testicules et la prostate mais également au niveau du cœur et du pancréas (Matsumoto et al., 2000).

La fonction de GPR27 est encore assez floue. Cependant, un rôle putatif dans la sécrétion de l'insuline est l'hypothèse la plus investiguée. Dans une étude de 2012, Ku *et al.* ont mis en évidence que le GPR27 agissait comme régulateur positif de la sécrétion d'insuline dans un modèle de lignées cellulaires pancréatiques (MIN6) via un screening par siARN. Ils ont également proposé que le GPR27 soit possiblement couplé à la sous-unité G<sub>αq</sub> (Ku, Pappalardo, Luo, German, & Mcmanus, 2012). Le couplage du GPR27 avec les protéines G est encore à l'heure actuelle un sujet controversé. Bien que l'équipe de Ku décrive un couplage à G<sub>q</sub>, d'autres chercheurs ne partagent pas ce point de vue. En effet, certains affirment que ce récepteur serait couplé de manière constitutive à la sous-unité G<sub>i</sub> (Martin, Steurer, & Aronstam, 2015) et d'autres chercheurs pensent que ce récepteur ne couple pas aux protéines G et serait donc atypique (Dupuis et al., 2017).

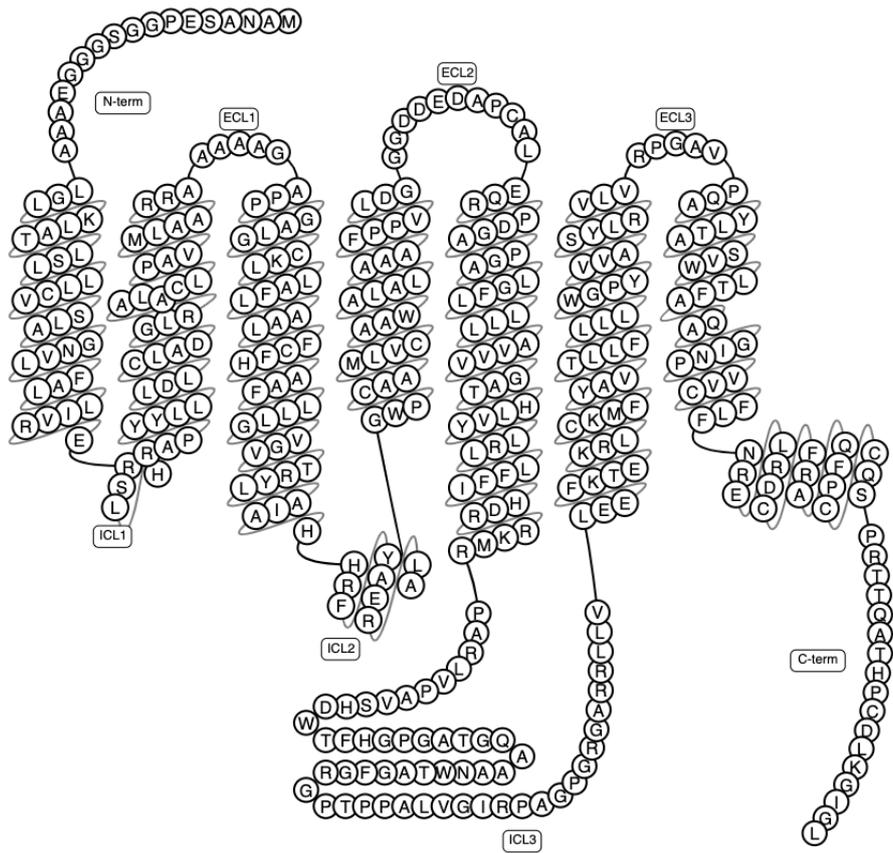


Figure 15 : Diagramme en serpent du GPR27. D'après le site « GPCRdb.com ».

Au niveau *in vivo*, des données issues de la génération d'une souris KO pour GPR27 ont été publiées. Le principal résultat est une diminution de près de 30% du taux de l'ARNm de l'insuline dans les îlots de Langerhans lorsqu'on invalide GPR27. Les scientifiques n'ont cependant mis en évidence qu'une intolérance au glucose modérée et une sensibilité à l'insuline normale. Ils ont néanmoins démontré que lorsque la souris était délétée pour GPR27, celle-ci avait un défaut de sécrétion d'insuline (Chopra, Yiv, Hennings, Zhang, & Ku, 2020).

Dans la même année, une autre équipe de chercheurs s'est intéressée à la délétion du GPR27 dans un modèle de zebrafish. Ils ont observé que lorsque l'on traite les larves avec de l'hydrocortisone (un glucocorticoïde), les larves KO avaient une augmentation de 57% du taux de glucose comparé aux larves sauvages (WT). De plus, lorsqu'ils ont nourri les larves avec de la nourriture riche en graisses, ils ont constaté que les larves KO avaient une augmentation de la glycémie plus élevée de 87% que le groupe WT. Pour expliquer cette différence de glycémie, les chercheurs ont voulu investiguer la sensibilité à l'insuline. Contrairement aux données collectées dans le modèle de souris KO, une diminution de la sensibilité aux injections d'insuline est observée chez le zebrafish KO. Les chercheurs ont donc émis l'hypothèse que la délétion du GPR27 menait à une résistance à l'insuline. De manière intéressante, ils ont également observé une augmentation d'acylcartinine laissant penser que la délétion de GPR27 pourrait toucher le métabolisme de la  $\beta$ -oxydation des acides gras, potentiellement en liaison avec une résistance à l'insuline (Nath et al., 2020).

Lors d'une campagne de screening dans des HEK293 via un test de complémentation, l'équipe de Julien Hanson a mis en évidence deux familles de ligands pour le GPR27. La première famille possède une structure de dichlorobenzamide et comprend notamment le composé ici nommé « 8535 ». La deuxième famille est constituée de glucocorticoïdes dérivés du clobetasol propionate (Dupuis, 2017). Dans des tests de complémentation, ces deux composés permettent le recrutement de la  $\beta$ -arrestine 2 au niveau de la partie C-terminale du récepteur.

## II. Matériel et méthodes

### II.1 Mutagenèse dirigée

Les oligonucléotides conçus pour permettre la délétion/substitution d'acides aminés désirée ont été synthétisés par la firme IDT (Coralville, Iowa, USA). La liste des différentes amorces utilisées se trouvent dans à l'**annexe 1**. Toutes les mutations ont été générées par le kit « Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit » de la firme New England Biolabs (Ipswich, MA, USA). Chaque plasmide contenant la mutation d'intérêt a été validé par un séquençage Sanger (Plateforme génomique du GIGA, Liège).

Toutes les mutations ont été réalisées à partir du plasmide nommé « pcDNA.ss.F.GPR27.NP ». Ce plasmide comprend donc la séquence WT du GPR27 humain cloné dans le plasmide pcDNA3.1<sup>+</sup> (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA). Une séquence flag (F) ainsi qu'une séquence signal « ss » sont présentes juste après la méthionine du codon « start » de l'insert. Du côté C-terminal du récepteur, un linker et la séquence codant pour une partie de la nanoluciférase (NP) sont également présentes (**Figure 16**).



*Figure 16 : Schéma de la construction du récepteur muté*

### II.2 Culture cellulaire

Les cellules « human embryonic kidney 293 » (HEK293) provenant de la firme « American Type Culture Collection » (référence CRL-1573, ATCC, Manassa, VA, USA) ont été cultivées en présence du milieu « Dulbecco's modified Eagle Medium » (DMEM) (Lonza, Verviers, Belgique). A ce milieu ont été rajoutés 10% de sérum fœtal bovin (International Medical Products, Bruxelles), 1% de pénicilline/streptomycine (Lonza, Verviers, Belgique) et 1% de L-glutamine (Lonza). Les conditions de culture sont une température de 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>.

## II.3 Transfection

Lorsque les cellules sont à environ 70-80% de confluence, une transfection des plasmides à l'aide d'« XtremGene 9 » (Roche, Madison, USA) est effectuée.

L'agent de transfection est dilué dans du milieu OPTI-MEM (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) à raison de 3µl de réactif pour 100µl d'OPTI-MEM. A ce milieu vient s'ajouter l'ADN des plasmides à transférer selon un ratio 3 :1 [xtremgene(µl) : ADN(µg)]. Une fois l'ADN injecté, une incubation de 15min à température ambiante a lieu.

Ensuite, le mix est ajouté goutte à goutte au milieu de culture cellulaire. La durée de transfection varie de 24 à 48h en fonction de l'expérience.

## II.4 Immunofluorescence

Les cellules HEK293 ont été mises en culture sur des lamelles coatées par de la D-lysine au fond d'une plaque 24 puits. Une transfection de 250ng d'ADN correspondant à celui du plasmide du mutant est effectuée dans chaque puits. Après 48h d'incubation à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>, les cellules ont été fixées par du paraformaldéhyde 4%. Les cellules ont été, ensuite, incubées pendant 15 min à température ambiante avec du NH<sub>4</sub>Cl (50mM dans du PBS). Après une série de lavages au PBS, les sites aspécifiques ont été bloqués par une solution de blocage comprenant 5% de FBS pendant 30min à température ambiante.

Les cellules ont été marquées via l'anticorps primaire (dilution 1/1000) Anti-Flag M2 (F3165) de Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA) pendant 1H30 à 20°C. Après lavage au PBS, l'anticorps secondaire IgG (H + L), F(ab')<sub>2</sub> anti-souris conjugué au fluorochrome Alexa 488 (dilution 1/1000) (Cell Signaling Technology Danvers, MA, USA) et le DAPI (5µg/ml)(Sigma-Aldrich) ont été mis en contact avec les cellules durant 1H30 à température ambiante.

Les lames ont été montées utilisant l'agent de montage « Prolong Diamond antifade mountant » (InvivoGen, San Diego, CA, USA).

L'acquisition des images s'est faite via le microscope confocal Nikon A1R.

## II.5 Test de complémentation à la nanoluciférase

### II.5.1 Principe

Ce test se base sur la complémentation de la nanoluciférase qui a été séparée en 2 parties distinctes. La première partie (NP) est fusionnée sur la queue C-terminale du récepteur GPR27 alors que la deuxième partie de la nanoluciférase (LgBit) est fusionnée à une protéine de signalisation. Dans notre cas, les protéines de signalisation d'intérêt sont la sous-unité  $\alpha$  de la protéine G et la  $\beta$ -arrestine (**Figure 17**). Si la mutation effectuée permet le couplage du récepteur aux protéines G, il existera un rapprochement physique entre le récepteur et la sous-unité alpha de la protéine G permettant une reconstitution de la nanoluciférase. En présence du substrat de l'enzyme, il sera possible de détecter un signal bioluminescent si la sous-unité  $\alpha$  interagit avec le récepteur.

### II.5.2 Méthodes

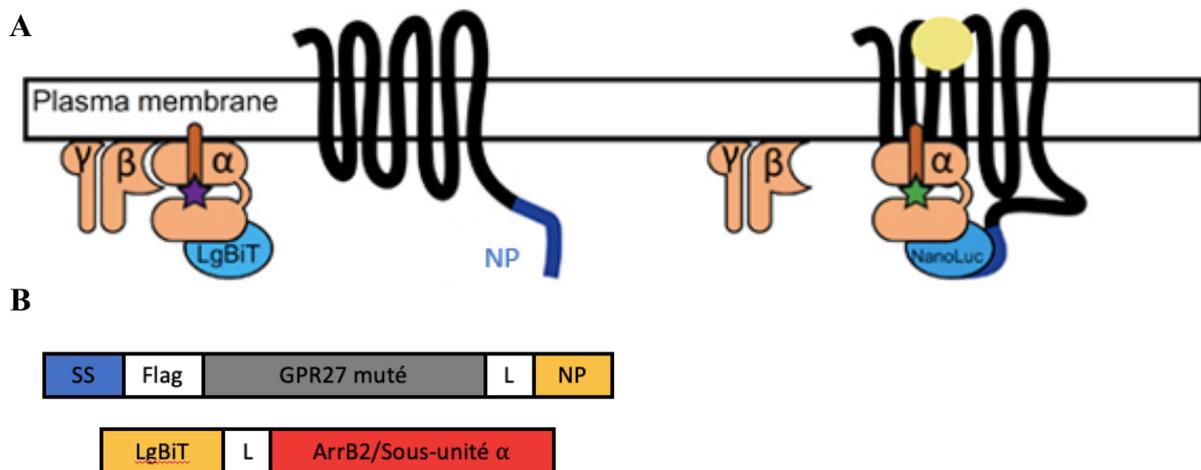
#### *II.5.2.1 Courbe concentration réponse*

Des cellules sont mises en culture dans des boîtes de 21,5 cm<sup>2</sup> jusqu'à atteindre une confluence de 80%. Une transfection de 24H avec un ratio 1 : 1 du plasmide codant pour le récepteur et le plasmide contenant protéine G ou l'arrestine est effectuée. Chaque plasmide est dilué 10 fois dans du pcDNA3.1<sup>+</sup> vide. Ensuite, les cellules sont trypsinisées et sont lavées avec du PBS. Le culot cellulaire est resuspendu dans du « Hank's Balanced Salt Solution » (HBSS) (Lonza) contenant la coelenterazine (50nM), le substrat de la nanoluciférase (Promega corporation). Les cellules sont mises dans une plaque à fond blanc 96 puits à raison de 50 000 cellules/puits, puis sont incubées durant 25 min à 37°C.

