



HAL
open science

Etude des mécanismes d'activation des récepteurs chimiotactiques couplés aux protéines G : Biais de signalisation et rôle d'une proline dans le deuxième domaine transmembranaire

Jane-Eileen Joubert

► **To cite this version:**

Jane-Eileen Joubert. Etude des mécanismes d'activation des récepteurs chimiotactiques couplés aux protéines G : Biais de signalisation et rôle d'une proline dans le deuxième domaine transmembranaire. Biologie cellulaire. Université Rouen Normandie, 2016. Français. NNT : . tel-02415576

HAL Id: tel-02415576

<https://normandie-univ.hal.science/tel-02415576>

Submitted on 17 Dec 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Etude des mécanismes d'activation des récepteurs chimiotactiques couplés aux protéines G : Biais de signalisation et rôle d'une proline dans le deuxième domaine transmembranaire

Présentée et soutenue par
Jane-Eileen JOUBERT

Thèse soutenue publiquement le 16 décembre 2016
devant le jury composé de

Mme Monique DONTENWILL	Directeur de Recherche, Strasbourg	Rapporteur
Mr Daniel FOURMY	Directeur de Recherche, Toulouse	Rapporteur
Mme Marie CHABBERT	Chargée de Recherche, Angers	Examineur
Mme Isabelle SEGALAS-MILAZZO	Professeur des Universités, Rouen Normandie	Examineur
Mr Laurent PREZEAU	Directeur de Recherche, Montpellier	Examineur
Mme Hélène CASTEL	Directeur de Recherche, Rouen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par Dr Hélène CASTEL, Laboratoire DC2N, Inserm U982



Doctorats : la nomenclature générique (47 modalités)

code diplôme SISE	LIBELLE
4200001	MATHEMATIQUES
4200002	PHYSIQUE
4200003	CHIMIE
4200004	MATHEMATIQUES APPLIQUEES ET SCIENCES SOCIALES
4200005	SCIENCES DE L'UNIVERS
4200006	ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE
4200007	PHYSIOLOGIE ET BIOLOGIE DES ORGANISMES - POPULATIONS - INTERACTIONS
4200008	RECHERCHE CLINIQUE, INNOVATION TECHNOLOGIQUE, SANTE PUBLIQUE
4200009	SCIENCES AGRONOMIQUES, BIOTECHNOLOGIES AGRO-ALIMENTAIRES
4200010	MEDECINE
4200011	ODONTOLOGIE
4200012	PHARMACIE
4200013	STAPS
4200014	MECANIQUE DES FLUIDES, ENERGETIQUE, THERMIQUE, COMBUSTION, ACOUSTIQUE
4200015	MECANIQUE DES SOLIDES, GENIE MECANIQUE, PRODUCTIQUE, TRANSPORT ET GENIE CIVIL
4200016	GENIE CIVIL
4200017	GENIE DES PROCEDES
4200018	INFORMATIQUE
4200019	GENIE ELECTRIQUE
4200020	ELECTRONIQUE, MICROELECTRONIQUE, OPTIQUE ET LASERS, OPTOELECTRONIQUE MICROONDES
4200021	SCIENCES ET TECHNOLOGIE INDUSTRIELLES
4200022	SCIENCES DU LANGAGE - LINGUISTIQUE
4200023	LANGUES ET LITTERATURES ANCIENNES
4200024	LANGUES ET LITTERATURES FRANCAISES
4200025	LITTERATURE GENERALE ET COMPAREE
4200026	ARTS PLASTIQUES, MUSICOLOGIE
4200027	FRANCAIS, LANGUE ETRANGERE
4200028	LANGUES ET LITTERATURES ETRANGERES
4200029	LANGUES ETRANGERES APPLIQUEES
4200030	CULTURES ET LANGUES REGIONALES
4200031	PHILOSOPHIE, EPISTEMOLOGIE
4200032	HISTOIRE, HISTOIRE DE L'ART ET ARCHEOLOGIE
4200033	GEOGRAPHIE
4200034	AMENAGEMENT
4200035	ARCHEOLOGIE, ETHNOLOGIE, PREHISTOIRE
4200036	SCIENCES RELIGIEUSES
4200037	PSYCHOLOGIE
4200038	SOCIOLOGIE, DEMOGRAPHIE
4200039	SCIENCES DE L'EDUCATION
4200040	SCIENCES DE L'INFORMATION ET DE LA COMMUNICATION
4200041	SCIENCES JURIDIQUES
4200042	SCIENCES POLITIQUES
4200043	SCIENCES ECONOMIQUES
4200044	SCIENCES DE GESTION
4200045	ADMINISTRATION ECONOMIQUE ET SOCIALE (AES)
4200046	AUTOMATIQUE, SIGNAL, PRODUCTIQUE, ROBOTIQUE
4200047	SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Le Docteur Dominique Dontenwill, Directrice de Recherche CNRS à l'Université de Strasbourg, a volontiers accepté de siéger dans ce jury de thèse en qualité de rapporteur. C'est pour moi un privilège que les travaux présentés dans ce manuscrit soient jugés par une spécialiste des protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire. Je la remercie très sincèrement.

Le Docteur Daniel Fourmy, Directeur de Recherche CNRS à l'Université de Toulouse, a également accepté d'être le rapporteur de ce travail, en tant qu'expert dans la signalisation biaisée et les mécanismes d'endocytose des récepteurs couplés aux protéines G. Je tiens à le remercier de me faire cet honneur.

Le Docteur Marie Chabbert, Chargée de Recherche CNRS à l'Université d'Angers, a bien voulu, en tant qu'examinatrice de ce travail, apporter son regard d'experte dans la modélisation et l'évolution des récepteurs couplés aux protéines G. Je tiens à lui signifier ma sincère reconnaissance.

Le Professeur Isabelle Ségalas-Milazzo, Professeur à l'Université de Rouen Normandie, me fait également l'honneur d'être examinatrice dans ce jury. Je tiens à la remercier sincèrement de partager son expertise sur la modélisation des interactions ligands-récepteur du système urotensinergique pour l'évaluation de ce travail.

Le Docteur Laurent Prézeau, Directeur de Recherche CNRS à l'Université de Montpellier, me fait également l'honneur d'être examinateur dans ce jury. Je tiens tout particulièrement à le remercier de m'avoir accueillie au sein de son équipe de recherche, pour sa disponibilité au cours de mes différents stages et pour ses conseils avisés. Ce fût un réel plaisir pour moi de travailler dans un environnement si dynamique et chaleureux et spécialisé dans la pharmacologie des récepteurs couplés aux protéines G. C'est un honneur pour moi de lui soumettre mon manuscrit. Qu'il trouve ici ma sincère reconnaissance.

Je tiens tout particulièrement à remercier le Docteur Hélène Castel, Directrice de Recherche Inserm à l'Université de Rouen Normandie, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe depuis mon

stage de première année de Master. Je la remercie de m'avoir accordé sa confiance et de m'avoir permis d'effectuer une thèse sous sa direction. J'ai beaucoup appris durant toutes ces années, que ce soit sur la manière de mener un projet de recherche, de présenter des résultats ou encore de rédiger un manuscrit mais aussi, et surtout, sur moi-même. Je lui suis sincèrement reconnaissante de toujours se démenner pour parvenir aux besoins de l'équipe, quitte à « faire la poule » auprès d'organismes caritatifs et/ou de financement. Grâce à elle, j'ai pu participer à de nombreux congrès nationaux et internationaux et eu la possibilité de pratiquer la recherche en dehors de notre unité : je lui en suis profondément reconnaissante. Enfin, je la remercie d'avoir sacrifié son temps, son sommeil et sa vie de famille dans les périodes difficiles de rédaction. Sans son aide, je serais probablement toujours encore en train de rédiger ce manuscrit. Je lui souhaite de toujours trouver le courage d'affronter les difficultés inhérentes au domaine de la recherche scientifique, et espère que son dur labeur sera reconnu et récompensé comme il le mérite.

Je remercie le Docteur Youssef Anouar, Directeur de Recherche Inserm et du laboratoire Inserm U982 de Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine, qui m'a accueillie au sein de son unité durant toutes ces années.

Laurence, sans ton aide dans la rédaction de ce manuscrit, je serais probablement encore prostrée au fond de ma chaise de bureau, à ajuster la taille des SEM et à faire de jolis schémas. Je te remercie d'avoir sacrifié ton temps pour finaliser ce manuscrit, tu as été, comme à ton habitude, d'un réel secours. Je te remercie également pour ton aide précieuse pour la biologie moléculaire, les ELISA « de la mort qui tue », les Western blots en folie ou encore les séries de Transwells. Je n'oublierai jamais toute l'aide que tu m'as apportée, ni les bons moments passés au bureau (« c'est vendredi, c'est permis ! », ta bonne humeur, ton soutien sans faille et ta disponibilité. Ta présence au sein de l'équipe est un réel plaisir et sans conteste un énorme atout. Sans toi, l'équipe ne serait pas non plus ce qu'elle est

aujourd'hui. Qu'elle trouve ici ma sincère gratitude et la reconnaissance qu'elle mérite.

Professeur Pierrick Gandolfo, merci pour ton aide précieuse dans la relecture de ce manuscrit et pour tes corrections toujours pertinentes. Je serai toujours impressionnée par ta capacité à détecter un point d'un point en italique (l'« œil de faucon » !), à manier les mots et les verbes et par ta culture littéraire impressionnante. Je te remercie également pour ta bonne humeur au quotidien.

Je remercie également Marie-Christine Tonon, pour sa gaité, ses petites friandises ramenées de Tunisie et surtout pour la relecture de ce manuscrit.

Fabrice Morin, je te remercie pour l'exemple de rigueur scientifique que tu représentes dans l'équipe, et tes questions, toujours très pertinentes, au cours des réunions d'équipe et de laboratoire.

Martine, je te remercie pour ton écoute dans des moments pas toujours évidents.

Je tiens également à remercier Catherine Beau pour sa gentillesse, sa disponibilité, sa réactivité dans les commandes ou dans les ordres de mission et ses conseils en tant qu'experte de Microsoft Word. Passer devant ton bureau en me prenant pour Miss France me manquera beaucoup.

Rhita, ma « jumelle de thèse », nous nous suivons depuis le Master au moins ! Toujours ensemble dans les bons comme les mauvais moments, je crois que nous formons une bonne équipe de travail ! Ta présence à mes côtés a été une réelle motivation durant toutes ces soirées et ces week-ends de travail. Je te souhaite le meilleur, que ce soit dans le monde du travail ou ta vie personnelle, et j'espère que tu pourras laisser s'épanouir la belle personne que tu es. Crois toujours en toi et n'oublie jamais ce dont tu es capable.

Dr Matthieu, mon ami de promotion et collègue de thèse, je tiens à te remercier pour ton aide dans la relecture de ce manuscrit, mais aussi et surtout !, pour toutes ces conversations au « 3 pièces » autour d'un mojito, ou encore au laboratoire. Tout comme Rhita, tu m'as

accompagnée tout au long de ce parcours et tu as su être un ami sur lequel on peut compter en toutes circonstances. Je te souhaite aussi le meilleur pour l'avenir.

Enfin, je voudrais remercier tous les Pingouins, d'aujourd'hui, d'hier et de demain. C'est incroyable de voir à quel point l'on peut être soudé dans cette équipe ! Cet esprit d'entraide et de partage, les discussions, scientifiques ou non... Les conseils, l'aide pendant les grosses manip mais aussi les verres en terrasse caractérisant les « jeunes » de l'équipe 3 et font des jaloux parmi les doctorants du laboratoire. Merci à tous, sans vous, cette expérience n'aurait pas été la même.

Je voudrais aussi remercier tous les membres de l'équipe Pin/Prézeau et de la plateforme Arpège pour votre accueil. Je remercie ici Carmen, pour s'être occupée de tous les pans administratifs et pour m'avoir attendue parfois après de longues journées de manip. Particulièrement, je souhaite remercier Claire, Isabelle et Damien, de la plateforme Arpège, pour leurs précieux conseils et leur sympathie. Mes collègues de bureau ; Fanny, Charleine et Cyril : merci pour la bonne humeur au quotidien, les discussions et les restaurants ! Je remercie également Nathalie et Julie. Une pensée spéciale pour les glaces mojito et tous ces petits moments qui ont fait de mes stages à Montpellier des moments enrichissants, que ce soit d'un point de vue scientifique mais aussi humain. Je n'oublierai jamais ces instants passés avec vous. Un énorme merci !

Enfin, je remercie ma famille, qui a su m'accompagner tout au long de mes études. Je n'en serai évidemment jamais arrivée là sans vous. Je vous remercie également d'avoir compris mes longues absences et silences radio. J'espère que vous vous rendez compte de l'importance que tout cela a eue pour moi. Je vous dois tout !

Résumé

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) affichent à la fois une structure et des voies de signalisation conservées mais aussi une grande diversité fonctionnelle, nécessaire à la spécialisation. Une spécialisation importante au cours de l'évolution est sans nul doute l'apparition du caractère chimiotactique, qui permet le développement des organes et la vascularisation, ou encore les réponses immunitaires. Ces comportements chimiotactiques induits par les RCPGs peuvent impliquer des couplages de protéines G mais également une interaction avec des protéines intracellulaires telles que les β -Arrestines. Cependant, les questions portant sur les RCPGs dans *i*) leur capacité à détecter de faibles concentrations/gradients moléculaires, *ii*) la transduction du signal depuis la poche de liaison jusqu'au domaine intracellulaire du récepteur, et *iii*) les modes d'interaction des β -arrestines restent aujourd'hui l'objet de nombreuses recherches. Les données récentes fournies par les structures à haute résolution indiquent que les RCPG sont des entités dynamiques qui adoptent des conformations actives multiples, capables de lier des ligands et d'activer préférentiellement ou non certaines voies de couplage de manière dite « biaisée », conduisant ainsi à la sélectivité fonctionnelle.

Sur la base de travaux antérieurs menés par l'équipe, nous avons émis l'hypothèse que les peptides dérivés de l'urotensine II (UII) présentent des effets physiologiques inattendus en raison d'une signalisation biaisée sur le RCPG urotensinergique UT. Dans un modèle de cellules HEK293 exprimant le récepteur UT humain recombinant, nous avons déterminé le couplage aux protéines G et aux β -arrestines suite à l'activation du récepteur par l'UII, en utilisant la méthode de transfert d'énergie de bioluminescence par résonance (BRET), ainsi que la production d'IP₁ et d'AMPc en utilisant le principe de HTR-FRET (*high-time resolved-Froster resonance energy transfer*). Nous avons montré que le récepteur UT active les protéines G_{i1}, G_{oA}, G_q et G₁₃ (et non G_s) et recrute les β -arrestines 1 et 2. Ces premiers événements conduisent à 2 phases de phosphorylation des kinases ERK1/2. Les peptides testés induisent trois profils différents: l'UII, l'*urotensin II-related peptide* (URP) et l'UII₄₋₁₁ présentent le profil d'agoniste entier; l'[Orn⁸]UII et l'[Orn⁵]URP activent les protéines G avec cependant des pEC_{50s} 5 à 10 fois plus élevés, et ne recrutent pas ou peu les β -arrestines; l'urantide ne présente pas non plus la capacité d'induire le recrutement des β -arrestines mais a montré une efficacité inversement proportionnelle à activer les protéines G_i et G_q vs. G_o et se présente donc comme un agoniste partiel de toutes les voies des protéines G. Il est intéressant de noter que les peptides sont tous capables d'induire la migration et l'adhésion cellulaire,

mais régulent différemment la survie cellulaire. Ainsi, nous démontrons une signalisation biaisée entre les protéines β -arrestine et G, et entre les sous-types de protéines G, ce qui dicte les réponses cellulaires du récepteur et peut ouvrir de nouvelles opportunités thérapeutiques.

Nous avons ensuite examiné si les propriétés chimiotactiques de l'UT, tout à fait inattendues puisque l'UII était principalement connu pour ses propriétés vasoactives, sont associées à une signature structurale acquise précocement au cours de l'évolution. De fait, il avait été proposé qu'au sein des récepteurs de la famille *Rhodopsine*, une délétion ancestrale évolutive dans le DTM2 de récepteurs du groupe ancestral PEP (peptides), conduisant au repositionnement d'une proline en 2.58, aurait accompagné l'expansion des récepteurs des groupes SO (somatostatinergique), CHEM (chimiokine) et PUR (purinergique), phylogénétiquement liés. Ainsi, en étudiant le prototype de récepteur PEP Kiss1R, présentant une proline en 2.59, et les récepteurs UT et CXCR4, en tant que prototypes respectifs des récepteurs SO et CHEM, nous avons cherché à obtenir des informations sur le rôle de cette proline P2.58 dans l'acquisition du comportement chimiotactique. Pour cela, nous avons généré des mutants des prototypes Kiss1R P2.59 et des deux récepteurs P2.58 UT et CXCR4 par substitution de la Pro du DTM2 en Ala, ou par insertion/délétion pour déplacer la proline en position 2.58 ou 2.59.

Nous avons montré, dans un modèle de cellules HEK293 recombinantes, que les récepteurs Kiss1R, UT et CXCR4 mutants conservent une expression membranaire et pour la plupart, des capacités de liaison. Les récepteurs P2.58 UT et CXCR4 activés par l'UII et le SDF-1 α , montrent des couplages $G_q/Ca^{2+}/IP_1$ et/ou $G_{i/o}$ et β -Arrestine 2, et sont capables de stimuler la migration chimiotactique par ondes dynamiques d'assemblage/désassemblage de points focaux d'adhésion (FA), ainsi que *via* la sélection d'un lamellipode principal. En revanche, l'activation du récepteur Kiss1R (P2.59) par la kisspeptine-10 (KP-10) évoque des couplages $G_q/Ca^{2+}/IP_1$ et une migration aléatoire par désassemblage incontrôlé des FA, et la production de nombreux lamellipodes par cellule. La mutation de la proline ou l'insertion/délétion conduit principalement à la perte des capacités de couplage G_q et/ou G_{i1} et G_{oA} , établissant le rôle clé de cette proline du DTM2 dans les mécanismes d'activation de Kiss1R, UT et CXCR4. Ainsi, le repositionnement de la proline de la position 2.59 à 2.58 joue probablement un rôle dans la re-sensibilisation des récepteurs, déterminante pour la régulation de l'assemblage/désassemblage des FAs et la réduction du nombre de lamellipodes.

L'ensemble de ces données nous amène à proposer que l'expansion massive des récepteurs P2.58 au cours de l'évolution est corrélée à l'acquisition de mécanismes d'activation pro-chimiotactiques par la régulation spatio-temporelle de signaux intracellulaires. Notamment, ce

mécanisme d'activation spécifique serait associé à une dynamique de désensibilisation/re-sensibilisation des RCPG, à des vagues d'adhésion/détachement locales et à la sélection des protrusions membranaires nécessaires à une migration chimiotactique efficace. Cette compétence spécifique aux récepteurs P2.58, et en particulier de l'UT, implique probablement une sélectivité fonctionnelle clef vis-à-vis des β -Arrestines.

Abstract

G protein-coupled receptors (GPCRs) display a form of conservation in term of structure and signaling mode but also show diversification, allowing specialization. An important specialization during evolution is undoubtedly the pro-chemoattractant capability that enables the development of organs and vascularization, or immune responses. These chemotactic behaviors may involve G protein couplings but also interaction with intracellular proteins including β -arrestins. However, still reside the questions on *i*) their ability to detect low concentrations / molecular gradients, *ii*) transducing the extracellular binding domain signal to the intracellular domain of the receptor, and *iii*) the modes of interaction of β -arrestins to the cytosolic GPCR domains. Recent data provided by the high-resolution structures indicate that GPCRs are dynamic entities that adopt multiple conformations, *i.e.* active able to link different types of ligands to activate in a biased manner receptor coupling pathways, leading to functional selectivity.

Based on previous works of the team, we hypothesized that urotensin II (UII)-derived peptides displayed unexpected physiological effects because of such biased signaling on the GPCR UT receptor. We determined the coupling to G proteins and β -arrestins of the UII-activated UT receptor expressed in HEK293 using bioluminescence resonance energy transfer (BRET) biosensors, as well as the production of IP_{1-3} and cAMP using homogenous time-resolved Forster resonance energy transfer (FRET) (HTRF)-based assays. We showed that activated UT coupled to G_{i1} , G_{oA} , G_q , and G_{13} , excluding G_s , and recruited β -arrestins 1 and 2. Integration of these pathways led to a 2-phase kinetic phosphorylation of ERK1/2 kinases. The tested peptides induced three different profiles: UII, urotensin-related peptide (URP), and UII₄₋₁₁ displayed the full profile; [Orn⁸]UII and [Orn⁵]URP activated G proteins, although with pEC₅₀s 5–10× higher, and did not or barely recruited β -arrestin; urantide also failed to recruit β -arrestin but displayed a reversed rank order of pEC₅₀s for G_i and G_q vs. G_o and was a partial agonist of all G-protein pathways. Interestingly, the peptides differently modulated cell survival but similarly induced cell migration and adhesion. Thus, we demonstrate biased signaling between β -arrestin and G proteins, and between G-protein subtypes, which dictates the receptor's cellular responses and may open therapeutic new opportunities.

We thus addressed whether the chemotactic properties of UT, quite unexpected since the urotensinergic system was previously characterized as a potent vasoactive system, may evolve from a structural signature acquired early during evolution. Based on previous published data, it is proposed that an evolutionary ancestral deletion in TM2, leading to a repositioning of a

proline in 2.58, of some Rhodopsine-like GPCRs belonging to the PEP (peptide) receptor family, allowed expansion of the SO (somatostatinergic), CHEM (chemokine) and PUR (purinergic) receptors phylogenetically linked. Thus, by studying the PEP receptor prototype Kiss1R, exhibiting a proline in 2.59, and the UT and CXCR4 receptors, as respective prototypes of SO and CHEM receptor groups, we aimed to gain information on the role of this P2.58 in the acquisition of chemotactic behaviour. Thus, we have proceeded by engineering the P2.59 prototype Kiss1R and the two P2.58 UT and CXCR4 receptors by single mutation of Pro to Ala or insertion/deletion to reposition the Pro.

We showed that wild-type and mutant Kiss1R, UT and CXCR4 expressed in HEK293 cells conserved expression levels and for most, binding capacities. The P2.58 UT and CXCR4 receptors activated by UII and SDF-1 α , exhibited $G_q/Ca^{2+}/IP_1$ (UT) and/or $G_{i/o}$ and β -Arrestin 2 couplings, as well ERK1/2 activation. They stimulated chemotactic migration *via* dynamic wave of assembly/disassembly of focal adhesions (FAs) associated with the selection of one prominent lamellipodia. In contrast, activation of the P2.59 Kiss1R receptor by Kisspeptin (KP-10) evoked $G_q/Ca^{2+}/IP_1$ couplings, and random migration through uncontrolled disassembly of FAs and production of many lamellipodia per cells. Single mutation or insertion/deletion mainly led to loss of G_q and/or G_{i1} and G_{oa} coupling capacities, establishing the key role of the proline in TM2 of Kiss1R, UT and CXCR4 in receptor activation. In addition, the P2.59 to P2.58 repositioning likely played a role in receptor re-sensitization, determinant for regulation of FAs assembly/disassembly and reduction of the number of lamellipodia.

Thus, we propose that P2.58 receptors expanding during evolution, acquired a key competence to favor cell chemotactic migration under external ligand signals. This would be associated with a dynamic of receptor desensitization/resensitization and localized adhesion-de-adhesion waves, selecting protrusions necessary for cell directed migration. This specific competence of P2.58 in general and the UT receptor in particular, likely involves a key functional selectivity towards β -arrestins.

Sommaire

Résumé
Abstract
Sommaire	i
Liste des abréviations.....	iv
Liste des figures	vii
Liste des tableaux	ix
Chapitre 1 : Les récepteurs couplés aux protéines G	- 1 -
1. Découverte des récepteurs couplés aux protéines G	- 2 -
1.1. De la « substance » au clonage.....	- 2 -
1.2. Désorphanisation des récepteurs couplés aux protéines G.....	- 3 -
2. Structure des récepteurs couplés aux protéines G	- 4 -
2.1. Les domaines extracellulaires des récepteurs couplés aux protéines G	- 6 -
2.2. Domaines transmembranaires des récepteurs couplés aux protéines G	- 7 -
2.2.1. Structure générale	- 7 -
2.2.2. Importance des prolines dans la conformation des DTM.....	- 10 -
2.3. Régions intracellulaires	- 12 -
3. Classification des récepteurs couplés aux protéines G	- 13 -
3.1. La classification structurelle.....	- 13 -
3.2. Classification phylogénétique des récepteurs couplés aux protéines G humains....	- 16 -
4. Aspects évolutifs des récepteurs couplés aux protéines G	- 22 -
4.1. Evolution des différentes familles de RCPG.....	- 22 -
4.2. Evolution des récepteurs couplés aux protéines G au sein de famille <i>Rhodopsine</i> ..	- 23 -
4.3. Corrélation entre l'évolution des groupes de RCPG et des éléments de séquence .	- 26 -
4.4. Evolution des motifs proline du DTM2 des récepteurs de la famille <i>Rhodopsine</i> ..	- 27 -
5. Mécanismes d'activation des récepteurs couplés aux protéines G	- 29 -
6. Voies de signalisation des récepteurs couplés aux protéines G	- 33 -
6.1. Les protéines G.....	- 33 -
6.1.1. Les sous-unités α des protéines G.....	- 34 -
6.1.2. Sous-unités β et γ des protéines G	- 37 -
6.1.3. Liaison des protéines G aux récepteurs couplés aux protéines G.....	- 39 -
6.1.4. Régulation des protéines G par les RGS.....	- 41 -
6.2. Kinases de récepteurs couplés aux protéines G.....	- 42 -

6.3. Les β -arrestines.....	- 43 -
6.4. Mécanismes de transactivation par les récepteurs couplés aux protéines G	- 46 -
6.5. Biais de signalisation.....	- 47 -
Chapitre 2 : Fonctions du système urotensinergique du cluster SO	- 52 -
Comparaison au système kisspeptine (PEP) et chimiokine SDF-1/CXCR4 (CHEM) - 52 -	
1. Le système urotensinergique, de l'Aplysie à l'Homme	- 52 -
1.1. Structure des peptides urotensinergiques	- 52 -
1.2. Gènes codant les peptides urotensinergiques	- 53 -
1.3. Séquence et maturation des peptides urotensinergiques.....	- 54 -
2. Localisation de l'UII et l'URP.....	- 55 -
2.1. Localisation périphérique	- 55 -
2.2. Localisation centrale.....	- 57 -
3. Récepteur de l'urotensine II, le récepteur UT.....	- 58 -
3.1. Récepteur UT.....	- 58 -
3.2. Comparaison au système du récepteur Kiss1R du cluster PEP	- 60 -
3.3. Comparaison au système du récepteur CXCR4 du cluster CHEM.....	- 64 -
4. Localisations, signalisations et fonctions du récepteur UT	- 69 -
4.3. Pharmacologie de l'UT.....	- 71 -
4.4. Rôles du système urotensinergique à l'échelle cellulaire et moléculaire	- 75 -
4.4.1. Effets du récepteur UT sur la prolifération, la survie, l'hypertrophie et la migration cellulaire.....	- 75 -
4.4.2. Effets du système Kiss1R sur la prolifération, la survie et la migration cellulaire.....	- 78 -
4.4.3. Effet du système SDF-1 α /CXCR4 sur la prolifération, la survie et la migration cellulaire	- 79 -
Partie 1. Biased signaling regulates the pleiotropic effects of the urotensin II receptor to modulate its cellular behaviors	- 83 -
Partie 2. A key evolutionary proline position - P2.58 - in G protein-coupled receptor controls adhesion and cell polarization during chemotaxis	- 104 -
Discussion-Conclusion	- 167 -
1. Différentes voies de couplages et sélectivité fonctionnelle du récepteur UT :	
implication dans la mise au point de ligands d'intérêt thérapeutique.....	- 167 -
2. Le récepteur UT, de la famille SO, présente une signature structurale propre aux récepteurs chimiokines de la famille CHEM	- 172 -

2.1. Signalisation spécifique des récepteurs chimiotactiques UT-P2.58 et CXCR4-P2.58 par rapport au récepteur peptidique Kiss1R-P2.59	- 173 -
2.2. Caractéristiques communes des récepteurs chimiotactiques UT-P2.58 et CXCR4-P2.58 permettant de favoriser la migration directionnelle	- 175 -
2.3. Impact de la mutation ou du repositionnement de la proline du DTM2 dans l'activation des récepteurs P2.58 et P2.59	- 179 -
2.4. Changements conformationnels menant à l'acquisition de la re-sensibilisation des récepteurs P2.58 et l'interaction à la β -Arrestine 2?	- 181 -
1. Du biais de signalisation du récepteur UT...	- 184 -
2. ...vers la compréhension du mécanisme d'activation des récepteurs P2.58.....	- 185 -
Références bibliographiques	- 190 -

Liste des abréviations

5HT	: Récepteurs de la sérotonine
A/Ala	: Alanine
AC	: Adénylates cyclases
AD	: Cluster des récepteurs adrénrgiques
ADNc	: Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADP/ATP	: Adénosine diphosphate/triphosphate
AIF	: <i>Apoptosis inducing factor</i>
AMIN	: Cluster des récepteurs aminergiques
AMPc	: Adénosine monophosphate cyclique
AngII	: Angiotensine II
AP-2	: <i>Adaptator protein 2</i>
ARNm	: Acide ribonucléique messenger
AT₁	: Récepteur de l'angiotensine de type 1
β-AD	: Récepteurs β-adrénrgiques
β₂-AD	: Récepteur β-adrénrgique de type 2
BK	: Récepteurs des bradykinines
BRET	: <i>Bioluminescence resonance energy transfer</i>
C/Cys	: Cystéine
CB1	: Récepteur cannabinoïde de type 1
CCL3	: Chimiokine C-C de type 3
CCR5	: Récepteur de la chimiokine CCL3
CHEM	: Cluster des récepteurs aux chimiokines
CHO	: <i>chinese ovary hamster</i>
COS-7	: CV-1 in Origin, and carrying the SV40 genetic material
CXCL	: Chimiokines de type C-X-C
CXCR4	: C-X-C Receptor 4, récepteur du SDF-1α
D/Asp	: Acide aspartique
D₂	: Récepteur dopaminergique de type 2
DAG	: Diacyl glycérol
DTM	: Domaines transmembranaires
E/Glu	: Acide glutamique
EC50	: Concentration efficace médiane
EGF	: <i>Epidermal growth factor</i>
EGFR	: Récepteur de l' <i>epidermal growth factor</i>
ERK	: <i>Extracellular-signal-regulated kinase</i>
F/Phe	: Phenylalanine
G/Gly	: Glycine
GABA	: <i>Gamma aminobutyric acid</i>
GABAR	: Récepteur du <i>Gamma aminobutyric acid</i>
GDP/GTP	: Guanosine diphosphate/triphosphate
GEF	: <i>Guanine-nucleotide exchange factor</i>
GHRHR	: <i>Growth hormone releasing hormone receptor</i>
GnRH	: <i>Gonadotropin-releasing hormone</i>
GIRK	: <i>G-protein coupled inwardly-rectifying potassium channels</i>
GPR14	: <i>G protein-coupled receptor 14, UT</i>
GPR37	: <i>G protein-coupled receptor 37</i>
GPR54	: <i>G protein-coupled receptor 54, Kiss1R</i>
GRAFS	: <i>Glutamate, Rhodopsin, Adhesion, Frizzled/Taste, Secretine</i>

GRK	: <i>G protein-coupled receptor kinase</i>
H/His	: Histamine
HEK293	: <i>Human embryonic kidney cell 293</i>
HTR-FRET	: <i>Homogeneous time resolved-Froster resonance energy transfer</i>
HUVEC	: <i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
I/Ile	: Isoleucine
IP₃	: Inositol triphosphate
JNK	: <i>c-Jun N-terminal kinase</i>
K/Lys	: Lysine
Kiss1R	: Récepteur des kisspeptines
KP	: Kisspeptines
L/Leu	: Leucine
LGR	: <i>Leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptors</i>
M/Met	: Méthionine
M2/M3	: Récepteurs muscariniques de type 2/3
MAPK	: <i>Mitogen activated protein kinase</i>
MCHR	: <i>Melanin-concentrating hormone receptor</i>
MDS	: <i>Multidimensionnal scalling</i>
MEC	: <i>Melanocortin, Endothelial differentiation G-protein coupled receptors Cannabinoid</i>
MECA	: <i>Melanocortin, Endothelial differentiation G-protein coupled receptors Cannabinoid and Adenosin binding receptors</i>
mGluR	: Récepteur métabotrope du glutamate
MLC	: <i>Myosin light chain kinase</i>
MLCK	: <i>Myosin light chain kinase</i>
MMP	: Métalloprotéases matricielles
MRG	: Récepteurs de la famille <i>Mas-related gene</i>
MTN	: Récepteurs de la mélatonine
mTOR	: <i>Mammalian target of rapamycin</i>
N/Asp	: Asparagine
NF-κB	: <i>Nuclear factor-kappa B</i>
NMU	: Neuromédine U
NMUR	: Récepteur de la Neuromédine U
NOX2	: NADPH oxydase de type 2
NTSR1	: Récepteur de la neurotensine de type 1
OLF	: Récepteurs olfactifs
OPN	: Récepteurs des opsines
ORL-1	: <i>Opiod receptor-like 1</i>
Orn	: Ornithine
P/Pro	: Proline
p38	: MAPK de type p38
p63RhoGEF	: <i>63 kDa guanine exchange factor</i>
PAR-1	: <i>Protease-activated receptor type 1</i>
PCR	: <i>Polymerase chain reaction</i>
PDB	: <i>Protein Data Bank</i>
PDE	: Phosphodiesterase
PEP	: Cluster des récepteurs peptidergiques
PH	: <i>Pleckstrin homology</i>
PIP₂	: Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
PIP₃	: Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate
PI3K	: Phosphoinositide 3 kinase