Ensuite, chaque puits est resuspendu avec 50 $\mu$ l du ligand dilué dans du HBSS et une lecture au luminomètre Centro XS<sup>3</sup> LB960 (Berthold Technologies) durant 5 minutes (temps de comptage de 0,5sec/puits) est effectuée.

L'aire sous la courbe de chaque condition est calculée puis normalisée par celle du contrôle correspondant aux cellules stimulées par le véhicule.

Un test de concentration-réponse à la PTX a été effectué. Ce test se basait sur le même mode opératoire décrit ci-dessus à l'exception du temps de transfection qui était de 48h. De plus, la PTX (Sigma-Aldrich) a été ajoutée à une concentration de 100ng/ml dans les milieux de culture 24h après la transfection.



Linker (L): GSSGGGSGGGGSSG

**Figure 17** : Principe du test de complémentation à la nanoluciférase. En **A**, la première partie de la luciférase (LgBiT) est fusionnée à la sous-unité  $\alpha$  de la protéine G. La deuxième partie de la nanoluciférase (NP) est fusionnée à la queue C-terminale du récepteur. En présence de son ligand, le récepteur s'active et la protéine G est recrutée. Cela reconstitue la nanoluciférase active (NanoLuc) qui émettra des photons en présence de luciférine. En **B**, construction du plasmide contenant GPR27 muté fusionné avec NP ainsi que la construction du plasmide contenant la sous-unité  $\alpha$  de la protéine G fusionnée à la LgBiT.

### II.5.2.2 Criblage des mutants

Des cellules HEK293 sont mises en culture dans une plaque 96 puits jusqu'à atteindre une confluence de 80% par puits. Une transfection de 48H avec un ratio 1 :1 d'ADN codant pour le récepteur et la protéine G est réalisée. Pour ce qui est de la  $\beta$ 2-arrestine, un ratio 1:2 est utilisé. Chaque plasmide est dilué 10 fois dans du pcDNA3.1<sup>+</sup> vide. Ensuite, le milieu est aspiré et remplacé par 50 $\mu$ l de HBSS contenant la coelenterazine (50nM). Après 25 min d'incubation à 37°C, 50  $\mu$ l du ligand dilué dans du HBSS est ajouté. Puis, une lecture au luminomètre Centro XS<sup>3</sup> LB960 durant 5 min (temps de comptage de 0,5sec/puits) est effectuée.

L'aire sous la courbe de chaque condition est calculée puis normalisée par celle du contrôle correspondant aux cellules stimulées par le véhicule

## II.6 Test de complémentation à la luciférase firefly

### II.6.1 Principe

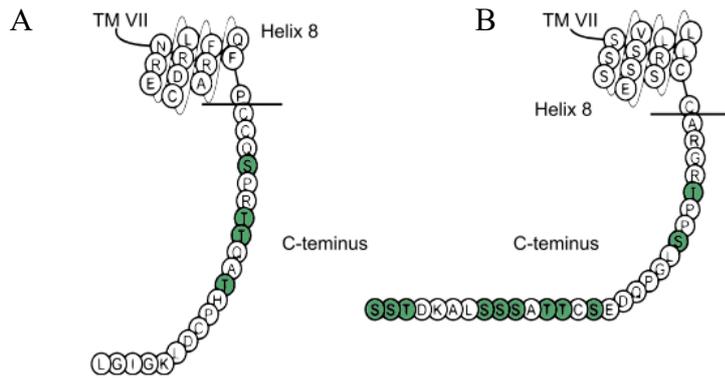
Le test permettant de cribler les ligands via une courbe concentration-réponse se base sur le même principe que le test de complémentation à la nanoluciférase expliqué précédemment. A noter qu'ici, ce n'est pas une nanoluciférase qui est employée mais une luciférase firefly.

L'autre différence majeure réside dans les modifications du récepteur. En effet, la queue C-terminale du récepteur a été remplacée par la queue C-terminale du récepteur V<sub>2</sub> (**Figure 18**). Le screening du ligand se base uniquement sur l'interaction entre le récepteur et la  $\beta$ -arrestine 2. De ce fait, en remplaçant la queue C-terminale du récepteur WT par celle du récepteur V<sub>2</sub> qui elle, est beaucoup plus riche en sérines/thréonines, cela permet un recrutement plus stable de la  $\beta$ -arrestine 2 (**Figure 19**)(Dupuis et al., 2017).

### II.6.2 Méthodes

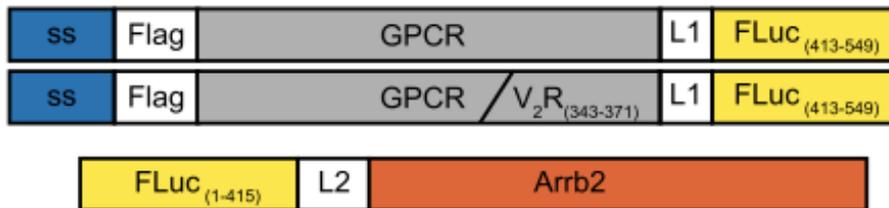
Après 24H de transfection, les cellules sont trypsinisées puis resuspendues dans du HBSS. Ensuite, 100 $\mu$ l de la suspension sont déposés dans chaque puits (+/- 50 000 cellules). A la resuspension cellulaire vient s'ajouter 1 $\mu$ l de ligand dans chaque puits à la concentration voulue. Après 25 min d'incubation à 37°C, la D-luciférine (500  $\mu$ M) est ajoutée. Ensuite, un mélange de 3 secondes suivi d'une lecture de la luminescence durant 5 min (0,5 sec/ puits) par le Centro XS<sup>3</sup> LB 960 reader sont effectués.

Pour chaque condition, l'aire sous la courbe est calculée puis normalisée par le contrôle correspondant aux cellules stimulées par le véhicule.



**Figure 18 :** *A. Queue C-terminale du récepteur GPR27 WT avec les sérines/thréonines en vert. B Queue C-terminale du récepteur V<sub>2</sub>.*

**A**



Linker 1 (L1): GSSGGG

Linker 2 (L2): GGGGS

**Figure 19 :** *Construction du plasmide contenant le récepteur et du plasmide contenant la  $\beta$ 2-arrestine. Comme le test à la nanoluciférase, le récepteur comprend une séquence signal (ss) et un flag (F). Le récepteur dispose d'un linker auquel vient se greffer la moitié de la luciférase firefly. L'autre moitié se trouve fusionnée du côté N-terminale de la  $\beta$ -arrestine 2 dans un plasmide distinct.*

### III. Objectifs et stratégie

Au sein de la famille des GPCR, certains motifs d'acides aminés sont très conservés au cours de l'évolution et sont impliqués dans le couplage aux protéines G. En ce qui concerne GPR27, la plupart de ceux-ci ne sont pas conservés, ce qui pourrait expliquer l'absence de couplage aux protéines G observé lors de travaux précédents dans le laboratoire. L'objectif de ce mémoire est de déterminer si les motifs spécifiques de GPR27, différant des motifs conservés dans les autres GPCR de classe A, lui confèrent son caractère atypique de ne pas coupler aux protéines G.

Pour confirmer cette hypothèse, des mutants de GPR27 vont être générés via mutagenèse dirigée afin de lui restaurer les différents motifs conservés par les autres récepteurs. Ensuite, le couplage aux protéines G de GPR27 et de ces mutants sera évalué dans un test de complémentation à la nanoluciférase. Si, en restaurant ces motifs, nous observons un couplage de GPR27 aux protéines G, cela confirmera que les motifs spécifiques de GPR27 sont effectivement responsables de son caractère atypique. Il a été démontré antérieurement au laboratoire qu'en présence d'un agoniste synthétique (nommé « 8535 »), la  $\beta$ -arrestine 2 était recrutée par GPR27 mais que la stimulation du récepteur avec cette molécule ne permet pas l'activation des protéines G. De ce fait, le couplage du récepteur avec l'arrestine en présence de ce ligand servira de contrôle positif.

Le test de complémentation à la nanoluciférase a été choisi car celui-ci se base sur un phénomène d'interaction récepteur/protéine G qui est un événement plus spécifique que les études de seconds messagers souvent utilisées. Une optimisation de ce test afin d'améliorer son amplitude d'effet est également un des objectifs principaux de ce mémoire.

## IV. Résultats

### IV.1 Génération de mutants

En parcourant la littérature, plusieurs motifs d'acides aminés conservés ont été identifiés pour étudier le couplage du GPR27 avec les protéines G ainsi que l'activation du récepteur. Ces motifs n'étant pas présents dans le GPR27 sauvage (WT), des mutations ont été induites pour reconstituer ceux-ci. La liste des mutations effectuées pour reconstituer les motifs conservés est reprise ci-dessous. Ces mutations ont été effectuées dans un plasmide d'expression contenant le GPR27 WT. Chaque mutation est reprise à la **figure 20**.

Après génération de la mutation par PCR dirigée et transformation bactérienne, les plasmides ont été purifiés et séquencés par un séquençage de Sanger afin de vérifier la présence de la mutation.

#### IV.1.1 Motif « PIF »

Dans la famille A des GPCR, un motif important pour le changement de conformation du récepteur de l'état inactif vers l'état actif se nomme « PIF ». Il est composé d'une proline en position 5.50, d'une isoleucine en 3.40 et d'une phénylalanine en 6.44 (Wacker et al., 2013). Au sein du GPR27, la proline a été remplacée par une leucine et l'isoleucine par une alanine. Le remplacement de la leucine par une proline en position 5.50 a donc été effectué afin de restaurer en partie le motif PIF. Cette mutation se nomme donc L5.50P. La première lettre désigne l'acide aminé présent dans le récepteur WT, le nombre représente la position de l'acide aminé selon la nomenclature de Ballesteros-Weinstein et la dernière lettre correspond à l'acide aminé qui remplace l'acide aminé naturellement présent dans le récepteur.

Une deuxième mutation, dans un autre plasmide, remplace l'alanine en position 3.40 en isoleucine pour restaurer l'isoleucine du « PIF ». Cette mutation se nomme A3.40I.

#### IV.1.2 L'ECL<sub>2</sub>

La 2<sup>ème</sup> boucle extracellulaire peut avoir des structures et des rôles très variés dans les GPCR. Le point commun de cette boucle est qu'elle participe à la formation ainsi qu'à la modulation de la poche de liaison. Elle peut faciliter la fixation du ligand dans certains récepteurs ou agir comme un « capuchon » du site orthostérique et empêcher la fixation du ligand (Woolley & Conner, 2017). Pour le récepteur GPR52, il a même été suggéré que l'ECL<sub>2</sub> permettait une activité basale élevée du récepteur (Lin et al., 2020).

Partant de l'éventualité que l'ECL<sub>2</sub> pouvait rendre imperméable le site orthostérique à un potentiel ligand endogène, un mutant ne contenant plus celle-ci a été généré.

#### IV.1.3 Motif NPxxY

Ce motif conservé dans le TM7 de la famille A des GPCR a un rôle essentiel dans la stabilisation et la formation de l'état actif permettant l'interaction avec la protéine G. Il permet notamment la stabilisation de l'interaction entre le TM3 et le TM5 qui forme l'interface essentielle pour la fixation de la sous-unité  $\alpha$  de la protéine G (Weis & Kobilka, 2018). Le motif NPxxY a été remplacé par NPxxC dans le GPR27. Une mutation pour remplacer cette cystéine par une tyrosine a été effectuée pour reconstituer le motif conservé (mutation C7.53Y).