PKA	: Protéine kinase de type A
PKC	: Protéine kinase de type C
PLC	: Phospholipase C
PTGR	: Récepteurs des prostaglandines
PTX	: Toxine pertussique
PUR	: Récepteurs purinergiques
Q/Glu	: Glutamine
R/Arg	: Arginine
RCPG	: Récepteur couplé aux protéines G
RGS	: <i>Regulator of G-protein signaling</i>
RhoA	: <i>Ras homolog gene family, membre A</i>
RMN	: Résonance magnétique nucléaire
ROCK	: <i>Rho-associated protein kinase</i>
ROS	: <i>Reactive oxygen species</i>
RTK	: Récepteurs à activité tyrosine-kinase
S/Ser	: Sérine
SII	: Peptide analogue de l'angiotensine II, [Sar ¹ ,Ile ⁴ ,Ile ⁸]AngII
SDF-1	: <i>Stromal-derived factor 1</i>
shRNA	: <i>Small hairpin ribonucleic acid</i>
siRNA	: <i>Small interfering ribonucleic acid</i>
SNC	: Système nerveux central
SO	: Cluster des récepteurs somatostatinerigiques
SOG	: Cluster des récepteurs somatostatinerigiques et de la galanine
SS/SSTR4	: Somatostatine
T/Thr	: Thréonine
TGF-β	: <i>Transforming growth factor β</i>
TSH	: <i>Thyroid-stimulating hormone</i>
UII/hUII	: Urotensine II/humaine
UII₄₋₁₁/h UII₄₋₁₁	: Peptide synthétique comprenant les acides amines 4 à 11 de l'UII
UCE	: <i>Urotensin converting enzyme</i>
URP	: <i>Urotensin II-related peptide</i>
UT	: Récepteur de l'urotensine II
V/Val	: Valine
V₂R	: Récepteur de type 2 de la vasopressine
VDCC	: <i>Voltage-dependent calcium channel</i>
VEGF	: <i>Vascular endothelial growth factor</i>
W/Trp	: Tryptophane

Liste des figures

Figure 1. Structure générale d'un RCPG.....	- 7 -
Figure 2. Structure cristallographique du récepteur opioïdérique μ de Rat.....	- 7 -
Figure 3. Représentation du réseau d'interactions entre les DTM des RCPG.	- 8 -
Figure 4. Alignement de séquences des domaines transmembranaires (DTM) des RCPGs représentatifs des 4 branches majeures de la classe A ou rhodopsine, selon la numérotation de Ballesteros & Weinstein.	- 9 -
Figure 5. Changements de conformation du TM6 du récepteur β 2-adrénergique au cours de l'activation	- 11 -
Figure 6. Représentation schématique des différentes classes de RCPG humains.	- 15 -
Figure 7. Classification GRAFS des RCPG humains.....	- 16 -
Figure 8. Relations phylogénétiques entre les RCPG du groupe α de la classe Rhodopsine..	- 17 -
Figure 9. Relations phylogénétiques entre les RCPG du groupe β de la classe Rhodopsine.	- 18 -
Figure 10. Relations phylogénétiques entre les RCPG du groupe γ de la classe Rhodopsine.....	- 19 -
Figure 11. Relations phylogénétiques entre les RCPG du groupe δ de la classe Rhodopsine	- 20 -
Figure 12. Relations entre 146 RCPG de classe A ou Rhodopsine	- 21 -
Figure 13. Apparition des familles de RCPG au cours de l'évolution.....	- 23 -
Figure 14. Mécanismes des switch moléculaires lors de l'activation des RCPG.....	- 31 -
Figure 15. Changements conformationnels de la deuxième boucle intracellulaire et des DTM5 et DTM6 au cours de l'activation de RCPG.....	- 32 -
Figure 16. Représentation de la structure d'une protéine G typique : la transducine.....	- 33 -
Figure 17. Superposition des structures de la β -arrestine 1 et β -arrestine 2.	- 43 -
Figure 18. Différents effets des β -arrestines dans la signalisation des RCPG.....	- 45 -
Figure 19. Comparaison de la séquence peptidique et de la structure tridimensionnelle de l'UII et de l'URP.....	- 53 -
Figure 20. Représentation des étapes de la maturation de l'UII, depuis son gène UTS2 jusque sa forme mature	- 54 -
Figure 21. Représentation schématique de la structure de l'UT humain	- 59 -
Figure 22. Transcription du gène <i>Kiss1</i> et maturation des kisspeptines.....	- 61 -
Figure 23. Séquences et structures des kisspeptines 10 et 54.....	- 62 -
Figure 24. Représentation schématique du Kiss1R humain	- 63 -
Figure 25. Structures cristallographiques du SDF-1 α sous forme monomérique et dimérique.....	- 65 -
Figure 26. Représentation schématique du récepteur CXCR4	- 67 -
Figure 27. Représentation schématique des profils de signalisation des ligands urotensinergiques et de leurs effets cellulaires	- 170 -

Figure 28. Schéma hypothétique récapitulant les profils de signalisation et les aspects dynamiques de la migration chimiotactique relayée par les RCPG P2.58.....- 178 -

Liste des tableaux

Tableau 1. Assignation des 13 clusters de RCPG humains non olfactifs dans les groupes G0 à G3.....	- 25 -
Tableau 2. Distribution de la (des) proline(s) au sein du DTM2 de RCPG non-olfactifs chez différentes espèces.....	- 28 -
Tableau 3. Les différentes sous-unités G α et leur fonction chez l'Homme.....	- 37 -
Tableau 4. Liste des différentes sous-unités G β et G γ chez l'Homme et fonctions.....	- 39 -
Tableau 5. Localisation périphérique de l'UII et de l'URP chez l'Homme, le Singe, le Rat et la Souris.....	- 56 -
Tableau 6. Localisation centrale de l'UII et de l'URP chez l'Homme, le Singe, le Rat et la Souris.....	- 57 -
Tableau 7. Localisation périphérique de l'UT chez l'Homme, le Singe, le Rat et la Souris.....	- 70 -
Tableau 8. Localisation centrale de l'UT chez l'Homme, le Singe, le Rat et la Souris.....	- 71 -
Tableau 9. Principaux composés agonistes et antagonistes du récepteur UT.....	- 74 -
Tableau 10. Voies de transduction associées à l'activation du récepteur UT et à l'implication dans les effets promitogènes, hypertrophiques et chimioattractants de l'UII...	- 77 -

Chapitre 1 : Les récepteurs couplés aux protéines G

La capacité des cellules à communiquer entre elles et avec leur environnement est une caractéristique déterminante dans l'évolution des organismes multicellulaires. Cette sensibilité à l'environnement, *i.e.* la perception de signaux extérieurs, permet aux cellules, et plus généralement aux organismes de s'adapter par homéostasie. Au cours du XX^{ème} siècle, c'est dans les années 80 que furent découvertes de nombreuses protéines transmembranaires dans les systèmes eucaryotes, constituant une interface indispensable entre l'environnement extra- et intracellulaire. Appelées «récepteurs», ces protéines sont capables de détecter, de manière spécifique, des signaux endogènes (hormones, amines, peptides ou encore facteurs de croissance) ou exogènes (lumière, molécules odorantes ou gustatives). Ils relayent alors une réponse cellulaire *via* un mécanisme dit de «transduction du signal», et constituent ainsi un processus biologique fondamental dans l'activité de tous les organismes.

Parmi les différentes familles de récepteurs identifiées, celle des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) est constituée d'environ 900 membres, ce qui la rend nettement majoritaire. Ces RCPG sont associés à de nombreux processus physiologiques, et donc physiopathologiques. Malgré une très faible identité dans leurs séquences nucléotidiques, les RCPG partagent une structure globale très conservée avec une organisation en 7 domaines transmembranaires (DTM). L'interaction avec leur(s) ligand(s) spécifique(s) provoque un changement de conformation qui, pour la plus part d'entre eux, permet le recrutement de protéines G hétérotrimériques. Ces dernières sont constituées d'une sous-unité α liée aux nucléotides guanosine diphosphate (GDP, état inactif de la protéine $G\alpha$) ou guanosine triphosphate (GTP, état actif de la protéine $G\alpha$), et d'un complexe hétérodimérique composé des sous-unités β et γ . Plus précisément, l'activation d'un RCPG entraîne l'échange du GDP en GTP au niveau de la sous-unité α puis la dissociation du complexe $\beta\gamma$, conduisant ainsi la transduction d'un signal intracellulaire par les sous-unités α -GTP d'une part, et les complexes $\beta\gamma$ d'autre part. Bien que les protéines G aient été les premières protéines identifiées pour leur interaction avec ces récepteurs (leur conférant ainsi leur nom), d'autres protéines sont aujourd'hui reconnues pour leur intervention dans la signalisation des RCPG. On peut notamment citer les β -arrestines et les RGS (*Regulator of G-protein signaling*), mais aussi des récepteurs membranaires de type chaperon, des RCPG ou des récepteurs à activité tyrosine-kinase, *via* des interactions directes ou par transrégulation.

1. Découverte des récepteurs couplés aux protéines G

1.1. De la « substance » au clonage

C'est au tout début du XX^{ème} siècle que la notion de « substances » spécialisées dans la réception de signaux chimiques et capables d'agir sur le métabolisme cellulaire fût proposée par le Dr John Newport Langley de l'Université de Cambridge (Langley, 1905). Selon ses hypothèses, ces substances seraient capables dans un premier temps, de réagir à des stimuli chimiques, probablement par liaison, puis d'agir à travers des effecteurs, dans la cellule pour réguler son activité. Plusieurs décennies plus tard, et en se basant sur la capacité de l'adrénaline et la noradrénaline à stimuler ou non certains processus physiologiques, tels que la vasoconstriction ou la dilatation de la pupille, le Dr Raymond Perry Ahlquist (Medical College of Georgia, Augusta) étaye cette idée et propose l'existence de récepteurs adrénergiques spécifiques α et β sur la base de leur affinité pour les différents ligands adrénergiques testés (Ahlquist, 1948). Il faudra attendre le milieu des années 1970 pour que l'équipe du Dr Robert Joseph Lefkowitz démontre formellement l'existence de ces récepteurs, grâce à la technique de radiomarquage (iodation de l'adrénaline et suivi de sa fixation) développée au sein de son laboratoire (Mukherjee *et al.*, 1975 ; Williams et Lefkowitz, 1978). Apparaît alors le terme de récepteur couplé aux protéines G, avec les premières théories développées grâce à la mise en évidence de l'interaction du récepteur avec une protéine de liaison à la guanosine (*guanine nucleotide regulatory proteins*) que l'on désigne maintenant sous le terme de protéine G, et un modèle décrivant l'interaction réversible du récepteur (R) avec cette protéine G (Lean *et al.*, 1980). Par la suite, le clonage du gène codant le récepteur β -adrénergique, puis l'analyse de son ADN complémentaire (ADNc) et de sa séquence protéique, ont permis de révéler une structure composée notamment de 7 domaines hydrophobes potentiellement transmembranaires (Kobilka *et al.*, 1987). Cette conformation avait déjà été décrite pour le récepteur de la rhodopsine quelques années auparavant (Nathans et Hogness, 1983) et avait été suggérée comme représentative des protéines membranaires sensibles à la lumière (Dixon *et al.*, 1986). Finalement, depuis ces années 1980 et avec la réussite des premières structures cristallisées de RCPG par l'équipe notamment du Dr Brian Kobilka, il est définitivement acquis que cette structure en 7 DTM est commune à l'ensemble des RCPG (Cherezov *et al.*, 2007 ; Palczewski *et al.*, 2000 ; Rasmussen *et al.*, 2007). Les 7 DTM sont organisés en hélices α reliées connectées par des *random coils* que l'on retrouve au niveau intracellulaire (boucles i_1 à i_3) et extracellulaire (boucles e_1 à e_3). Ils constituent les séquences protéiques les plus conservées dans la grande famille des RCPG. L'extrémité N-

terminale de longueur variable est située au niveau extracellulaire, tandis que l'extrémité C-terminale, elle aussi de longueur variable voire absente, est cytosolique.

Cette homologie structurale a été mise à profit dans les années 80 pour identifier de nouveaux RCPG. Proposée par le groupe de Civelli *et al.* (1988), puis reprise par de nombreux laboratoires, la première stratégie technologique a consisté à réaliser une PCR (*polymerase chain reaction*) sur un banque génomique de Rat, utilisant des oligo-nucléotides ciblant la séquence du récepteur β_2 -adrénergique mais dégénérés (mélanges d'oligonucléotides de séquences partiellement homologues) offrant ainsi la possibilité d'hybridation sur des gènes dont la séquence permet le codage de segments protéiques hydrophobes typiques des RCPG. C'est ainsi que le récepteur de type 2 de la dopamine (D_2) a été cloné (Bunzow *et al.*, 1988), ouvrant la voie au clonage de nombreux autres récepteurs par la suite. Pour autant, c'est principalement le séquençage du génome humain complet et son analyse qui ont permis d'identifier les gènes codant d'autres RCPG (Lander *et al.*, 2001).

Dans la mesure où plupart des RCPG ont été caractérisés sur la base de leur homologie de séquence avec des RCPG modèles tels que le récepteur β_2 -adrénergique ou le récepteur de la rhodopsine, pour certain, les ligands restaient inconnus, ils ont donc été appelé récepteurs «orphelins».

1.2. Désorphanisation des récepteurs couplés aux protéines G

Codés par plus de 900 gènes, soit environ 2% du génome humain, les RCPG représentent la plus large famille de protéines transmembranaires du protéome (Lander *et al.*, 2001). Leur distribution ubiquiste, la grande diversité de signaux capables de les activer, leur spécificité et leurs diverses voies de transduction soulignent leur rôle prépondérant dans la régulation de nombreuses fonctions physiologiques. Ainsi, un tiers environ des thérapies actuelles cible ce type de récepteurs (Rask-Andersen *et al.*, 2011). La désorphanisation de RCPG, c'est-à-dire la découverte du/des ligand(s) endogène(s) d'un récepteur orphelin, constitue une première étape de compréhension du rôle physiologique des RCPG et du développement de nouveaux agents thérapeutiques potentiels. Connue sous le terme « pharmacologie inverse », cette stratégie très couramment utilisée pour l'identification de ligands de RCPG orphelins (Libert *et al.*, 1991) consiste à induire l'expression d'un RCPG orphelin d'intérêt dans des cellules eucaryotes (souvent des lignées de type HEK293 (*human embryonic kidney-293*), CHO (*chinese hamster ovary cells*) etc), puis à cribler une banque de ligands potentiels sur une série de tests fonctionnels. Trois approches sont employées dans la caractérisation d'un ligand : *i*) isolation de molécules naturelles à partir d'extraits de tissus, *ii*) criblage d'une chimiothèque et *iii*)

prédiction de ligands peptidiques par approche bioinformatique en comparant par homologie de séquence les RCPG orphelins aux RCPG dont le ligand est connu. Ces approches se basent sur la détection de seconds messagers produits après interaction du ligand avec le RCPG tels que le calcium (Ca^{2+}), l'AMPc (adénosine monophosphate cyclique), l'acide arachidonique voire l'internalisation du récepteur (Civelli *et al.*, 2006). Une autre technique consiste à mesurer la liaison du $\gamma\text{-}^{35}\text{S}$ -GTP consécutive à l'activation du RCPG à partir d'extraits membranaires. L'ensemble des travaux réalisés sur les 20 dernières années a permis de désorphaniser de nombreux RCPG, permettant par la suite la caractérisation des fonctions biologiques et physiologiques qui leurs sont associées.

La plupart des ligands identifiés par ces approches sont de nature peptidique, comme les nociceptines capables de lier le récepteur *opioid receptor-like 1* (Meunier *et al.*, 1995). Malgré ces résultats probants, cette stratégie revêt certaines contraintes et n'a pas permis de désorphaniser tous les RCPG et de fait, des banques de molécules ont été mises à profit pour associer de nombreux RCPG à des ligands déjà connus. C'est ainsi que l'urotensine II (UII) et par exemple la neuromédine U (NMU) ont été identifiés comme ligand endogène du récepteur UT (ou UTS2R) (Mori *et al.*, 1999) et du récepteur NMUR (Kojima *et al.*, 2000), respectivement.

L'étude phylogénétique des RCPG orphelins peut aussi mettre en exergue des parentés entre récepteurs. Ainsi, des RCPG partageant de fortes similitudes dans leurs séquences, notamment celles codant les régions des RCPG impliquées dans la liaison, répondent classiquement aux mêmes types de ligands. Il est donc possible de prédire la catégorie de ligands potentiels à utiliser lors du criblage. Ainsi, le criblage ciblé des RCPG sans ligand connu a permis d'élargir le panel de RCPG maintenant désorphanisés. Malgré les efforts de la communauté scientifique, 140 RCPG sont toujours considérés comme orphelins (Tang *et al.*, 2012), et la question même de la liaison d'une molécule endogène pour l'activation peut se poser.

2. Structure des récepteurs couplés aux protéines G

En l'espace d'une dizaine d'années, et grâce aux comparaisons de séquences et de structures cristallographiques de RCPG de différentes classes, les connaissances sur la structure des RCPG dans leur état actif ou inactif ont beaucoup évoluées. En effet, depuis la structure cristallographique du récepteur de la rhodopsine, l'analyse cristallographique des RCPG a été limitée par leur caractère hydrophobe qui nécessite l'utilisation de détergent, l'ajout de composés additifs pour améliorer la stabilité du récepteur et préserver sa structure

tridimensionnelle, et enfin par leur flexibilité, l'ensemble constituant un obstacle pour l'obtention de cristaux de qualité. Pour ces raisons, les modifications post-traductionnelles ainsi que les parties N- et C-terminales sont retirées, ce qui limite la compréhension de leur structure et de leur rôle. La fusion de la protéine du lysozyme T4 à l'extrémité intracellulaire des DTM5 et 6, à la place de la boucle i_3 , des mutations ou l'utilisation d'anticorps (dénommés *nanobodies* : anticorps à domaine unique dérivés des immunoglobulines atypiques de camélidés) dans le but de stabiliser les RCPG dans un état et une structure donnée peuvent également affecter la mobilité des DTM et ainsi influencer la structure globale des récepteurs. Ainsi, ces étapes de purification et de cristallisation des RCPG induisent potentiellement des biais dans l'analyse de leur structure (Venkatakrishnan *et al.*, 2013).

La comparaison de près de 200 séquences de RCPG a révélé qu'ils sont constitués de 300 à 1500 acides aminés. Bien qu'il y ait peu d'homologie de séquence entre les RCPG des différentes familles (*cf.* § 3, pages 15 à 23), leur structure générale comprend nécessairement une partie extracellulaire N-terminale, 7 DTM (DTM1 à 7) structurés en hélices α , trois boucles extracellulaires (e_1 à e_3) et trois boucles intracellulaires (i_1 à i_3), et un domaine C-terminal comprenant l'extrémité carboxyle de la protéine. On peut également observer une 8^{ème} hélice α cytosolique, consécutive au DTM7, orientée parallèlement à la membrane plasmique, et généralement ancrée par l'association de palmitates aux cystéines très conservées qu'elle comprend (Figure 1).

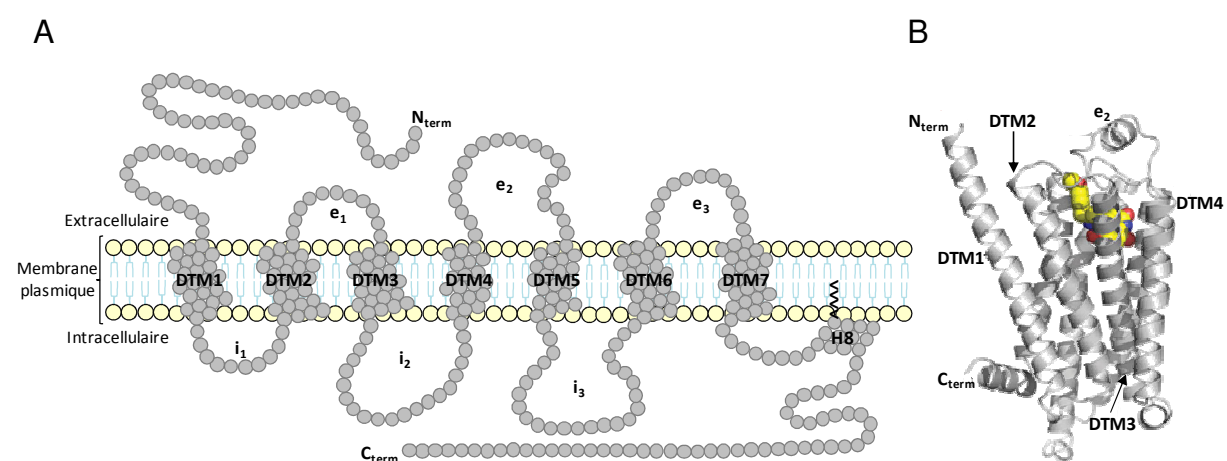


Figure 1. Structure générale d'un RCPG. **A.** Représentation schématique des 7 DTM (DTM1 à DTM7), de la partie N-terminale (N_{term}), des boucles extracellulaires (e_1 à e_3) et intracellulaires (i_1 à i_3), de la 8^{ème} hélice α (H8) ancrée à la membrane grâce à une palmitoylation (vvvv), et de la queue C-terminale (C_{term}). **B.** Structure cristallographique du récepteur β_1 -adrénergique de dinde (*Meleagris gallopavo*) lié à un agoniste (le carmotérol, dont les atomes de carbone (jaune), d'oxygène (rouge) et d'azote (bleu) sont représentés). Les extrémités N_{term} et C_{term} du récepteur β_1 -adrénergique, ainsi que les DTM1 à DTM4 et l' e_2 sont indiqués (d'après Warne *et al.*, 2008).

D'une manière générale, la partie extracellulaire intervient dans l'accessibilité du ligand; la région transmembranaire correspond au cœur structurel de la protéine et forme notamment la poche de liaison du ligand, liaison qui induit un réarrangement des DTM. Ce changement conformationnel permet alors la transduction du signal *via* l'interaction entre l'interface intracellulaire (queue C-terminale et boucles i_1 à i_3) et des protéines cytosoliques de signalisation telles que les protéines G ou les β -arrestines.

2.1. Les domaines extracellulaires des récepteurs couplés aux protéines G

Comprenant la partie N-terminale et les boucles e_1 à e_3 , cette partie est la plus variable en termes de séquence et consécutivement de structure (Lagerström et Schiöth, 2008). Elle comporte des motifs de N-glycosylation, impliqués dans l'adressage à la membrane plasmique plus ou moins conservés dans la région N-terminale, ainsi qu'un pont disulfure entre une cystéine située dans l'extrémité extracellulaire du DTM3 et une cystéine de la boucle e_2 . Très conservé parmi une large partie des RCPG, ce pont disulfure participerait à l'intégralité structurale du récepteur, au transport à la membrane plasmique et à la liaison du ligand (Savarese *et al.*, 1992), ainsi qu'à la signalisation du RCPG (Kosugi et Mori, 1994). Il ne s'agit toutefois pas d'une généralité, comme l'atteste la structure de certains récepteurs dépourvus de ce pont disulfure, *e.g.* les récepteurs du sphingosine-1-phosphate et de l'acide lysophosphatidique.

La région extracellulaire est particulièrement sollicitée dans la liaison des ligands peptidiques, tels que la vasopressine (Conner *et al.*, 2007), l'endothéline-1-2 (Arai *et al.*, 1993) ou les opioïdes (Dietrich *et al.*, 1998), mais aussi des ligands de grande taille comme les hormones glycoprotéiques, telles que la *thyroid-stimulating hormone* (TSH) (Perlman *et al.*, 1995). On distingue deux types d'arrangements de la région extracellulaire des récepteurs de classe A ou rhodopsine (*cf* § 3) : certaines sont disposées de telle sorte qu'elles occluent la poche de liaison du ligand tandis que d'autres laissent un vaste espace ouvert permettant à l'agoniste d'atteindre la poche de liaison située au sein des DTM. Ces deux mécanismes dépendent principalement du caractère hydrophobe ou hydrophile du ligand. À titre d'exemple, la partie N-terminale et la boucle e_2 de la rhodopsine adoptent chacune, grâce à la présence de deux feuilletts β , une conformation qui permet de recouvrir le rétinol 11-*cis*, ligand hydrophobe lié de façon covalente au récepteur, ce qui prévient son hydrolyse (Palczewski *et al.*, 2000). Pour les récepteurs de molécules solubles dans l'eau, il n'existe pas de structure fondamentalement conservée, l' e_2 peut-être organisée en hélice α , feuillet β ou encore seulement partiellement structurée. Cependant, les simulations de dynamique

moléculaire suggèrent que l'e₂ serait nécessaire par exemple, aux premières étapes de reconnaissance et de sélection du ligand par les récepteurs β -adrénergiques (González *et al.*, 2011). Plusieurs études indiquent que la délétion de ce domaine N-terminal augmente l'expression membranaire des récepteurs aux cannabinoïdes, du GPR37 et du récepteur α_{1D} -adrénergique (Andersson *et al.*, 2003; Dunham *et al.*, 2009; Hague *et al.*, 2004), suggérant son rôle important dans l'adressage de certains RCPG à la membrane plasmique. De fait, cette région serait majoritairement impliquée dans les processus précédant l'activation des RCPG de classe A, tels que l'adressage à la membrane et la liaison du ligand.

2.2. Domaines transmembranaires des récepteurs couplés aux protéines G

Les DTM des RCPG présentent une conformation en hélices hydrophobes de type α , ancrées dans la membrane, assurant le lien entre l'environnement extra- et intracellulaire. Ils relaient, *via* des changements de conformation induits par la liaison du ligand depuis la partie extracellulaire jusque dans la partie intracellulaire, les mécanismes indispensables à l'établissement d'une cascade de signalisation par le recrutement ou l'implication de protéines cytosoliques ou membranaires. Et pour certains récepteurs, les DTM constituent le site de liaison du ligand.

2.2.1. Structure générale

Les DTM forment le « cœur » des RCPG, élément central dans l'activation des récepteurs. Leurs 7 DTM sont disposés de manière globulaire délimitant un « pore » central, chaque DTM étant orienté dans le sens inverse des aiguilles d'une montre, excepté le DTM3 qui occupe une position centrale au sein des autres DTM (Figures 1 et 2).

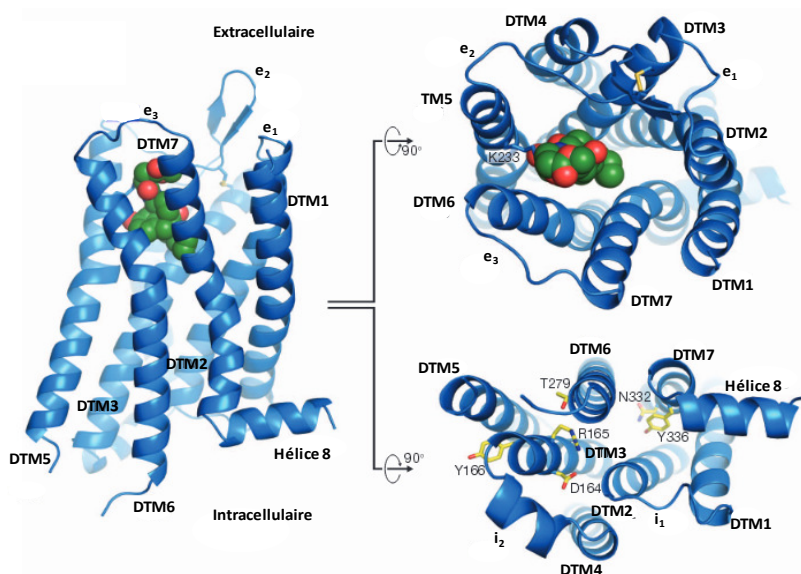


Figure 2. Structure cristallographique du récepteur opioïdérique μ de Rat. Vue depuis le plan membranaire, les domaines extracellulaire et intracellulaire du récepteur μ liés à un antagoniste irréversible spécifique des récepteurs μ et κ (le β -funaltrexamine, β -FNA). On peut remarquer la position centrale du DTM3, qui est en étroite interaction avec l'antagoniste (d'après Manglik *et al.*, 2012).

Les différentes hélices présentent un degré d'inclinaison variable par rapport au plan de la membrane plasmique, conférant aux RCPG une forme en V, la partie la plus ouverte étant du côté extracellulaire (Figure 2). Les hélices sont reliées par des boucles intra- et extracellulaires *random coils* hydrophiles et leur structure tertiaire est stabilisée par des interactions non covalentes inter-hélices de type ionique (Shapiro *et al.*, 2002) ou liaisons hydrogènes (Gray et Matthews, 1984). La comparaison des structures cristallographiques de différents RCPG révèle que seules les positions de ces interactions sont conservées et situées dans les régions centrales ou cytoplasmiques des DTM ; les résidus impliqués sont quant à eux variables. Ainsi, il existe une forte interaction entre les DTM1-DTM2, DTM3-DTM4, DTM3-DTM5 et DTM3-DTM6-DTM7, selon la comparaison de 17 structures cristallographiques de RCPG de la classe A ou rhodopsine (*cf.* § 3.) (Figure 3A) (Venkatakrisnan *et al.*, 2013).

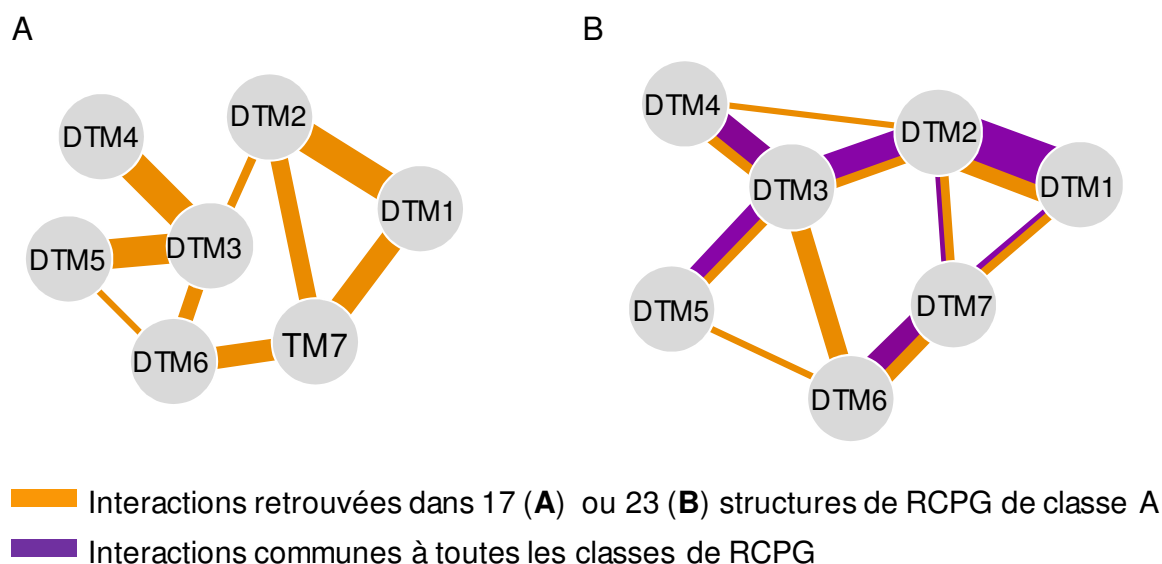


Figure 3. Représentation du réseau d'interactions entre les DTM des RCPG. **A.** Interactions entre les DTM de 17 RCPG de la classe A. Deux résidus sont considérés en contact si la distance entre deux de leurs atomes est inférieure ou égale à la distance d'interaction de van der Waals (correspondant à la somme des rayons de van der Waals de chacun des atomes, majorée de 0,6Å). L'épaisseur des jonctions entre les DTM est proportionnelle au nombre d'interaction entre ceux-ci (d'après Venkatakrisnan *et al.*, 2013). **B.** Interactions retrouvées dans au moins 23 des 24 structures de RCPG de classe A étudiées. Les interactions communes à toutes les classes de RCPG sont en violet, tandis que celles retrouvées uniquement dans les RCPG de classe A sont en orange (d'après Cvicek *et al.*, 2016).

Une seconde étude, menée par Cvicek *et al.* en 2016 et portant sur l'alignement de structures de 26 RCPG de différentes classes, met quant à elle en évidence des interactions fortement conservées entre les DTM4-DTM2-DTM3 et DTM1-DTM2-DTM7 (Figure 3B), le DTM2 jouant un rôle interactionnel central dans ce cas. Particulièrement, l'interaction entre

les résidus en position 2.45 et 3.42 selon la nomenclature proposée par Ballesteros et Weinstein en 1995 est conservée entre toutes les classes de RCPG (Cvicek *et al.*, 2016).

La nomenclature proposée par Ballesteros et Weinstein permet de préciser la position relative d'un acide aminé d'un segment transmembranaire par rapport au résidu le plus conservé au sein du DTM, arbitrairement assigné à la position 50 (Figure 4).

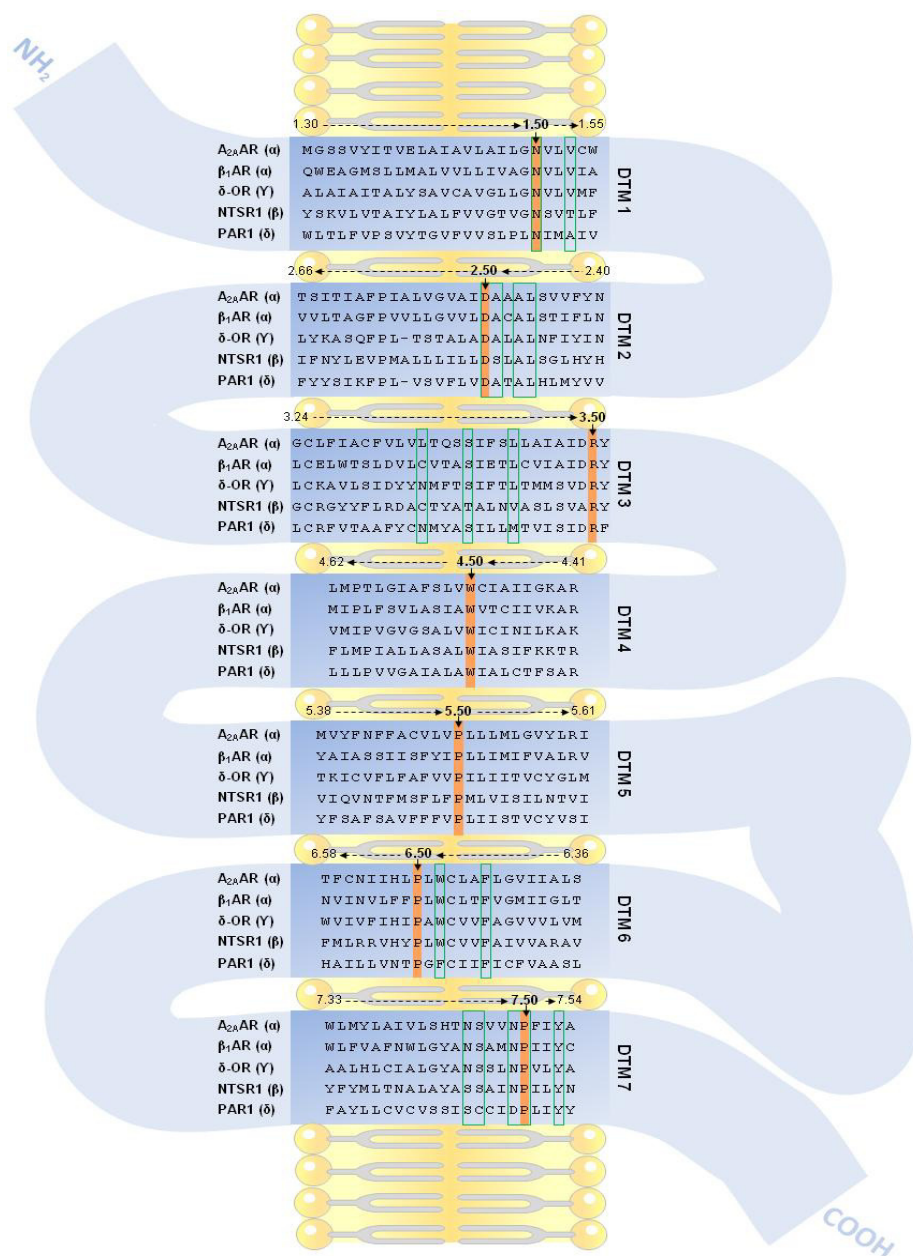


Figure 4. Aligment de séquences des domaines transmembranaires (DTM) des RCPGs représentatifs des 4 branches majeures de la classe A ou rhodopsine, selon la numérotation de Ballesteros & Weinstein. Cette numérotation, qui est basée sur la présence de résidus hautement conservés dans chacun des 7 DTM se compose de annotations : la première indique l'hélice (DTM1 à 7) et la seconde, la position du résidu considéré par rapport au résidu le plus conservé de l'hélice, défini comme le nombre 50. Le résidu le plus conservé de chaque domaine (X.50, boîte orange) est marqué par une flèche. Les résidus constituant la poche Na⁺ sont encadrés en vert. La lettre grecque entre parenthèses à la droite du nom du récepteur indique la branche de la classe A ou Rhodospine à laquelle le RCPG appartient. Abréviations: A_{2A}AR, récepteur A_{2A} de l'adénosine ; β₁AR, récepteur β₁-adrénergique; δ-OR, récepteur opioïde δ ; NTSR1, récepteur de la neurotensine de type 1 ; PAR1, récepteur de la thrombine.

Le chiffre précédant la position relative correspond quant à lui au DTM en question. Ainsi, dans l'exemple sus-cité, la position 2.45 fait référence au 5^{ème} acide aminé en amont de l'acide aminé le plus conservé du DTM2 (Ballesteros et Weinstein, 1995).

Bien qu'elles soient ancrées dans la membrane plasmique, les hélices α sont composées de résidus hydrophobes pour les uns et hydrophiles pour les autres. En effet, l'ancrage à la membrane nécessite un caractère hydrophobe des résidus, tandis que la partie supérieure des DTM, exposée à l'environnement extracellulaire et constituant ainsi la poche de liaison du récepteur, nécessite des résidus polaires, ou hydrophiles. Ainsi, les chaînes latérales des résidus hydrophiles sont orientées vers le centre du RCPG, *e.g.* vers le site de liaison du ligand, tandis que les chaînes des résidus hydrophobes sont dirigées vers la bicouche lipidique. On peut donc considérer que les hélices transmembranaires de RCPG sont amphiphiles (Crasto, 2010). Il existe une complémentarité entre les charges présentes sur les chaînes latérales des DTM au niveau de la poche de liaison et les charges portées par le ligand. À titre d'exemple, la neurotensine, peptide de 13 acides aminés, agoniste endogène du RCPG NTSR1 (*Neurotensin Receptor 1*), possède des charges positives sur les chaînes latérales des arginines (Arg⁸ et Arg⁹), alors que le récepteur quant à lui présente des charges négatives au niveau de la poche de liaison (Krumm et Grisshammer, 2015).

2.2.2. Importance des prolines dans la conformation des DTM

La proline (P) est le seul acide aminé cyclique pyrrolidique et contient une amine non-primaire, dite secondaire, qui modifie ainsi ses capacités d'interaction avec d'autres résidus présents dans une séquence peptidique donnée. En effet, la perte de la liaison hydrogène intra-hélice entre le cycle pyrrolidique de la proline et l'oxygène du groupe carbonyle du résidu du tour d'hélice précédent (c'est à dire positionné en $i-4$, i étant la position de la proline) requiert une adaptation de la conformation α pour éviter un encombrement stérique et assurer une stabilisation de la structure de l'hélice. Cette dernière se distord donc légèrement, créant ainsi des structures que l'on nomme selon leurs caractéristiques « cassures en coude », « renflements π » ou encore « distorsions non-canoniques », et qui se traduisent par un changement dans l'orientation de l'hélice (Cordes *et al.*, 2002). L'angle moyen de la courbure induite par la présence d'une proline est situé autour de 20° (Chakrabarti et Chakrabarti, 1998; Deupi *et al.*, 2004).

La présence, en amont ou en aval, de certains acides aminés, tels qu'une sérine (S) ou une thréonine (T), fréquemment retrouvés dans les DTM, peut diminuer ou accentuer ces distorsions causées par les prolines. Les motifs S/TxP et S/T-P accentuent la courbure en

augmentant à la fois l'angle induit par la proline et l'angle de torsion de l'hélice, tandis que les motifs S/TxxP, PxS/T et PxS/T diminuent ces paramètres (Deupi *et al.*, 2004; Weber *et al.*, 2012). Puisqu'elles compromettent la stabilité des hélices α , les prolines sont généralement absentes de ces structures, à l'exception des DTM des RCPG.

Ces prolines représentent parfois l'acide aminé le plus conservé des DTM des RCPG, ce qui leur conférerait un rôle clef évolutif. En modifiant la courbure, l'orientation des DTM mais aussi leur flexibilité, les résidus prolines participent donc à l'ouverture de la poche de liaison, l'orientation de certains résidus impliqués dans le site de liaison du ligand, ainsi qu'à l'orientation de la partie intracellulaire des DTM. Plusieurs études ont montré que la modification des motifs S/TxP et les changements d'orientation des DTM, particulièrement de leur domaine cytosolique C-terminal, sont associés aux mécanismes d'activation des RCPG (Govaerts *et al.*, 2001; Miura et Karnik, 2002). La superposition des structures cristallographiques du récepteur β 2-adrénérique lié à des agonistes, agonistes inverses ou antagonistes montre, lors de l'activation de ce récepteur, un mouvement systématique de la région proche de la proline P2.59 du DTM2 vers le DTM3 ainsi qu'un rapprochement de l'angle du DTM5 vers les DTM3 et DTM4 (Van der Kant et Vriend, 2014). De la même manière, la superposition des structures cristallographiques du DTM6 de ce même récepteur lié à un antagoniste (récepteur dans un état inactif), à une protéine G ou à un *nanobody* stabilisant son état actif, montre que lors de l'activation, si l'angle créé par la proline conservée en 6.50 reste identique, la partie intracellulaire du DTM6 est très mobile (Figure 5).

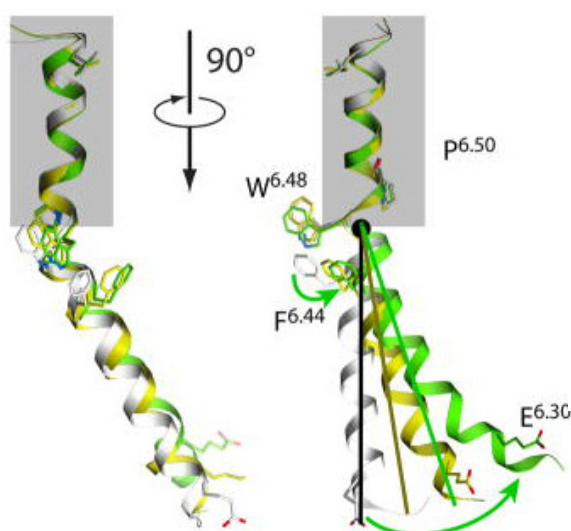


Figure 5. Changements de conformation du TM6 du récepteur β 2-adrénérique au cours de l'activation. Structures de l'état inactif (code Protein Data Bank (PDB) 2RH1, gris), de l'état actif du récepteur lié à un *nanobody* (code PDB 3P0G, jaune) ou à une protéine G (code PDB 3SN6, vert) superposées au niveau de la partie extracellulaire au dessus de la proline 6.50 (rectangle gris) (d'après Katritch *et al.*, 2013). F, phenylalanine ; W, tryptophane ; E, acide glutamique. P, proline.

En conclusion, les prolines des DTM sont étroitement impliquées dans les mécanismes de transduction du signal par les RCPG, depuis la liaison du ligand jusqu'à l'activation des RCPG et le recrutement de protéines intracellulaires telles que les protéines G.

2.3. Régions intracellulaires

Ces régions comprennent les boucles intracellulaires i_1 à i_3 ainsi que le fragment carboxy-terminal pouvant lui-même se structurer en partie sous forme d'une huitième hélice α ancrée à la membrane plasmique *via* la palmitoylation de résidus cystéines qu'il contient. Les boucles intracellulaires et la région C-terminale contiennent des acides aminés responsables de l'interaction du RCPG avec des partenaires protéiques cytosoliques (Katritch *et al.*, 2012; Rasmussen *et al.*, 2007). En accord avec les structures cristallographiques résolues, les boucles intracellulaires i_1 et i_2 sont généralement assez courtes, et structurées parfois en hélices comprenant jusqu'à deux tours. Alors que la structure de la boucle i_1 est largement conservée dans les RCPG cristallisés à ce jour, celle de la boucle i_2 est beaucoup plus variable. Or, après activation par fixation du ligand, cette boucle i_2 est classiquement reconnue dans l'interaction entre le RCPG et une sous-unité α des protéines G (Katritch *et al.*, 2012). Un des points conservés dans cette boucle intracellulaire est la présence d'une arginine (R) ou d'une tyrosine (Y) qui forme une interaction ionique avec l'asparagine (D) du motif D-R-Y de l'extrémité cytosolique du DTM3, rapprochant ainsi l' i_2 des domaines transmembranaires. Cette interaction est donc impliquée dans la stabilité de la structure globale des RCPG, comme cela a été montré grâce à la résolution de la structure cristallographique du récepteur β_1 -adrénergique complexé à un antagoniste de haute affinité (Warne *et al.*, 2008). Peu structurées, flexibles et donc fréquemment tronquées lors des études de cristallographie, les structures de la boucle i_3 et de la région C-terminale restent les moins documentées. Pour autant, il est reconnu que ces régions, généralement longues et souples et dépourvues de structure ordonnée, participent directement à la reconnaissance spécifique de partenaires protéiques, et sont nécessaires à leur activation et/ou leur fonction (Gsponer et Babu, 2009).

L'extrémité C-terminale des RCPG peut comprendre des sites de palmitoylation, à savoir des cystéines (C) sous le motif CxxxC. La palmitoylation est une modification post-traductionnelle nécessaire à l'ancrage à la membrane plasmique d'une 8^{ème} hélice. Ces sites joueraient donc un rôle clé dans la fonctionnalité et la stabilité de la conformation des RCPG, ainsi que dans leur homodimérisation (Zheng *et al.*, 2012). L'extrémité C-terminale peut également comprendre des sites de phosphorylation (résidus sérine et thréonine, notamment) opérée par diverses kinases partenaires des RCPG, tels que les GRKs (*G-protein-coupled receptor kinases*), par des protéines kinases de type A ou C (PKA, PKC), ou encore par des récepteurs à activité tyrosine-kinase (RTK). Une fois phosphorylés, ces résidus constituent des motifs qui peuvent être reconnus par des protéines partenaires, servir de plateforme pour

ces protéines, et être indispensables à leurs fonctions (Nobles *et al.*, 2011). Pour exemple, les GRKs phosphorylent le domaine C-terminal ou bien la boucle i_3 des RCPG, conférant alors une forte affinité pour les β -arrestines, qui peuvent ainsi être recrutées par le récepteur. Les β -arrestines initient un certains nombres de mécanismes, tels que la désensibilisation du récepteur par découplage des protéines G *via* encombrement stérique (Lohse *et al.*, 1990), l'internalisation du récepteur par recrutement de clathrine et de protéines adaptatrices telles que la protéine AP-2 (*Adaptor protein complex 2*) (Wolfe et Trejo, 2007), mais aussi le rapprochement d'autres partenaires protéiques, cytoplasmiques ou membranaires.

3. Classification des récepteurs couplés aux protéines G

Bien que les RCPG partagent une structure commune, certaines caractéristiques permettent de les distinguer et de les classer dans différentes familles. Cependant, que l'on se base sur l'homologie de séquence, de structure, le mode de liaison du ligand ou sur leur parenté phylogénique, le grand nombre de RCPG rend difficile l'élaboration d'un système de classification global.

3.1. La classification structurelle

Anciennement la plus utilisée, cette première classification fût proposée au début des années 90 par la bioinformaticienne Teresa K. Attwood et son collègue John B. C. Findlay de l'Université de Leeds. Celle-ci repose sur l'identification, par analyse des séquences protéiques des domaines transmembranaires des RCPG répertoriés chez les vertébrés et invertébrés, d'empreintes appelées « *fingerprints* » conservées au sein de certains groupes de RCPG (Attwood et Findlay, 1994). Six classes (A à F) ont ainsi été proposées : Rhodopsine (A), Sécrétine (B), Métabotropique glutamate (C), *Fungal pheromone* (D), AMPc (E) et *Frizzled smoothed* (F). Chez l'Homme, les classes A, B et C sont majoritaires. En 1994, une première base de données (la *G protein Coupled Receptor Database*), regroupant les flux d'informations exponentielles sur les RCPG, sont construites sur cette méthode de classification et participe ainsi à sa reconnaissance par l'ensemble de la communauté de chercheurs spécialistes des RCPG (Kolakowski, 1994). Les membres RCPG d'une même classe, partagent des homologies de séquence, de structure, et de mode de liaison du ligand.

Comprenant à elle seule 670 membres (dont environ 400 récepteurs olfactifs), la classe A constitue la plus grande famille de RCPG (avec 80% des RCPG répertoriés), probablement aussi la plus étudiée. Elle comporte effectivement 23 des 28 récepteurs dont les structures cristallisées à haute résolution sont élucidées *e.g.* la rhodopsine (Palczewski *et al.*, 2000), le

récepteur β_2 -adrénergique (Rasmussen *et al.*, 2007), le récepteur du *stromal cell-derived factor 1* (SDF-1 α), *C-X-C receptor 4* (CXCR4) (Wu *et al.*, 2010) ou encore le récepteur μ -opioïde (Manglik *et al.*, 2012). Les récepteurs de classe A sont capables de lier une grande variété de composés tels que les molécules dites odorantes, les peptides, les hormones, les glycoprotéines, les chimiokines ou encore des neurotransmetteurs classiques. Les homologies de séquence entre les récepteurs de la classe A sont très faibles : elles reposent sur la conservation de quelques rares résidus, principalement situés dans les DTM, qui joueraient un rôle primordial dans leur structure et fonctionnalité. Plus précisément, il s'agit du motif D(E)-R-Y(V) à la jonction entre le DTM3 et la i_2 , le motif NPxxY dans le TM7, ou encore deux cystéines présentes au niveau des boucles e_1 (ou à l'extrémité extracellulaire du DTM3) et e_2 qui forment un pont disulfure caractéristique de nombreux RCPG, ainsi qu'un acide aminé très conservé dans chacun des DTM (position 50 d'après la classification de Ballesteros).

En 1999, les Drs Joël Bockaert et Jean-Philippe Pin ont proposé de sous-diviser la classe A en trois groupes selon des parentés phylogénétiques et selon leur mode de liaison au ligand (Bockaert et Pin, 1999) (Figure 6). Le groupe 1a comprend les récepteurs de petites molécules, comme les récepteurs adrénergiques et la rhodopsine. Le site de liaison est situé entre les DTM, *e.g.* dans le coeur des RCPG, dans une cavité formée par les DTM3, 5 et 6. Le groupe 1b compte notamment les récepteurs des peptides et des cytokines, et le site de liaison inclut la partie N-terminale des RCPG, les boucles extracellulaires ainsi que la partie supérieure des DTM. Le groupe 1c est caractérisé par un large domaine extracellulaire N-terminal. Le site de liaison est principalement composé de la partie N-terminale des récepteurs, ainsi que des e_1 et e_2 .

Avec 20 membres, les récepteurs de classe B forment la deuxième famille de RCPG, incluant les récepteurs de certaines hormones et certains neuropeptides, *e.g.* le *Growth hormone releasing hormone receptor* ou le récepteur du *Vasoactive intestinal polypeptide*. Cette classe peut être divisée en deux groupes distincts : le groupe *Secretin* et le groupe *Adhesion*. Les RCPG de classe B partagent un large domaine N-terminal extracellulaire, pouvant aller jusqu'à 300 acides aminés, dont de nombreuses cystéines très conservées qui permettent la formation d'un réseau de ponts disulfures.

Les récepteurs de classe C sont caractérisés par leur très large domaine N-terminal extracellulaire dont la taille varie entre 300 et 600 acides aminés (contre quelques dizaines pour les récepteurs de la classe A) organisé en deux lobes.

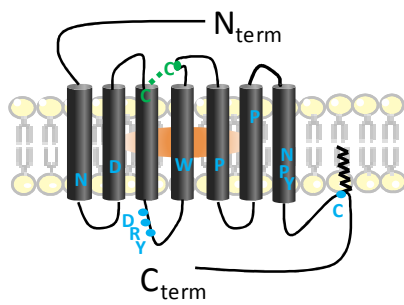
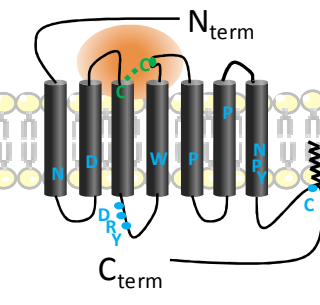
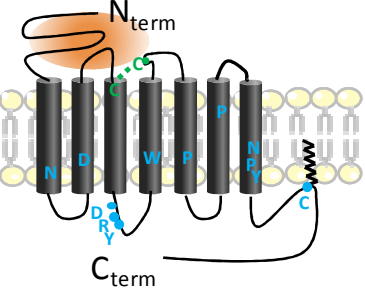
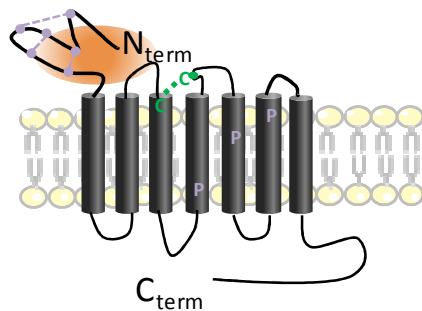
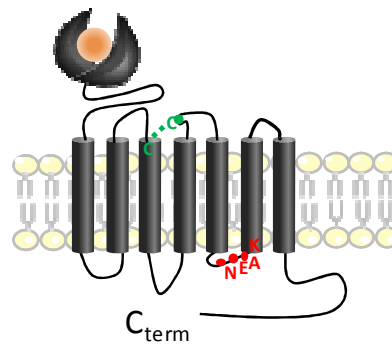
Classe A*Famille 1a**Famille 1b**Famille 1c***Classe B****Classe C**

Figure 6. Représentation schématique des différentes classes de RCPG humains. Schématisation des RCPG de classe A (et des familles 1a, 1b et 1c), B et C, ainsi que du site d'interaction avec leur ligand naturel (orange). Les seuls motifs conservés entre les RCPG de classe A, B et C sont les cystéines du DTM3 et de l' e_2 formant un pont disulfure (représenté en vert). Les résidus et motifs communs aux RCPGs de classe A sont indiqués en bleu. On peut noter la conservation d'un résidu dans chaque hélice, le motif DRY (qui peut aussi être ERY), et une cystéine de la région C-terminale pouvant être un point de palmytoylation servant d'ancrage à la 8^{ème} hélice α . La famille 1a comprend les récepteurs des petits ligands, comme les récepteurs d'odorants ou les récepteurs β -adrénergiques. Le site de liaison est situé au sein des DTM. La famille 1b inclue les récepteurs aux peptides qui se fixent sur un site constitué de la partie N-terminale, des boucles extracellulaires et de la partie supérieure des DTM. La famille 1c comprend les récepteurs des hormones glycoprotéiques qui interagissent principalement au niveau de l'extrémité extracellulaire composée de la partie N-terminale et des e_1 et e_2 . La classe B est caractérisée par une large partie N-terminale qui contient de nombreuses cystéines impliquées dans un réseau de ponts disulfures. Les motifs et résidus conservés au sein de cette classe sont indiqués en mauve. La classe C est caractéristique des ligands de très petite taille, comme les ions ou le GABA (acide gamma-aminobutyrique). Ces récepteurs possèdent une partie N-terminale organisée en deux lobes, spécialisés dans la liaison du ligand. Cette structure particulière est appelée *Venus fly-trap*. Le motif NEAK, conservé au sein de cette famille, est indiqué en violet (adaptée d'après Bocaert et Pin, 1999).

Appelée *Venus fly-trap* en référence à la plante carnivore *Dionaea muscipula*, cette structure abrite une cavité impliquée dans la liaison du ligand. Cette famille compte par exemple les récepteurs métabotropiques glutamatergiques (mGluR₁ à mGluR₈), GABAergiques (*Gamma-aminobutyric acid*; GABAR1a-f/GABAR2a-c) ou encore le récepteur sensible au calcium CASR (*Calcium sensing receptor*).

Les classes D et E (soit *Fungal pheromone* et AMPc) correspondent aux récepteurs de phéromones uniquement retrouvés chez la levure. Les récepteurs de classe F correspondent

quant à eux aux récepteurs AMPc de l'espèce *Dictyostelium discoideum* (Attwood et Findlay, 1994).

Cette première classification n'est basée que sur l'analyse des DTM des RCPG, et n'est pas spécifique des RCPG humains. Ainsi, les familles D, E et F ne sont pas représentées chez l'Homme, et les familles A comprennent des récepteurs de l'opsine des invertébrés et des archaebactéries. C'est pour cela qu'une nouvelle classification des RCPG répertoriés dans le génome humain uniquement, a été proposée moins de dix ans plus tard par Fredriksson *et al.* (Fredriksson *et al.*, 2003).

3.2. Classification phylogénétique des récepteurs couplés aux protéines G humains

Sous l'acronyme GRAFS : *Glutamate*, *Rhodopsine*, *Adhésion*, *Frizzled/Taste* et *Sécrétine*, cette classification en cinq familles repose sur l'analyse de distances phylogéniques entre séquences (« neighbour-joining ») de 342 gènes de RCPG humains non-olfactifs. Il s'agit de: *Glutamate* (G, 15 RCPG, qui correspondent à la classe C), *Rhodopsine* (R, 701 RCPG dont 241 non-olfactifs, qui correspondent à la classe A), *Adhésion* (A, 24 RCPG, qui équivalent à la classe B), *Frizzled/taste2* (F, 24 RCPG) et *Sécrétine* (S, 15 RCPG, qui appartiennent à la classe B) (Figure 7).

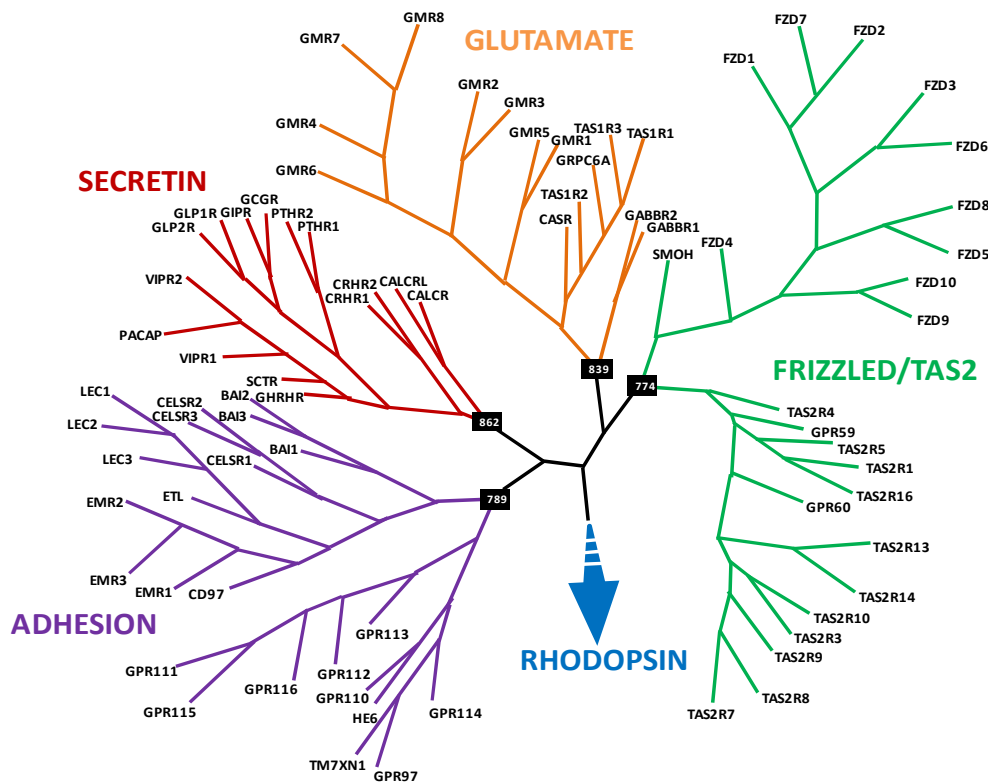


Figure 7. Classification GRAFS des RCPG humains. Relations phylogénétiques entre les RCPG humains. L'arbre a été obtenu en utilisant la méthode de maximum de parcimonie. La position de la famille *Rhodopsine* a été déterminée en analysant vingt RCPG lui appartenant, choisis de manière aléatoire (d'après Fredriksson *et al.*, 2003).

Toujours sur la base des distances phylogénétiques, quatre groupes principaux se dégagent (α , β , γ et δ) de la classe *Rhodopsine*, particulièrement riche; ces groupes comprennent eux-mêmes différentes branches, ou clusters déterminés par la méthode de maximum de parcimonie (méthode statistique non-paramétrique permettant de construire des arbres de classification hiérarchique et de choisir l'arbre le plus probable en sélectionnant celui qui contient le moins de changements évolutifs).

Le **groupe α** comprend 89 RCPG répartis en cinq clusters: les récepteurs des prostaglandines (PTGR), des amines (AMIN), des opsines (OPN), de la mélatonine (MTN) et les récepteurs MECA (*Melanocortin, Endothelial differentiation G-protein coupled receptors, Cannabinoid and Adenosin binding receptors*) (Figure 8).

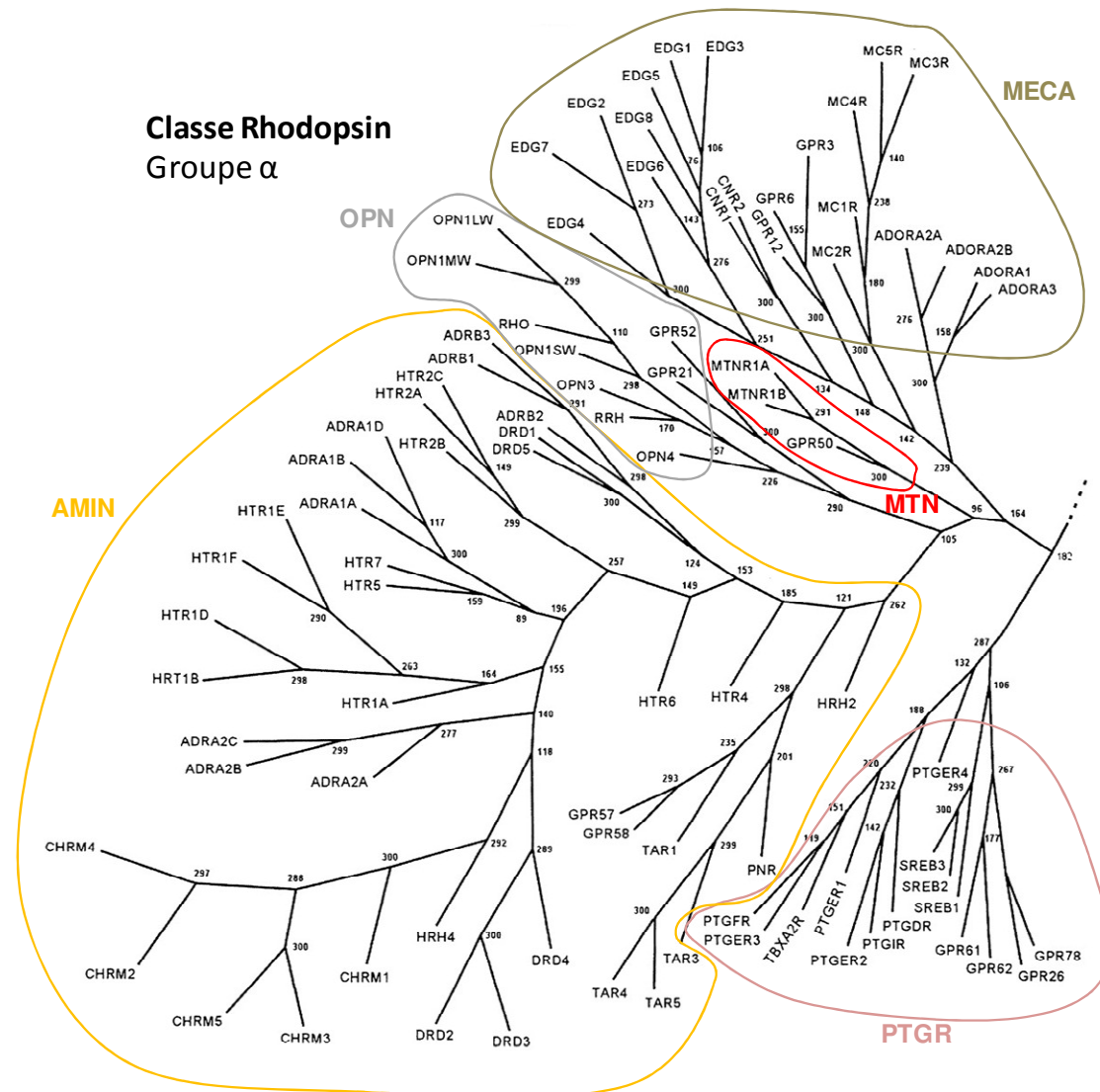


Figure 8. Relations phylogénétiques entre les RCPG du groupe α de la classe Rhodopsine. L'arbre a été obtenu en utilisant la méthode de maximum de parcimonie. Le groupe α comprend cinq clusters : les récepteurs de prostaglandines (PTGR), des amines (AMIN), des opsines (OPN), de la mélatonine (MTN) et les récepteurs MECA (*Melanocortin, Endothelial differentiation G-protein coupled receptors, Cannabinoid and Adenosin binding receptors*) (d'après Fredriksson *et al.*, 2003).

Avec 40 membres, le cluster des récepteurs des amines est le plus représenté, incluant les récepteurs sérotoninergiques, dopaminergiques ou encore adrénérgiques ; tous les ligands connus de ce cluster de récepteurs ont une homologie structurale relativement conservée ; ce sont des molécules de petite taille avec un cycle aromatique unique.

Le groupe β possède 36 récepteurs, dont tous les ligands connus sont des peptides (PEP) (Figure 9). Cependant, aucun cluster particulier ne se dégage de l'analyse des séquences des récepteurs de ce groupe. On peut citer, pour exemple, les récepteurs de la neurotensine, du neuropeptide Y ou celui de l'ocytocine ainsi que quelques récepteurs orphelins.

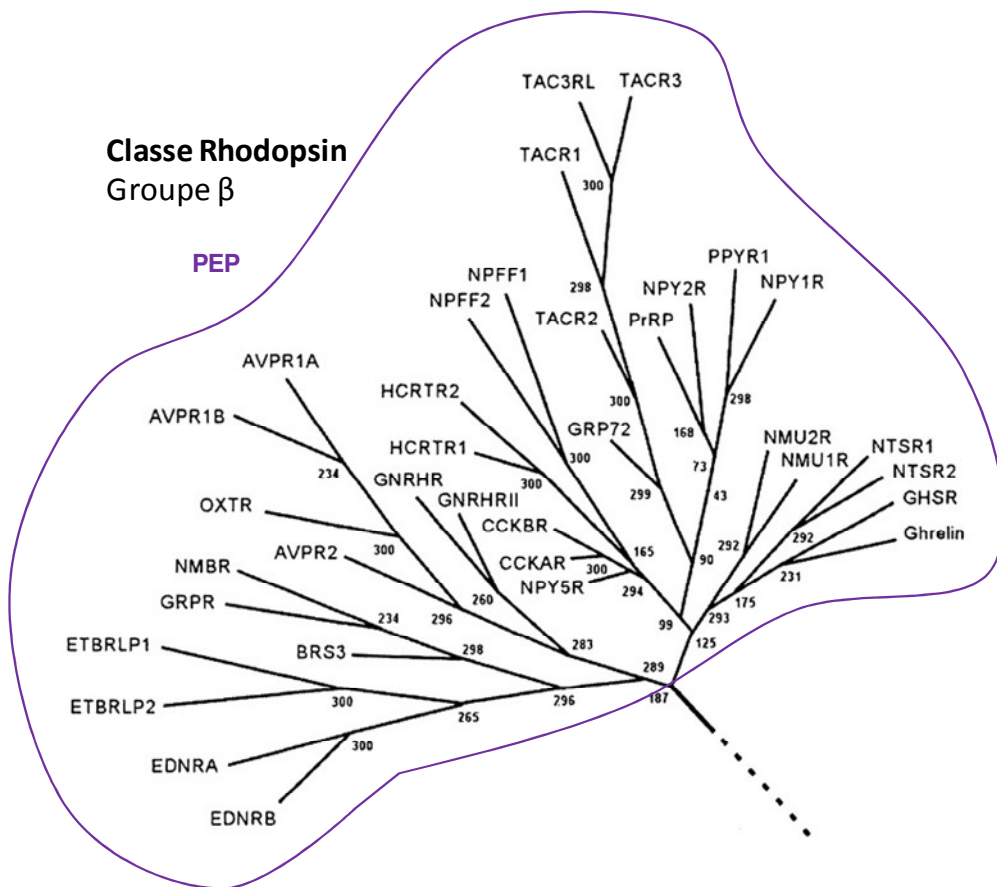


Figure 9. Relations phylogénétiques entre les RCPG du groupe β de la classe Rhodopsine. L'arbre a été obtenu en utilisant la méthode de maximum de parcimonie. Le groupe β possède 36 récepteurs dont tous les ligands sont des peptides (PEP) (d'après Fredriksson *et al.*, 2003).