#### IV.1.4 Motif DRY

Ce motif se trouve sur le TM3 et est également conservé dans la famille des rhodopsines. Ce motif est l'un des plus connus et étudiés pour le couplage des protéines G (Ballesteros et al., 1998). Son rôle est critique dans le couplage aux protéines G. Ce motif permet de former la poche de liaison de la protéine G avec le récepteur et interagit directement avec la sous-unité  $\alpha$  de la protéine G. Au sein du GPR27, ce motif DRY a été remplacé par un motif « TRY ». Un mutant substituant la tyrosine par un acide aspartique a été généré pour reconstituer ce motif DRY. Cette mutation s'appelle T3.49D.

#### IV.1.5 NPxxY-DRY

A partir du plasmide contenant la mutation DRY, une nouvelle mutation pour remplacer le motif NPxxC en NPxxY a été effectuée. Ce mutant comprend donc le GPR27 avec les motifs NPxxY et DRY reconstitués. Cette démarche a pour but de tester l'hypothèse selon laquelle l'absence de plusieurs motifs conservés empêcherait le GPR27 d'être couplé aux protéines G.

#### IV.1.6 « Rotamer toggle switch »

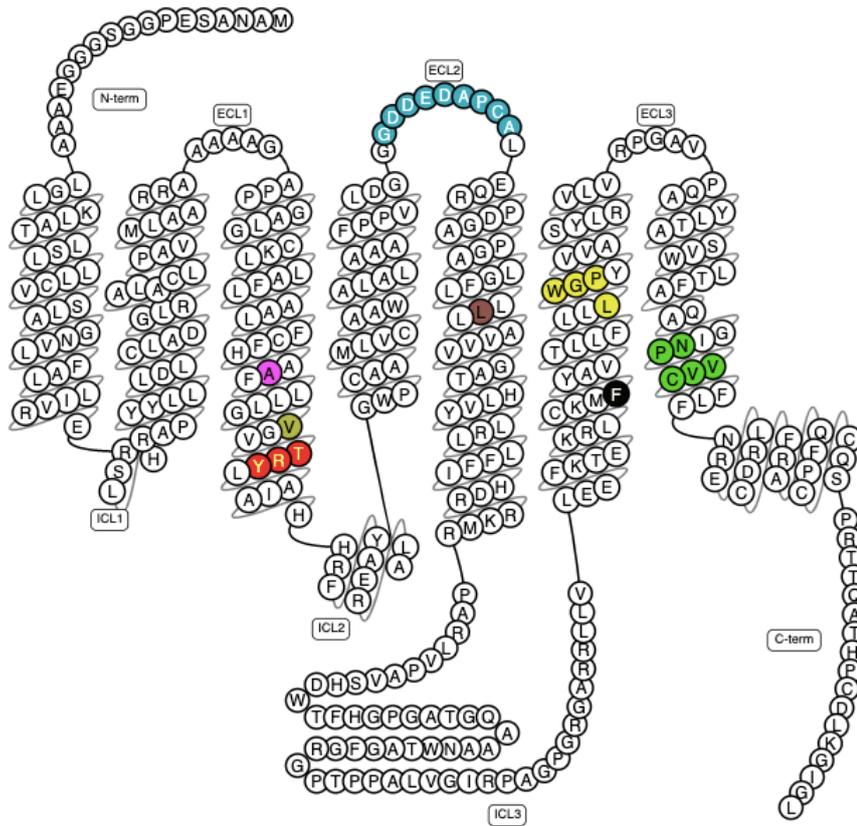
Le motif « CWxP » se trouve sur le TM6 des récepteurs de la famille des rhodopsines. Il est impliqué dans le phénomène de « rotamer toggle switch ». Ce mécanisme désigne le basculement conformationnel vers l'état actif du GPCR lorsque celui-ci est activé par le ligand. Ce motif permet l'écartement du TM6 qui est l'évènement clé du basculement conformationnel du récepteur vers son état actif (Trzaskowski et al., 2012). A nouveau, dans GPR27, ce motif n'est pas présent. La mutation L6.47C a donc été effectuée pour reconstituer ce motif.

#### IV.1.7 Mutation F6.37L

Cette mutation ne fait pas référence à un motif conservé particulier mais a été mise en avant dans un article portant sur l'étude par mutagenèse du récepteur adénosine A2B. A partir d'un modèle d'homologie basé sur plusieurs structures cristallographiques de GPCR appartenant à la famille A, ils ont prédit que la leucine 6.37 était un acide aminé interagissant avec la sous-unité  $G_{\alpha s}$ . Après analyse par mutagenèse, ils ont conclu que cette leucine était essentielle dans l'interaction avec les protéines G (Liu, Groenewoud, Peeters, Lenselink, & IJzerman, 2014). GPR27 ne possédant pas cette leucine en position 6.37, celle-ci a été rajoutée par substitution de la phénylalanine présente en position 6.37 du GPR27 sauvage.

#### IV.1.8 Mutation V3.46I

Tout comme F6.37L, cette mutation n'est pas contenue dans un motif conservé connu chez les rhodopsines. Par contre, dans une étude portant sur le récepteur GnRH, il a été mis en évidence que la substitution de l'isoleucine en valine au sein de ce récepteur abolissait totalement la transduction du signal du récepteur, indiquant potentiellement un rôle dans le couplage aux protéines G (Ballesteros et al., 1998). GPR27 possédant une valine à la position 3.46, celle-ci a été remplacée par une isoleucine.



**Figure 20** : Diagramme en serpent du GPR27 wild-type. En rouge, la séquence TRY subit la mutation T3.49D pour reconstituer le motif DRY. En vert, la séquence NpxxC subit la mutation C7.53Y pour reconstituer le motif NpxxY. En bleu, l'ECL<sub>2</sub> subit une délétion. En jaune, la mutation L6.47C est effectuée pour reconstituer le motif CWxP qui correspond au « rotamer toggle switch ». En noir, la phénylananine en position 6.37 subit une substitution par une isoleucine (mutation F6.37L). En rose, la mutation A3.40I est effectuée pour reconstituer en partie le motif PIF. En brun, la mutation L5.50P permet la reconstitution partielle du motif PIF. En kaki, la valine est remplacée par une isoleucine (mutation 3.46I).

## IV.2 Résultats séquençage

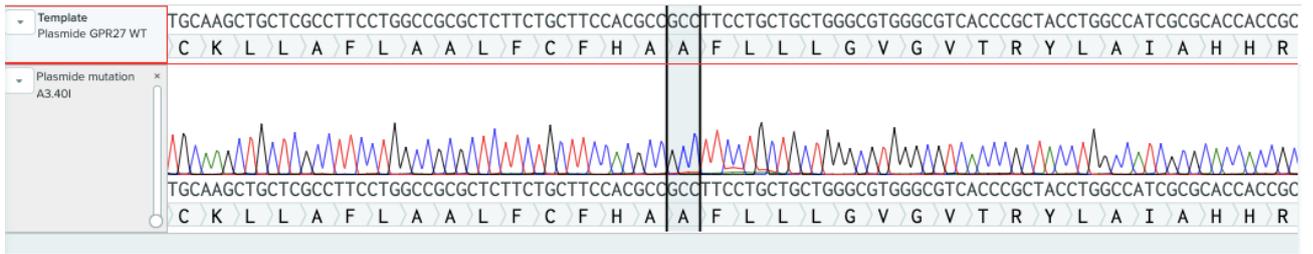
Les différents plasmides comprenant les mutations citées ci-dessus ont été envoyés à la plateforme de séquençage du GIGA. Ceux-ci ont séquençé les plasmides via la méthode de séquençage de Sanger. A titre d'exemple, voici les résultats reçus de plateforme de séquençage pour le séquençage du plasmide contenant la mutation L6.47C effectuée afin de reconstituer le motif CWxP, le « romater toggle switch » (**figure 21**). On peut distinguer la séquence d'ADN du GPR27 WT qui nous sert de guide en haut et en bas la séquence du plasmide mutant. Les séquences sous l'ADN correspondent à leur traduction en acides aminés.

Nous pouvons voir que dans le plasmide GPR27 sauvage, un motif LWxP est présent. En revanche pour la séquence du mutant, nous pouvons voir en rouge une substitution de 2 bases d'ADN (CTC en TGC) qui codent désormais pour une cystéine. Le motif CWxP a donc bien été restauré dans le plasmide mutant.



**Figure 21** : Résultat du séquençage du plasmide comportant la mutation L6.47C. Cette séquence est alignée à la séquence du plasmide contenant le GPR27 WT.

Toutes les mutations listées lors de la section précédentes ont été confirmées par séquençage excepté pour les plasmides correspondant à la mutation A3.40I (motif PIF) et V3.46I. Lors de l'analyse du séquençage, aucune différence entre le plasmide du GPR27 sauvage et le plasmide mutant n'a été observée (**Figure 22**). Ces plasmides n'ont donc pas été utilisés pour la suite des expériences.

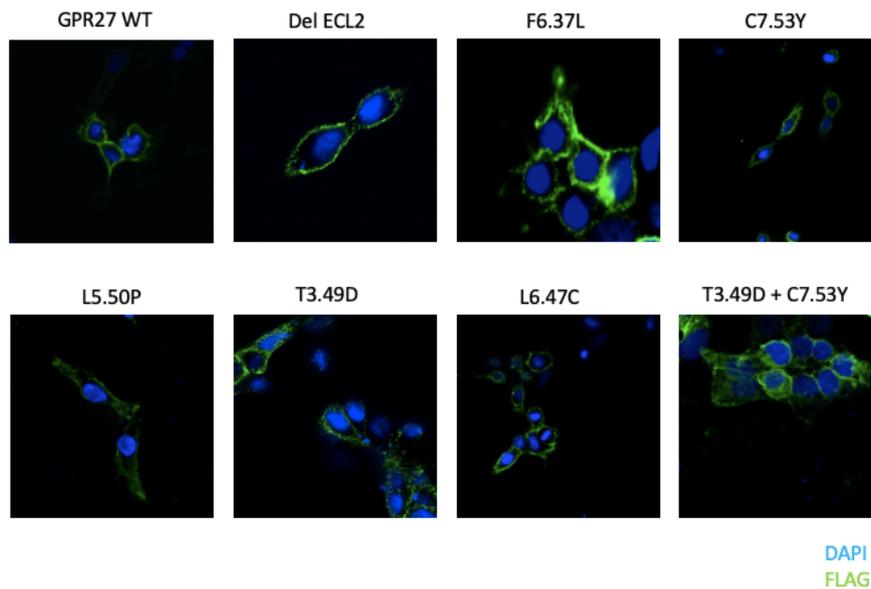
**A****B**

**Figure 22** : Résultat du séquençage du plasmide comportant la mutation A3.40I (motif PIF) en A et de la mutation V3.46I en B. Cette séquence est alignée à la séquence du plasmide contenant le GPR27 WT.

### IV.3 Marquage par immunofluorescence des mutants

Pour confirmer l'expression des mutants à la membrane, ceux-ci ont été transfectés dans des cellules HEK293 puis marqués par un anticorps dirigé contre la séquence « FLAG » qui est présente à l'extrémité N-terminale de chaque récepteur mutant (**Figure 23**).

Les différents GRP27 mutants semblent tous être exprimés à la membrane.



**Figure 23** : Marquage par immunofluorescence des mutants marqués par la séquence FLAG. La coloration bleue correspond aux noyaux marqués par le DAPI et la coloration verte correspond aux récepteurs mutants marqués par l'anticorps anti-flag.

## IV.4 Test des mutants

Deux tests de complémentation basés sur différentes luciférase sont disponibles au laboratoire pour tester les différentes mutations induites dans GPR27. Le premier test de complémentation se base sur la complémentation de la luciférase firefly après interaction entre la  $\beta$ -arrestine 2 et le GPR27 dont la queue C-terminale a été remplacée par celle du récepteur  $V_2$  (GPR27 $V_2$ ) (voir principe dans le matériel et méthodes). Jusqu'à présent, le test de complémentation de la luciférase firefly mesurant l'interaction entre le récepteur chimère GPR27 $V_2$  et la  $\beta$ -arrestine 2 est utilisé au sein du laboratoire de pharmacologie moléculaire comme test de criblage. Cependant, ce test nécessite l'utilisation du GPR27 $V_2$  afin d'être assez sensible. Le développement d'une nouvelle luciférase plus brillante comme la nanoluciférase pourrait permettre l'utilisation du GPR27 sauvage dans les tests de criblage mesurant l'interaction avec la  $\beta$ -arrestine 2 et éviter ainsi l'utilisation d'un récepteur chimère. Ce deuxième test, se basant sur la complémentation de la nanoluciférase, pourrait permettre d'étudier à la fois l'interaction du récepteur GPR27 sauvage avec les protéines G et la  $\beta$ -arrestine 2.