Le groupe γ inclut 59 RCPG, répartis en trois clusters différents *i.e.* SOG (15 RCPG, dont les récepteurs somatostatinerigiques, opioïdergiques ou encore le récepteur GPR54, ou Kiss1R), les clusters MCHR (deux RCPG de la MCH) et CHEM (42 RCPG dont les récepteurs de chimiokines comme le récepteur CXCR4, les récepteurs de l'angiotensine (ANG) et des bradykinines (BK) ainsi qu'un large nombre de récepteurs orphelins) (Figure 10).

Le groupe δ est le plus large puisqu'il comprend les récepteurs olfactifs (460 RCPG estimés) auxquels s'ajoutent 58 autres RCPG. Il est subdivisé en quatre clusters, *i.e.* *MAS-related receptors* (MRG, 8 RCPG), LGR, (8 RCPG de glycoprotéines), PUR (42 RCPG purinergiques) et enfin OLF (460 RCPG olfactifs) (Figure 11).

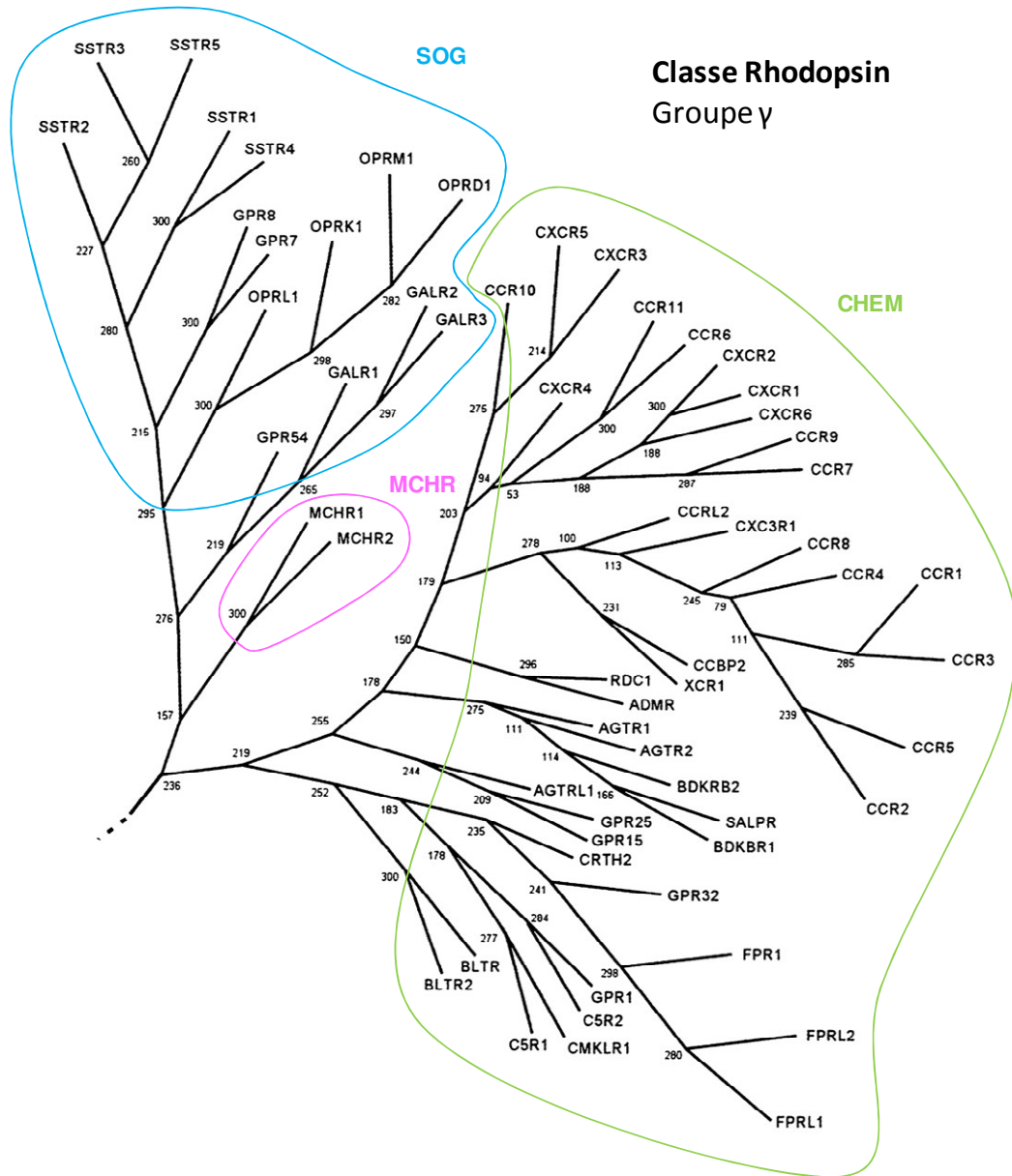


Figure 10. Relations phylogénétiques entre les RCPG du groupe γ de la classe Rhodopsine. L'arbre a été obtenu par la méthode de maximum de parcimonie. Le groupe γ comprend 59 récepteurs répartis en trois clusters : SOG, MCHR et CHEM (d'après Fredriksson *et al.*, 2003).

C'est cette classification qui est dorénavant utilisée dans les études portant sur les RCPG. Cependant, la méthode de *neighbour-joining* et parcimonie maximale utilisée dans l'analyse des séquences n'a pas permis d'affecter 23% des récepteurs dans l'une des cinq grandes familles GRAFS. Selon les auteurs, ces difficultés seraient dues à une partie atypique dans la séquence des gènes du RCPG en question (codant généralement pour les boucles intra- ou

extracellulaires) qui résulterait d'une origine chimérique du récepteur et/ou d'une pression évolutive qui ne serait pas partagée par les récepteurs « voisins » (Fredriksson *et al.*, 2003).

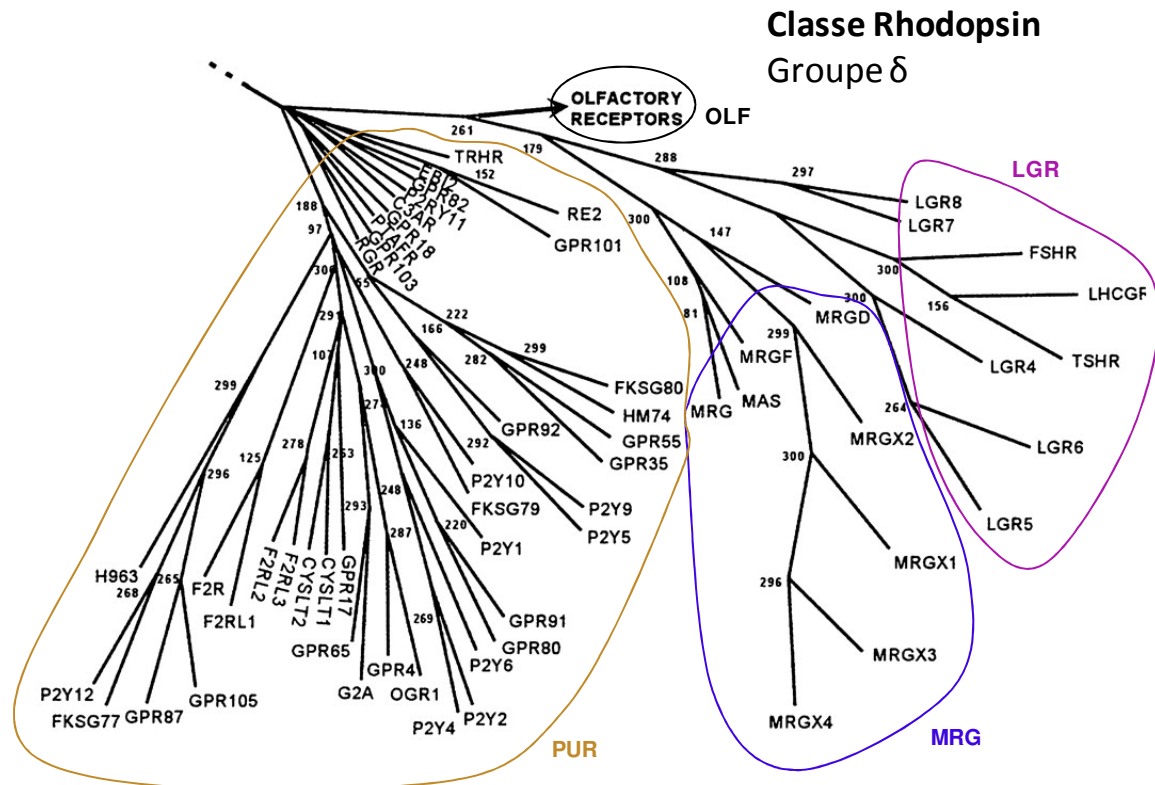


Figure 11. Relations phylogénétiques entre les RCPG du groupe δ de la classe Rhodopsine. La place du groupe des récepteurs olfactifs a été déterminée en sélectionnant aléatoirement 17 récepteurs. Ce groupe a été enlevé de la représentation en arbre pour plus de lisibilité, et représenté par une flèche. Les groupe δ est subdivisé en quatre clusters : MRG, LGR, PUR et OLF (d'après Fredriksson *et al.*, 2003).

Parmi ces récepteurs, on trouve par exemple le récepteur du peptide urotensine II (UII) codé par le gène *UTS2R*, précédemment nommé *GPR14* puis rebaptisé après désorphanisation, récepteur *UT* (IUPHAR/BPS, <http://www.guidetopharmacology.org>). En revanche, lorsque l'on compare la poche de liaison des ligands des récepteurs de classe A, le récepteur *UT* se retrouve proche du récepteur *GPR109A* et des récepteurs purinergiques *P2Y* répertoriés dans le cluster PUR par Fredriksson *et al.*. Le rapprochement phylogénétique des RCPG de classe A selon l'homologie de séquence de leur ligand(s) endogène(s) rapproche cette fois-ci le récepteur *UT* des récepteurs opioïdiques du groupe *SOG1* selon Fredriksson *et al.* (Lin *et al.*, 2013; Figure 12).

Pour parer ces ambiguïtés, certaines équipes ont analysé les séquences de gènes des RCPG par échelonnement multidimensionnel (ou *MDS* pour *MultiDimensional Scaling*). Grâce à cette stratégie, et hormis quelques différences par rapport à la classification *GRAFS*, l'équipe dirigée par le Dr M. Chabbert (UMR Inserm 1083, CNRS 6214, Angers, France) a réussi à répertorier les RCPG de la classe *Rhodopsine* dans les mêmes clusters que ceux trouvés par

Fredriksson *et al.* (Pelé *et al.*, 2011). D'après cette étude, les variations sont les suivantes : les récepteurs de la galanine et le récepteur Kiss1R appartenant au cluster SOG (Fredriksson *et al.*, 2003) semblent rattachés au cluster PEP, de fait le cluster SOG devient le cluster SO, alors que les récepteurs de la famille MCHR (Melanin Concentrating Hormone Receptors) et le récepteur UT sont regroupés dans le cluster SO (Pelé *et al.*, 2011).

Finalement, il apparaît que les variations obtenues dans la classification phylogénétique des RCPG soient dues à des différences de méthodologie, au niveau des échantillons (prise en compte de la totalité de la séquence ou seulement de la partie codant pour les DTM) ou de la méthode d'analyse utilisée.

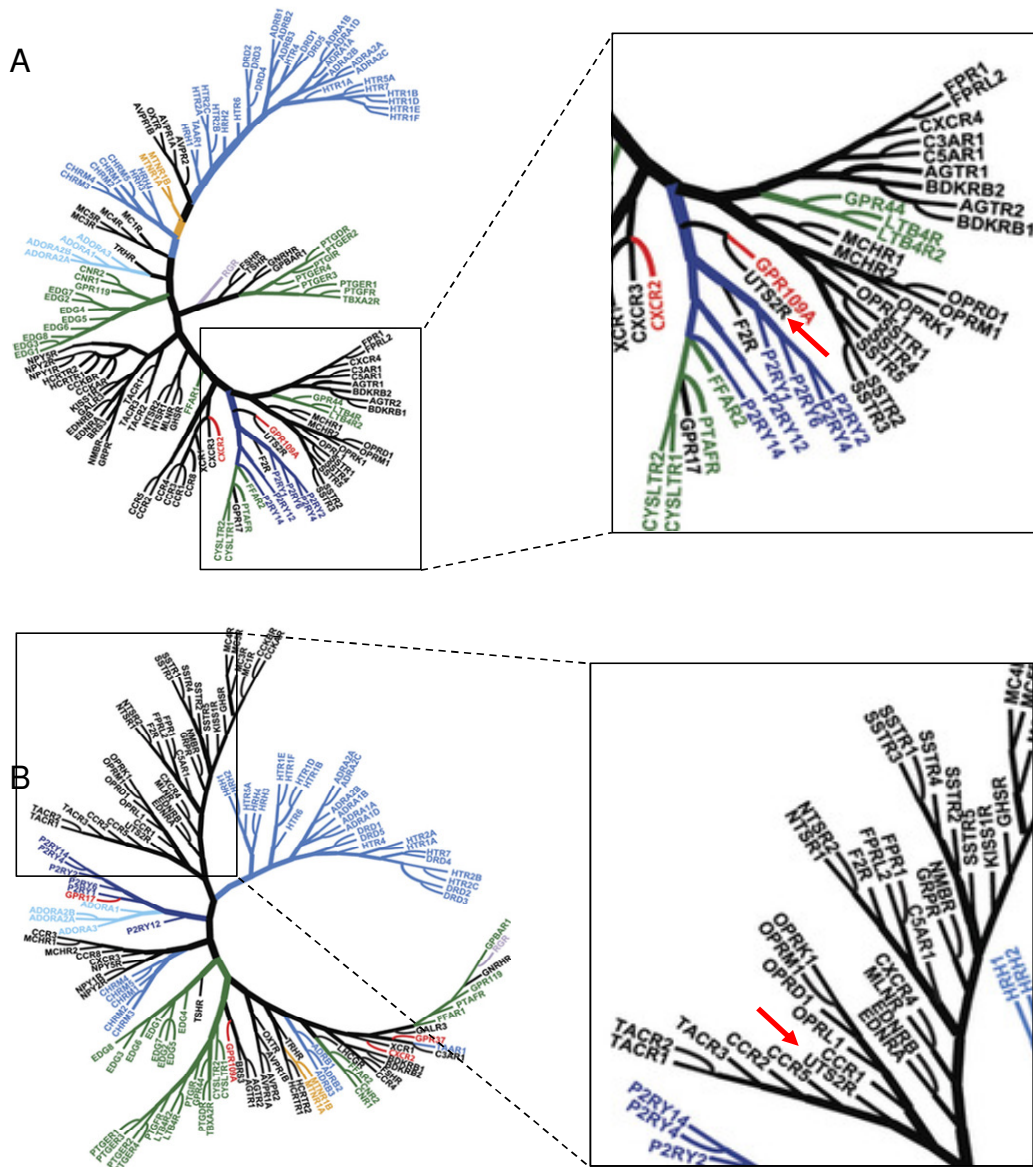


Figure 12. Relations entre 146 RCPG de classe A ou Rhodopsine. A. À gauche, dendrogramme représentant les parentés entre les 146 RCPG de classe A étudiés, basées sur la similitude de séquence de leur poche de liaison. À droite, zoom sur la partie du dendrogramme dans laquelle on retrouve le RCPG UT (UTS2R, indiqué par la flèche rouge). B. À gauche, dendrogramme représentant les parentés entre les 146 RCPG de classe A étudiés, basées sur la similitude de leur(s) ligand(s). À droite, zoom sur la partie du dendrogramme dans laquelle on retrouve le RCPG UT (UTS2R, indiqué par la flèche rouge). Le code couleur est basé sur les propriétés

chimiques des ligands endogènes (*i.e.* bioamine (bleu), mélatonines (doré), lipides (vert), peptides (noir), purinergiques (bleu foncé), adénosines (bleu clair) et orphelins (rouge). Figure modifiée d'après Lin *et al.*, 2013.

4. Aspects évolutifs des récepteurs couplés aux protéines G

On retrouve des gènes codant des RCPG dans des organismes aussi variés que les plantes ou les insectes, mais aussi les levures et les champignons, ce qui indique que ces récepteurs partageraient une origine commune chez les eucaryotes. Un récepteur à 7 DTM a aussi été identifié chez la bactérie. Appelée bactériorhodopsine en raison de sa sensibilité à la lumière, cette protéine ne possède pas d'homologie de séquence avec les RCPG des eucaryotes, et son activation n'entraîne pas le recrutement de protéine G, mettant en doute leur parenté phylogénétique. Avec l'essor des méthodes d'analyses computationnelles, certaines équipes se sont focalisées sur l'étude de l'évolution phylogénétique des RCPG. Non seulement ces études apportent une connaissance et une meilleure compréhension, et la découverte d'ancêtres communs permet la classification et l'annotation dans les bases de données actuelles des RCPG orphelins, susceptibles de constituer de nouvelles cibles thérapeutiques. Ainsi, les méthodes d'étude phylogénétique des RCPG peuvent être basées sur l'étude de génomes de multiples espèces, ou sur l'étude du génome d'une espèce en particulier.

4.1. Evolution des différentes familles de RCPG

L'étude du génome de 12 espèces eucaryotes uni- et pluri-cellulaires réalisée par l'équipe de Helgi B. Schiöth propose une répartition des différentes familles GRAFS au cours de l'évolution (Nordstrom *et al.*, 2011) (Figure 13). Plus ancienne que les quatre autres, la famille des AMPc est retrouvée dans le groupe des alvéolobiontes (organismes vivants unicellulaires eucaryotes) pour disparaître chez les espèces plus évoluées telles que le Poulet ou l'Homme. On retrouve ensuite les familles *Frizzled/Taste2* et *Adhésion* chez l'amibe *Dictostelium discoideum*. La famille Sécérétine apparaît chez *Caenorhabditis elegans* et présente beaucoup de similitudes avec la famille *Adhésion*, suggérant qu'elle en est issue. Le *Trichoplax adhaerens* (métazoaire au plan d'organisation simple) est l'espèce la plus ancienne dans laquelle on retrouve des RCPG de la famille *Rhodopsine*.

L'analyse par *HHsearch* indique que la famille *Rhodopsine* est plus proche de la famille AMPc, puis *Adhésion*, alors que l'analyse par la méthode *Needleman-wunsch* montre qu'elle serait plus proche de la famille *Adhésion*, puis *Glutamate* et enfin AMPc. En réalité, les familles *Adhésion* et AMPc partagent un certain nombre de résidus ou motifs conservés qui les rapprochent de la famille *Rhodopsine*. Il est suggéré que la famille *Rhodopsine* a pour origine la famille AMPc, et que la bifurcation de ce nouveau groupe soit survenue dans un

temps proche du moment où la famille *Adhésion* s'est elle-même différenciée (Nordstrom *et al.*, 2011).

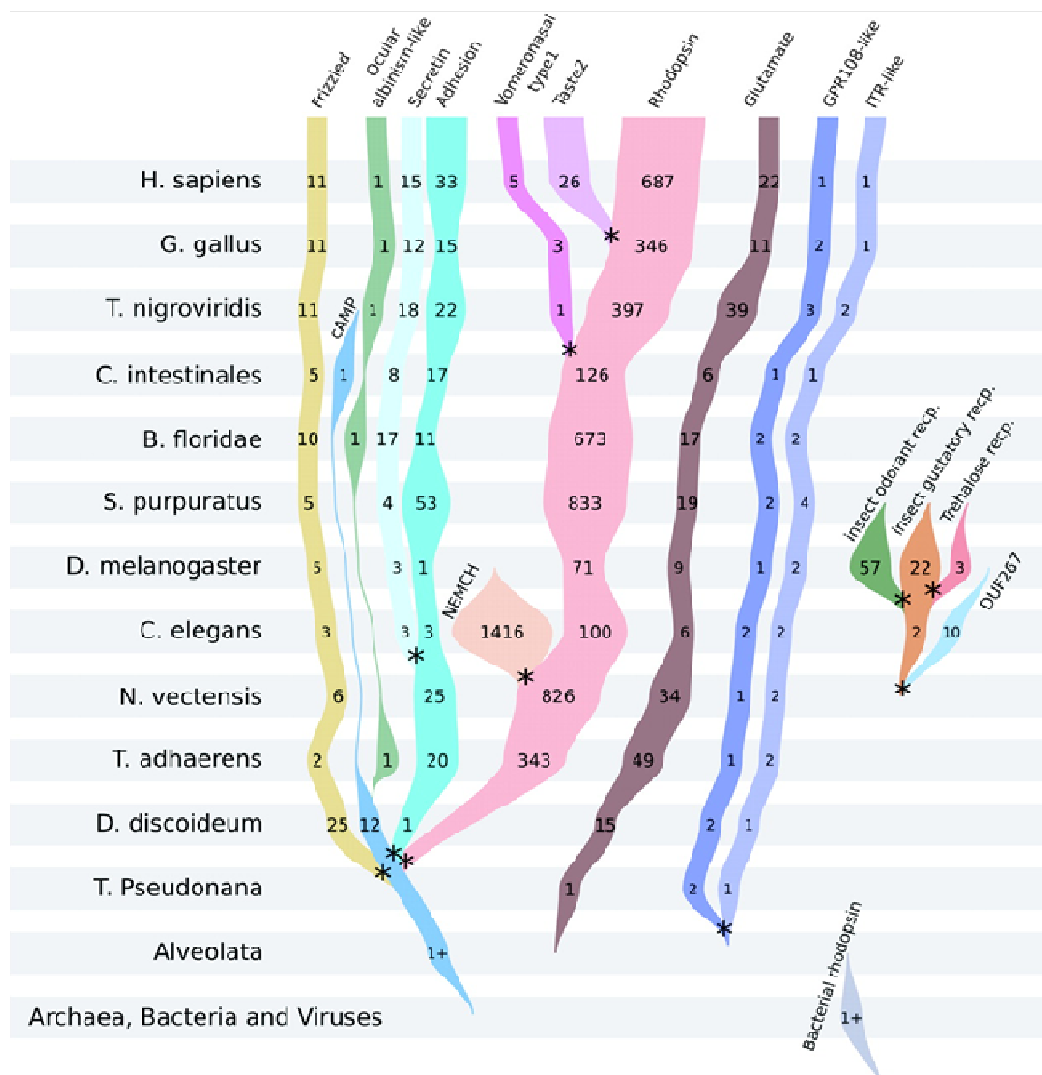


Figure 13. Apparition des familles de RCPG au cours de l'évolution. La figure répertorie le nombre (chiffres) de séquences trouvées dans chaque famille et espèce. Chaque ligne correspond à une espèce et chaque couleur correspond à une famille de RCPG (d'après Nordström *et al.*, 2011).

La famille *Rhodopsine* présente le succès évolutif le plus important, puisqu'elle représente 60% du répertoire de RCPG présents chez les espèces bilatérales (eumétazoaires présentant une symétrie bilatérale, en opposition aux eumétazoaires radiés) (Fredriksson et Schiöth, 2005). Notamment, la répartition de ces 13 sous-groupes (PTRG, AMIN, OPN, MTN, MECA, PEP, SOG, MCHR, CHEM, MRG, LGR, PUR et OLF, cf § 3.) au sein des différentes espèces étudiées est très intéressante d'un point de vue évolutif.

4.2. Evolution des récepteurs couplés aux protéines G au sein de famille *Rhodopsine*

L'étude menée par Fredriksson et Schiöth en 2005, comparant les génomes de 13 espèces, montre que seuls les sous-groupes AMIN, PEP et SOG sont bien représentés chez *C. elegans*,

les autres sous-groupes étant soit absents (OLF, MCHR, PUR, CHEM et PTEGR), soit représentés seulement par un ou quelques RCPG. Chez les arthropodes étudiés (*Drosophila melanogaster*, mouche du vinaigre et *Anopheles gambiae*, moustique vecteur de la malaria), on retrouve les mêmes groupes, avec une proportion plus importante de RCPG pour LGR, MEC et MTN; on note aussi l'apparition du groupe OPN. C'est avec le lignage des chordés qu'apparaît les groupes MECA et LGR ainsi que le groupe CHEM, qui figure par la suite parmi les plus représentés chez les vertébrés. Les vertébrés se caractérisent par l'apparition des clusters PUR et OLF et une très grande proportion en récepteurs du cluster CHEM. Le cluster MRG n'est quant à lui présent que chez les mammifères (Fredriksson et Schiöth, 2005). Il semble donc que les clusters ancestraux de la famille *Rhodopsine* soient les clusters AMIN, PEP et SOG.

La MDS offre un nouveau point de vue sur les relations phylogénétiques entre les différents groupes de récepteurs. L'utilisation de cette méthode d'analyse est basée sur l'hypothèse selon laquelle l'évolution des RCPG pourrait suivre un chemin radial plutôt que bifurqué (représenté par le système classique d'arbre phylogénétique). Les liens phylogénétiques entre les RCPG d'une même espèce sont représentés en trois dimensions, et les résultats peuvent être superposés entre plusieurs espèces. Chez *N. vectensis*, *C. elegans*, *C. intestinalis*, *D. rerio* et *H. sapiens*, l'analyse par MDS des RCPG de la famille *Rhodopsine* a permis de trier les récepteurs en quatre groupes (G0 à G3) comprenant différents clusters (Pelé *et al.*, 2011) : le groupe G0 représente le groupe central et inclut les clusters PEP, OPN et MRN, G1 les clusters SO (et non SOG, les récepteurs de la galanine se retrouvant, selon ce type d'analyse, dans le cluster PEP), CHEM et PUR, G2 les clusters AMIN et AD et enfin G3 les clusters LGR, MEC, PTG et MRG (Tableau 1).

Seul le cluster MECA (qui comprend les récepteurs de la mélanocortine MCR, les récepteurs du SIP, les récepteurs cannabinoïdes et adrénergiques) n'appartient pas à un groupe distinct. L'analyse par MDS divise ce cluster en deux, *e.g.* les récepteurs adrénergiques (AD) rejoignent le cluster AMIN dans G2, et les récepteurs restants (MEC) rejoignent G3. Chez *C. intestinalis*, le cluster CHEM se distingue peu du cluster SO. Il semble que ce groupe SO/CHEM ait donné lieu, chez les vertébrés, aux clusters SO, CHEM et PUR, suggérant une origine commune. De plus, chez les espèces ancestrales les plus éloignées de l'Homme les clusters SO et PEP sont proches, mais leur distance augmente au cours de l'évolution pour qu'ils atteignent finalement la place qu'ils occupent chez les vertébrés. Ces observations plaident en faveur d'une origine commune entre ces clusters (Pelé *et al.*, 2011).

Groupe	Clusters	Description
G0	PEP	<u>Récepteurs de peptides :</u> NMUR1 NMUR2 NTR1 NTR2 GPR39 EDNRA EDNRB ETBR2 GPR37 PKR1 PKR2 NPY1R NPY2R NPY4R NPY5R BRS3 GRPR NMBR CCKAR GASR QRFPR OX1R OX2R NPFF1 NPFF2 PRLHR GNRR2 GNRHR GPR83 GALR1 GALR2 GALR3 KISSR GP151 GP173 GPR19 GPR27 GPR84 GPR85 V1AR V1BR V2R OXYR TRFR NK1R NK2R NK3R GP150
	OPN	<u>Opsines :</u> OPN3 OPN5 RGR OPSR OPSD OPSB OPN4 OPSX
	MTN	<u>Récepteurs de la mélatonine:</u> MTR1A MTR1B MTR1L
G1	SO	<u>Récepteurs somatostatinerigiques et opioïdériques :</u> OPRM OPRD OPRK OPRX SSR1 SSR2 SSR3 SSR4 SSR5 NPBW1 NPBW2 UR2R MCHR1 MCHR2
	CHEM	<u>Récepteurs de chimiokines:</u> CCR5 CCR2 CCR3 CCR1 CCR4 CCR8 CX3C1 CCRL2 CCBP2 XCR1 CCR9 CCR7 CCR6 CCRL1 CXCR4 CXCR2 CXCR1 CXCR5 CCR10 CXCR3 CXCR6 CXCR7 RL3R1 RL3R2 ADMR AGTR1 AGTR2 BKRB1 BKRB2 APJ GPR25 GPR15 C5ARL C5AR C3AR GPR44 FPRL1 FPRL2 FPR1 LT4R1 LT4R2 CML1 GPR32 GPR33 GPR1 GP152
	PUR	<u>Récepteurs purinergiques :</u> P2RY1 P2RY2 P2RY4 P2RY5 P2RY6 P2RY8 P2RY9 P2Y10 P2Y12 P2Y13 P2Y14 PTAFR SUCR1 OXER1 OXGR1 GPR109A PSYR CLTR1 CLTR2 PAR1 PAR2 PAR3 EBI2 FFAR1 FFAR2 FFAR3 GPR4 GPR17 GPR18 GPR20 GPR31 GPR34 GPR35 GPR55 GPR81 GPR87 GPR92 GP132 GP141 GP174 GP171 Q5KU21 GPR82 P2Y11 PAR4
G2	AMIN	<u>Récepteurs aminergiques:</u> 5HT1B 5HT1D 5HT1E 5HT1F 5HT1A 5HT7R 5HT4R 5HT2A 5HT2C 5HT2B 5HT5A HRH1 HRH2 HRH3 HRH4 DRD1 DRD2 DRD3 DRD4 DRD5 TAAR1 TAAR2 TAAR3 TAAR5 TAAR6 TAAR9 5HT6R ADRB3 TAAR8 ACM1 ACM2 ACM3 ACM4 ACM5
	AD	<u>Récepteurs adrénérgiques:</u> ADA1A ADA1B ADA1D ADA2A ADA2B ADA2C ADRB1 ADRB2
G3	LGR	<u>Récepteurs de glycoprotéines:</u> LGR4 LGR5 LGR6 RXFP1 RXFP2 TSHR LSHR FSHR
	MEC	<u>Récepteurs de mélanocortine, S1P et canabinoïdes:</u> ACTHR MSHR MC3R MC4R MC5R CNR1 CNR2 EDG1 EDG2 EDG3 EDG4 EDG5 EDG6 EDG7 EDG8 GPR3 GPR6 GPR12 SPR1
	PTG	<u>Récepteurs aux prostaglandines:</u> PE2R2 PE2R3 PE2R4 PD2R PI2R
	MRG	<u>Récepteurs MAS-related:</u> MAS MAS1L MRGRF MRGX1 MRGX2 MRGX3 MRGX4 MRGRD MRGRE

Tableau 1. Assignment des 13 clusters de RCPG humains non olfactifs dans les groupes G0 à G3. Les récepteurs appartenant à chacun des clusters sont répertoriés.

4.3. Corrélation entre l'évolution des groupes de RCPG et des éléments de séquence

La comparaison des séquences des différents groupes (G0 à G3) montre que le groupe G0 ne possède pas d'élément qui lui soit spécifique. En revanche, G2 se caractérise par la présence d'une asparagine en position 3.32 (D3.32), résidu retrouvé chez toutes les espèces, et celle d'un tryptophane en position 7.40 (W7.40), lui aussi très conservé mis à part chez *N. vectensis*, suggérant un rôle majeur de ces deux acides aminés dans l'évolution des clusters du groupe G2 chez les espèces plus évoluées. Le groupe G3 est marqué par l'absence de la proline du TM5 en position 5.50 (P5.50), souvent associée à la mutation du W3.18 et du G3.21 du motif WxxFG localisé dans le TM3. L'absence de proline dans le TM2 est également fréquemment observée pour les récepteurs du groupe G3.

La position 3.37 est intéressante lorsque l'on se penche sur le groupe G1, non seulement parce que le résidu qui s'y trouve est variable dans les récepteurs SO chez *N. vectensis* et *C. elegans*, mais aussi parce qu'elle correspond à une tyrosine pour les récepteurs SO des chordés et vertébrés. Cependant, l'acide aminé caractéristique des récepteurs du groupe G1 est une proline en position 2.58 (P2.58), souvent précédée par un résidu aliphatique. Dès l'espèce *N. vectensis*, cette proline est présente dans la séquence des récepteurs du cluster SO. Elle est aussi caractéristique des récepteurs du groupe G1, et par ailleurs retrouvée dans d'autres groupes, mais à différentes positions. De façon intéressante, le groupe G0 comporte principalement des récepteurs abritant une proline en position 2.59. S'il en est de même pour G2, le groupe G3 se singularise par l'absence de proline dans le TM2 ou par une proline en position 2.59. Seul le groupe G1, qui comprend les clusters SO, CHEM et PUR, est donc caractérisé par une proline P2.58 (Pelé *et al.*, 2011).

Les prolines P5.50, P6.50 et P7.50 sont les résidus les plus conservés des hélices α 5, 6 et 7, respectivement, et jouent un rôle majeur dans leur structure. Avec une amine secondaire et non primaire, ces acides aminés sont responsables au sein des hélices de différentes distorsions, ou cassures, dont l'angle est d'environ -65° . C'est ainsi que les prolines P5.50, P6.50 et P7.50 induisent un renflement π , une cassure en coude et une distorsion non-canonique, respectivement. Alors que dans ces DTM la présence et la position d'un résidu proline sont très conservées, le DTM2 peut présenter une seule proline, qui quand elle est présente (80% des RCPG de classe A), est positionnée en 2.58 (41%), 2.59 (36%) ou 2.60 (2%). Localisée en P2.58, ce résidu induit un coude typique (Devillé *et al.*, 2009; Visiers *et al.*, 2002) mais lorsque cette proline est absente, il peut exister un motif GG (comme c'est le cas pour le récepteur rhodopsine) responsable d'un renflement π comparable à ceux induit par les prolines P2.59 et P2.60. Ces données, basées sur les modélisations récentes, ont été

confirmées par des études cristallographiques menées sur des récepteurs avec P2.58 ou P2.59, soit un motif GG dans le DTM2 (Palczewski *et al.*, 2000; Rasmussen *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2010). En jouant ainsi sur la courbure et la flexibilité du DTM2, la position de la proline pourrait avoir des conséquences sur le degré d'ouverture de la poche de liaison des RCPG et dans leurs mécanismes d'activation (Yohannan *et al.*, 2004). Ainsi, la présence de la proline et sa localisation au sein du DTM2 pourraient ainsi être étroitement associées à l'évolution structurale des RCPG, notamment de la famille *Rhodopsine*, RCPG qui se sont diversifiés pour «s'adapter» et répondre à un nombre important de ligands distincts.