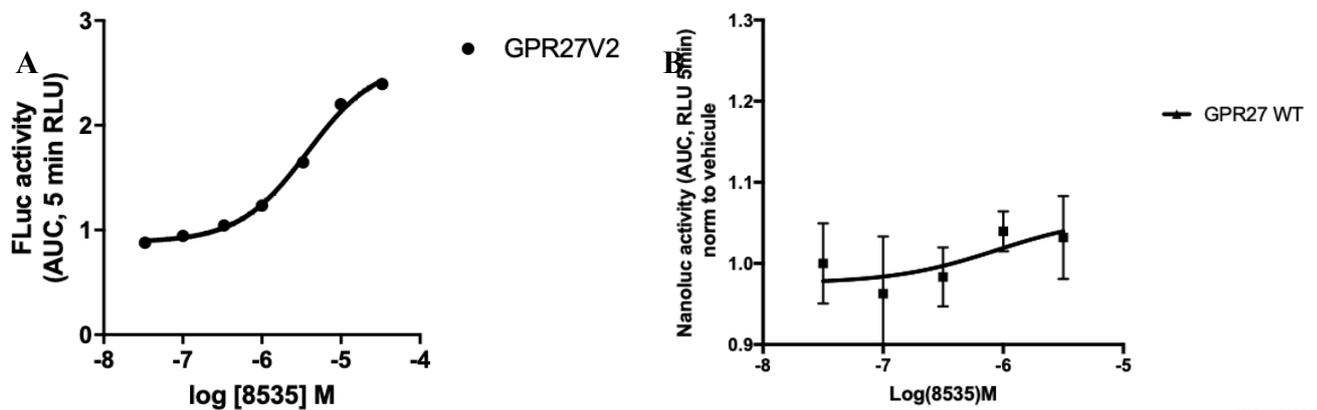
Pour étudier l'interaction des protéines G avec les mutants de GPR27, le choix s'est donc porté sur l'utilisation du test de complémentation à la nanoluciférase pour plusieurs raisons. Premièrement, ce test, contrairement à celui basé sur la luciférase firefly, permet l'utilisation du GPR27 sauvage et non d'un récepteur modifié. Deuxièmement, la nanoluciférase est plus sensible et d'une taille plus petite que la luciférase firefly, diminuant ainsi d'éventuelles perturbations pharmacologiques des GPCR (Dixon et al., 2016).

#### IV.4.1 Mise au point du test de complémentation basé sur la nanoluciférase

Avant de commencer à tester les différentes mutations effectuées sur GPR27, une comparaison entre le test utilisant la firefly et celui utilisant la nanoluciférase a été réalisée. Cette mise au point a pour but de mettre en évidence si l'utilisation de la nanoluciférase permettrait d'augmenter l'amplitude du signal produit par l'interaction du GPR27 sauvage et de la  $\beta$ -arrestine 2 après stimulation avec son ligand synthétique, le 8535. Pour rappel, le 8535 est le ligand synthétique découvert par le laboratoire de pharmacologie moléculaire qui agit comme un agoniste du GPR27 et permet le recrutement de l'arrestine

Pour le test à la firefly, le 8535 possède une  $pEC_{50}$  de  $5,4 \pm 0,052$  avec un  $E_{max}$  de  $2,60 \pm 0,054$ . Pour le test à la nanoluciférase, le 8535 a une  $pEC_{50}$  de  $6,05 \pm 1,22$  ainsi qu'une  $E_{max}$  de  $1,06 \pm 0,71$  (**Figure 24**).

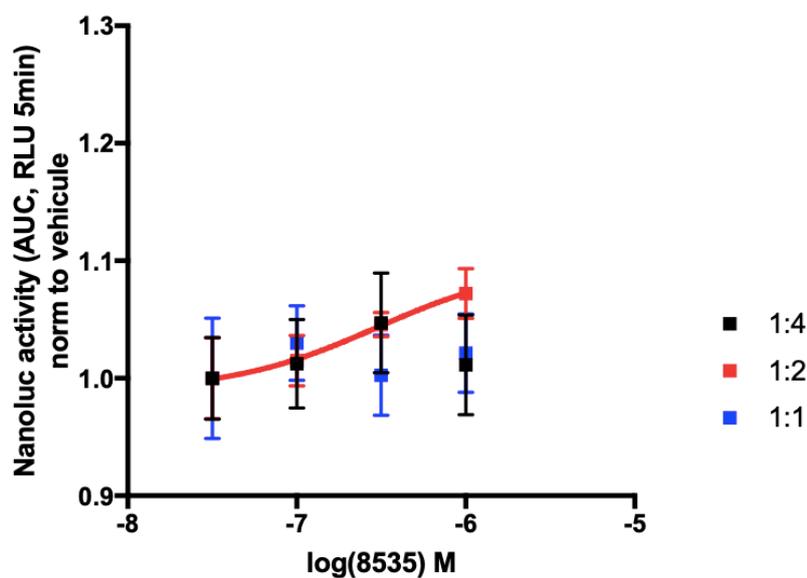
Comparé au test à base de firefly, la nanoluciférase possède une amplitude d'effet plus faible. Afin de pouvoir profiter des avantages du test à la nanoluciférase cités précédemment, une optimisation de celui-ci a été réalisée.



*Figure 24* : Courbe concentration-réponse du test de complémentation de la  $\beta$ -arrestine 2 avec le GPR27 sauvage stimulé avec différentes concentrations de 8535. En **A**, ce test est effectué avec la luciférase firefly et en **B** avec la nanoluciférase.

#### IV.4.1.1 Optimisation des ratios de transfection

Le premier paramètre à avoir été optimisé est le ratio d'ADN de transfection entre le plasmide codant pour GPR27 et le plasmide codant pour la  $\beta$ -arrestine 2. Trois ratios différents ont été testés : 1:1 (plasmide du GPR27 : plasmide de la  $\beta$ -arrestine 2), 1:2 et 1:4 (**figure 25**).



*Figure 25* : Courbe concentration-réponse du test de complémentation de la  $\beta$ 2-arrestine avec le GPR27 WT stimulé avec différentes concentrations de 8535. Différents ratios de transfection ont été testés : 1:1 (plasmide du GPR27 : plasmide de la  $\beta$ 2-arrestine), 1:2 et 1:4

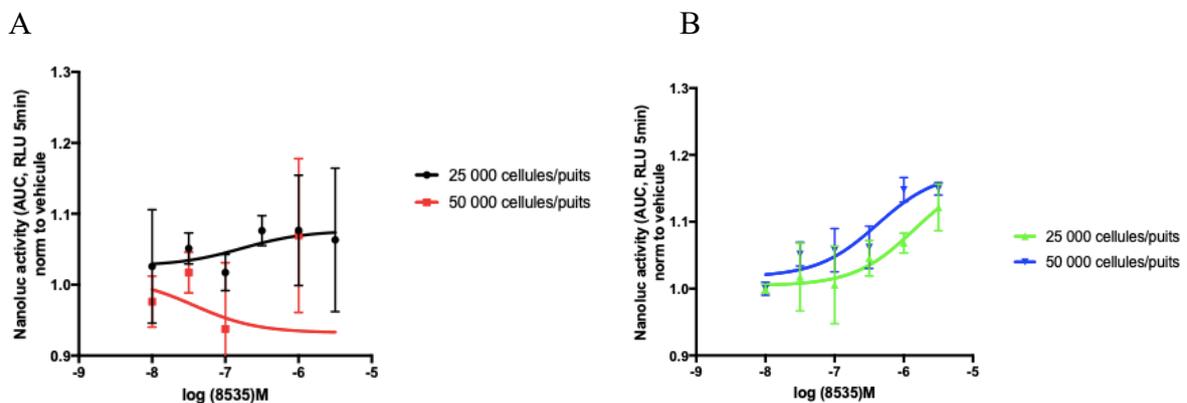
L'écart-type des différents points est très élevé. On n'observe aucune différence entre les ratios 1:4 et 1:1 pour lesquels il est impossible de déterminer une  $EC_{50}$ . En revanche, pour le ratio 1:2 une courbe pharmacologique est extrapolable avec une  $pEC_{50}$  de  $7,29 \pm 1,35$  et une  $E_{max}$  de  $1,05 \pm 0,019$ . Ce ratio 1:2 est utilisé pour la suite des autres expériences.

#### IV.4.1.2 Optimisation du nombre de cellules ainsi que du volume du ligand

Les prochaines conditions optimisées sont le nombre de cellules par puits ainsi que le volume de ligand utilisé par puits pour stimuler les cellules (**Figure 26**). Il n'existe pas de différence majeure lorsqu'on passe de 25 000 à 50 000 cellules par puits.

Par contre, lorsque les puits sont stimulés par un volume de 50  $\mu$ l de ligand concentré 2x à la place de 1  $\mu$ l de ligand concentré 100x, une augmentation de l'amplitude du signal est observée avec une  $E_{max}$  de  $1,17 \pm 0,024$  et une  $pEC_{50}$  de  $6,382 \pm 0,27$ . Le protocole utilisant 1  $\mu$ l de composé (100x) possède une amplitude d'effet plus faible ( $E_{max} = 0,93 \pm 0,056$ ) et une grande variation de signal.

Pour les prochaines expériences, une concentration cellulaire de 50 000 cellules par puits ainsi qu'une stimulation par 50  $\mu$ l de ligand (2x) par puits seront utilisées.



**Figure 26** : Courbe concentration-réponse du test de complémentation de la  $\beta$ -arrestine 2 avec le GPR27 WT stimulé avec différentes concentrations de 8535. En **A**, une comparaison de l'impact du nombre de cellules lorsque 1  $\mu$ l de ligand concentré 100x est ajouté par puits. En **B**, cette comparaison s'effectue lorsque 50  $\mu$ l de ligand concentré 2x sont ajoutés.

#### IV.4.1.3 Comparaison de deux protocoles

La dernière optimisation du test a été la comparaison de deux protocoles. Le protocole A, préconisait une incubation de la coelenterazine (le substrat de la nanoluciférase) avec les cellules avant de les disposer en plaque. Pendant ce temps, le ligand était déjà ajouté dans la plaque vide. Lorsque les cellules ont terminé leur incubation, celles-ci sont ajoutées dans les puits contenant le ligand puis lues au luminomètre.

Le protocole B lui, stipulait d'incuber les cellules avec la coelenterazine dans la plaque 96 puits puis d'ajouter le ligand dans les puits juste avant la lecture.

En plus de ces 2 protocoles, 2 temps d'incubation de la coelenterazine ont également été comparés (15 min et 25 min) (**figure 27**).

La différence entre 15 min et 25 min d'incubation de la coelenterazine ne semble pas influencer les résultats du test de complémentation. En revanche, le protocole B (incubation des cellules dans la plaque 96 puits) semble diminuer la variabilité des résultats comparé au protocole A. De plus l' $E_{max}$  après 25 min d'incubation de la coelenterazine est plus élevée pour le protocole B ( $1,34 \pm 0,068$ ) que le protocole A ( $1,10 \pm 0,045$ ).

Le protocole B ainsi qu'une incubation de 25 min seront utilisés pour tester les mutants. Le protocole optimisé et utilisé par la suite est détaillé dans la section « matériel et méthodes ».