4.4. Evolution des motifs proline du DTM2 des récepteurs de la famille *Rhodopsine*

L'étude de l'évolution du motif proline au sein du DTM2 des RCPG de différentes espèces montre que la proportion de RCPG possédant une proline en position 2.58 (que l'on nommera « récepteurs P2.58 ») augmente chez les espèces « supérieures » (Tableau 2). En effet, alors que les récepteurs P2.58 ne représentent que 7% des RCPG chez *C. elegans*, ils augmentent jusque 25% chez *D. rerio* et 40% chez l'Homme. Les proportions en récepteurs P2.59 ou ne possédant pas de proline sont, quant à elles, très variables selon les espèces et ne suivent pas de modèle évolutif particulier. La quantité de récepteur P2.60 est très faible chez toutes les espèces (Devillé *et al.*, 2009). Chez l'espèce ancestrale *C. elegans*, les récepteurs P2.58 sont regroupés dans un groupe apparenté au cluster SO de l'espèce humaine. Chez *D. melanogaster*, les récepteurs P2.58 correspondent à deux récepteurs de l'allostatine C, qui sont proches des récepteurs du cluster SO, mais aussi à quatre opsines et deux récepteurs du cluster PEP. Chez *C. intestinalis*, les récepteurs P2.58 sont regroupés dans un seul groupe, et tous les récepteurs peuvent être affiliés au cluster SO ou CHEM. Enfin, chez *D. rerio* et *H. sapiens*, les récepteurs P2.58 sont retrouvés dans les clusters SO, CHEM et PUR. Les clusters AMIN et PEP des différentes espèces comprennent majoritairement des récepteurs P2.59, mais ils peuvent également ne pas posséder de proline. La proline en position 2.60 n'est observée que pour un petit nombre de récepteurs de peptides et d'opsines (Devillé *et al.*, 2009).

Etant donnés les liens phylogénétiques entre les clusters PEP, SO, CHEM et PUR, il est proposé que la position de la proline en 2.58 pour les clusters SO, CHEM et PUR résulte d'une délétion au sein du DTM2 d'un récepteur du cluster PEP. La distorsion de l'hélice serait ainsi passée d'un renflement π présent dans les récepteurs PEP, à une cassure en coude. L'émergence des groupes CHEM et PUR coïncide avec l'apparition des chordés et des vertébrés, respectivement. Il n'est donc pas exclu que le changement de conformation du

DTM2, suite à la délétion d'un résidu au sein de son hélice, ait contribué à l'émergence de mécanismes d'activation spécifiques à ces clusters SO, CHEM et PUR.

Clusters	Position de la (des) proline(s) (P)	<i>C. elegans</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>C. Intestinalis</i>	<i>D. Rerio</i>	<i>H. sapiens</i>
AMIN	P2.58	-	1	-	1	-
	P2.59	16	12	7	45	34
	P2.59P2.60	-	2	1	5	2
	Pas de P	2	4	4	2	6
PEP	P2.58	-	-	1	1	2
	P2.59	21	21	8	20	39
	P2.60	1	-	1	2	5
	P2.59P2.60	1	-	1	-	-
	Pas de P	8	5	1	2	4
SO	P2.58	7	2	8	11	14
	P2.58P2.59	1	-	-	-	-
	Pas de P	3	-	-	-	-
MECA	P2.59	1	1	3	4	4
	Pas de P	-	-	3	18	18
LGR	Pas de P	1	4	30	2	8
OPN	P2.58	-	4	-	-	-
	P2.59	-	2	-	5	2
	P2.60	-	-	-	1	1
	P2.59P2.60	-	1	-	-	-
	Pas de P	-	-	2	16	5
MTN	P2.59	-	-	2	3	3
PTGR	P2.59	-	-	2	4	5
	Pas de P	-	-	-	-	3
CHEM	P2.58	-	-	1	17	45
	P2.59	-	-	-	1	-
	Pas de P	-	-	3	1	1
PUR	P2.58	-	-	-	15	44
	P2.58P2.59	-	-	-	-	2
MRG	Pas de P	-	-	-	-	9
NC	P2.58	-	1	-	-	4
	P2.59	19	9	5	4	13
	P2.60	1	-	-	1	2
	Pas de P	27	5	7	-	6

Tableau 2. Distribution de la (des) proline(s) au sein du DTM2 de RCPG non-olfactifs chez différentes espèces. Répertoire des prolines ou de l'absence de proline au sein du DTM2 des RCPG des 12 clusters (y compris le cluster des RCPG non-classifiable noté NC) chez les espèces *C. elegans*, *D. melanogaster*, *C. intestinalis*, *D. rerio* et *H. sapiens*. Le motif proline consensus des clusters, s'il existe, est indiqué en gras (d'après Devillé *et al.*, 2009).

5. Mécanismes d'activation des récepteurs couplés aux protéines G

Il existe deux hypothèses majeures sur l'impact de la liaison d'un ligand sur la conformation d'un RCPG ou de la sélectivité d'un ligand par rapport à la conformation initiale du RCPG. Selon la première théorie, appelée ajustement induit, ou « *induced fit* », le ligand est un élément rigide qui va induire et stabiliser une nouvelle conformation du RCPG, quant à lui considéré comme flexible. La seconde hypothèse, dite de la sélection conformationnelle, propose de considérer les RCPG comme des ensembles dynamiques en équilibre sous différentes conformations. Dans ce cas, le ligand posséderait une affinité plus grande pour l'une ou l'autre de ces conformations et la liaison au RCPG stabiliserait la structure du récepteur et engendrerait la réponse signalétique spécifique qui lui est associée (Changeux et Edelstein, 2011).

Au sein de la famille *Rhodopsine*, les récepteurs de la rhodopsine et des petites amines (adrénergiques, dopaminergiques et cholinergiques) sont les mieux étudiés vis-à-vis de la liaison de leur ligand. Ils servent aujourd'hui de modèles pour définir les éléments structuraux et moléculaires impliqués dans la liaison du ligand et/ou dans les changements conformationnels des RCPG consécutifs à la liaison. En effet, la compréhension de ces mécanismes pourrait amener à la conception rationnelle de nouveaux ligands synthétiques possédant une activité définie et contrôlée.

La liaison d'un agoniste à son RCPG induit des changements de conformation de régions proches de la poche de liaison, qui facilitent les mouvements interhélicaux accompagnés de réarrangements de microdomaines composés d'acides aminés très conservés, appelés *switch* moléculaires (Figure 14) (Rasmussen *et al.*, 2011). Ainsi, l'activation des RCPG est communément discutée en termes de réarrangements de leur structure tertiaire, *via* ces *switch* moléculaires. Ces réarrangements font suite à la liaison du ligand et entraînent l'activation subséquente des protéines G ou le recrutement des β -arrestines. En revanche, lié à un antagoniste, les boucles cytoplasmiques des DTM sont très rapprochées les unes des autres, ce qui bloque l'interaction du RCPG avec des protéines partenaires telles que les protéines G ou les β -arrestines (Cherezov *et al.*, 2007; Palczewski *et al.*, 2000).

Parmi les séquences consensus clefs des RCPG de la famille *Rhodopsine*, le motif DRY est probablement le plus étudié. Situé à la base du DTM3 et à l'interface de la boucle i_2 , ce motif se compose, la plupart du temps, d'un résidu aspartate (D3.49), d'une arginine (R3.50, considérée comme le résidu le plus conservé du DTM3 de tous les RCPG de la famille *Rhodopsine*), et d'une tyrosine (Y3.51). Des études de mutagenèse ont montré que l'interaction entre les résidus de ce motif avec la Q6.30 du DTM6, est nécessaire au maintien

de l'état inactif du RCPG. Ainsi, la mutation de ces résidus E/DRY conduit à l'activation constitutive du récepteur β 2-adrénérique (Rasmussen *et al.*, 1999). La liaison des résidus de ce motif avec le DTM6 constitue ce que l'on appelle un verrou ionique, ou *ionic lock* (Ballesteros *et al.*, 1998). Plus précisément, ce verrou se rompt lors de l'activation, et les DTM3 et 6 s'éloignent l'un de l'autre, permettant ainsi l'arrimage du domaine C-terminal des protéines $G\alpha$ -GTP au sein de la crevasse cytoplasmique des RCPG. On peut toutefois noter que les études cristallographiques portant sur la structure des récepteurs β -AD, de l'histamine ou du récepteur CXCR4 montrent que cet *ionic lock* n'est pas maintenu à l'état inactif, en raison d'une différence d'orientation des résidus impliqués ou de l'absence de ces mêmes résidus (Cherezov *et al.*, 2007; Rasmussen *et al.*, 2007; Shimamura *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2010). Malgré tout, bien qu'il existe une forte proximité des DTM3 et 6 dans ces récepteurs, il est probable que les modifications apportées à ces RCPG dans le but de les stabiliser dans la conformation requise pour leur cristallisation, soient responsables de la perte de ce verrou.

Le DTM6 est également porteur d'un motif très conservé au sein des RCPG de la famille *Rhodopsine* : il s'agit du motif CW/FxP qui comprend en outre la proline 6.50, résidu le plus conservé de ce DTM. Il a été proposé que cette proline constitue une charnière moléculaire lors de l'activation des RCPG. En effet, la comparaison des structures de RCPG dans un état inactif ou actif a permis de mettre en lumière le rôle central du DTM6 lors de l'activation d'un récepteur (Choe *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2008; Rasmussen *et al.*, 2011; Rosenbaum *et al.*, 2011), puisqu'il semble effectivement s'éloigner des DTM3 et 7 au profit d'un rapprochement avec le DTM5. Ce mouvement s'explique par la rotation des chaînes latérales des résidus C6.47, W6.48 du motif, mais aussi du résidu F6.52, provoquant le pivotement de l'extrémité cytoplasmique du DTM6, autour de la proline 6.50 (Shi *et al.*, 2002a). On peut notamment observer la rotation du résidu W6.48 du motif CW/FxP vers le résidu F5.47. Les résidus juxtaposés au motif CW/FxP (*i.e.* F6.44, W6.48, F6.51 et F6.52), situés face à la poche de liaison des récepteurs monoaminergiques, pourraient interagir avec l'agoniste et favoriser la réorientation de la boucle cytoplasmique du DTM6 en modifiant l'angle induit par la proline 6.50 dans l'hélice α (Ballesteros *et al.*, 2001; Rasmussen *et al.*, 1999). Appelée *rotamer toggle switch*, la rotation de la boucle cytoplasmique du DTM6 lors de l'activation est impliquée dans la rupture de l'*ionic lock* décrit précédemment.

Le dernier switch moléculaire est situé sur le DTM7. Il s'agit du motif très conservé NPxxY, localisé dans la partie cytoplasmique de l'hélice, dont les résidus sont engagés dans un réseau d'interactions impliquant le DTM3, DTM6 et l'hélice 8. Une mutation du résidu tyrosine (Y7.53) du motif NPxxY du récepteur opioïdérique δ (DOR), ou de la méthionine

6.40 du DTM6, inhibe l'interaction entre ces hélices et conduit à une activité constitutive du récepteur (Décaillot *et al.*, 2003). De manière similaire, la mutation de l'asparagine N7.49 du récepteur de la TSH augmente significativement son activité constitutive (Govaerts *et al.*, 2001b). De plus, la mutation de la tyrosine Y7.53 a pour conséquence une phosphorylation et une internalisation constitutives du récepteur B₂ de la bradykinine (Kalatskaya *et al.*, 2004). Il existe également une interaction entre le DTM7 et l'hélice 8 de la rhodopsine, qui est rompue au cours de l'activation du récepteur. Cependant, cette interaction n'est pas retrouvée pour tous les RCPG (Trzaskowski *et al.*, 2012).

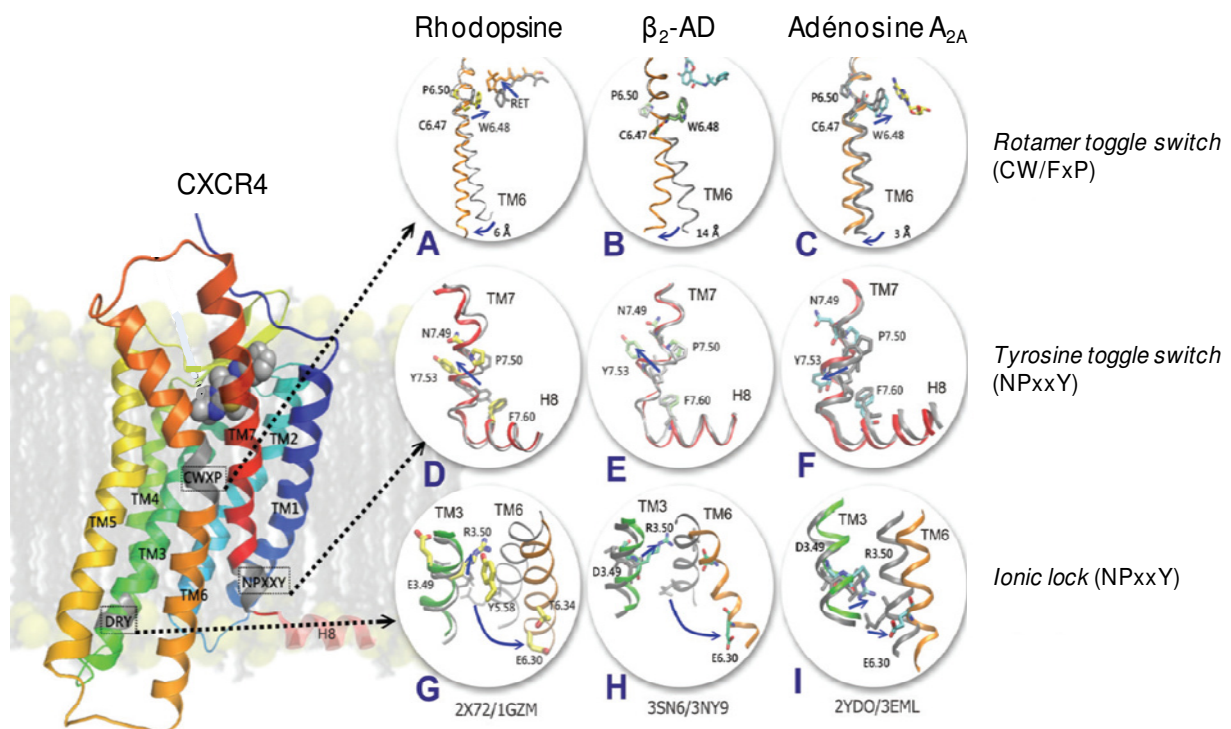


Figure 14. Mécanismes des switch moléculaires lors de l'activation des RCPG. Trois mécanismes sont représentés : le *rotamer toggle switch* (A, B et C), le *tyrosine toggle switch* (D, E et F) et le *ionic lock* (G, H et I). Ils sont tous les trois basés sur les structures cristallographiques du récepteur rhodopsine (gauche), β_2 -adrénergique (centre) et de l'adénosine de type 2 (A_{2A}, droite) liés à des agonistes et antagonistes ou agonistes-inverses. Les structures cristallographiques des récepteurs dans leur état inactif sont représentées en gris, tandis que les formes actives sont représentées en couleurs. Les codes de la *Protein Data Bank* d'où sont issues ces structures sont indiqués sous les inserts. La structure générale des RCPG est basée sur la résolution cristallographique du récepteur CXCR4 (Wu *et al.*, 2010). Dans les inserts A à I, les flèches bleues indiquent les mouvements des structures lors de l'activation ; l'amplitude des mouvements sont également précisées. Les résidus sont numérotés selon la nomenclature de Ballesteros-Weinstein. Figure adaptée de Trzaskowski *et al.*, 2012.

La tyrosine du motif NPxxY est aussi reconnue pour interagir avec l'arginine en position 2.40 du DTM2 (Ballesteros *et al.*, 1998; Prioleau *et al.*, 2002), dont la boucle cytoplasmique opère un mouvement de rotation lors de l'activation notamment du récepteur de l'angiotensine de type 1 (AT₁) (Miura et Karnik, 2002; Miura *et al.*, 2003). Ainsi, le motif NPxxY est impliqué dans un réseau d'interactions qui maintient les RCPG dans un état

inactif. Lors de l'activation, il s'opère une réorganisation de ce réseau de ponts hydrogènes due au mouvement du DTM6 vers le DTM5 décrit précédemment, permettant au motif NPxxY d'interagir avec le motif DRY de la boucle cytoplasmique du DTM3 (Standfuss *et al.*, 2011). Ce mouvement, appelé *tyrosine toggle switch*, est considéré comme un interrupteur moléculaire, pivot de l'activation des RCPG.

L'ensemble de ces *switchs* moléculaires, au niveau des micro-domaines très conservés, sont indissociables de réarrangements plus globaux au sein des RCPG qui connectent la liaison du ligand à la signalisation intracellulaire. Les différentes structures cristallographiques de RCPG révèlent que la boucle i_2 peut, ou non, adopter une conformation en hélice α . Selon Shan *et al.*, l' i_2 peut passer d'une structure à une autre (Figure 15) et la conformation en hélice α représente une transition vers l'état actif d'un RCPG (Shan *et al.*, 2010). Ceci a également été observé pour le récepteur β_2 -AD couplé ou non à Gs (Rasmussen *et al.*, 2011). Il est par ailleurs admis qu'au cours de l'activation, une élévation de deux ou trois tours d'hélice s'opère au niveau des parties C-terminale et N-terminale des DTM5 et DTM6, respectivement (Figure 15) (Park *et al.*, 2008; Rasmussen *et al.*, 2011). Cette élévation s'accompagne d'un léger rapprochement (deux à trois Å) du DTM5 vers le DTM6, entraînant ainsi l'ouverture de la crevasse cytoplasmique du RCPG et favorisant la liaison de la sous-unité α des protéines G (Janz et Farrens, 2004). Ces réarrangements des DTM5 et DTM6 ont été observés pour la rhodopsine, qu'elle soit liée à la protéine $G\alpha_t$ où à la β -arrestine (Kang *et al.*, 2015).

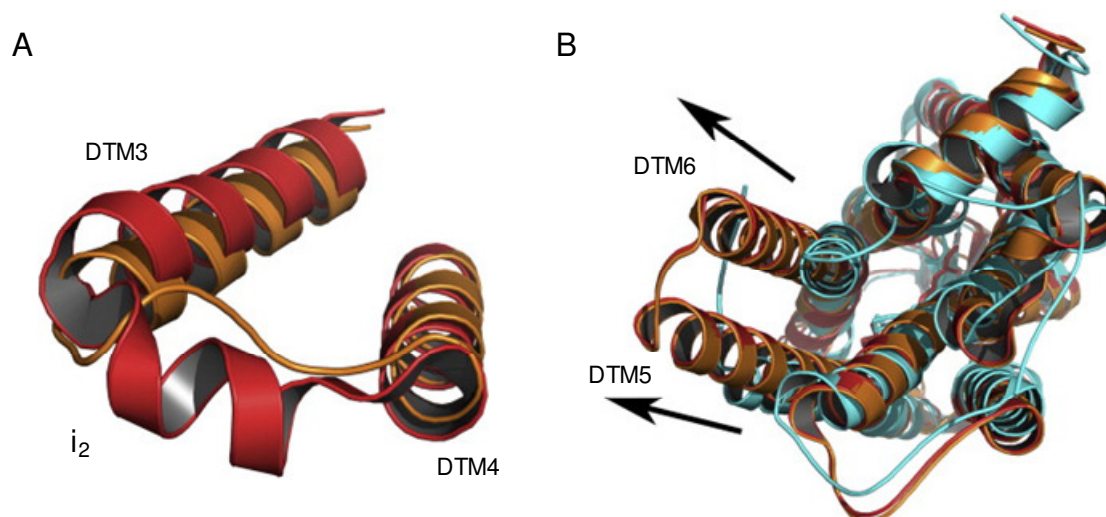


Figure 15. Changements conformationnels de la deuxième boucle intracellulaire et des DTM5 et DTM6 au cours de l'activation de RCPG. A. Cas du récepteur β_2 -AD : la forme activée (code *Protein Data Bank* : 3P0G) et la forme inactivée (code *Protein Data Bank* : 2RH1) des DTM3, DTM4 et de la boucle i_2 du récepteur β_2 -AD sont représentées en rouge et orange, respectivement. On peut observer un changement de conformation de la boucle i_2 , d'une forme peu structurée à une hélice α . B. Cas de la rhodopsine : la rhodopsine (forme inactive, code *Protein Data Bank* : 1F88), l'opsine (forme intermédiaire, *Protein Data Bank* : 3CAP) et la métarhodopsine II (forme active, *Protein Data Bank* : 3PXO) sont représentées en bleu, orange et rouge, respectivement. On peut observer une élévation des DTM5 et 6 au cours de l'activation. Figure adaptée d'après Moreira *et al.*, 2014.

En conclusion, plusieurs verrous moléculaires contraignant les RCPG dans un état inactif sont rompus au cours de l'activation, favorisant ainsi les réarrangements des parties cytoplasmiques des DTM et de certaines boucles intracellulaires et permettant le recrutement de partenaires protéiques responsables de la signalisation intracellulaire des RCPG.

6. Voies de signalisation des récepteurs couplés aux protéines G

Comme leur nom l'indique, les RCPG partagent une capacité à s'associer à des protéines G hétérotrimériques. Ces récepteurs interagissent aussi avec d'autres protéines, participant à différentes étapes de la signalisation, ouvrant ainsi de nouvelles possibilités en terme pharmacologique de modulation allostérique et/ou biaisée des récepteurs, orientée vers la sélection de certaines voies de signalisation associées aux RCPG, typiques ou plus atypiques. Les différentes sous-unités de protéines G et d'autres partenaires des RCPG sont détaillés ci-après.

6.1. Les protéines G

Constituées de trois sous-unités, les protéines G sont des hétérotrimères non obligatoires transitoires considérés comme l'interrupteur moléculaire responsable de la réponse intracellulaire consécutive à l'activation d'un RCPG. Chaque trimère est composé d'une sous-unité α ($G\alpha$) et d'un dimère comprenant les sous-unités β et γ ($G\beta\gamma$) indissociable en conditions non-dénaturantes (Gilman, 1987; Wall *et al.*, 1995) (Figure 16).

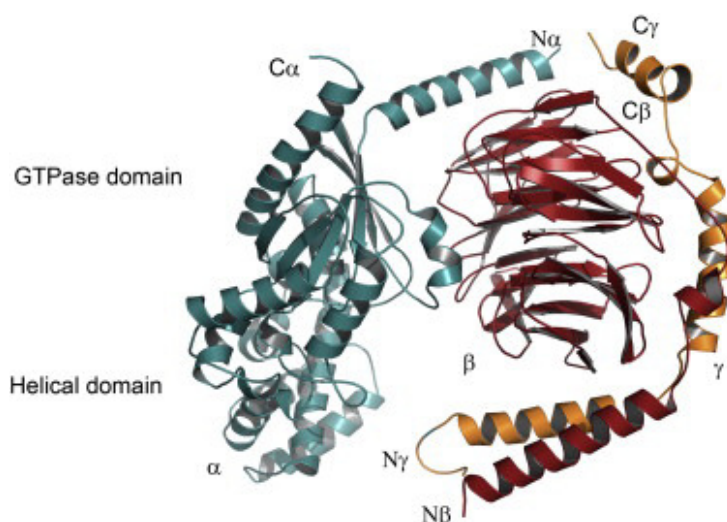


Figure 16. Représentation de la structure d'une protéine G typique : la transducine. Les sous-unités $G\alpha$, $G\beta$ et $G\gamma$ sont représentées en bleu, rouge et orange, respectivement. Les extrémités C- et N-terminales des sous-unités α , β et γ sont notées $C\alpha$, $N\alpha$, $C\beta$, $N\beta$, $C\gamma$ et $N\gamma$, respectivement. On peut remarquer le rapprochement étroit des sous-unités β et γ formant le complexe indissociable $\beta\gamma$. D'après Moreira *et al.*, 2013.

Plusieurs isoformes de chacune des sous-unités constituant les protéines G ont été identifiées: 21 sous-unités α , 6 sous-unités β et 12 sous-unités γ encodées par 16, 5 et 12 gènes, respectivement (Hurowitz *et al.*, 2000). Le mécanisme de transduction du signal par les protéines G repose sur l'échange du GDP, porté par la sous-unité α , en GTP au cours de l'activation d'un RCPG.

La liaison d'un agoniste à un RCPG provoque un réarrangement conformationnel du récepteur qui favorise alors la dissociation du GDP porté par la sous-unité α . Celle-ci recrute alors du GTP, ce qui entraîne un changement de conformation de cette sous-unité, alors incapable d'interagir avec le complexe $G\beta\gamma$ (Oldham *et al.*, 2006). En effet, la liaison au récepteur activé provoque l'éloignement de l'hélice de $\alpha 5$ de la protéine $G\alpha$ par rapport à sa boucle $\beta 6-\alpha 5$, ce qui favoriserait l'échange de nucléotide (Oldham *et al.*, 2006). Ainsi dissociés, $G\alpha$ -GTP et $G\beta\gamma$ peuvent activer une large gamme de protéines partenaires, appartenant à différentes voies de signalisation, et engendrer une réponse cellulaire adaptée au signal extracellulaire (Oldham et Hamm, 2008). Parce qu'il catalyse l'échange du GDP en GTP, un RCPG est donc considéré comme un facteur d'échange du nucléotide guanine, ou « *guanine-nucleotide exchange factor* », GEF (Rosenbaum *et al.*, 2009). La signalisation activée par $G\alpha$ et $G\beta\gamma$ prend fin lorsque le GTP porté par $G\alpha$ est hydrolysé en GDP grâce à une activité ATPasique (ATP : adénosine triphosphate) intrinsèque, permettant alors la réassociation des sous-unités α et $\beta\gamma$ en complexe tripartite (Oldham et Hamm, 2008). Dans la mesure où l'activité GTPase de protéines G isolées est bien plus lente que celle observée en conditions physiologiques, l'existence de mécanismes accélérant cette activité avait été proposée. De fait, de nombreux effecteurs ont été mis en évidence pour leur capacité à catalyser l'échange du GTP porté par $G\alpha$ en GDP (*cf.* § 6.4.1). Il convient de préciser que les sous-unités α ne constituent pas les seuls relais signalétiques du complexe trimérique, le complexe $\beta\gamma$ étant lui aussi capable de moduler l'activité de certains effecteurs intracellulaires (*cf.* § 6.1.2).

6.1.1. Les sous-unités α des protéines G

Avec une masse molaire de 39 à 52 kDa, les sous-unités α comprennent toutes un domaine en hélices et un domaine GTPase qui comprend des hélices α (α_{1-5} et α_G) et des feuillets β (β_{1-6}), reliés par des *random coils* (par exemple la boucle $\alpha^2-\beta^4$ reliant l'hélice α_2 au feuillet β_4), ainsi que trois boucles flexibles nommées switch I, II et III (Noel et al., 1993) dont la conformation est dépendante de la fixation au GTP ou au GDP. Le domaine GTPase est responsable de l'hydrolyse du GTP, abrite un site de liaison au dimère $\beta\gamma$, aux RCPG et à des

effecteurs. À l'état inactif, la boucle switch II de $G\alpha$ liée au GDP est séquestrée par le complexe $G\beta\gamma$. Durant l'activation, la liaison du GTP sur $G\alpha$ induit la dissociation de $G\beta\gamma$ et switch I, II et III adoptent des conformations favorables à l'interaction avec des effecteurs et des régulateurs de protéines G (Sprang, 1997; Tesmer *et al.*, 1997). La région switch I relie la partie catalytique des $G\alpha$ à un troisième domaine. Composé de six hélices, il est structuré de telle manière qu'il forme un couvercle au dessus de la poche de liaison du nucléotide, le maintenant ainsi au cœur de la protéine $G\alpha$ (Oldham *et al.*, 2006). Switch II adopte quant à lui une conformation en hélice sensible à l'activation de la protéine G et permet l'interaction à $\beta\gamma$ ainsi qu'aux RGS et aux effecteurs (Bastepe *et al.*, 2002). Enfin, switch III forme une boucle lorsque la sous-unité α est sous sa forme activée.

Hormis $G\alpha_t$ (t pour transducine, sous-unité α spécifique des récepteurs rhodopsine et cône-opsine), toutes les protéines $G\alpha$ subissent des modifications post-traductionnelles telles que l'ajout d'acide palmitique, ou plus rarement d'acide myristique, ce qui détermine la localisation de la sous-unité à la membrane et son potentiel d'interaction avec d'autres protéines (Degtyarev *et al.*, 1994; Franco *et al.*, 1996; Preininger *et al.*, 2003). Contrairement à la myristoylation, la palmitoylation est réversible et dépend de l'état d'activation du complexe hétérotrimérique. Ainsi, la fixation de GTP et l'activation des sous-unités $G\alpha$ favorisent leur dépalmitoylation, tandis que leur inactivation favorise leur palmitoylation (Zhang and Casey, 1996).

S'il existe une spécificité dans les effecteurs recrutés par les protéines G, le mécanisme global d'activation des sous-unités α décrit dans le paragraphe précédent reste en revanche très conservé. Selon leur homologie de séquence et leur impact sur la régulation sélective d'effecteurs, ces sous-unités ont été classées en quatre grandes familles, *i.e.* $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_q$, $G\alpha_s$ et $G\alpha_{12/13}$ (Simon *et al.*, 1991).

La famille $G\alpha_s$ inclut les sous-unités $G\alpha_s$, $G\alpha_{sxl}$ et $G\alpha_{solf}$. Elles ont la capacité de stimuler les adénylates cyclases (AC) qui convertissent l'ATP en AMPc. Second messenger, l'AMPc active la PKA, qui par phosphorylation du facteur de transcription CREB (*cAMP response element-binding protein*) entre autre, permet de réguler l'expression de nombreux gènes. L'activité de ces sous-unités est sensible à la toxine du choléra, produite par *Vibrio cholerae*, qui, en catalysant l'ADP-ribosylation (ADP : adénosine diphosphate) d'un résidu cystéine de l'extrémité C-terminale de $G\alpha$, empêche sa liaison au RCPG, maintenant ainsi la protéine G sous un état inactif.

La famille $G\alpha_{i/o}$ englobe les protéines $G\alpha_{i1-3}$, $G\alpha_o$, $G\alpha_t$, $G\alpha_z$ et $G\alpha_{gust}$. A l'exception de $G\alpha_z$, elles sont sensibles à la toxine pertussique (PTX), produite par *Bordetella pertussis*, et

qui catalyse l'ADP-ribosylation d'une cystéine de la région N-terminale des $G\alpha_i$, impliquée dans la liaison de la sous-unité au récepteur, inhibant ainsi les voies de signalisation normalement activées par ces sous-unités. Les sous-unités $G\alpha_i$ sont connues pour réduire la production d'AMPc depuis l'ATP en inhibant l'activité de l'AC. Ainsi, le recrutement des sous-unités $G\alpha_i$ par certains récepteurs a pour conséquence de diminuer l'activité enzymatique de protéines kinases dépendante de l'AMPc. La sous-unité $G\alpha_o$ est pour sa part capable de réguler les canaux calciques et potassiques, l'AC, certaines phospholipases C (PLC) et la voie de transduction des MAPK (*mitogen activated protein kinase*) (Bratton *et al.*, 2012; Clark *et al.*, 2003)

La famille $G\alpha_q$ comprend les sous-unités $G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{14}$ et $G\alpha_{15/16}$. Elles activent classiquement une PLC responsable de l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP₂) en diacylglycérol (DAG) et inositol triphosphate (IP₃). Le DAG active la PKC qui phosphoryle de nombreux effecteurs intracellulaires, tandis que l'IP₃ interagit avec un récepteur canal perméable au calcium, localisé à la surface du réticulum endoplasmique, et dont l'ouverture entraîne une élévation de la concentration cytosolique de calcium (Little *et al.*, 1992). D'autres voies de signalisation activées par la famille des $G\alpha_q$ ont été décrites. À titre d'exemples, le RCPG PAR-1 (*protease activated receptor-1*) dont le ligand naturel est la thrombine, active le promoteur *c-jun* via le recrutement de différentes MAPK telles que la *c-Jun N-terminal kinase* (JNK), MAPK p38, *extracellular-signal-regulated kinase* ERK5 et ERK6 (Marinissen *et al.*, 2003) à travers un couplage à la protéine $G\alpha_q$. Le récepteur de l'histamine H1 peut quant à lui activer la protéine RhoA suite à l'activation de Gq et la stimulation consécutive de p63RhoGEF (Lutz *et al.*, 2005).

La famille $G\alpha_{12/13}$ est constituée des sous-unités α_{12} et α_{13} qui ne partagent que 65% d'homologie entre elles et 45% avec les autres sous-unités α . Elles apparaissent comme les principaux régulateurs de l'activité de Rho GTPases. Faute d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques, les voies de signalisation relayées par $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ ne sont étudiées que depuis peu, grâce aux outils d'interférence ARN (acide ribonucléique) notamment. L'utilisation de formes mutantes et constitutionnellement actives a révélé leur rôle dans la formation de fibres de stress d'actine et de point focaux d'adhésion *via* entre autres l'activation de la GTPase Rho (Buhl *et al.*, 1995). Dans la lignée de fibroblastes Swiss 3T3, l'utilisation d'un mutant dominant négatif a démontré le rôle de la sous-unité $G\alpha_{13}$ sur les fibres de stress *via* la transactivation du RTK sensible à l'*epidermal growth factor* (EGF), l'EGFR (Gohla *et al.*, 1998). La découverte d'une GEF ciblant Rho (p115RhoGEF) a également été montré au cours de la stimulation de la voie Rho/ROCK (*Rho-associated protein kinase*)/MLCK (*myosin light*

chain kinase), consécutive à l'activation de $G\alpha_{12/13}$ et responsable de la migration cellulaire induite par le récepteur de chimiokine CXCR4 (Bian *et al.*, 2006; Tan *et al.*, 2006). L'ensemble de ces données est résumée dans le Tableau 3.