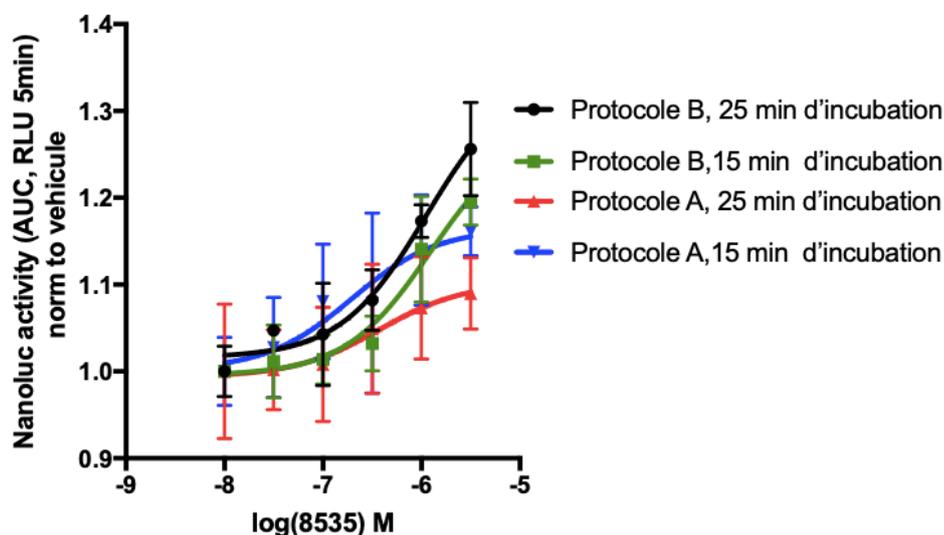


Figure 27 : Courbe concentration-réponse du test de complémentation de la  $\beta$ -arrestine 2 avec le GPR27 sauvage stimulé avec différentes concentrations de 8535. Les protocoles A et B sont comparés et testés avec 2 temps d'incubation de coelenterazine différents : l'un à 15 et l'autre à 25 min.

#### IV.4.2 Etude du couplage aux protéines G

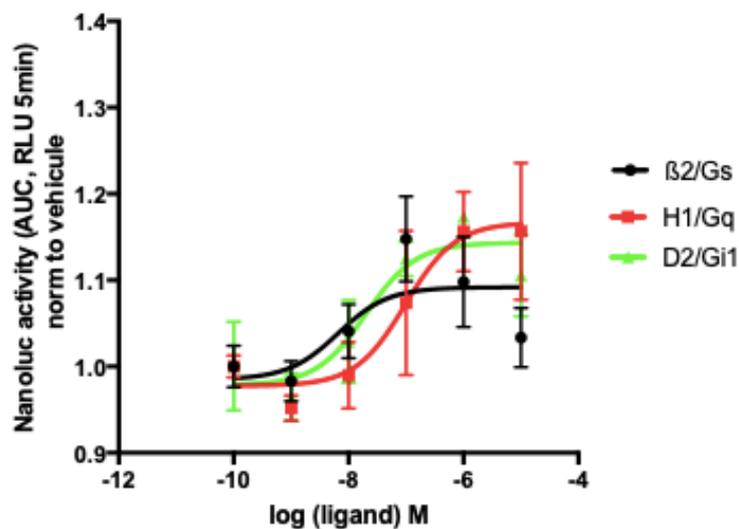
Afin de mettre en place un test évaluant l'interaction des différents mutants de GPR27 avec plusieurs sous-unités  $\alpha$ , différents GPCR connus pour interagir avec  $G_{i1}$ ,  $G_q$  et  $G_s$  sont stimulés avec leurs agonistes respectifs et serviront de contrôles positifs. Cette expérience a pour but de confirmer que le test de la nanoluciférase optimisé permet la détection du couplage aux protéines G de différents GPCR.

La liste des GPCR utilisés comme contrôles positifs de différentes protéines G est présente dans la **table 1** :

Récepteur	Sous-unité $\alpha$	Ligand
D <sub>2</sub>	G <sub>i1</sub>	Dopamine
H <sub>1</sub>	G <sub>q</sub>	Histamine
$\beta_2$	G <sub>s</sub>	Isoprénaline

*Table 1 : Tableau reprenant les différents GPCR utilisés comme contrôle positif pour différentes protéines G ainsi que le ligand utilisé pour les stimuler.*

Lorsque ces couples de récepteurs/protéines G sont transfectés dans des HEK293, un recrutement de leur protéines G respectives est observé de manière concentration-dépendante (**Figure 28**).



*Figure 28 : Courbes concentration-réponse du test de complément de différents couples GPCR/protéine G stimulés par leurs ligands respectifs.*

Après avoir confirmé la détection du recrutement des sous-unités  $G_s$ ,  $G_q$ ,  $G_{i1}$  après activation de différents GPCR, un contrôle négatif visant à tester le recrutement de ces différentes protéines G avec le GPR27 sauvage stimulé par le 8535 a été réalisé.

Cette expérience a pour but de confirmer l'hypothèse que le GPR27 ne couple pas aux protéines G dans un test mesurant directement l'interaction récepteur et protéine G.

Lors de l'analyse de l'interaction de ces 3 sous-unités avec le GPR27 stimulé à différentes doses de 8535, il a été constaté que seule l'interaction de GPR27 avec la  $\beta$ -arrestine 2 induit une augmentation du signal de complémentation de la nanoluciférase. Le signal bioluminescent diminue de manière concentration-dépendante pour les sous-unités  $G_s$ ,  $G_q$  et  $G_{i1}$  (**figure 29**).

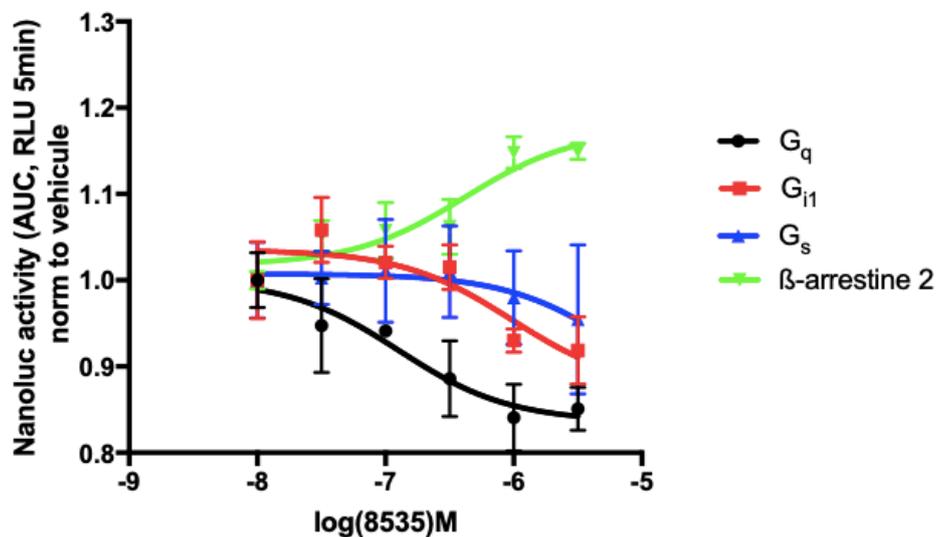
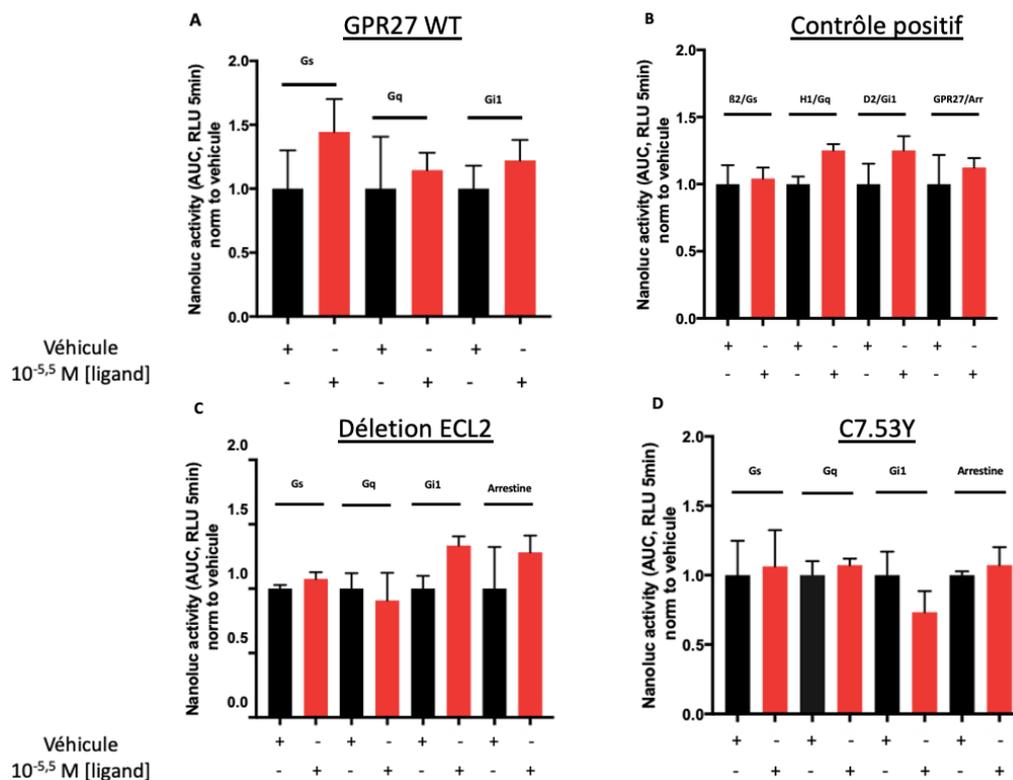


Figure 29 : Courbe concentration-réponse de l'interaction du GPR27 sauvage avec les sous-unités  $G_s$ ,  $G_q$ ,  $G_{i1}$  et la  $\beta$ 2-arrestine stimulé par différentes concentrations de 8535. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la moyenne.

#### IV.4.3 Criblage du couplage aux protéines G des différents mutants de GPR27

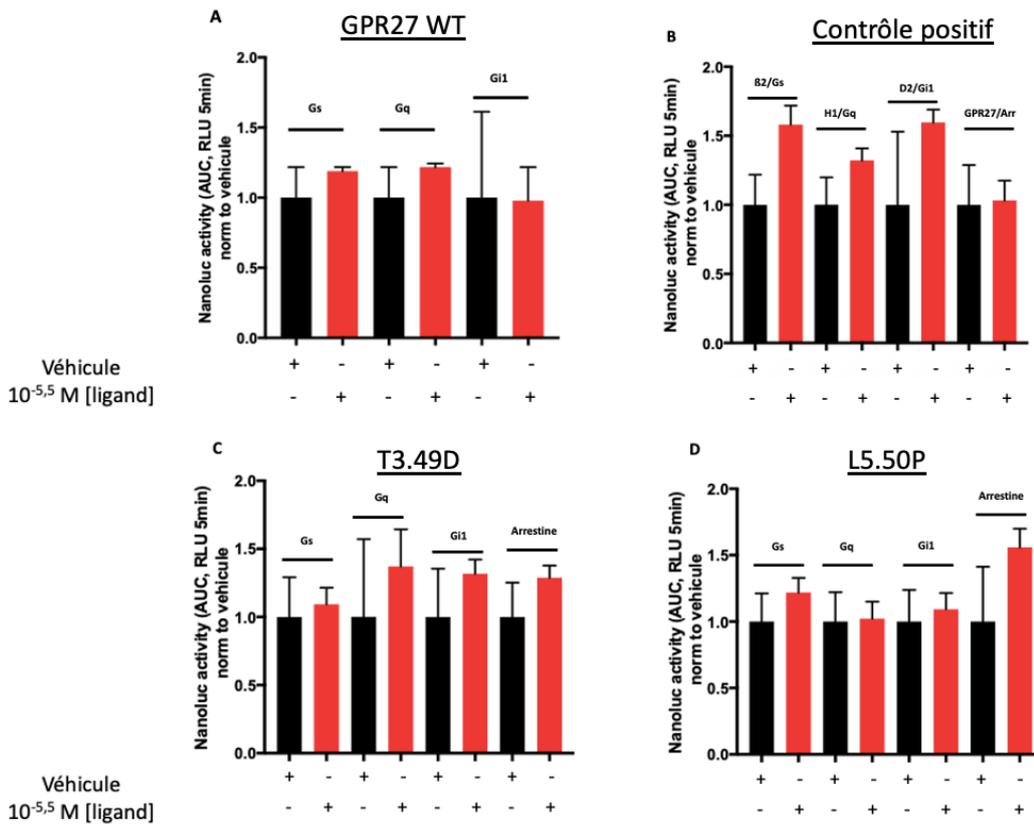
L'évaluation de l'interaction des protéines G avec les différents mutants de GPR27 confirmés par séquençage a été effectuée. Les sous-unités  $G_s$ ,  $G_q$ ,  $G_{i1}$  et la  $\beta$ -arrestine 2 ont été analysées après stimulation avec le 8535 à  $3.16 \mu\text{M}$ . Les couples GPCR/sous-unité  $\alpha$  stimulés par leurs ligands respectifs figurant dans le **tableau 1** utilisés lors de l'expérience précédente sont également testés comme contrôles positifs pour valider le test (**Figure 30-32 B**). Les interactions entre les différentes sous-unités  $\alpha$  et le GPR27 sauvage sont également testées et serviront de référence (**Figure 30-32 A**).

Tout d'abord, le mutant comprenant la délétion de l'ECL<sub>2</sub> (DeleCL<sub>2</sub>) ainsi que le mutant C7.53Y (motif NPxxY) ont été testés (**Figure 30**).

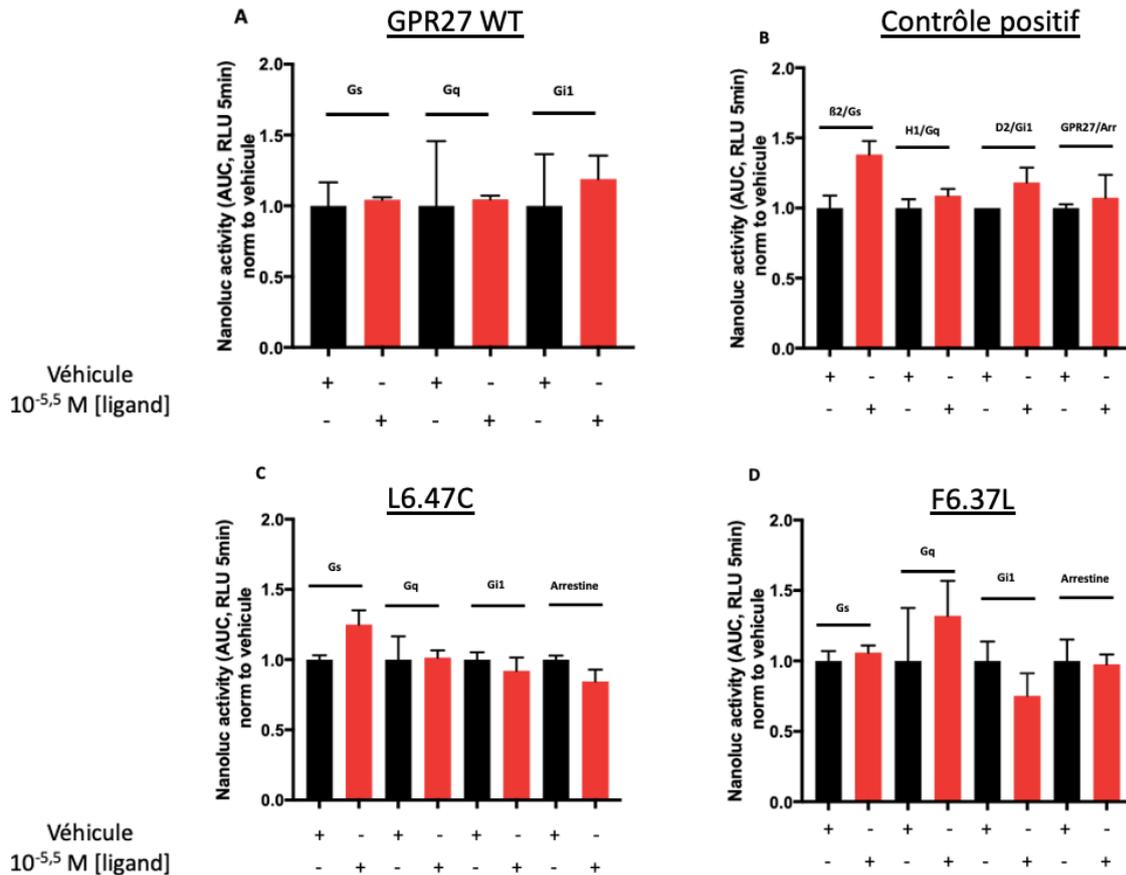


**Figure 30** : Criblage de l'interaction de différentes protéines avec les mutants générés. En **A**, le GPR27 WT a été criblé en présence des sous-unités  $G_s$ ,  $G_q$  et  $G_{i1}$ . Le ligand servant à la stimulation correspond au 8535. En **B**, les différents récepteurs contrôles sont stimulés par leurs ligands respectifs. En **C**, le mutant comprenant la délétion de l'ECL<sub>2</sub> et en **D** le mutant C7.53Y sont stimulés par le 8535 et comparés au véhicule.

Ensuite, les mutants T3.49D (motif DRY) et L5.50P (motif PIF) ont été analysés (**Figure 31**). Les résultats correspondant à la **figure 32** concernent l'analyse des mutants L6.47C et F6.37L.



**Figure 31** : Criblage de l'interaction de différentes protéines avec les mutants générés. En **A**, le GPR27 WT a été criblé en présence des sous-unités G<sub>s</sub>, G<sub>q</sub> et G<sub>i1</sub>. Le ligand servant à la stimulation correspond au 8535. En **B**, les différents récepteurs contrôles sont stimulés par leurs ligands respectifs. En **C**, le mutant comprenant la mutation T3.49D et en **D** le mutant L5.50P sont stimulés par le 8535 et comparés au véhicule.



**Figure 32** : Criblage de l'interaction de différentes protéines avec les mutants générés. En **A**, le GPR27 WT a été screené en présence des sous-unités  $G_s$ ,  $G_q$  et  $G_{i1}$ . Le ligand servant à la stimulation correspond au 8535. En **B**, les différents récepteurs contrôles sont stimulés par leurs ligands respectifs. En **C**, le mutant comprenant la mutation L6.47C et en **D** le mutant F6.37L sont stimulés par le 8535 et comparés au véhicule.

En effectuant un test de Mann-Whitney, aucune différence statistiquement significative entre le groupe stimulé par le véhicule et celui stimulé par le ligand n'est observée dans les différents contrôles (**figure 30-32B**).

Aucun des mutants stimulés par le 8535 n'a une augmentation de signal statistiquement significative par rapport aux véhicules. Cependant, une franche augmentation de l'activité de la nanoluciférase est détectée lorsque le mutant DelECL<sub>2</sub> et la protéine  $G_{i1}$  sont stimulés avec le 8535 (**figure 30C**). Cette augmentation d'activité pour le couple DelECL<sub>2</sub>/ $G_{i1}$  est accompagnée d'une faible variation contrairement aux autres mutants testés.

#### IV.4.3.1 Analyse du mutant contenant la délétion de l'ECL2

Le mutant dépourvu de son ECL<sub>2</sub> démontrait une augmentation de l'activité de la nanoluciférase lorsque les cellules étaient co-transfectées avec G<sub>i1</sub>, suggérant une interaction avec ce récepteur mutant et la protéine G.

Comme cité précédemment dans l'introduction, le couplage des GPCR avec la sous-unité G<sub>i1</sub> est inhibé en présence de la toxine PTX. De ce fait, les cellules ont été transfectées avec le plasmide contenant le mutant de GPR27 sans ECL<sub>2</sub> et le plasmide codant pour la protéine G<sub>i1</sub>. Les cellules ont été incubées en présence ou en absence de PTX dans le milieu de culture. Pour vérifier que l'inhibition du couplage GPCR/sous-unité G<sub>i1</sub> était détectable par le test à la nanoluciférase, le récepteur D<sub>2</sub>/G<sub>i1</sub> stimulé avec de la dopamine servait de contrôle.

Lorsqu'on analyse la courbe concentration-réponse du D<sub>2</sub>/G<sub>i1</sub>, on remarque que l'activité de la nanoluciférase est dépendante de la concentration de dopamine. Pour la condition contenant la PTX, l'augmentation du signal de complémentation de la *nanoluciférase* après stimulation avec la dopamine à différentes concentrations est inhibée par l'incubation des cellules avec la PTX. (**Figure 33**). Pour le couple DeECL<sub>2</sub>/G<sub>i1</sub>, aucune courbe pharmacologique concentration-réponse n'a été observée. Sur base de ce résultat, nous ne pouvons donc pas confirmer que le mutant GPR27 DeECL<sub>2</sub> couple à G<sub>i1</sub> après stimulation avec le 8535.

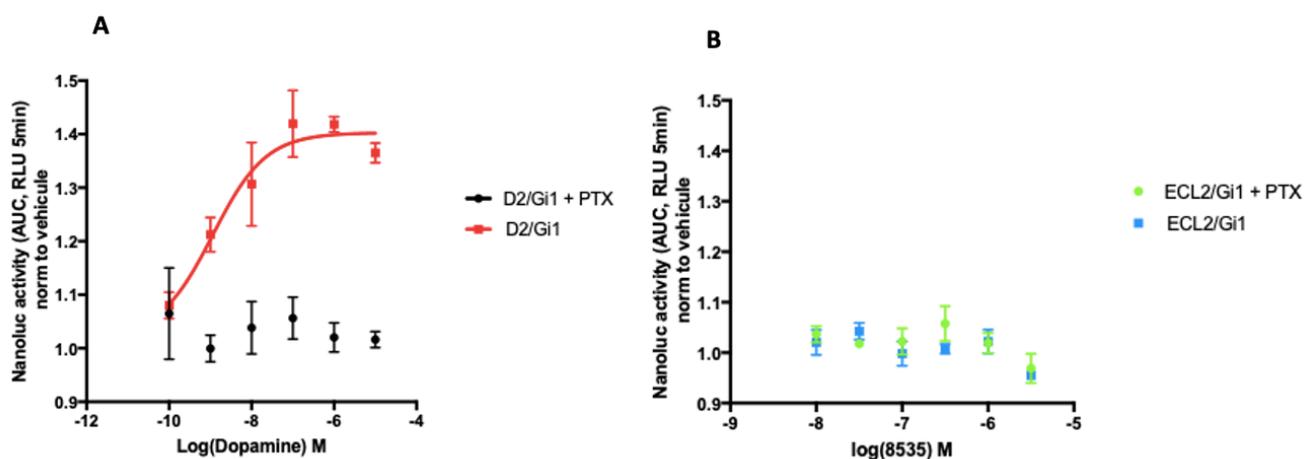


Figure 33 : Courbe concentration-réponse en A du couple D<sub>2</sub>/G<sub>i1</sub> avec ou sans PTX stimulé par différentes concentrations de dopamine et en B du couple DeECL<sub>2</sub>/G<sub>i1</sub> avec ou sans PTX stimulé par différentes concentrations de 8535.

## V. Discussion

Toutes les mutations effectuées par PCR ont été confirmées par séquençage sauf pour les mutations A3.40I et V3.46I. Leur séquence ne diffère pas du récepteur WT. Cela peut indiquer une quantité résiduelle non négligeable de plasmide matrice dans le produit PCR. Pour remédier à ce problème, le kit utilisé pour la mutagenèse utilise une enzyme nommée « DSN1 » qui digère les plasmides méthylés et donc matrice. Pour diminuer les chances d'avoir un produit PCR contenant toujours le plasmide WT, une augmentation de la durée d'incubation avec l'enzyme est une solution.

L'expression à la membrane des mutants séquencés a été confirmée par immunofluorescence. Cette information est cruciale, car elle permet de confirmer que ces récepteurs mutés peuvent interagir avec le 8535, le ligand synthétique. L'immunofluorescence a l'avantage de donner des informations qualitatives telles que la localisation précise du récepteur. En revanche, aucune donnée quantitative ou semi-quantitative, quant à l'expression des récepteurs, ne peut être fournie. Une ELISA ou une analyse par cytomètre en flux utilisant des anticorps anti-FLAG sont des perspectives à réaliser.

L'optimisation du test de complémentation de la nanoluciférase mesurant l'interaction entre la  $\beta$ -arrestine 2 et le GPR27 WT en dose-réponse avec le 8535 a permis de passer d'une  $E_{\max}$  de 1,06 à 1,34. Cette amplitude d'effet est plus faible que le test à la firefly ( $E_{\max} = 2,60$ ). Le test à la firefly utilise une lignée cellulaire stable du GPR27 chimère avec une queue C-terminale du récepteur  $V_2$  qui stabilise le complexe arrestine/récepteur. Le test à la nanoluciférase lui, utilise le GPR27 WT qui est transfecté de manière transitoire, ce qui peut expliquer la différence d'amplitude entre ces 2 tests.