Nom	Gène	Expression	Exemple d'effecteurs
$G\alpha_s$	<i>GNAS</i>	Ubiquiste	↗ toutes les AC
$G\alpha_{olf}$	<i>GNAL</i>	Epithelium olfactif, cerveau	↗ AC
$G\alpha_{i1}$	<i>GNAI1</i>	Largement exprimé	↘ AC I, III, V, VI, VIII, IX
$G\alpha_{i2}$	<i>GNAI2</i>	Ubiquitaire	↘ AC I, III, V, VI, VIII, IX
$G\alpha_{i3}$	<i>GNAI3</i>	Largement exprimé	↘ AC I, III, V, VI, VIII, IX
$G\alpha_o$	<i>GNAO</i>	Neurones	↘ AC I
$G\alpha_z$	<i>GNAZ</i>	Neurones, plaquettes	↘ ACV, VI, ↗ RAP1GAP
$G\alpha_{gust}$	<i>GNAT3</i>	Cellules gustatives	↗ PDE
$G\alpha_{t-r}$	<i>GNAT1</i>	Bâtonnets de la rétine	↗ PDE6
$G\alpha_{t-c}$	<i>GNAT2</i>	Cônes de la rétine	↗ PDE6
$G\alpha_q$	<i>GNAQ</i>	Ubiquitaire	↗ PLC β 1-4, ↗ p63RhoGEF
$G\alpha_{11}$	<i>GNAI1</i>	Ubiquitaire	↗ PLC β 1-4, ↗ p63RhoGEF
$G\alpha_{14}$	<i>GNAI4</i>	Reins, poumons, foie	↗ PLC β 1-4
$G\alpha_{15}$	<i>GNAI5</i>	Cellules hématopoïétiques	↗ PLC β 1-4
$G\alpha_{12}$	<i>GNAI2</i>	Ubiquitaire	↗ PDZ-RhoGEF, ↗ LARG
$G\alpha_{13}$	<i>GNAI3</i>	Ubiquitaire	↗ PDZ-RhoGEF, ↗ LARG

Tableau 3. Les différentes sous-unités $G\alpha$ et leur fonction chez l'Homme. AC : adénylate cyclase (ici de la classe III qui comprend les isoformes I à X), LARG : RhoGEF associée à la leucémie (*Leucemia associated RhoGEF*), PDE : phosphodiesterase, PLC : phospholipase C, RAP1GAP : protéine d'activation de l'activité GTPasique de RAP1 (*RAP1 GTPase-activating protein*), RhoGEF : facteur d'échange de la guanine de Rho (*Rho-guanine nucleotide exchange factor*), PDZ : *Post-synaptic density protein, Drosophila disc larg tumor suppressor and Zonula occludens-1 protein* (d'après Wettschureck et Offermanns, 2005).

6.1.2. Sous-unités β et γ des protéines G

Les sous-unités $G\beta$ et $G\gamma$ ont une masse molaire d'environ 36 et 8 kDa, respectivement. Elles forment un complexe stable qui justifie de le considérer comme une même unité fonctionnelle $G\beta\gamma$ (Tableau 4), capable d'augmenter considérablement l'affinité de la sous-unité $G\alpha$ pour le RCPG inactivé et d'inhiber la libération spontanée du GDP fixé à $G\alpha$.

Jusqu'au milieu des années 90, la sous-unité $G\alpha$ était considérée comme l'élément majeur dans la signalisation relayée par les protéines G, reléguant ainsi le complexe $G\beta\gamma$ au rôle de plateforme protéique nécessaire au rapprochement de $G\alpha$ avec le RCPG. Toutefois, une première étude portant sur des cellules embryonnaires cardiaques de Poulet avait démontré que l'acétylcholine, en interagissant avec les récepteurs muscariniques de type 2 (M2),

provoque le recrutement de $G\beta\gamma$, lui-même responsable de l'ouverture du canal potassique de type *gated inward rectifying potassium* (Logothetis *et al.*, 1987). Cette famille de canaux potassiques regroupe quatre sous-unités distinctes, chacune régulée par interaction directe avec les complexes $G\beta\gamma$ (Schoots *et al.*, 1999), qui entraînent l'hyperpolarisation cellulaire *via* un efflux potassique et incidemment, un effet chronotrope négatif *via* le système parasympathique. Les complexes $G\beta\gamma$ ont aussi la capacité d'inhiber l'activité des canaux calciques voltage-dépendants (VDCC), ce qui se traduit par une réduction de l'amplitude des pics de courants calciques (pour revue : Currie, 2010).

Comme décrit précédemment (§ 6.1.1), les sous-unités $G\alpha_s$ et $G\alpha_i$ modulent l'activité des AC. Cependant, les complexes $G\beta\gamma$ possèdent la capacité d'interagir directement avec certaines isoformes d'AC pour réguler leur activité, qui selon les isoformes d'AC engagées, peut conduire à une augmentation ou une réduction de la production d'AMPc. Dans les deux cas, l'effet est relayé par une interaction directe entre le complexe $G\beta\gamma$ et les domaines cytoplasmiques C1 et C2 de l'AC (Chen *et al.*, 1995; Diel *et al.*, 2006; Wittpoth *et al.*, 1999).

Les PLC, activées par les protéines $G\alpha$ de la famille $G\alpha_q$, sont aussi régulées par les complexes $G\beta\gamma$. Il existe 13 isoformes de PLC, classées en six familles, *e.g.* PLC- β , - γ , - δ , - ε , - ζ , et - η , parmi lesquelles PLC- β sont les principales cibles de la sous-unité α_q . Ce sont aussi les premières pour lesquelles une interaction avec $G\beta\gamma$ conduisant à une augmentation de leur activité (et incidemment à une élévation de la concentration calcique intracellulaire) a été démontrée. Si $G\alpha$ et le complexe $\beta\gamma$ régulent tous deux la PLC- β , leurs sites d'interactions sont toutefois différents : la première lie le domaine C2, tandis que le second agirait *via* le domaine PH (*pleckstrin homology*) (Wang *et al.*, 1999). Ces observations ne constituent pas une règle dans la mesure où $\beta\gamma$ est capable de moduler l'activité de PLC- η_2 , pourtant dépourvue de domaine PH (Zhou *et al.*, 2008). Enfin, $G\beta\gamma$ peut aussi agir sur l'activité de PLC- ε et PLC- η avec des efficacités différentes selon la composition du complexe.

Par une liaison directe, les complexes $G\beta\gamma$ sont aussi capables de moduler l'activité de certaines phosphoinositide 3 kinases (PI3K) telles que PI3K β et PI3K γ (Voigt *et al.*, 2005), enzymes qui catalysent notamment la phosphorylation du groupe inositol du phosphatidylinositol, qui se traduit ainsi par la production de phosphatidylinositol-3-phosphate (PIP₃). La voie de signalisation typique engagée par les PI3K comprend Akt et *mammalian target of rapamycin* (mTOR), ce qui aboutit à la régulation de divers activités cellulaires telles que le trafic intracellulaire, la migration, la motilité, la croissance, la prolifération, ou encore la différenciation. L'ensemble de ces données est résumée dans le Tableau 4.

Nom	Gène	Expression	Exemple d'effecteurs
Gβ ₁	<i>GNB1</i>	Largement exprimé, bâtonnet	↘ACI, III, V, VI ↗ACII, IV, VII ↗PLCβ ↗GIRK1-4 (Kir3.1-3.4) ↗GRK2-GRK3 ↗PI3K ↗VDCC de type T ↘VDCC de type N, P/Q, R
Gβ ₂	<i>GNB2</i>	Largement exprimé	
Gβ ₃	<i>GNB3</i>	Largement exprimé, cônes	
Gβ ₄	<i>GNB4</i>	Largement exprimé	
Gβ ₅	<i>GNB5</i>	Cerveau	
Gγ ₁	<i>GNGT1</i>	Bâtonnets, cerveau	
Gγ ₂	<i>GNG2</i>	Largement exprimé	
Gγ ₃	<i>GNG3</i>	Cerveau, cellules sanguines	
Gγ ₄	<i>GNG4</i>	Largement exprimé	
Gγ ₅	<i>GNG5</i>	Largement exprimé	
Gγ ₆	<i>GNG6</i>	Largement exprimé	
Gγ ₇	<i>GNG7</i>	Epithélium olfactif	
Gγ ₈	<i>GNG8</i>	Largement exprimé	
Gγ ₁₀	<i>GNG9</i>	Largement exprimé	
Gγ ₁₁	<i>GNG10</i>	Largement exprimé	
Gγ ₁₂	<i>GNG11</i>	Ubiquiste	
Gγ ₁₃	<i>GNG12</i>	Cerveau, bourgeons olfactifs	
Gγ ₁₄	<i>GNG13</i>	Cônes, cerveau	

Tableau 4. Liste des différentes sous-unités Gβ et Gγ chez l'Homme et fonctions. GIRK : canal potassique rectifiant entrant régulé par les protéines G ; GRK : kinase des RCPG ; PI3K : phosphatidylinositol-3-kinase ; VDCC : canal calcique dépendant du voltage (d'après Wettschureck et Offermanns, 2005).

Constituées d'un ensemble de protéines kinases spécifiques des sérines, thréonines et tyrosines, les MAPK sont elles aussi impliquées dans de nombreux processus cellulaires. Cet ensemble est divisé en cinq groupes : ERK1/2, MAPK p38, JNK1-3, ERK3/4 et ERK7/8 (aussi appelées *Nemo-like kinases*), et ERK5. Principalement activées par les RTK, elles peuvent aussi initier leurs voies de signalisation suite à une stimulation d'un RCPG *via* Gβγ. Il a notamment été démontré que Gβγ pouvait stimuler ERK1/2, JNK et p38 (Coso *et al.*, 1996; Koch *et al.*, 1994; Yamauchi *et al.*, 1997).

6.1.3. Liaison des protéines G aux récepteurs couplés aux protéines G

Deux théories ont été proposées pour expliquer le couplage des protéines G aux RCPG. Selon la première, l'interaction entre ces deux protéines se fait selon un mode collisionnel et par diffusion latérale des protéines G au niveau de la membrane plasmique (on parle de couplage collisionnel), où les protéines G n'interagissent qu'avec des récepteurs activés (Gilman, 1987). Cependant, l'observation de complexes RCPG/protéine G (Galés *et al.*, 2005) avant l'activation du récepteur, ainsi que l'activation rapide (de l'ordre de la milliseconde) des

protéines G suite à la stimulation d'un RCPG (Hille, 1992), ont fait émerger la seconde hypothèse, selon laquelle il existerait un précouplage entre les RCPG et les protéines G. De nombreuses observations ont confirmé cette hypothèse, en particulier l'observation *i*) que la protéine G_t peut être associée aussi bien à la rhodopsine activée qu'inactivée (Jastrzebska *et al.*, 2010), *ii*) qu'il est possible d'isoler des complexes récepteur/protéine G en l'absence de stimulation par un agoniste (Nanoff et Stiles, 1993), *iii*) que la majorité des sites de contact entre le récepteur muscarinique M3 et $G\alpha_s$ sont détectables aussi bien à l'état actif qu'inactif du récepteur (Hu *et al.*, 2010) et *iv*) que les sous-unités $G\alpha_s$ et $G\beta\gamma$ sont toujours associées au récepteur β_2 -AD, indépendamment de son état d'activation (Lachance *et al.*, 1999). Ainsi, un précouplage faciliterait la signalisation en évitant ou accélérant l'étape de collision.

Le nombre croissant d'études cristallographiques de RCPG couplés ou non à différentes protéines G a permis de déterminer les éléments structuraux impliqués dans l'interaction des deux protéines. Parmi les différentes structures portées par les sous-unités α , 8 se sont avérées déterminantes pour le couplage au RCPG : la partie N-terminale de la sous-unité, des hélices α_2 , α_4 et α_6 , et des boucles α_2 - β_4 , α_4 - β_6 , α_3 - β_5 et α_N - β_1 du domaine GTPase. Les extrémités N- et C- terminales, les boucles α_4 - β_6 et α_N - β_1 semblent participer à la spécificité d'interaction entre les protéines G et les RCPG (pour revue : Moreira, 2014). Plus spécifiquement, certains résidus semblent avoir leur importance. Par exemple, l'étude du complexe formé par le M3 et de la protéine G_q a montré que *i*) la sous-unité $G\alpha_q$ interagit avec plusieurs sites de l'hélice 8 du M3 notamment *via* des résidus de la boucle α_4 - β_6 et l'extrémité C-terminale *ii*) G_q se lie avec au moins trois résidus de la boucle cytoplasmique du DTM6 de M3 et *iii*) le résidu arginine de l'hélice α_N de $G\alpha_q$ est en contact avec l' i_2 de M3 (Hu *et al.*, 2010). Dans le cas du complexe formé par la rhodopsine et $G\alpha_t$, la boucle i_3 de la rhodopsine est proche des extrémités N- et C-terminale ainsi que de la boucle α_4 - β_6 . L'extrémité C-terminale de $G\alpha_t$ interagit avec l' i_3 , la boucle cytoplasmique du DTM6 ainsi qu'avec l'hélice 8 de la rhodopsine (Ernst *et al.*, 2000; Itoh *et al.*, 2001; Janz et Farrens, 2004; Taylor et Neubig, 1994). Dans le cas du récepteur β_2 -AD couplé au complexe $G\alpha_s\beta_1\gamma_2$, la structure cristallographique montre que parmi les structures de $G\alpha$, seules les parties C- et N-terminales et l'hélice α_4 interagissent avec le récepteur (Rasmussen *et al.*, 2011). Comme il avait déjà été observé pour la rhodopsine, il apparaît que la partie C-terminale s'insère au cœur de la cavité cytoplasmique (formée au cours de l'activation du récepteur) constituée des DTM3, 5, 6 et 7 (Janz et Farrens, 2004; Rasmussen *et al.*, 2011; Scheerer *et al.*, 2008). D'autres études ont également démontré que le motif E/DRY est impliqué dans une interaction directe avec les sous-unités $G\alpha$ (Choe

et al., 2011; Scheerer et al., 2008), ce qui corrobore les mécanismes d'activation et la théorie du verrou ionique observé pour les RCPG.

Le complexe $\beta\gamma$ joue donc un rôle dans la stabilisation du complexe protéine G/récepteur en initiant une conformation de la sous-unité $G\alpha$ qui favorise et stabilise son interaction avec le RCPG (Oldham *et al.*, 2006). De plus, il a été montré que la queue C-terminale de $G\beta$ est en contact avec la boucle i_3 du récepteur α_2 -AD (Taylor *et al.*, 1994), ou que le complexe $G\beta\gamma$ interagit avec l'hélice 8 de la rhodopsine (Phillips et Cerione, 1992). De manière surprenante, aucune interaction n'a été observée en cristallographie par Rasmussen *et al.* entre le récepteur β_2 -AD et $G\beta\gamma$ (Rasmussen *et al.*, 2011).

En conclusion, les structures déterminantes dans l'interaction RCPG/protéines G sont principalement comprises dans le domaine GTPase et les extrémités de la sous-unité α , ainsi que les parties cytoplasmiques des RCPG telles que celles des DTM3, 5, 6 et 7, la boucle i_3 et l'hélice 8. Ces sites peuvent en outre être partagés avec des protéines responsables de la régulation de la signalisation des RCPG *via* les protéines G.

6.1.4. Régulation des protéines G par les RGS

Les protéines régulatrices de la signalisation des protéines G (ou RGS pour *regulators of G-protein signaling*) appartiennent à une catégorie de protéines intracellulaires capables d'inhiber la signalisation des RCPG. Cette activité inhibitrice passe par une interaction directe avec la sous-unité α des protéines G *via* leur partie centrale disposant d'une « *RGS box* », ou domaine RGS, composé de 125 acides aminés constituant une séquence conservée (Koelle et Horvitz, 1996). À ce jour, une trentaine de RGS ont été identifiées pour leur capacité à interagir avec les sous-unités $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_q$ et $G\alpha_{12/13}$. En fonction de la séquence de leur domaine RGS, ces protéines ont été classées en cinq familles : R4, R7, R12, RZ et RA (Ross et Wilkie, 2000). Ce motif conservé est également retrouvé dans d'autres protéines régulatrices de l'activité des RCPG, comme les kinases de récepteurs couplés aux protéines G (GRK) ou les RhoGEF.

En catalysant l'hydrolyse du GTP porté par $G\alpha$, qui met fin à son activité et promeut la réassociation du complexe $G\alpha\beta\gamma$, les RGS jouent sur la durée et la cinétique de signalisation des RCPG. Ainsi, ces protéines peuvent aussi être appelées GAP, pour *GTPase activating proteins* (Oldham et Hamm, 2008). Pour preuve, l'induction de l'expression ou la surexpression de RGS diminue l'efficacité et/ou la puissance d'un agoniste (Hollinger et Hepler, 2002; Roy *et al.*, 2006). À l'inverse, l'inhibition ou la réduction de l'expression de

certaines RGS améliore l'activité d'agonistes de certains récepteurs, comme observé pour les récepteurs CXCR4, AT1 ou encore M3 (Bansal *et al.*, 2007).

La RGS4 est la plus étudiée des membres de cette superfamille. D'un point de vue structural, elle est composée d'un domaine RGS flanqué des régions N- et C- terminales. Ces extrémités sont impliquées dans la localisation subcellulaire de la protéine, tandis que le domaine RGS assure un rôle de régulateur des protéines G. La surexpression de RGS4 bloque la signalisation induite par l'activation de $G\alpha_{i/o}$ ou de $G\alpha_q$ tandis que l'expression basale de cette protéine n'a quant à elle qu'un effet modéré sur la signalisation calcique relayée par $G\alpha_q$ et induit une oscillation rythmique de la concentration cytosolique calcique (Luo *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 1999). Ces données suggèrent une régulation fine de la signalisation des protéines G par les RGS en conditions physiologiques plutôt que l'inhibition observée dans les modèles d'étude où elles sont surexprimées.

6.2. Kinases de récepteurs couplés aux protéines G

Les *G-protein coupled receptors kinases* (GRK) sont capables de phosphoryler un RCPG activé par un agoniste, indépendamment des seconds messagers. Cette phosphorylation est la première étape de la désensibilisation du récepteur, étape suivie par le recrutement des β -arrestines (*cf*; § 6.3) (Moore *et al.*, 2007). Selon leur distribution tissulaire ou leur spécificité pour certains récepteurs, les 7 membres des GRK sont répertoriés dans trois catégories : GRK1 et GRK7, spécifiques de la rhodopsine et du récepteur « cône-opsine » ; GRK2 et GRK3, exprimés de manière ubiquiste; GRK4, majoritairement exprimée au niveau cérébral, rénal et testiculaire; GRK5 et GRK6, toutes deux ubiquistes.

Toutes les GRK partagent une structure comprenant un domaine catalytique très conservé, tandis que leurs domaines N- et C-terminal sont plus variables. La partie N-terminale abrite des sites d'interactions avec d'autres protéines et détermine la localisation intracellulaire de la protéine. GRK2 possède aussi un domaine « *RGS-like* », qui lui permet d'abolir la signalisation de $G\alpha_{q11}$ en séquestrant cette sous-unité et en l'empêchant d'interagir avec ses effecteurs (Dorn, 2009). Le domaine C-terminal, commun aux GRK2 et GRK3, contient quant à lui des sites de liaisons au complexe $G\beta\gamma$ et au PIP_2 impliqués dans l'adressage des GRK aux RCPG membranaires (Pitcher *et al.*, 1992).

Une fois activées par phosphorylation (par exemple par un RCPG) (Palczewski *et al.*, 1991), les GRK sont capables de phosphoryler à leur tour des résidus sérines et thréonines présents sur la boucle i_2 ou l'extrémité C-terminale des RCPG. Ces phosphorylations sont notamment responsables du recrutement des β -arrestines, qui favorisent le découplage des

RCPG aux protéines G (désensibilisation) ainsi que leur internalisation et leur trafic intracellulaire. Les différentes GRK ne phosphorylent pas les récepteurs de la même manière. Ainsi, l'hypothèse de la signalisation en code-barre propose que les différents patrons de phosphorylations résultant de l'action des GRK imposent des conformations variables aux β -arrestines menant à diverses signalisations (Nobles *et al.*, 2011).

6.3. Les β -arrestines

Il existe quatre type d'arrestines (1 à 4) répertoriées dans deux familles : les arrestines visuelles (1 et 4) et non-visuelles (ou β -arrestines 1 et 2). Les arrestines visuelles interagissent avec le récepteur rhodopsine, alors que les β -arrestines sont ubiquistes. Ces protéines sont recrutées par un RCPG activé (Krasel *et al.*, 2005) dont le domaine intracellulaire est préalablement phosphorylé par les GRK (Nobles *et al.*, 2007; Xiao *et al.*, 2004). Dépourvues d'activité enzymatique, les arrestines servent alors de plateformes dont les fonctions dépendent des partenaires protéiques engagés.

Principalement constituées de feuillets β , les arrestines ont une forme allongées et sont composées de deux domaines *immunoglobulin-like* nommés domaine N et C (Figure 17). Le domaine N contient une petite hélice α nommée hélice 1 et des structures entre les feuillets β appelées *finger loop*, *middle loop* et *lariat loop* qui constituent une interface entre les domaines N et C (Shukla *et al.*, 2013).

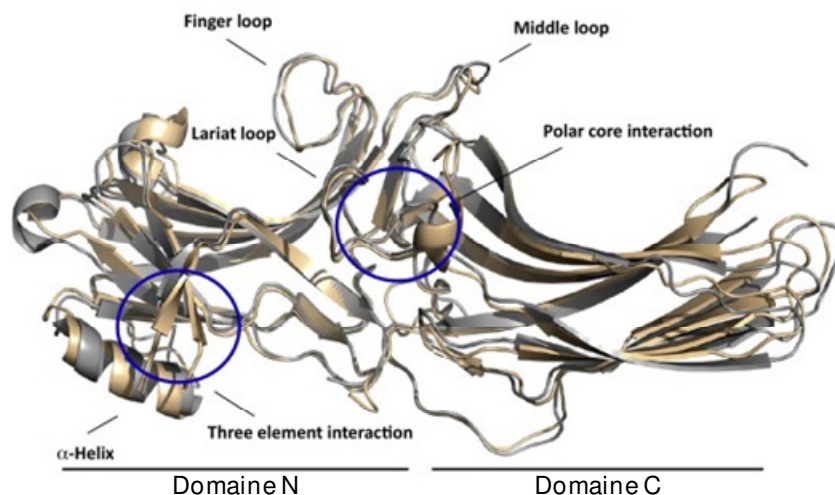


Figure 17. Superposition des structures de la β -arrestine 1 et β -arrestine 2. La superposition des structures cristallographiques de la β -arrestine 1 (gris) et de la β -arrestine 2 (doré) dans leur conformation inactive révèle des structures 3D très comparables. Les trois éléments d'interaction (« *three element interaction* ») et le cœur polaire d'interaction (« *polar core interaction* »), qui maintiennent les β -arrestines dans leur conformation basale, sont indiqués (cercles bleu). Les boucles *lariat loop*, *middle loop* et *finger loop*, qui pourrait jouer un rôle dans l'interaction aux RCPG, et l'hélice α sont également indiquées. D'après Srivastava *et al.*, 2015.

La résolution récente de la structure de la rhodopsine associée à une arrestine visuelle pré-activée montre que celle-ci interagit sur plusieurs sites du récepteur *i.e.* les extrémités cytoplasmiques des DTM5, 6 et 7, les boucles i_2 et i_3 , l'hélice 8 et l'extrémité C-terminale. Sur l'arrestine, les zones de contact sont essentiellement les boucles séparant les feuilletts β du domaine N (principalement la *finger loop*, qui adopte une conformation en hélice α quand l'arrestine est activée), ainsi que le feuillet β qui suit la *finger loop* (Kang *et al.*, 2015).

Le rôle classiquement attribué aux β -arrestines réside dans l'endocytose et l'arrêt de la signalisation des RCPG induits par les protéines G (ou désensibilisation). En effet, les β -arrestines sont impliquées dans différentes voies d'endocytose telles que les voies clathrine-dépendantes, cavéole-dépendantes et clathrine/cavéole-indépendantes. Pour exemple, en ce qui concerne la voie clathrine-dépendante, les β -arrestines jouent un rôle majeur dans le recrutement de la protéine adaptatrice AP-2 (pour *adaptor protein-2*) et de la clathrine pour former un complexe d'endocytose avec le RCPG. Il a été démontré que la β -arrestine 1 était constitutivement phosphorylée par ERK1/2, diminuant l'interaction avec la clathrine. Après activation du récepteur β_2 -AD, la β -arrestine 1 est recrutée au récepteur, permettant l'engagement des protéines adaptatrices de l'endocytose (Lin *et al.*, 1997). Le recrutement d'AP-2 et de la clathrine force ensuite la membrane plasmique à s'invaginer pour ensuite former une vésicule intracellulaire (Laporte *et al.*, 1999). Les récepteurs sont ensuite dirigés, selon l'affinité du RCPG pour les β -arrestines, vers des endosomes de recyclage amenant de nouveau le récepteur à la membrane, ou vers des endosomes tardifs conduisant à la dégradation des RCPG par les lysosomes (Oakley *et al.*, 1999, 2000). L'arrimage des arrestines à un RCPG activé conduit à sa désensibilisation. En effet, en occupant les mêmes sites d'interaction, les arrestines, par encombrement stérique, découplent les RCPG des protéines G, ce qui a pour conséquence d'en arrêter la signalisation (Lohse *et al.*, 1992; Mukherjee *et al.*, 1999). Cependant, les β -arrestines ont également un rôle dans la transduction de la signalisation, indépendamment des protéines G. Notamment, les β -arrestines sont responsables du recrutement de la tyrosine kinase c-Src (*cellular-Src*, Src pour *sarcoma*) au récepteur, facilitant ainsi l'activation de MAPK telles que ERK1/2 (Wei *et al.*, 2003), les JNK (McDonald *et al.*, 2000) ou encore la kinase p38 (Sun *et al.*, 2002). Ainsi, les β -arrestines jouent un rôle dans les effets cellulaires variés de ces kinases, tels que la migration, la prolifération, la survie cellulaire, ou encore l'activation de gènes (Figure 18).

L'étude récente de la structure d'un récepteur β_2 -AD chimérique, dénomé β_2V_2R (dans lequel la région C-terminale du récepteur β_2 -AD est remplacée par celle du récepteur de type 2 de la vasopressine, V_2R) a montré que la β -arrestine 1 pouvait adopter deux conformations

distinctes en interaction avec le récepteur chimérique : dans l'une, la β -arrestine 1 ne se lie que sur le fragment C-terminal phosphorylé du récepteur, tandis que l'autre permet à la *finger loop* de s'insérer dans le cœur du RCPG (Shukla *et al.*, 2014). Cette dernière conformation, qui rappelle celle adoptée par les sous-unité α des protéines G, a été récemment décrite grâce à une étude cristallographique du récepteur β_2 -AD (Kang *et al.*, 2015).

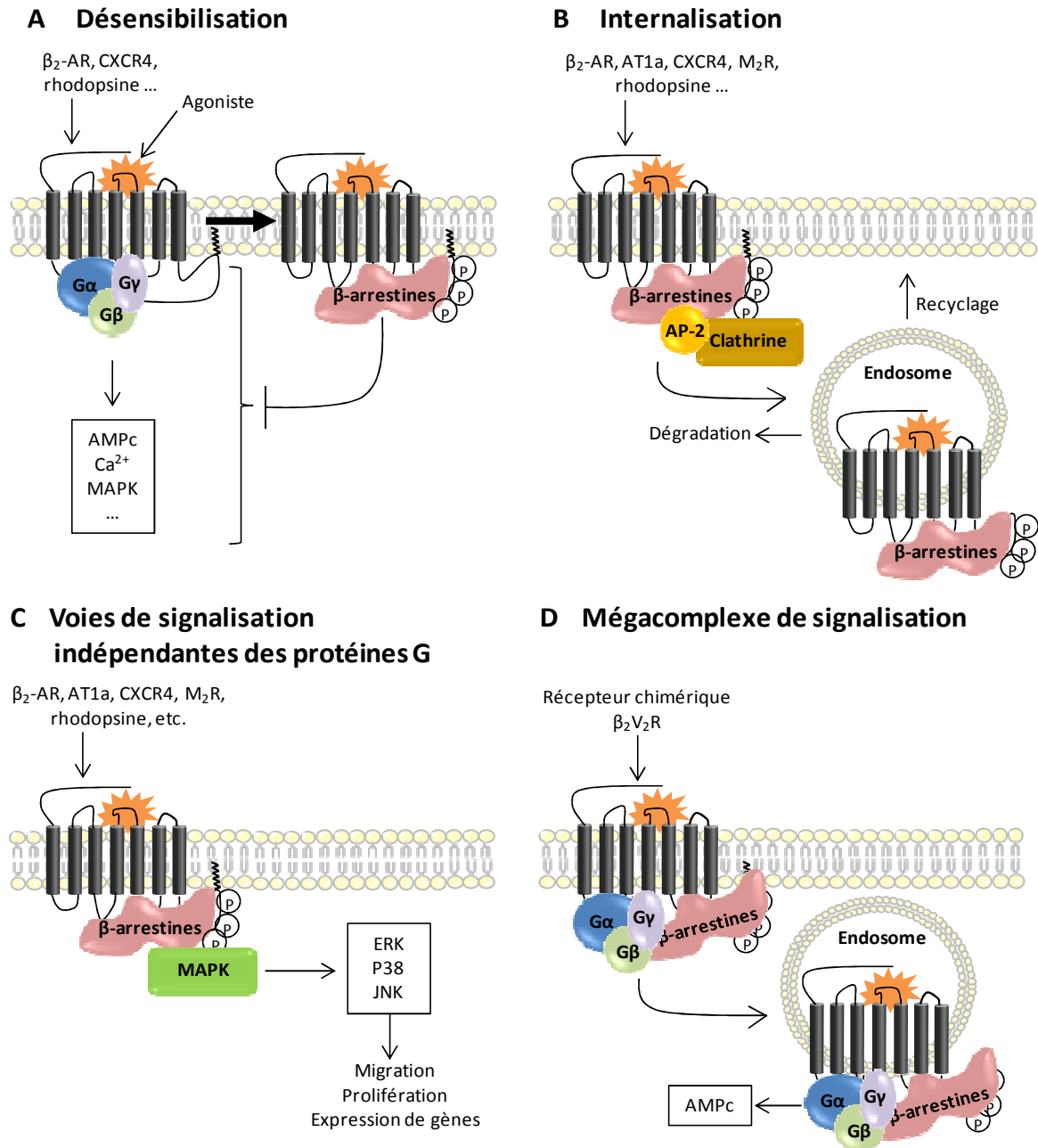


Figure 18. Différents effets des β -arrestines dans la signalisation des RCPG. **A.** Désensibilisation des RCPG par découplage des protéines G dû à l'encombrement stérique induit par la liaison des β -arrestines. **B.** Internalisation du complexe RCPG/ β -arrestines suite au recrutement de la protéine adaptatrice AP-2 et de la clathrine. L'internalisation aboutit à un recyclage à la membrane ou à une dégradation des RCPG selon leur affinité pour les β -arrestines. **C.** Voies de signalisation indépendantes des protéines G. Les β -arrestines entraînent l'activation de la voie des MAPK impliquées dans de nombreux processus cellulaires. **D.** Hypothèse de la formation d'un mégacomplexe de signalisation avec un couplage des RCPG à la fois aux protéines G et aux β -arrestines, menant à la persistance de la voie de signalisation dépendante des protéines G depuis les endosomes précoces.

L'interaction de β -arrestine 1 avec le domaine C-terminal du RCPG uniquement, laisse accessible les boucles intracellulaires du récepteur, ce qui permettrait au complexe internalisé RCPG/ β -arrestine et potentiellement protéine G, de continuer à signaler depuis les endosomes précoces. Cette hypothèse est confortée par le fait qu'une signalisation prolongée *via* G_{α_s} a été observée suite à la stimulation et l'internalisation du V_2R (Calebiro *et al.*, 2009). Afin de vérifier leur hypothèse, cette équipe a utilisé le récepteur chimère β_2V_2R et des antagonistes imperméants ou permeants à la membrane plasmique, et mesuré l'activité de la protéine G_s à travers l'accumulation d'AMPC. Ainsi, de manière tout à fait originale, ces auteurs ont montré qu'après internalisation, le récepteur β_2V_2R lié à la β -arrestine 1 était capable de maintenir une signalisation *via* la protéine G_s . Cette équipe a également mis en évidence, par la technique de BRET (*bioluminescence resonance energy transfer*) une proximité (10 nm) entre la sous-unité G_{α_s} et les β -arrestines 1 et 2, et a pu observer, par la technique d'électromagnétisme, le méga-complexe β_2V_2R/β -arrestine 1/ G_{α_s} (Thomsen *et al.*, 2016). Cependant, l'utilisation d'un récepteur chimérique, dans lequel la région C-terminale d'un récepteur de classe B (V_2R), connu pour interagir de manière plus soutenue avec les β -arrestines (Oakley *et al.*, 1999, 2000), ont amené Thomsen *et al.* à proposer que la formation de ce méga-complexe et la signalisation depuis les endosomes intracellulaires pourraient être rares ou limitées pour les récepteurs de classe A.

6.4. Mécanismes de transactivation par les récepteurs couplés aux protéines G

Les voies de signalisation des RCPG suivent classiquement une cascade d'évènements linéaires, depuis l'interaction de l'agoniste jusqu'au recrutement des différents effecteurs intracellulaires. Toutefois, il est maintenant clairement établi que certains RCPG sont aussi capables d'activer des récepteurs membranaires, recrutant ainsi les voies de signalisation qui leur sont associées.

Nommée transactivation, cette voie de signalisation singulière a initialement été décrite sur une lignée de fibroblastes dans laquelle l'activation de RCPG entraîne la phosphorylation rapide de résidus tyrosine du récepteur de l'EGFR (Daub *et al.*, 1996) avec une efficacité comparable à celle observée en présence du ligand naturel EGF (Leserer *et al.*, 2000). En fait, le groupe des RTK, auquel appartient l'EGFR, constitue la catégorie majoritaire de récepteurs transactivés par les RCPG. De plus, ces derniers peuvent également transactiver d'autres types de récepteurs à activité proche de celle des RTK, tels que les récepteurs de la famille des TGF- β (*transforming growth factor β*) ou les *Toll-like receptors*.

La transactivation des RTK par certains RCPG met en jeu l'activation *i)* de métalloprotéases matricielles (MMP) liées à la membrane plasmique (Leserer *et al.*, 2000; Prenzel *et al.*, 1999) ou *ii)* de seconds messagers tels que le Ca^{2+} ou de protéines partenaires des RCPG (PLC, Src, β -arrestines ou encore les protéines G) qui à leur tour entraînent la phosphorylation et l'activation des RTK (Andreev *et al.*, 2001; El-Shewy *et al.*, 2011; Esposito *et al.*, 2011; Gesty-Palmer *et al.*, 2013).

Il a été montré que le récepteur β_2 -AD est capable de transactiver le récepteur PAR-1 *via* l'action de la MMP de type 13 (Jaffré *et al.*, 2012). On parle également de transactivation lorsque deux (ou plusieurs) RCPG collaborent dans leur signalisation au cours d'une interaction physique de type di- ou oligo-mérisation. Ce phénomène a tout d'abord été découvert pour les récepteurs de la famille C, ou *Glutamate*, avec par exemple les GABABR1/GABABR2 (Kaupmann *et al.*, 1998) et du glutamate mGluRs (Pin *et al.*, 2004), puis étendu aux récepteurs de la famille *Rhodopsine* (pour revue: Franco *et al.*, 2016). Ainsi, certains RCPG sont capables de transactiver d'autres RCPG par une interaction physique ou par l'activation de protéines intermédiaires qui ont pu être de manière non exhaustive décrites dans ce premier chapitre.

6.5. Biais de signalisation

Jusqu'au milieu des années 90, la communauté scientifique pensait que *i)* les ligands d'un RCPG donné pouvaient présenter différentes efficacités tout en activant le même set de protéines de signalisation (protéines G et β -arrestines par exemple) et *ii)* un agoniste donné activait les protéines G et β -arrestines avec une efficacité équivalente. Ces paradigmes étaient en adéquation avec l'hypothèse selon laquelle il n'existait qu'un seul et même état d'activation du RCPG, responsable de l'amplitude des réponses cellulaires (Benovic *et al.*, 1988). De fait, en fonction de l'impact d'un ligand sur un RCPG, on distinguait plusieurs types : 1) l'agoniste complet, capable d'induire une activation maximale du récepteur (et implicitement une réponse maximale), 2) l'agoniste partiel, moins efficace que le précédent, 3) l'antagoniste, dépourvu d'effet propre mais capable de réduire voire bloquer l'efficacité et la puissance d'un agoniste, et enfin 4) l'agoniste inverse qui inhibe l'activité basale/constitutive d'un RCPG. Cependant, et grâce à des études originellement réalisées sur les récepteurs cholinergiques (*cf.* ci-après), puis aux nombreuses études pharmacologiques et structures cristallographiques, il est maintenant admis que parmi les agonistes d'un RCPG donné, certains peuvent privilégier une voie de signalisation par rapport à une autre (Violin et

Lefkowitz, 2007). Dans ce cas, on parle alors de sélectivité fonctionnelle, d'agonisme biaisé ou encore de biais de signalisation (Jarpe *et al.*, 1998; Kenakin, 1995).

La première proposition d'un agonisme biaisé a été rapportée par différentes équipes qui ont démontré que la liaison de l'acétylcholine au récepteur muscarinique M1 active aussi bien la voie de l'AMPc (par un couplage à Gs) que la voie de la PLC (*via* Gq), alors que certains analogues cholinergiques bloquent l'accumulation d'AMPc tout en conservant la capacité d'activer la PLC (Fisher *et al.*, 1993; Gurwitz *et al.*, 1994). Après ces travaux pionniers, d'autres groupes ont mis en évidence une signalisation biaisée pour un large éventail de RCPG. Parmi les cas de figure recensés, celui des β -arrestines vis-à-vis des protéines G est le plus commun. À titre d'exemple, l'ICI118.551 et le propranolol, agonistes inverses du récepteur β_2 AD vis à vis de la signalisation de l'AC/AMPc, se comportent comme des agonistes partiels lorsque l'on considère la voie ERK1/2 relayée par les β -arrestines (Azzi *et al.*, 2003).

On peut également évoquer le cas du récepteur AT₁ de l'angiotensine II (AngII), qui compte parmi les RCPG les plus étudiés en terme de biais de signalisation. Ce couple ligand/récepteur provoque *i)* l'hydrolyse du phosphatidylinositol *via* un couplage Gq et l'activation de la PLC, *ii)* l'activation de la voie MAPK, *iii)* la phosphorylation du récepteur et *iv)* l'internalisation du complexe AT₁/AngII. Un peptide analogue de l'AngII, le [Sar¹,Ile⁴,Ile⁸]AngII (SII), dont les chaînes latérales des acides aminés impliqués dans la liaison au récepteur ont été modifiées, est capable de stimuler la voie MAPK, la phosphorylation d'AT₁ et son internalisation, mais n'a pas d'impact sur l'accumulation d'IP₃ (Holloway *et al.*, 2002). Les auteurs proposent que l'activation d'AT₁ par ces analogues modifie l'état d'activation du récepteur en conférant des états conformationnels différents de ceux induits par l'AngII. Dans la continuité de ces travaux, Lefkowitz et coll. ont montré que SII, incapable de provoquer le couplage à la protéine G_{q/11} au récepteur AT₁ ainsi que l'accumulation d'IP₃, peut initier le recrutement de la β -arrestine 2, l'internalisation du récepteur et la stimulation de ERK1/2. Ces effets sur l'internalisation du récepteur et la voie MAPK du ligand SII sont bloqués en présence d'ARN interférent ciblant la β -arrestine 2 (Wei *et al.*, 2003). Ainsi, le ligand SII de l'AT₁ se comporte comme un ligand biaisé du récepteur AT₁. Il convient de noter que ces premiers résultats sont en contradiction avec ceux obtenus à l'aide de nouveaux outils d'études pharmacologiques basés sur le BRET, qui ont montré que l'AngII mais aussi SII étaient capables de recruter la β -arrestine 2 et d'activer toutes les isoformes des protéines G des familles G_{q/11} ou G_{i/o}. Il semble toutefois que les deux ligands

ne stabilisent pas la même conformation du récepteur AT₁ lié aux protéines G, ce qui conduirait éventuellement à des différences de signalisation (Saulière *et al.*, 2012).

Un autre exemple intéressant est celui du récepteur CXCR4, dont le ligand endogène CXCL12 existe à la fois sous forme mono- et dimérique (Kufareva *et al.*, 2014; Ziarek *et al.*, 2013). Il apparaît que la forme monomérique de CXCL12/SDF-1 α est capable de mobiliser le Ca²⁺ intracellulaire, d'inhiber la voie de signalisation de l'AMPc, de recruter la β -arrestine 2 et de stimuler l'accumulation des filaments d'actine lors de la migration cellulaire. La forme dimérique du ligand peut quant à elle provoquer une augmentation des flux calciques, l'inhibition de l'AC et une rapide phosphorylation de la MAPK ERK1/2. En revanche, elle est incapable de stimuler le recrutement des β -arrestines, la polymérisation des filaments d'actine ou encore la migration chimiotactique. Il apparaît donc que la structure quaternaire du ligand est déterminante dans les voies de transductions engagées par le récepteur CXCR4 suite à sa stimulation (Drury *et al.*, 2011). La pepducine ATI-2341, un fragment peptidique dérivé de la séquence de la boucle i₃ du récepteur CXCR4 auquel a été greffée une entité hydrophobe, agit également comme un ligand biaisé du CXCR4. Plus précisément, alors que CXCL12 peut recruter les protéines G_i et G₁₂ et chacune des β -arrestines 1 et 2, la pepducine est seulement capable de solliciter des protéines de la famille G_i, par antagonisme des autres voies (Quoyer *et al.*, 2013).

La principale hypothèse retenue pour expliquer le biais de signalisation propose que les différences structurales des ligands seraient responsables des variations de conformation adoptée par les RCPG activés, aboutissant ainsi au recrutement sélectif ou à la stabilisation de différents états conformationnels des effecteurs intracellulaires (Costa-Neto *et al.*, 2016). Cette hypothèse est corroborée par un nombre croissant d'études qui démontrent que des ligands de structures différentes sont capables de stabiliser les RCPG dans des états conformationnels distincts. On peut citer par exemple les études de résonance magnétique nucléaire (RMN) sur les états d'activation du récepteur β_2 -adrénergique (Nygaard *et al.*, 2013), ainsi que les travaux menés par l'équipe du Dr Kobilka. Cette dernière évalue la dynamique des RCPG (rhodopsine et β_2 -AD) et des variations d'énergie en fonction de la conformation (Deupi et Kobilka, 2010). Les études de simulation de dynamique moléculaire du récepteur AT₁, par l'équipe du Dr Lavigne, montrent que les états conformationnels du récepteur sont différents lorsqu'il est couplé aux β -arrestines ou à la protéine G α_q (Cabana *et al.*, 2015). Cette idée de différents états actifs d'un même récepteur a également été proposée pour le récepteur de type 2A de la sérotonine (5-HT_{2A}) après des simulations de dynamique moléculaire. Celles-ci ont montré que les ligands hallucinogènes et non-hallucinogènes du 5-

HT_{2A} favorisent différentes conformations de sa boucle i₂ (Perez-Aguilar *et al.*, 2014), phénomène également observé en spectrométrie quantitative de masse pour le récepteur β₂-AD (Kahsai *et al.*, 2011).

D'un point de vue structural, la mutation dirigée d'acides aminés au sein des DTM 6 et 7 impliqués dans l'activation du récepteur CCR5 (récepteur 5 de chimiokine de type CC) a également un impact sur sa signalisation évoquée par certains ligands chimiokines. En particulier, la substitution du résidu tyrosine 251 du DTM 6 en alanine empêche le recrutement des β-arrestines normalement induit par son ligand CCL3, tandis que l'activation de G_i et de sa voie de signalisation sont conservées. À *contrario* et sur ce même modèle, le ligand CCL5 gagne considérablement en efficacité vis-à-vis de la β-arrestine, par rapport au récepteur natif. De manière inattendue, l'aplaviroc, antagoniste de CCR5 agit alors comme un agoniste complet du récepteur muté (Steen *et al.*, 2013).

Alors que de nombreux cas de biais de signalisation ont été décrits à partir d'études *in vitro*, l'impact pharmacologique *in vivo* de ce phénomène reste peu référencé et difficile à anticiper. En effet, s'il existe des biais de signalisation dépendant des ligands, le tissu cellulaire ciblé et l'expression du récepteur d'intérêt au sein de ce même tissu peut influencer les voies de transduction engagées par un ligand. Quoi qu'il en soit, le criblage de ligands dits biaisés dans le développement de nouvelles thérapies reste prometteur pour limiter certains effets secondaires induits par des ligands opioïdiques. Dans cette optique, on pourrait s'affranchir *i*) des effets de dépression respiratoire relayés par les β-arrestines (Raehal *et al.*, 2005) et *ii*) de la tolérance et/ou dépendance des opioïdes couramment utilisés comme analgésiques. C'est pourquoi la mise en évidence d'analgésiques opioïdiques incapables de recruter cette voie de transduction (Groer *et al.*, 2007) pourrait ainsi éviter ces effets secondaires (Xu *et al.*, 2007) voire améliorer l'effet désiré en première instance (Bohn *et al.*, 1999). Toujours dans cet esprit, il a été montré que le losartan, un antagoniste du récepteur AT₁, prévient les effets vasoconstricteurs néfastes relayés par le système angiotensinergique, mais réduit la pression artérielle moyenne et les performances cardiaques. En revanche, l'utilisation du ligand biaisé TRV120027 augmente les performances cardiaques tout en préservant le volume ischémique cardiaque chez le Rat (Violin *et al.*, 2010). Des effets comparables ont été observés pour des modèle canins d'insuffisance cardiaque, dans lequel le TRV120027 rétablit les fonctions cardiaques tout en préservant le fonctionnement rénal (Boerrigter *et al.*, 2012).

Ainsi, des ligands engageant spécifiquement une voie de signalisation d'un RCPG donné, constituent une piste très prometteuse dans la découverte de nouvelles molécules

thérapeutiques et dans l'amélioration des thérapies actuelles. Afin de développer de nouveaux ligands biaisés, il est toutefois indispensable aussi de comprendre les mécanismes d'interaction entre ligand et récepteur.

En conclusion, il apparaît ainsi que la compréhension de la structure des RCPG, leur mécanismes d'activation et les cascades de signalisation possibles associées à ces récepteurs, ne permet finalement pas **la généralisation des mécanismes**, bien que les ligands, les RCPG, les protéines G, les protéines régulatrices des protéines G et les effecteurs, se présentent sous forme de « modules d'assemblage ». Ainsi, les études évolutives, phylogénétiques et expérimentales du rôle des acides aminés clefs qui permettent l'activation de certaines classes de RCPG, permettraient d'étayer les mécanismes de sélectivité et/ou de biais de signalisation, conduisant à des activités cellulaires distinctes. À terme, ce sont bien des ligands et outils pharmacologiques développés sur la base de cette compréhension qui sont recherchés, notamment dans le cas ici du récepteur UT de l'urotensine II, appartenant à la famille SO, et dont les effets cellulaires, physiologiques et physiopathologiques sont encore mal compris.

Chapitre 2 : Fonctions du système urotensinergique du cluster SO

Comparaison au système kisspeptine (PEP) et chimiokine SDF-1/CXCR4 (CHEM)

1. Le système urotensinergique, de l'Aplysie à l'Homme

Découvertes conjointement par deux biologistes, Howard Bern de l'Université de Berkeley (Californie) et Karl Lederis de l'Université de Calgary (Canada) à la fin des années 1960, les « urotensines » sont des neuropeptides isolés initialement à partir du système neurosécréteur (urophyse) d'un poisson téléostéen, le *Gillichthys mirabilis*, et ainsi nommés pour leur capacité à stimuler la musculature lisse (Bern & Lederis, 1969). Parmi eux, l'UII fut identifiée chez de nombreuses espèces de poissons (Pearson *et al.*, 1980), puis au début des années 1990, dans le cerveau d'un tétrapode, la grenouille verte *Rana ridibunda* (Conlon *et al.*, 1992). A la suite de cette découverte, le gène codant l'UII fut séquencé chez d'autres espèces de mammifères y compris l'Homme (Ames *et al.*, 1999 ; Coulouarn *et al.*, 1998).

1.1. Structure des peptides urotensinergiques

L'UII est composé de 11 acides aminés chez les primates (Figure 19), *Homo sapiens* inclus, jusqu'à 17 acides aminés chez la Souris, et montre une remarquable conservation de sa structure au cours de l'évolution, notamment au sein d'une portion hexapeptidique CFWKYC C-terminale formée par l'association covalente de deux cystéines *via* un pont disulfure. L'identité de cette séquence a été rigoureusement respectée au cours des 560 millions d'années d'évolution qui séparent la Lamproie de l'Homme (Coulouarn *et al.*, 1998), suggérant une importance capitale du cycle dans l'activité biologique. A ce jour, l'UII a été caractérisée chez une seule espèce d'invertébrés, le Lièvre de mer ou *Aplysia californica* (González *et al.*, 1992), sous une forme composée de vingt acides aminés et dont l'hexapeptide cyclique ne diffère de celui des vertébrés par deux résidus seulement (Romanova *et al.*, 2012).

En 2003, un peptide paralogue de l'UII, l'*urotensin II-related peptide* (URP) a été isolé à partir d'extraits de cerveaux de Rat (Sugo *et al.*, 2003). Le clonage des ADNc codant les prépro-URP de l'Homme, de la Souris et du Rat a révélé que les précurseurs possèdent 54% d'homologie entre l'Homme et le Rat, contre 47% entre l'Homme et la Souris (Sugo et Mori, 2008). Identique chez tous les mammifères, la séquence de l'URP (Figure 19) est très proche de celle de l'UII puisqu'elle correspond à l'Ala¹-UII₅₋₁₁ humaine.

Des études de RMN ont révélé qu'en solution aqueuse, la partie cyclique de l'UII adopte une structure contrainte, sans tour canonique, *i.e.* une structure tertiaire constituée d'interactions stables de type hydrogène entre des acides aminés, au lieu d'appariements classiques de type covalent (Flohr *et al.*, 2002). Les Drs Isabelle Milazzo et Laure Guilhaudis (COBRA, IRCOF, Rouen) ont aussi démontré que l'UII humaine présente dans l'eau un γ -turn inverse (Lescot *et al.*, 2007) (Figure 19) alors qu'en milieu micellaire sodium dodécyl sulfate, sa forme tronquée (hUII₄₋₁₁) possède un β -turn de type II (Carotenuto *et al.*, 2004).

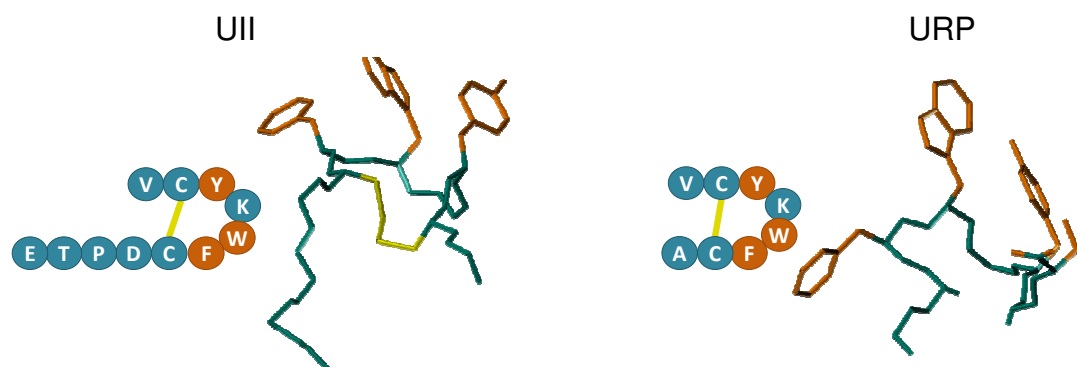


Figure 19. Comparaison de la séquence peptidique et de la structure tridimensionnelle de l'UII et de l'URP. Le pont disulfure (jaune) et les acides aminés (orange) du cycle correspondent à une portion hydrophobe indispensable à l'interaction du ligand avec son récepteur. D'après les travaux des Drs Milazzo et Guilhaudis (COBRA UMR6014 CNRS, Rouen).

Les différences de conformation entre l'UII et l'URP ou les formes courtes d'analogues plaident en faveur d'une modulation allostérique de la forme liée du récepteur, susceptible de conduire à l'activation de voies de couplage distinctes. Cette hypothèse pourrait expliquer les activités biologiques parfois variables de l'UII et de l'URP (Chatenet *et al.*, 2013 ; Doan *et al.*, 2012 ; Jarry *et al.*, 2010 ; Prosser *et al.*, 2008).

1.2. Gènes codant les peptides urotensinergiques

Chez l'Homme, les gènes codant l'UII et l'URP, *UTS2* et *UTS2b* respectivement, sont composés de cinq exons et localisés dans les régions p36 du chromosome 1 et q28 du chromosome 3, respectivement (Sugo *et al.*, 2003). Le gène de l'UII code précisément un préproUII, dont la maturation génère deux isoformes de proUII (*cf.* § 1.3), et celui de l'URP pour un préproURP.

Deux gènes paralogues à la famille de l'UII ont été identifiés chez les téléostéens. Appelés *URP1* et *URP2*, ces gènes auraient disparu dans le lignage des tétrapodes (Parmentier *et al.*, 2011). De façon intéressante, la séquence génétique codant les résidus AFWKYCQN retrouvée sur le chromosome 5 dans le génome humain, possède de fortes similitudes avec le peptide issu de l'*URP1* et représenterait ainsi un éventuel pseudogène *URP1-like*. En accord

avec ces données, d'autres gènes (*PTTG1* et *LMNB1*), voisins chez les téléostéens du locus d'*URP1*, sont également retrouvés aux alentours de ce gène « *URP1-like* » chez l'Homme (Parmentier *et al.*, 2011).

Les séquences de l'UII, l'URP et de la somatostatine (SS) présentent de grandes similitudes, notamment au niveau de l'hexapeptide cyclique, région active de la SS (Conlon *et al.*, 1997 ; Pearson *et al.*, 1980 ; Tostivint *et al.*, 2006). Chez le Poisson zèbre, le Poulet et l'Homme, la comparaison des gènes codant ces peptides montre que les couples de gènes *UII/SS2* et *URP/SS1* présentent des homologies structurales significatives (Tostivint *et al.*, 2006). Selon cette étude, deux gènes ancestraux, le *protoUII* et le *protoSS*, auraient respectivement donné naissance aux gènes *UII/SS2* et *URP/SS*. A l'appui de cette hypothèse, d'autres gènes comme *MASP2*, *CLCN6* et *TP73* de la région 1p36 possèdent aussi un paralogue dans la région 3q28 (Tostivint *et al.*, 2006).

1.3. Séquence et maturation des peptides urotensinergiques

Bien qu'identiques pour au moins 97 acides aminés, les isoformes A et B de préproUII présentent des extrémités N-terminales, porteuses du peptide signal, différentes. Ces deux isoformes subissent un clivage protéolytique au niveau d'un site tribasique KKR par une enzyme de conversion spécifique à l'UII (UCE pour *Urotensin converting enzyme*) qui reste non-identifiée à ce jour (Ames *et al.*, 1999 ; Coulouarn *et al.*, 1998) (Figure 20).

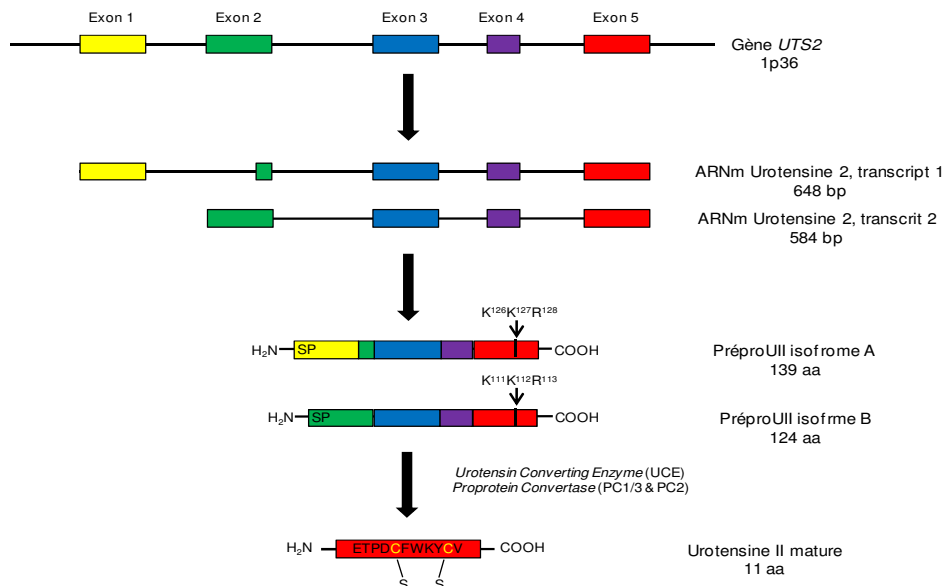


Figure 20. Représentation des étapes de la maturation de l'UII, depuis son gène UTS2 jusque sa forme mature. Le gène *UTS2* code pour deux transcrits (variants d'épissage alternatif) 1 et 2. Le transcript 1 comprend l'exon 1, une partie de l'exon 2, ainsi que les exons 3, 4 et 5. Le transcript 2 comprend les exons 2, 3, 4 et 5. Ces variants d'épissage sont traduits en préproUII isoformes A (139 acides aminés) et B (124 acides aminés), respectivement. Ces deux isoformes subissent des clivages protéolytiques, notamment au niveau de leur site tribasique en C-terminale, par l'UCE et les *proprotein convertases* PC1/3 et PC2 et donnent l'UII mature de 11 acides aminés.

L'étude des processus de maturation du préproUII en proUII (25 acides aminés) montre que l'endoprotéase Furin et la protéase de sérines, trypsine, agissent comme des UCE intra- et extracellulaires, respectivement (Russel *et al.* 2004). Le clivage de la proUII aboutit ensuite à la maturation de l'UII et lui confère ses activités biologiques (Russel *et al.*, 2003) (Figure 20). La séquence de l'URP est localisée à l'extrémité C-terminale du proURP dont la maturation est générée par un clivage protéolytique au niveau d'un site dibasique KR conservé depuis les poissons jusqu'aux mammifères (Sugo *et al.*, 2003).

2. Localisation de l'UII et l'URP

2.1. Localisation périphérique

L'UII et l'URP présentent une large distribution périphérique, en particulier au niveau des systèmes cardiovasculaire, rénal et endocrine (Tableau 5).

Tissus	Homme	Singe	Rat	Souris
Système cardiovasculaire				
Cœur	Coulouarn <i>et al.</i> , 1998; Ames <i>et al.</i> , 1999; Totsune <i>et al.</i> , 2001; 2003; Sugo <i>et al.</i> , 2003; Maguire <i>et al.</i> , 2004	Ames <i>et al.</i> , 1999	Ames <i>et al.</i> , 1999; Sugo <i>et al.</i> , 2003	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002; Dubessy <i>et al.</i> , 2008*
<i>Myocarde</i>	Douglas <i>et al.</i> , 2002		Dai <i>et al.</i> , 2008; Nakayama <i>et al.</i> , 2008; Hirose <i>et al.</i> , 2009	
<i>Oreillettes</i>	Matsushita <i>et al.</i> , 2001; Douglas <i>et al.</i> , 2002; Dschietzig <i>et al.</i> , 2002; Maguire <i>et al.</i> , 2004	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002	Sugo <i>et al.</i> , 2003	
<i>Ventricules</i>	Totsune <i>et al.</i> , 2001; 2003; Dschietzig <i>et al.</i> , 2002; Tzanidis <i>et al.</i> , 2003; Maguire <i>et al.</i> , 2004	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002	Dai <i>et al.</i> , 2008; Nakayama <i>et al.</i> , 2008; Hirose <i>et al.</i> , 2009	
Aorte thoracique	Matsushita <i>et al.</i> , 2001	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002	Maguire <i>et al.</i> , 2008	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002
Veines saphènes	Matsushita <i>et al.</i> , 2001; Dschietzig <i>et al.</i> , 2002; Maguire <i>et al.</i> , 2004			
Plasma	Totsune <i>et al.</i> , 2001; 2003; Dschietzig <i>et al.</i> , 2002; Ng <i>et al.</i> , 2002; Richards <i>et al.</i> , 2002; Russel <i>et al.</i> , 2003; Heringlake <i>et al.</i> , 2004; Lapp <i>et al.</i> , 2004; Joyal <i>et al.</i> , 2006; Ban <i>et al.</i> , 2009		Song <i>et al.</i> , 2006a; Wang <i>et al.</i> , 2011	
Système endocrinien				
Hypophyse	Coulouarn <i>et al.</i> , 1998; Totsune <i>et al.</i> , 2001		Sugo <i>et al.</i> , 2003	Dubessy <i>et al.</i> , 2008
Pancréas	Coulouarn <i>et al.</i> , 1998; Totsune <i>et al.</i> , 2001; Sugo <i>et al.</i> , 2003		Sugo <i>et al.</i> , 2003; Silvestre <i>et al.</i> , 2004	
Surrénales	Coulouarn <i>et al.</i> , 1998; Totsune <i>et al.</i> , 2001; Maguire <i>et al.</i> , 2004		Sugo <i>et al.</i> , 2003; Albertin <i>et al.</i> , 2006	
Testicules	Sugo <i>et al.</i> , 2003		Sugo <i>et al.</i> , 2003	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002; Dubessy <i>et al.</i> , 2008
Ovaires	Coulouarn <i>et al.</i> , 1998;		Sugo <i>et al.</i> , 2003	

	Sugo <i>et al.</i> , 2003			
Placenta	Totsune <i>et al.</i> , 2001; Sugo <i>et al.</i> , 2003; Maguire <i>et al.</i> , 2004			
Systèmes uro-génital et gastro-intestinal				
Reins	Coulouarn <i>et al.</i> , 1998; Nothacker <i>et al.</i> , 1999; Matsushita <i>et al.</i> , 2001; Totsune <i>et al.</i> , 2001; 2003; Sugo <i>et al.</i> , 2003; Langham <i>et al.</i> , 2004	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002	Song <i>et al.</i> , 2006a; Tian <i>et al.</i> , 2008; Mori <i>et al.</i> , 2009*	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002
Tube contourné	Shenouda <i>et al.</i> , 2002; Maguire <i>et al.</i> , 2004; Balat <i>et al.</i> , 2007		Song <i>et al.</i> , 2006; Tian <i>et al.</i> , 2008	
Glomérule	Shenouda <i>et al.</i> , 2002; Maguire <i>et al.</i> , 2004; Balat <i>et al.</i> , 2007			Adebisi <i>et al.</i> , 2014
Tube collecteur	Shenouda <i>et al.</i> , 2002; Maguire <i>et al.</i> , 2004		Song <i>et al.</i> , 2006a	
Prostate	Coulouarn <i>et al.</i> , 1998; Sugo <i>et al.</i> , 2003		Sugo <i>et al.</i> , 2003	
Estomac	Coulouarn <i>et al.</i> , 1998; Sugo <i>et al.</i> , 2003		Sugo <i>et al.</i> , 2003	Dubessy <i>et al.</i> , 2008
Intestin	Coulouarn <i>et al.</i> , 1998; Sugo <i>et al.</i> , 2003		Sugo <i>et al.</i> , 2003	Dubessy <i>et al.</i> , 2008*
Foie	Coulouarn <i>et al.</i> , 1998; Sugo <i>et al.</i> , 2003		Sugo <i>et al.</i> , 2003*; Wang <i>et al.</i> , 2011	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002
Autres tissus				
Thymus	Coulouarn <i>et al.</i> , 1998; Sugo <i>et al.</i> , 2003		Sugo <i>et al.</i> , 2003	Coulouarn <i>et al.</i> , 1999
Rate	Coulouarn <i>et al.</i> , 1998; Sugo <i>et al.</i> , 2003	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002	Sugo <i>et al.</i> , 2003	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002
Poumons	Sugo <i>et al.</i> , 2003; Maguire <i>et al.</i> , 2004		Sugo <i>et al.</i> , 2003*	Qi <i>et al.</i> , 2004
Muscles squelettiques		Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002		Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002; Dubessy <i>et al.</i> , 2008; Wang <i>et al.</i> , 2009
Cellules immunitaires	Sugo <i>et al.</i> , 2003; Bousette <i>et al.</i> , 2004; Kristof <i>et al.</i> , 2010			

Tableau 5. Localisation périphérique de l'UII et de l'URP chez l'Homme, le Singe, le Rat et la Souris. Les références suivies d'une étoile (*) indiquent la présence simultanée des deux peptides. En noir, travaux ayant démontré la présence dans les différents tissus des ARNm de l'UII ou de l'URP ; en rouge, travaux reportant la présence d'une immunoréactivité *UII-like*.

Chez l'Homme, des niveaux élevés d'expression de l'UII sont retrouvés dans le myocarde (Douglas *et al.*, 2002), les oreillettes et les ventricules (Dschietzig *et al.*, 2002 ; Maguire *et al.*, 2004 ; Matsushita *et al.*, 2001). Ce peptide est également retrouvé dans le cœur de Rat (Ames *et al.*, 1999 ; Sugo *et al.*, 2003) et de Souris (Dubessy *et al.*, 2008 ; Elshourbagy *et al.*, 2002). Au niveau vasculaire, les ARNm codant la prépro-UII ont été détectés dans le réseau artériel, essentiellement dans l'aorte thoracique, les artères pulmonaires et les artérioles. En revanche, ils sont quasiment absents du réseau veineux, exception faite des veines saphènes et ombilicales (Dschietzig *et al.*, 2002 ; Maguire *et al.*, 2004 ; Matsushita *et al.*, 2001).

2.2. Localisation centrale

Initialement observée dans le système nerveux central (SNC) de poissons téléostéens (Yulis et Lederis, 1986), la présence de l'UII a par la suite été décrite dans le cerveau d'un tétrapode, la Grenouille verte *Rana ridibunda* (Chartrel *et al.*, 1996) avec une immunoréactivité principalement associée aux motoneurones du noyau hypoglosse du tronc cérébral et de la corne ventrale de la moelle épinière. L'expression de l'UII dans cette sous-population neuronale existe également dans les noyaux des nerfs crâniens abducens, facial, trijumeau et hypoglosse de Rat (Coulouarn *et al.*, 1999 ; Dun *et al.*, 2001) et ceux de la partie caudale de la moelle épinière de Souris (Coulouarn *et al.*, 1999 ; Egginger *et al.*, 2006), de Rat (Coulouarn *et al.*, 1999 ; Dun *et al.*, 2001) et de l'Homme (Ames *et al.*, 1999 ; Coulouarn *et al.*, 1998) (Tableau 6). De façon inattendue, l'UII est apparemment absente du tronc cérébral chez le Singe (Ames *et al.*, 1999 ; Elshourbagy *et al.*, 2002). Enfin, de faibles quantités de ce peptide ont été détectées dans des extraits de liquide céphalorachidien chez l'Homme (Cowley *et al.*, 2005 ; Thompson *et al.*, 2003).

Tissus	Homme	Singe	Rat	Souris
Cerveau	Ames <i>et al.</i> , 1999; Totsune <i>et al.</i> , 2001; 2003; Sugo <i>et al.</i>, 2003*	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002	Sugo <i>et al.</i>, 2003	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002
<i>Hypothalamus</i>	Totsune <i>et al.</i> , 2001		Egginger <i>et al.</i> , 2011	Dubessy <i>et al.</i>, 2008
Tronc cérébral	Coulouarn <i>et al.</i> , 1998; Ames <i>et al.</i> , 1999; Totsune <i>et al.</i> , 2001; Ng <i>et al.</i> , 2002		Coulouarn <i>et al.</i> , 1999; Dun <i>et al.</i> , 2001; Pelletier <i>et al.</i> , 2002	
Moelle épinière	Coulouarn <i>et al.</i> , 1998; Ames <i>et al.</i> , 1999; Sugo <i>et al.</i>, 2003	Coulouarn <i>et al.</i> , 1998; Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002	Coulouarn <i>et al.</i> , 1998; Dun <i>et al.</i> , 2001; Pelletier <i>et al.</i> , 2002; Sugo <i>et al.</i>, 2003	Coulouarn <i>et al.</i> , 1999; Pelletier <i>et al.</i> , 2002; Dubessy <i>et al.</i>, 2008 ; Egginger <i>et al.</i> , 2011
Cervelet	Sugo <i>et al.</i> , 2003	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002	Coulouarn <i>et al.</i> , 1999	Coulouarn <i>et al.</i> , 1999; Dubessy <i>et al.</i>, 2008
LCR	Thompson <i>et al.</i> , 2003; Cowley <i>et al.</i> , 2005			

Tableau 6. Localisation centrale de l'UII et de l'URP chez l'Homme, le Singe, le Rat et la Souris. Les références suivies d'une étoile (*) indiquent la présence simultanée des deux peptides. En noir, travaux ayant démontré la présence dans les différents tissus des ARNm de l'UII ou de l'URP ; en rouge, travaux rapportant la présence d'une immunoréactivité *UII-like*. LCR, liquide céphalo-rachidien.

Malgré sa découverte en 2003, la distribution de l'URP dans le SNC n'est pas encore clairement établie. Les ARNm codant le peptide sont présents dans la moelle épinière chez l'Homme et le Rat, avec des niveaux d'expression largement inférieurs à ceux de l'UII (Sugo *et al.*, 2003). Chez la Souris, ces ARNm sont retrouvés au niveau du tronc cérébral et dans des motoneurones de la corne antérieure de la moelle épinière ainsi que dans les somas neuronaux de l'aire préoptique, au niveau des fibres de l'organe vasculaire de la lame terminale et de l'éminence médiane (Dubessy *et al.*, 2008).