Dans l'article publié par le laboratoire de pharmacologie moléculaire et décrivant la découverte du ligand synthétique du GPR27 après criblage dans le test à la luciférase firefly, le test de complémentation à la firefly a également été adapté pour mesurer l'interaction entre la  $\beta$ -arrestine 2 et le GPR27 WT stimulé par le 8535. Les résultats indiquent des niveaux d'amplitude similaires à celui du test à la nanoluciférase optimisé lors de ce mémoire (Dupuis et al., 2017). Ce qui est surprenant étant donné que la nanoluciférase est plus sensible que la luciférase firefly. Des amplitudes plus élevées étaient, donc, attendues.

Un autre facteur pouvant expliquer la faible amplitude est que la fenêtre dynamique du recrutement de l'arrestine avec le GPR27 diminue rapidement après 5 minutes de stimulation avec le 8535. Etant donné que l'ajout du ligand se fait manuellement juste avant la lecture, le temps de stimuler l'entièreté de la plaque de cellules, l'effet peut être partiellement manqué. L'utilisation d'un système robotisé permettant l'ajout simultané du ligand dans tous les puits permettrait de s'affranchir de ce problème.

Le ratio de la co-transfection du plasmide contenant le récepteur et du plasmide contenant l'arrestine a été optimisé. Le ratio 1:2 a été choisi pour la suite des expériences. Différents ratios pourraient être testés. De plus, cette optimisation de ratio n'a été faite que pour le couple GPR27 WT/arrestine stimulé par le 8535. Chaque couple, comme par exemple les contrôles positifs tels que D<sub>2</sub>/G<sub>i1</sub> ou B<sub>2</sub>/G<sub>s</sub>, devraient également être optimisés systématiquement au niveau des ratios de transfection.

Le test de complémentation des différents contrôles positifs pour le recrutement de sous-unités  $\alpha$  de protéines G a permis de confirmer que les conditions optimisées pour le test de complémentation du couple GPR27/arrestine permettaient également de visualiser l'interaction GPCR/protéine G de manière concentration-dépendante. Cependant, l' $E_{\max}$  des différents contrôles est plus faible que le couple GPR27/arrestine.

Le test de complémentation des différentes sous-unités  $\alpha$  avec le récepteur GPR27 WT stimulé par différentes concentrations de 8535 a permis de renforcer l'hypothèse selon laquelle ce récepteur n'interagit pas avec les protéines G. Cette expérience a permis également de démontrer la spécificité du 8535 à recruter uniquement la  $\beta$ 2-arrestine. Cependant, il faut garder à l'esprit l'éventualité selon laquelle le 8535 pourrait être un ligand biaisé et induire une conformation du GPR27 lui permettant de ne recruter que l'arrestine.

Lors du criblage des mutants avec une seule concentration de 8535, les divers contrôles positifs ne se sont pas démarqués statistiquement des véhicules dû à une variabilité élevée. Cette variabilité élevée peut s'expliquer par un « effet plaque ». Cet effet se caractérise par une évaporation accrue du milieu dans les puits aux extrémités de la plaque.

Dès lors, l'interprétation des différents résultats concernant les mutants est hasardeuse. Cette expérience étant une étape de criblage, tous les mutants devraient être testés par une courbe dose-réponse de 8535 pour chaque sous-unité  $\alpha$ . Seules 3 sous-unités ont été testées lors de ce mémoire, il en existe évidemment des dizaines d'autres qui seraient intéressantes à analyser telles que les différentes formes de la famille  $G_{\alpha_{i/o}}$  ou encore la sous-unité  $G_{\alpha_s}$  XL.

Le mutant portant la délétion de l'ECL<sub>2</sub> transfecté avec  $G_{i1}$  présentait une augmentation du signal comparé au véhicule. Ce résultat suggère que déléter l'ECL<sub>2</sub> du GPR27 permettrait son couplage à  $G_{i1}$ . Pour confirmer cette éventualité, une courbe concentration-réponse en présence de PTX a été effectuée. Pour rappel, la PTX a comme caractéristique d'inhiber le couplage des GPCR avec les sous-unités  $G_{\alpha_i}$ . Le couple  $D_2/G_{i1}$  stimulé avec différentes concentrations de dopamine servait de contrôle positif. Sans la PTX, on observe que l'amplitude d'effet de  $D_2/G_{i1}$  est supérieure comparé à l'expérience de mise au point de contrôles positifs réalisée page 34. Cette observation peut potentiellement s'expliquer par le fait que 48h de transfection ont eu lieu spécialement pour l'expérience avec la PTX et seulement 24h pour tous les autres tests de complémentation du mémoire. Pour la suite, une expression de 48h des protéines d'intérêt semble être la plus adaptée afin d'améliorer l'amplitude du signal.

Concernant l'utilisation de la PTX, celle-ci abolit clairement le couplage du récepteur  $D_2$  à la sous-unité  $G_{i1}$ , ce qui confirme que l'utilisation de la PTX permet d'inhiber tout couplage avec la sous-unité  $G_{i1}$ . Pour le mutant comprenant la délétion de l'ECL<sub>2</sub>, aucune courbe concentration-réponse n'a été observée et la PTX n'a eu donc aucun effet, sous-entendant que le résultat du criblage des mutants n'était qu'un faux positif.

Cependant, une investigation de second-messager comme la quantification de l'AMP cyclique serait une piste à envisager pour le mutant DelECL<sub>2</sub>. Etant donné que les résultats sont normalisés par le mutant non stimulé au 8535, il est possible que ce mutant entraîne un couplage aux protéines G mais de manière indépendante du ligand. L'ECL<sub>2</sub> participant au site orthostérique des ligands, cette théorie est d'autant plus convaincante (Woolley & Conner, 2017). De plus, le GPR27 étant fortement exprimé au niveau du système nerveux central, un couplage à la protéine G<sub>i1</sub> serait plausible compte tenu du fait que cette protéine G est très souvent utilisée dans la physiologie du neurone (Subtypes, 2009)(Cho et al., 2015).

Le récepteur à la thrombine PAR-1 est activé suite à son clivage de sa queue N-terminale par des métalloprotéases, un mécanisme semblable avec l'ECL<sub>2</sub> du GPR27 pourrait être envisagé (Austin, Covic, & Kuliopulos, 2013).

En revanche, lors d'une campagne de « désorphelinisation » du GPR52, une équipe de chercheurs a mis en évidence par mutagenèse dirigée que la délétion de l'ECL<sub>2</sub> de ce récepteur éteignait complètement son couplage aux protéines G (Lin et al., 2020). Leur théorie est basée sur le fait que l'ECL<sub>2</sub> participe à l'activité constitutive du récepteur et que lorsqu'on retire celle-ci, l'activité constitutive est diminuée.

L'activité constitutive est d'une grande utilité pour permettre d'étudier un récepteur orphelin car cela permet de développer des tests fonctionnels sensibles permettant l'identification de ligands (Laschet et al., 2018) (Abboud et al., 2020). Au laboratoire, les différentes analyses du récepteur ont été incapables de mettre en évidence une quelconque activité constitutive du récepteur GPR27. Cela a été récemment confirmé par une technique élégante de BRET qui n'a décelé aucun couplage de GPR27 aux protéines G de manière constitutive (Sumin & Nevin A, 2021). Une mise au point du test réalisée par cette équipe serait intéressante à effectuer avec les mutants générés pour détecter une activité constitutive de ceux-ci. De plus, un mutant de GPR27 (F6.44H) a été généré il y a quelques années au laboratoire. Celui-ci présentait une activité constitutive élevée dans le test de complémentation à la firefly. Un test de celui-ci avec la nanoluciférase serait intéressant et pourrait servir de contrôle positif.

La mutagenèse dirigée pour étudier des récepteurs orphelins est une méthode qui a fait ses preuves pour différentes campagnes de « désorphelinisation » comme le GPR83 (Müller et al., 2013) et le GPR52 (Lin et al., 2020). Etant donné que les récepteurs orphelins n'ont, par définition, aucun ligand endogène connu, leur étude est compliquée. Grâce au ligand synthétique découvert dans le laboratoire, il a été permis d'obtenir un contrôle positif pour mettre au point le test de complémentation à la nanoluciférase. Ce test a l'avantage d'être plus sensible et plus spécifique que d'autres tests comme le FRET ou le BRET qui sont couramment utilisés pour étudier le couplage des GPCR avec les protéines G (Laschet, Dupuis, & Hanson, 2019). De ce fait, l'optimisation de ce test est un atout considérable pour étudier l'interaction des protéines G et du GPR27 dans le cas de mutagenèse dirigée. Outre l'étude de l'interaction des protéines G avec GPR27, ce système de complémentation permettrait d'étudier éventuellement l'interaction avec des partenaires atypiques.

Un des derniers GPCR orphelins à avoir été désorphelinisé est le GPR182 (Le et al., 2021) (Schmid et al., 2018). Lors de cette campagne, les chercheurs utilisaient également un test de complémentation à la nanoluciférase pour étudier le couplage de ce récepteur avec les protéines G. Cela souligne l'importance de ce type de tests qui permettront *in fine* une meilleure compréhension du GPR27, de la famille des SREB ainsi que des récepteurs atypiques en général.

## VI. Bibliographie

- Abboud, D., Daly, A. F., Dupuis, N., Bahri, M. A., Inoue, A., Chevigné, A., ... Hanson, J. (2020). GPR101 drives growth hormone hypersecretion and gigantism in mice via constitutive activation of Gs and Gq/11. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18500-x>
- Abramowitz, J., Grenet, D., Birnbaumer, M., Torres, H. N., & Birnbaumer, L. (2004). XLas, the extra-long form of the  $\alpha$ -subunit of the Gs G protein, is significantly longer than suspected, and so is its companion Alex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(22), 8366–8371. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308758101>
- Attwood, T. K., & Findlay, J. B. C. (1994). Fingerprinting g-protein-coupled receptors. *Protein Engineering, Design and Selection*, 7(2), 195–203. <https://doi.org/10.1093/protein/7.2.195>
- Austin, K. M., Covic, L., & Kuliopulos, A. (2013). Matrix metalloproteases and PAR1 activation. *Blood*, 121(3), 431–439. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-09-355958>
- Ballesteros, J., Kitanovic, S., Guarnieri, F., Davies, P., Fromme, B. J., Konvicka, K., ... Sealfon, S. C. (1998). Functional microdomains in G-protein-coupled receptors: The conserved arginine-cage motif in the gonadotropin-releasing hormone receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 273(17), 10445–10453. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.17.10445>
- Banerjee, A. A., & Mahale, S. D. (2015). Role of the extracellular and intracellular loops of follicle-stimulating hormone receptor in its function. *Frontiers in Endocrinology*, 6(JUL). <https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00110>
- Böttke, T., Ernicke, S., Serfling, R., Ihling, C., Burda, E., Gurevich, V. V., ... Coin, I. (2020). Exploring GPCR-arrestin interfaces with genetically encoded crosslinkers. *EMBO Reports*, 21(11), 1–11. <https://doi.org/10.15252/embr.202050437>
- Boucrot, E., & McMahon, H. T. (2011). Initiation de l'endocytose par vésicules de clathrine. *Médecine/Sciences*, 27(2), 122–125. <https://doi.org/10.1051/medsci/2011272122>
- Brzostowski, J. A., & Kimmel, A. R. (2001). Signaling at zero G: G-protein-independent functions for 7-TM receptors. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(5), 291–297. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(01\)01804-7](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(01)01804-7)
- Cherezov, V., Rosenbaum, D. M., Hanson, M. A., Rasmussen, S. G. F., Foon, S. T., Kobilka, T. S., ... Stevens, R. C. (2007). High-resolution crystal structure of an engineered human  $\beta$ 2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science*, 318(5854), 1258–1265. <https://doi.org/10.1126/science.1150577>
- Cho, K. S., Guo, C., Chew, J., Yuan, J. C., Zhu, R., He, Z., & Chen, D. F. (2015). The Intrinsic Determinants of Axon Regeneration in the Central Nervous System. In *Neural Regeneration*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801732-6.00012-4>
- Chopra, D. G., Yiv, N., Hennings, T. G., Zhang, Y., & Ku, G. M. (2020). Deletion of Gpr27 in vivo reduces insulin mRNA but does not result in diabetes. *Scientific Reports*, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62358-4>
- Davenport, A. P., Alexander, S. P. H., Sharman, J. L., Pawson, A. J., Benson, H. E., Monaghan, A. E., ... Harmar, A. J. (2013). International union of basic and clinical pharmacology. LXXXVIII. g protein-coupled receptor list: Recommendations for new pairings with cognate Ligands. *Pharmacological Reviews*, 65(3), 967–986. <https://doi.org/10.1124/pr.112.007179>

- Denis, C., Sauliere, A., Galandrin, S., Senard, J.-M., & Gales, C. (2012). Probing Heterotrimeric G Protein Activation: Applications to Biased Ligands. *Current Pharmaceutical Design*, *18*(2), 128–144. <https://doi.org/10.2174/138161212799040466>
- Dixon, A. S., Schwinn, M. K., Hall, M. P., Zimmerman, K., Otto, P., Lubben, T. H., ... Wood, K. V. (2016). NanoLuc Complementation Reporter Optimized for Accurate Measurement of Protein Interactions in Cells. *ACS Chemical Biology*, *11*(2), 400–408. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.5b00753>
- Dupuis, N. (2017). *PROBES AND SIGNALING PATHWAYS FOR THE ORPHAN GPCR GPR27*.
- Dupuis, N., Laschet, C., Franssen, D., Szpakowska, M., Gilissen, J., Geubelle, P., ... Hanson, J. (2017). Activation of the orphan G protein-coupled receptor GPR27 by surrogate ligands promotes  $\beta$ -arrestin 2 recruitment. *Molecular Pharmacology*, *91*(6), 595–608. <https://doi.org/10.1124/mol.116.107714>
- Erlanson, S. C., McMahon, C., & Kruse, A. C. (2018). Structural Basis for G Protein-Coupled Receptor Signaling. *Annual Review of Biophysics*, *47*(February), 1–18. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-070317-032931>
- Flock, T., Ravarani, C. N. J., Sun, D., Venkatakrishnan, A. J., Kayikci, M., Tate, C. G., ... Babu, M. M. (2015). Universal allosteric mechanism for  $G_{\alpha}$  activation by GPCRs. *Nature*, *524*(7564), 173–179. <https://doi.org/10.1038/nature14663>
- Fredriksson, R., Lagerström, M. C., Lundin, L. G., & Schiöth, H. B. (2003). The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Molecular Pharmacology*, *63*(6), 1256–1272. <https://doi.org/10.1124/mol.63.6.1256>
- Guo, S., Zhang, X., Zheng, M., Zhang, X., Min, C., Wang, Z., ... Kim, K. M. (2015). Selectivity of commonly used inhibitors of clathrin-mediated and caveolae-dependent endocytosis of G protein-coupled receptors. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1848*(10), 2101–2110. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.05.024>
- Heuss, C., & Gerber, U. (2000). G-protein-independent signaling by G-protein-coupled receptors. *Trends in Neurosciences*, *23*(10), 469–475. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(00\)01643-X](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(00)01643-X)
- Ibrahim, P., Wifling, D., & Clark, T. (2019). Universal Activation Index for Class A GPCRs. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *59*(9), 3938–3945. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b00604>
- Khilnani, G., & Khilnani, A. K. (2011). Inverse agonism and its therapeutic significance. *Indian Journal of Pharmacology*, *43*(5), 492–501. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.84947>
- Ku, G. M., Pappalardo, Z., Luo, C. C., German, M. S., & McManus, M. T. (2012). *An siRNA Screen in Pancreatic Beta Cells Reveals a Role for Gpr27 in Insulin Production*. *8*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002449>
- Laschet, C., Dupuis, N., & Hanson, J. (2018). The G protein-coupled receptors deorphanization landscape. *Biochemical Pharmacology*, *153*(February), 62–74. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.02.016>
- Laschet, C., Dupuis, N., & Hanson, J. (2019). A dynamic and screening-compatible nanoluciferase-based complementation assay enables profiling of individual GPCR–G protein interactions. *Journal of Biological Chemistry*, *294*(11), 4079–4090. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.006231>
- Latorraca, N. R., Venkatakrishnan, A. J., & Dror, R. O. (2017). GPCR dynamics: Structures in motion. *Chemical Reviews*, *117*(1), 139–155. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00177>
- Le, A., Bonnavion, R., Yu, W., Wessam, M., Ramas, S., & Zhang, Y. (2021). *Receptor That Maintains*

*Hematopoietic Stem Cell Homeostasis*. 118(17). <https://doi.org/10.1073/pnas.2021596118/-DCSupplemental.Published>

- Liggett, S. B., Freedman, N. J., Schwinn, D. A., & Lefkowitz, R. J. (1993). Structural basis for receptor subtype-specific regulation revealed by a chimeric  $\beta 3/\beta 2$ -adrenergic receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(8), 3665–3669. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.8.3665>
- Lin, X., Li, M., Wang, N., Wu, Y., Luo, Z., Guo, S., ... Xu, F. (2020). Structural basis of ligand recognition and self-activation of orphan GPR52. *Nature*, 579(7797), 152–157. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2019-0>
- Liu, R., Groenewoud, N. J. A., Peeters, M. C., Lenselink, E. B., & IJzerman, A. P. (2014). A yeast screening method to decipher the interaction between the adenosine A2B receptor and the C-terminus of different G protein  $\alpha$ -subunits. *Purinergic Signalling*, 10(3), 441–453. <https://doi.org/10.1007/s11302-014-9407-6>
- Lüscher, C., & Slesinger, P. A. (2010). Emerging roles for G protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) channels in health and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 11(5), 301–315. <https://doi.org/10.1038/nrn2834>
- Manglik, A., & Kruse, A. C. (2017). Structural Basis for G Protein-Coupled Receptor Activation. *Biochemistry*, 56(42), 5628–5634. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00747>
- Martin, A. L., Steurer, M. A., & Aronstam, R. S. (2015). Constitutive activity among orphan class-A G protein coupled receptors. *PLoS ONE*, 10(9), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138463>
- Masuh, I., Balaji, S., Muntean, B. S., Skamangas, N. K., Chavali, S., Tesmer, J. J. G., ... Martemyanov, K. A. (2020). A Global Map of G Protein Signaling Regulation by RGS Proteins. *Cell*, 183(2), 503–521.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.052>
- Matsumoto, M., Hidaka, K., Akiho, H., Tada, S., Okada, M., & Yamaguchi, T. (1996). Low stringency hybridization study of the dopamine D4 receptor revealed D4-like mRNA distribution of the orphan seven-transmembrane receptor, APJ, in human brain. *Neuroscience Letters*, 219(2), 119–122. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(96\)13198-0](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(96)13198-0)
- Matsumoto, M., Saito, T., Takasaki, J., Kamohara, M., Sugimoto, T., Kobayashi, M., ... Furuichi, K. (2000). An evolutionarily conserved G-protein coupled receptor family, SREB, expressed in the central nervous system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 272(2), 576–582. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2829>
- Meyrath, M., Szpakowska, M., Zeiner, J., Massotte, L., Merz, M. P., Benkel, T., ... Cheigné, A. (2020). The atypical chemokine receptor ACKR3/CXCR7 is a broad-spectrum scavenger for opioid peptides. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16664-0>
- Müller, A., Kleinau, G., Piechowski, C. L., Müller, T. D., Finan, B., Pratzka, J., ... Biebermann, H. (2013). G-Protein Coupled Receptor 83 (GPR83) Signaling Determined by Constitutive and Zinc(II)-Induced Activity. *PLoS ONE*, 8(1), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053347>
- Nath, A. K., Ma, J., Li, Z. C. Z., Vitery, C., Kelley, M. L., Peterson, R. T., ... Yeh, J. J. (2020). Genetic deletion of *gpr27* alters acylcarnitine metabolism, insulin sensitivity, and glucose homeostasis in zebrafish. (July 2019), 1546–1557. <https://doi.org/10.1096/fj.201901466R>
- Naumann, U., Camerani, E., Pruenster, M., Mahabaleswar, H., Raz, E., Zerwes, H. G., ... Thelen, M. (2010). CXCR7 functions as a scavenger for CXCL12 and CXCL11. *PLoS ONE*, 5(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009175>

- O'Brien, J. B., Wilkinson, J. C., & Roman, D. L. (2019). Regulator of G-protein signaling (RGS) proteins as drug targets: Progress and future potentials. *Journal of Biological Chemistry*, 294(49), 18571–18585. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.007060>
- Peterson, Y. K., & Luttrell, L. M. (2017). The diverse roles of arrestin scaffolds in g protein-coupled receptor signaling. *Pharmacological Reviews*, 69(3), 256–297. <https://doi.org/10.1124/pr.116.013367>
- Pfleger, J., Gresham, K., & Koch, W. J. (2019). G protein-coupled receptor kinases as therapeutic targets in the heart. *Nature Reviews Cardiology*, 16(10), 612–622. <https://doi.org/10.1038/s41569-019-0220-3>
- Rajagopal, S., Rajagopal, K., & Lefkowitz, R. J. (2010). Teaching old receptors new tricks: Biasing seven-transmembrane receptors. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(5), 373–386. <https://doi.org/10.1038/nrd3024>
- Rasmussen, S. G. F., Devree, B. T., Zou, Y., Kruse, A. C., Chung, K. Y., Kobilka, T. S., ... Kobilka, B. K. (2011). Crystal structure of the  $\beta$  2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature*, 477(7366), 549–557. <https://doi.org/10.1038/nature10361>
- Salon, J. A., Lodowski, D. T., & Palczewski, K. (2011). The significance of G protein-coupled receptor crystallography for drug discovery. *Pharmacological Reviews*, 63(4), 901–937. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003350>
- Schann, S., Neuville, P., & Bouvier, M. (2014). Novel Screening Paradigms for the Identification of Allosteric Modulators and/or Biased Ligands for Challenging G-Protein-Coupled Receptors. In *Annual Reports in Medicinal Chemistry* (1st ed., Vol. 49). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800167-7.00018-3>
- Schmid, C. D., Schledzewski, K., Mogler, C., Waldburger, N., Kalna, V., Marx, A., ... Koch, P. S. (2018). GPR182 is a novel marker for sinusoidal endothelial differentiation with distinct GPCR signaling activity in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 497(1), 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.01.185>
- Scott, M. G. H., Benmerah, A., & Marullo, S. (2004). Endocytose des récepteurs couplés aux protéines G. *Médecine/Sciences*, 20(1), 78–83. <https://doi.org/10.1051/medsci/200420178>
- Seifert, R., & Wenzel-Seifert, K. (2002). Constitutive activity of G-proteins-coupled receptors: Cause of disease and common property of wild-type receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 366(5), 381–416. <https://doi.org/10.1007/s00210-002-0588-0>
- Seyedabadi, M., Gharghabi, M., Gurevich, E. V., & Gurevich, V. V. (2021). Receptor-arrestin interactions: The gpcr perspective. *Biomolecules*, 11(2), 1–25. <https://doi.org/10.3390/biom11020218>
- Smith, J. S., & Rajagopal, S. (2016). The  $\beta$ -Arrestins: Multifunctional regulators of G protein-coupled receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 291(17), 8969–8977. <https://doi.org/10.1074/jbc.R115.713313>
- Subtypes, M. R. (2009). *Muscarinic Receptors: Autonomic Neurons - ScienceDirect*. Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080450469006926>
- Sumin, L., & Nevin A, N. A. (2021). *Constitutive G protein coupling profiles of understudied orphan GPCRs*. 1–17.
- Trzaskowski, B., Latek, D., Yuan, S., Ghoshdastider, U., Debinski, A., & Filipek, S. (2012). Action of Molecular Switches in GPCRs - Theoretical and Experimental Studies. *Current Medicinal Chemistry*, 19(8), 1090–1109. <https://doi.org/10.2174/092986712799320556>
- Wacker, D., Stevens, R. C., & Roth, B. L. (2017). How Ligands Illuminate GPCR Molecular Pharmacology. *Cell*, 170(3), 414–427. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.009>

- Wacker, D., Wang, C., Katritch, V., Han, G. W., Huang, X. P., Vardy, E., ... Stevens, R. C. (2013). Structural features for functional selectivity at serotonin receptors. *Science*, *340*(6132), 615–619. <https://doi.org/10.1126/science.1232808>
- Weis, W. I., & Kobilka, B. K. (2018). The Molecular Basis of G Protein-Coupled Receptor Activation. *Annual Review of Biochemistry*, *87*, 897–919. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-033910>
- Woolley, M. J., & Conner, A. C. (2017). Understanding the common themes and diverse roles of the second extracellular loop (ECL2) of the GPCR super-family. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *449*, 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.11.023>