3. Récepteur de l'urotensine II, le récepteur UT

3.1. Récepteur UT

Le récepteur UT a initialement été découvert et cloné en 1995 par deux équipes à partir de *i*) d'extraits de tissus sensoriels de Rat (Tal *et al.*, 1995) et *ii*) d'une banque génomique de Rat (Marchese *et al.*, 1995). À ce stade, ce RCPG fût nommé *sensory epithelium neuropeptide-like* par le premier groupe de chercheurs, et GPR14 (selon la nomenclature en vigueur) par le second. Alors que Ames *et al.* identifient, par la technique de pharmacologie inverse (*cf.* § 1.2), le peptide urotensine II comme le ligand endogène du récepteur humain homologue au GPR14 (Ames *et al.*, 1999), trois autres équipes, la même année, corroborent l'existence du système urotensine II/GPR14 chez diverses espèces (Liu *et al.*, 1999; Mori *et al.*, 1999; Nothacker *et al.*, 1999). C'est sur la base de ces études que le récepteur est renommé *urotensin II receptor*, ou UT, par l'Union Internationale de la Pharmacologie de Base et Clinique (IUPHAR).

Le récepteur UT humain appartient à la classe A ou rhodopsine des RCPG de la famille des récepteurs SO, et présente une homologie de séquence avec certains récepteurs, notamment de la somatostatine SSTR4 (27%, pourcentage qui augmente lorsque l'on ne considère que la séquence des TM : 47%) et opioïdiques (μ OR : 26% ; δ OR : 26% et κ OR : 25%) (Marchese *et al.*, 1995). À l'instar des RCPG de classe A, l'UT possède un domaine N-terminal relativement court présentant deux sites de N-glycosylation (N²⁹ et N³³), un motif NLxxxD^{2.50} au sein de son DTM2, un pont disulfure entre les résidus cystéines de l'extrémité extracellulaire du DTM3 et de la boucle e₂, un motif ER^{3.50}Y à l'extrémité cytoplasmique du DTM3, un motif CFxP^{6.50} au sein du DTM6, le très conservé motif NP^{7.50}xxY au niveau du DTM7 ainsi qu'un site de palmitoylation au niveau de la queue C-terminale (C³³⁴) (Onan *et al.*, 2004). D'autres motifs spécifiques sont observés, à savoir *i*) un motif de localisation nucléaire KRARR au niveau de la boucle i₃ (Chatenet *et al.*, 2012), *ii*) des sites potentiels de phosphorylation par des protéines kinases A et C, la *casein kinase I* et la *glycogen synthase kinase 3* au niveau des boucles i₂ et i₃ (Marchese *et al.*, 1995; Onan *et al.*, 2004; Proulx *et al.*, 2008; Tal *et al.*, 1995), *iii*) un cluster de sérines, site potentiel de phosphorylations impliqué dans l'internalisation du récepteur, au niveau de l'extrémité C-terminale (Oakley *et al.*, 2001; Proulx *et al.*, 2008a) et *iv*) des motifs polyprolines de types I et II sur la queue C-terminale permettant l'interaction avec des protéines possédant des domaines de types *src homology 3* (SH3) (Figure 21). Le récepteur UT possède donc une P2.58 responsable d'un coude typique au sein du DTM2 (Deville *et al.*, 2009) confirmé par les études cristallographiques portant sur

la structure des récepteurs CXCR4 (Wu *et al.*, 2010) ou encore du récepteur μ -opioïdérique (Manglik *et al.*, 2012).

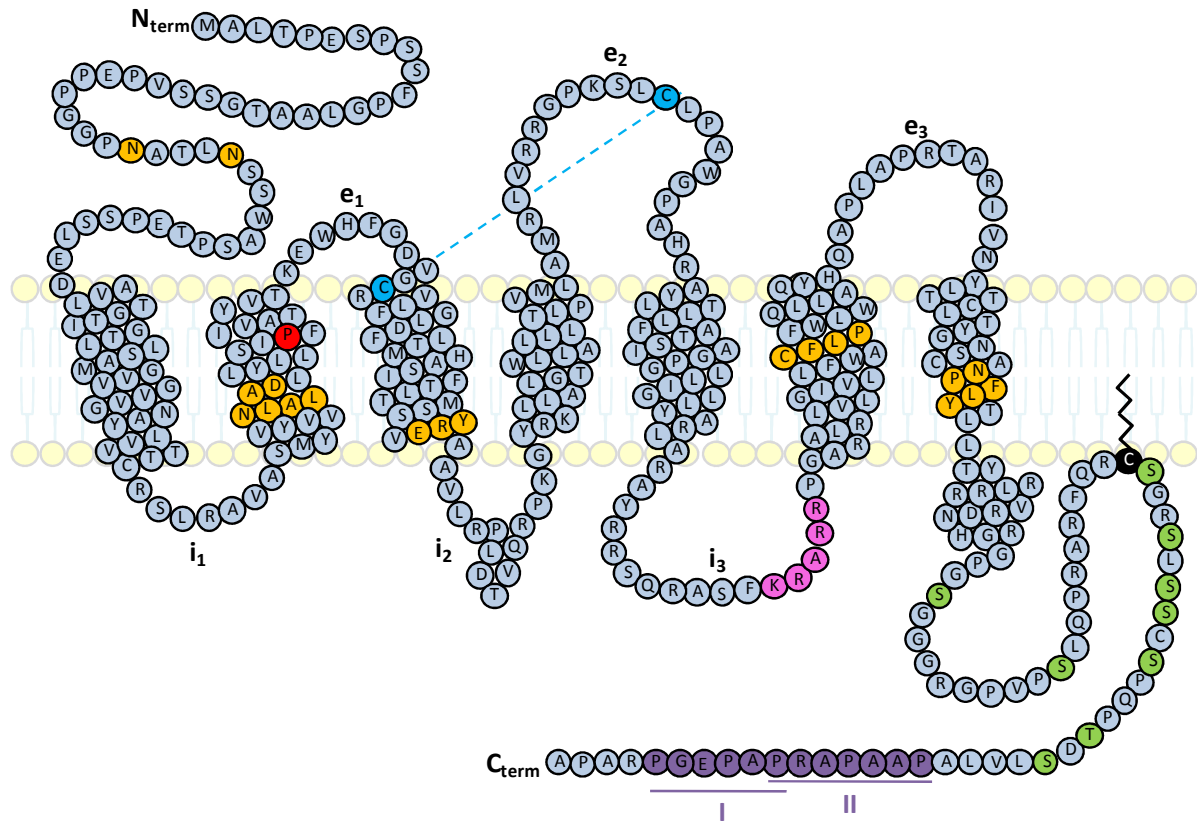


Figure 21. Représentation schématique de la structure de l'UT humain. Les acides aminés représentés en jaunes sont des résidus hautement conservés au sein de la classe A des RCPG dont l'UT fait partie : deux sites de N-glycosylation dans la partie N-terminale (N_{term}), un motif NLxxxD dans le DTM2, le motif ERY à l'extrémité cytoplasmique du DTM3, le motif CFxP du DTM6 et NPxxY au sein du DTM7. Les deux résidus cystéines participant au pont disulfure présent entre l'extrémité extracellulaire du DTM3 et la boucle e_2 apparaissent en bleu. En plus de ces motifs consensus, la queue C-terminale de l'UT présente des sites de phosphorylation (en vert), une cystéine, potentiel site de palmitoylation et d'ancrage à la membrane plasmique (en noir), ainsi que deux motifs polyprolines de type I et II (en violet) mis en évidence à l'aide du logiciel *Scansite* (<http://scansite3.mit.edu/#home>). Une séquence de localisation nucléaire (en rose) a également été identifiée dans la boucle i_3 . La proline en position 2.58 apparaît en rouge au sein du DTM2.

Plus récemment, des séquences incluses dans les DTM du récepteur UT de Rat ont été identifiées comme responsables de la formation d'une poche impliquée dans la liaison du ligand, *i.e.* les résidus I1.35 du DTM1 ; S2.56, F2.59, I2.60 et Y2.64 du DTM2 ; L3.28, F3.29, D3.32, F3.33 et M3.36 du DTM3 ; W4.50, M4.60 et I4.64 du DTM4 ; F6.44, W6.54 et L6.58 du DTM6 et V7.34, Y7.36, T7.38 et T7.39 du DTM7 (Holleran *et al.*, 2009; Sainsily *et al.*, 2013 ; 2014). Mis à part les résidus M4.60 et I4.64, tous ces résidus sont conservés chez l'Homme. Le résidu M4.60 de l'UT de Rat est remplacé par le résidu V4.60, impliqué dans la liaison de l'antagoniste SB706375 au récepteur UT humain (Kim *et al.*, 2010).

Le récepteur UT présente un couplage à de nombreuses protéines G. Notamment, la stimulation de l'UT par l'UII entraîne une mobilisation calcique importante, sur différentes

lignées cellulaires de mammifères (Ames *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 1999; Nothacker *et al.*, 1999), ainsi que l'activation de la voie ERK1/2 (Ziltener *et al.*, 2002). L'administration d'UII à proximité de tranches aortiques de Lapin provoque une augmentation d'inositol phosphate (IP) dans le milieu, *via* la PLC (Opgaard *et al.*, 2000). Enfin, la mutation du résidu R3.50 du motif D/ERY impliqué dans le couplage des RCPG aux protéines G, abolit l'effet de l'UII sur l'accumulation d'IP par les cellules COS-7 exprimant l'UT (Proulx *et al.*, 2008b). Ces observations indiquent un couplage du récepteur UT à la protéine G_q, et nous avons pour la première fois décrit un couplage direct du récepteur UT à la protéine G_q par la technique de BRET (Brulé *et al.*, 2014).

Une étude d'électrophysiologie sur des cellules de myocarde de Rat a montré que l'UII potentialise les courants calciques de manière dose-dépendante et sensible à la PTX (Zhang *et al.*, 2015). L'activation de l'UT conduit à la stimulation de RhoA au cours de la contraction des muscles lisses aortiques, de la réorganisation du cytosquelette et de la prolifération de cellules musculaires lisses aortiques de Rat, ce qui impliquerait l'activation de protéines G des famille G_{i/o}, G_{q/11} et/ou G_{12/13} (Sauzeau *et al.*, 2001). Récemment, notre équipe a démontré qu'un gradient d'UII était capable de promouvoir la migration de cellules HEK293, effet inhibé par l'application de PTX ou l'utilisation de siRNA (ARN interférent) dirigé contre G₁₃ (Lecointre *et al.*, 2015). L'ensemble de ces données suggèrent un couplage du récepteur UT aux protéines G_{q/11} mais aussi G_{i/o} et G₁₃. Ces données ont été confirmées par des études de BRET menées par notre équipe en collaboration avec les équipes du Dr Prézeau (IGF de Montpellier, France) et du Dr Leduc (Université de Sherbrook, Québec), qui ont mis en évidence l'activation des protéines G_{i1}, G_{oA}, G_q et G₁₃ mais pas de G_s par le récepteur UT suite à sa stimulation (Brulé *et al.*, 2014). Ainsi, le récepteur UT couple une large gamme de protéines G, en accord avec les effets biologiques pléiotropes du système urotensinergique.

3.2. Comparaison au système du récepteur Kiss1R du cluster PEP

Les kisspeptines (KP) sont codées par le gène *Kiss1*, originellement cloné par hybridation soustractive entre des lignées de mélanomes non-métastatiques et métastatique (Lee et Welch, 1997; Lee *et al.*, 1996), et caractérisé pour sa capacité à abolir le caractère métastatique de différentes lignées cellulaires de mélanomes humains. Le gène *Kiss1* code pour un précurseur de 145 acides aminés (prépro-kisspeptine) dont le clivage protéolytique génère 4 peptides de 10, 13, 14 et 54 acides aminés (KP-10, KP-13, KP-14 et KP-54, respectivement) (Kotani *et al.*, 2001) (Figure 22). Dans la mesure où il n'existe pas de site de

clivage consensus en amont de la séquence correspondant le KP-10 chez les mammifères, l'existence d'une maturation endogène de ce peptide reste controversée (Pinilla *et al.*, 2012).

Les kisspeptines se caractérisent par la présence d'un motif RF-NH₂ (Arginine-Phénylalanine greffée d'une fonction amide) en position C-terminale. Le motif porté par la forme la plus courte (KP-10) très conservée parmi les vertébrés, est responsable de l'activité biologique (Clements *et al.*, 2001 ; Kotani *et al.*, 2001).

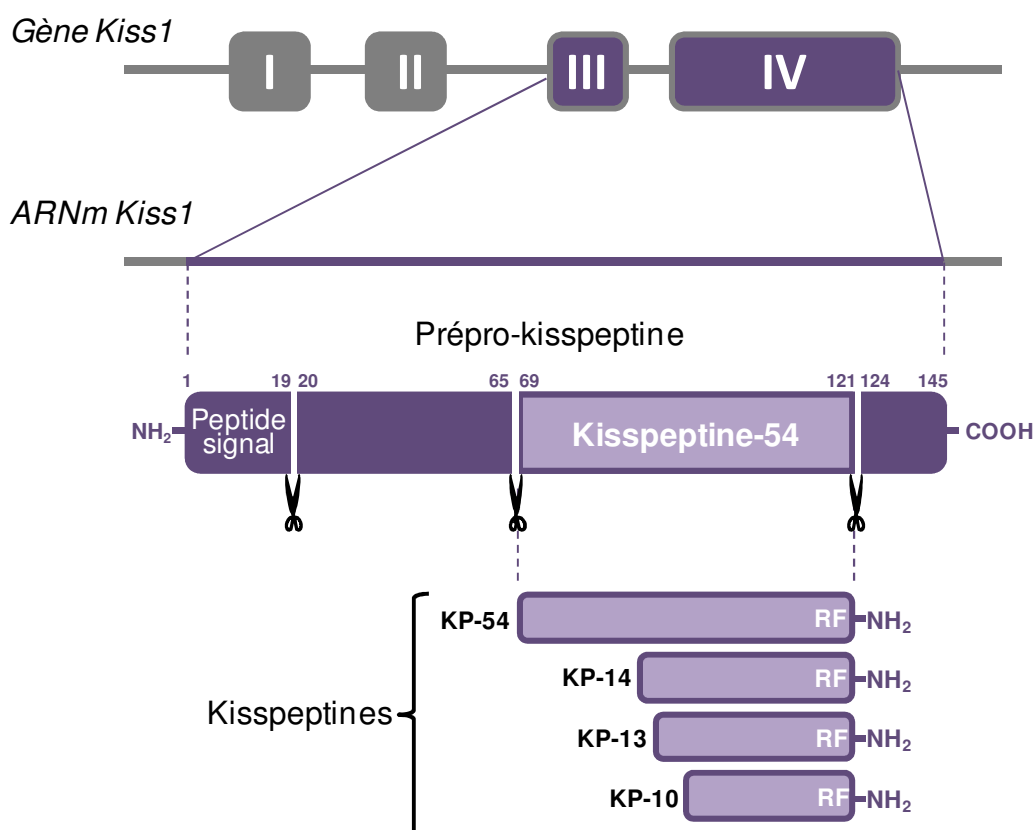


Figure 22. Transcription du gène *Kiss1* et maturation des kisspeptines. Les kisspeptines sont les produits du gène *Kiss1* constitué de quatre exons (I à IV) chez l'Homme dont les deux premiers sont non-codants. Les exons III et IV génèrent le prépro-kisspeptine dont le clivage protéolytique génère les kisspeptines KP-54, KP-14, KP-13 et KP-10, qui comportent un motif RF-NH₂ en position C-terminale. Le KP-10, dont la séquence peptidique est très conservée chez les vertébrés, correspond à la forme biologiquement active la plus courte.

En effet, la synthèse d'analogues du KP-54 a démontré que les cinq acides aminés comprenant le motif RF-NH₂ jouent un rôle clé dans la liaison et l'activation de leur récepteur sélectif, le GPR54 ou Kiss1R (Niida *et al.*, 2006). Des études de RMN ont par ailleurs montré que la forme humaine de ce peptide présente des *turns* sans pour autant adopter une conformation en hélice α (Figure 23), que ce soit en solution aqueuse ou micellaire (Lee *et al.*, 2009), contrairement au KP-10 de Rat (Gutiérrez-Pascual *et al.*, 2009). Par cette même approche, l'étude de la structure du KP-54 révèle l'absence de conformation en hélice (Shin *et al.*, 2009).

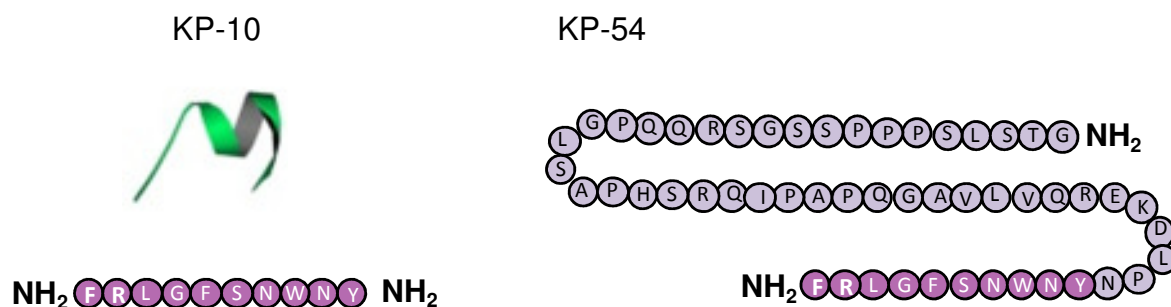


Figure 23. Séquences et structures des kisspeptines 10 et 54. Le KP-10 adopte une conformation en hélice α et le KP-54 présente plusieurs hélices α . La séquence de 10 acides aminés conservés entre les différentes kisspeptines apparaît en rose tandis que la séquence propre au KP-54 est représentée en mauve. Les structures de KP-10 et KP-54 sont issues des travaux du Dr Milazzo (COBRA, UMR CNRS 6014, Université de Rouen Normandie).

Le récepteur Kiss1R a pour la première fois été mis en évidence en 1999 à partir d'extraits de cerveau de Rat. Identifié comme un récepteur orphelin (GPR54), ses domaines transmembranaires partagent plus de 40% de similitude de séquence avec ceux des récepteurs de la galanine (Lee *et al.*, 1999). Deux ans plus tard, deux équipes différentes isolent à partir d'extrait de placenta humain ou d'une banque d'ADNc de cerveau humain, un RCPG sélectif au KP-54 et qui présente 84% d'homologie de séquence avec le GPR54 de Rat. Ces équipes nomment alors ce récepteur hoT7T175 et AXOR12, respectivement (Muir *et al.*, 2001 ; Ohtaki *et al.*, 2001). C'est à partir de ces études que les kisspeptines sont reconnues comme ligands endogènes du GPR54, alors dénommé Kiss1R. Ce dernier est largement exprimé dans le cervelet, le cortex cérébral (Muir *et al.*, 2001) ainsi que dans l'ensemble du cerveau, l'hypophyse, le tractus gastrointestinal, le foie et le système vasculaire, de la même manière que les kisspeptines (Ohtaki *et al.*, 2001).

Appartenant à la classe A ou *Rhodospine* des RCPG et au cluster PEP, le récepteur présente 3 sites de N-glycosylation sur son extrémité N-terminale, les motifs consensus de cette classe, *i.e.* un motif NLxxxD au niveau du DTM2, le motif d'interaction aux protéines G DRxY à l'extrémité cytoplasmique du DTM3, un pont disulfure entre deux cystéines localisées à l'extrémité extracellulaire du DTM3 et sur la boucle e_2 , un motif CWxP au sein du DTM6 ainsi que la séquence consensus NPxxY sur l'extrémité cytoplasmique du DTM7. De manière similaire au récepteur UT, Kiss1R possède une huitième hélice α au commencement de son extrémité C-terminale, ancrée à la membrane plasmique *via* une cystéine palmitoylée, ainsi que deux motifs polyprolines de type I et II (Figure 24). Membre des PEP, le Kiss1R possède une proline dans le DTM2, en position 2.59, alors que celle-ci est retrouvée en position 2.58 chez l'UT. Les études de modélisation et de cristallographie menées sur le récepteur β_2 -AD (Rasmussen *et al.*, 2007), indiquent que cette proline en

position 2.59 confère au DTM2 un renflement π plutôt qu'un coude typique induit par la présence de la proline en position 2.58 (Deville *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2010).

Peu de données sont actuellement disponibles sur les domaines ou acides aminés du Kiss1R impliqués dans l'interaction aux kisspeptines ou dans les mécanismes d'activation. Cependant, une mutation ponctuelle du résidu leucine en position 148 au niveau de la boucle i_2 du Kiss1R est responsable d'un hypogonadisme hypogonadotrophique idiopathique, suggérant une perte de fonction du récepteur et donc une implication de ce résidu dans la liaison au ligand et/ou dans la signalisation du récepteur (Wacker *et al.*, 2008).

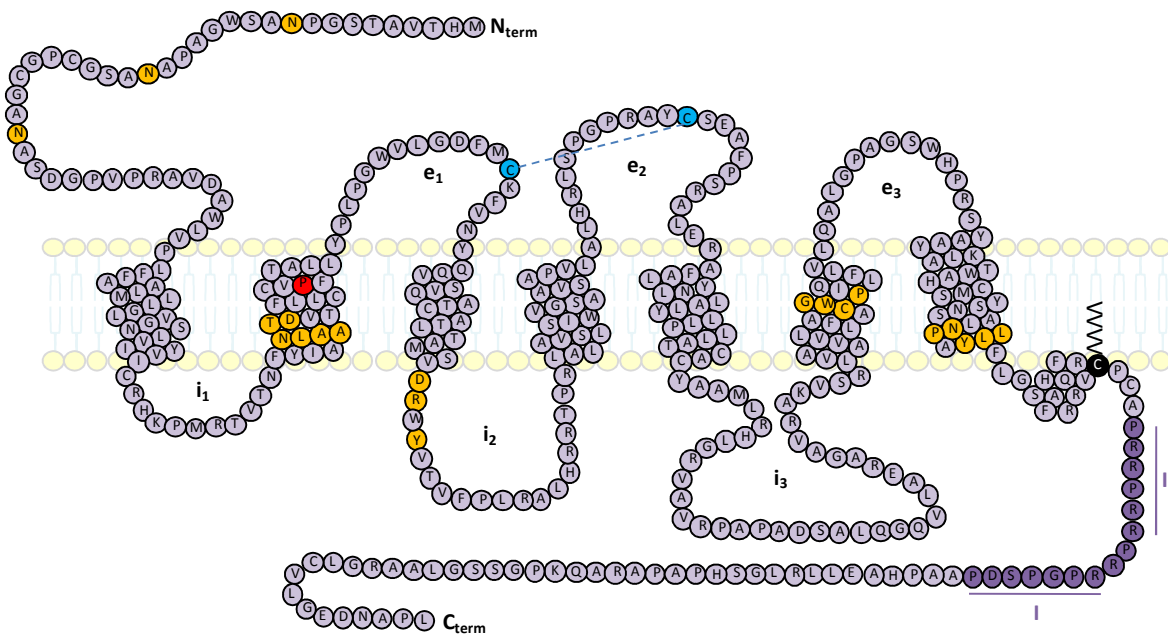


Figure 24. Représentation schématique du Kiss1R humain. Les acides aminés représentés en orange correspondent aux résidus hautement conservés au sein de la classe A des RCPG, dont le Kiss1R fait partie. Il s'agit de trois sites de N-glycosylation dans la partie N-terminale (N_{term}), un motif NLxxxD dans le DTM2, le motif DRxY à l'extrémité cytoplasmique du DTM3, le motif CWxP du DTM6 et NPxxY au sein du DTM7. Les deux résidus cystéines participant au pont disulfure situé entre l'extrémité extracellulaire du DTM3 et la boucle e_2 apparaissent en bleu. En plus de ces motifs consensus, la queue C-terminale du Kiss1R présente une cystéine, potentiel site de palmitoylation et d'ancrage à la membrane plasmique (en noir), ainsi que deux motifs polyprolines de type I et II (en violet) mis en évidence à l'aide du logiciel *Scansite* (<http://scansite3.mit.edu#home>). La proline en position 2.59 apparaît en rouge au sein du DTM2.

Appliquées sur des cellules CHO exprimant le Kiss1R, les kisspeptines stimulent l'hydrolyse de PIP_2 , entraînent une élévation de la $[Ca^{2+}]_c$ et activent les MAPK ERK1/2 et p38, indiquant un couplage à la protéine G_q (Kotani *et al.*, 2001). Ces voies de signalisation ont également été observées dans d'autres lignées cellulaires exprimant le Kiss1R, telles que les B16-BL6 ou les HEK293 (Muir *et al.*, 2001; Ohtaki *et al.*, 2001). Plus récemment, il a été démontré que Kiss1R régule l'activité de ERK1/2 et l'expression de gènes hypothalamiques

par un couplage à G_q ainsi que par le recrutement des β -arrestines (Szereszewski *et al.*, 2010). Aucune donnée de la littérature ne montre un couplage aux autres protéines G. De plus, la mobilisation calcique induite par les kisspeptines sur les cellules CHO et HEK293 n'est pas modifiée par un traitement à la PTX, suggérant que ces effets ne sont pas relayés par des protéines G de la famille $G_{i/o}$ (Kotani *et al.*, 2001; Muir *et al.*, 2001). De plus, dans le modèle de cellules CHO, la stimulation du Kiss1R par les kisspeptines n'entraîne pas d'accumulation d'AMPc, ce qui suggère l'absence de couplage à G_s (Kotani *et al.*, 2001). Ainsi, il est admis que le récepteur Kiss1R est couplé aux protéines G de la famille $G_{q/11}$.

3.3. Comparaison au système du récepteur CXCR4 du cluster CHEM

Les chimiokines correspondent à une classe de petites cytokines (5-10 kDa) inflammatoires ou homéostatiques partageant la propriété de stimuler la migration de différents types cellulaires incluant les lymphocytes, les monocytes, les neutrophiles, les cellules endothéliales, les cellules souches mésenchymateuses ou encore les cellules épithéliales malignes (Smith *et al.*, 2012 ; Viola et Luster, 2008). Les quelques 50 chimiokines découvertes à ce jour sont classées en quatre groupes distincts (CXC, CC, C et CX3C) sur la base du nombre de résidus séparant les premières cystéines présentes dans leur extrémité C-terminale. Ainsi, les chimiokines CXC ne possèdent qu'un acide aminé entre les premières cystéines de leur extrémité N-terminale ; les chimiokines CC contiennent deux résidus cystéine adjacents ; les chimiokines C abritent un seul résidu cystéine en N-terminale et enfin, les chimiokines CX3C possèdent trois résidus non-conservés entre une paire de cystéines en position N-terminale. La classification des récepteurs des chimiokines est basée sur la nature de leur ligand, *i.e.* les récepteurs CXCR, CX3CR et CCR lient des chimiokines de type CXC, CX3C et CC, respectivement (Balkwill, 2004).

Le CXCL12 (ou SDF-1 pour *Stromal derived factor-1*) est une chimiokine homéostatique de 8 kDa dont l'ADNc a pour la première fois été cloné à partir d'une lignée de cellules stromales de moelle osseuse (Tashiro *et al.*, 1993). L'équipe de Tashiro *et al.* a identifié en réalité deux ADNc, codant potentiellement des cytokines, qu'ils nomment SDF-1 α et SDF-1 β . L'ADNc codant un facteur capable de stimuler la prolifération de pré-lymphocytes B est parallèlement cloné (Nagasawa *et al.*, 1994) avant qu'une autre équipe identifie à nouveau la cytokine et fasse le rapprochement avec celle identifiée plus tôt par Tashiro *et al.*. Le groupe de Nagasawa *et al.*, qui décrit cette cytokine comme le plus puissant chimioattractant des lymphocytes, propose de la nommer « SDF-1 » (Bleul *et al.*, 1996).

Contrairement aux gènes des autres chimiokines, exclusivement situés sur le chromosome 4, le gène codant SDF-1 est porté par le chromosome 10. Ce gène possède 4 exons et génère 6 transcrits issus de variations d'épissage, codants pour les isoformes SDF-1 α , SDF-1 β , SDF-1 γ , SDF-1 δ , SDF-1 ϵ et SDF-1 ϕ . Ces isoformes contiennent les mêmes 3 premiers exons mais diffèrent par la longueur de leur 4^{ème} exon, si il est présent (Cojoc *et al.*, 2013). Les isoformes SDF-1 α et SDF-1 β sont les plus étudiées. Toutes ces isoformes du SDF-1 lient deux récepteurs différents de la classe A ou *Rhodopsine* des RCPG du cluster CHEM: le récepteur CXCR4 et le récepteur CXCR7. Alors que le récepteur CXCR7 peut aussi lier la chimiokine CXCL11, le récepteur CXCR4 lie sélectivement les isoformes du SDF-1 (Boudot *et al.*, 2011). Nous avons ici choisi de cibler notre propos sur le couple SDF-1 α et CXCR4.

La chimiokine SDF-1 α adopte une forme mono- et dimérique de façon équilibrée, tendant toutefois vers la forme dimérique dans les études de cristallisation (Baryshnikova et Sykes, 2006; Veldkamp *et al.*, 2005) et en présence de protéines partenaires (Crump *et al.*, 1997), incluant le domaine extracellulaire N-terminal du récepteur CXCR4 (Heveker *et al.*, 1998). L'équipe de Veldkamp *et al.* a synthétisé un dimère stabilisé par un pont disulfure, ainsi qu'un monomère stabilisé par la substitution de l'histidine 25 en arginine. Ils ont montré que la forme monomérique du SDF-1 α présente une activité biologique sur CXCR4 plus prononcée que la forme dimérique, et que cette dernière ne relaye pas les effets chimiotactiques du CXCR4 (Veldkamp *et al.*, 2008).

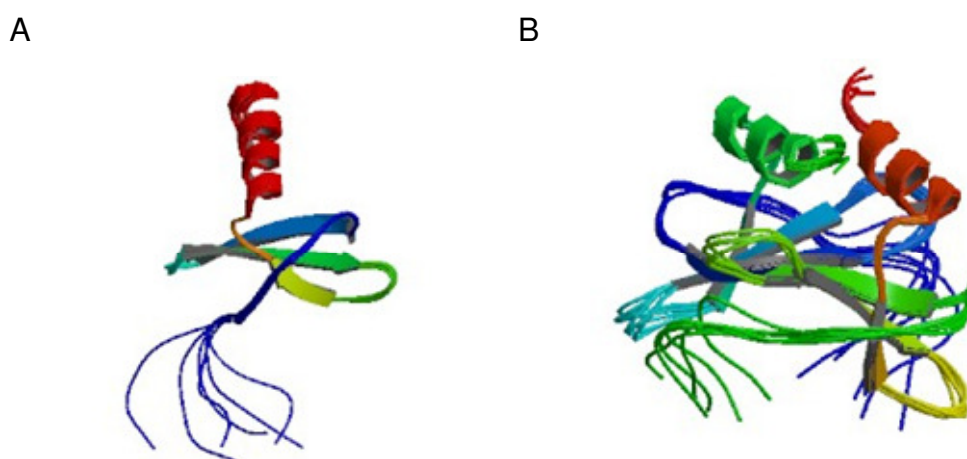


Figure 25. Structures cristallographiques du SDF-1 α sous forme monomérique et dimérique. A. Structure cristallographique du SDF-1 α sous forme monomérique. On peut noter la présence d'une hélice α (rouge) et de trois feuillets β (jaune, vert et bleu). Code PDB: 2KED. B. Structure cristallographique du SDF-1 sous forme dimérique. Code PDB : 2K01. Ces deux structures sont issues de l'étude de Veldkamp *et al.*, 2008.

La structure cristallographique du SDF-1 montre que son monomère s'organise en trois feuillets β (β 1 : résidus 24-28, β 2 : résidus 38-42 et β 3 : résidus 46-50) et une hélice α (résidus 56-66). Sous forme dimérique, l'hélice α du deuxième monomère est plus courte d'un acide

aminé (résidus 57-66), alors que les feuillettes β ne diffèrent pas (Ryu *et al.*, 2007). La région N-terminale du SDF-1 α n'adopte pas de conformation particulière et serait impliquée dans la liaison au récepteur CXCR4 et dans ses mécanismes d'activation (Crump *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 2003) (Figure 25).

L'ADNc codant le récepteur CXCR4 a été isolé à partir d'une banque d'ADNc de monocyte humain (Loetscher *et al.*, 1994) sans pour autant être associé à un ligand. L'équipe responsable de cette découverte nomme le récepteur LESTR et l'associe à l'activation des cellules inflammatoires. Deux ans plus tard, dans le cadre de recherches de corécepteurs impliqués dans l'infection par le Virus de l'Immunodéficience Humaine, une deuxième équipe identifie ce récepteur et le nomme Fusin (Feng *et al.*, 1996). La même année, le SDF-1 est identifié comme ligand du récepteur LESTR/fusin et est enfin dénommé CXCR4 (Oberlin *et al.*, 1996). Le couple SDF-1 α /CXCR4 est ensuite décrit comme le système chimiokine le plus puissant impliqué dans la migration chimiotactique des pré-lymphocytes B (Bleul *et al.*, 1996). Par la suite, il apparaît également comme régulateur de l'hématopoïèse chez l'Homme et du développement cérébelleux chez la Souris (Aiuti *et al.*, 1997; Ma *et al.*, 1998; Zou *et al.*, 1998).

L'étude cristallographique de la structure du récepteur CXCR4 par Wu *et al.* montre qu'en plus de la structure retrouvée chez tous les RCPG de classe A décrite précédemment pour les récepteurs UT et Kiss1R, le CXCR4 possède un deuxième pont disulfure engageant une cystéine en position 28 (domaine N-terminal) et une cystéine en position 7.25 (extrémité extracellulaire du DTM7), résidus conservés parmi tous les récepteurs de chimiokines à l'exception des récepteurs CXCR5 et CXCR6. Les deux ponts disulfure connectant les régions extracellulaires du récepteur CXCR4 seraient impliqués dans la liaison du ligand (Zhou et Tai, 2000). Contrairement aux autres RCPG de classe A, la structure cristallographique de CXCR4 montre l'absence de la 8^{ème} hélice α et du site de palmitoylation et d'ancrage à la membrane (Figure 26). Dans cette étude, différentes mutations de CXCR4 ont été effectuées afin de mieux cristalliser ce récepteur. Parmi celles-ci, la mutation du résidu thréonine 6.36 (DTM6) en proline conduit à la perturbation de la conformation en hélice des résidus 6.30 à 6.36 et à l'absence de signalisation du récepteur alors qu'il semble conserver son affinité pour le ligand (Wu *et al.*, 2010).

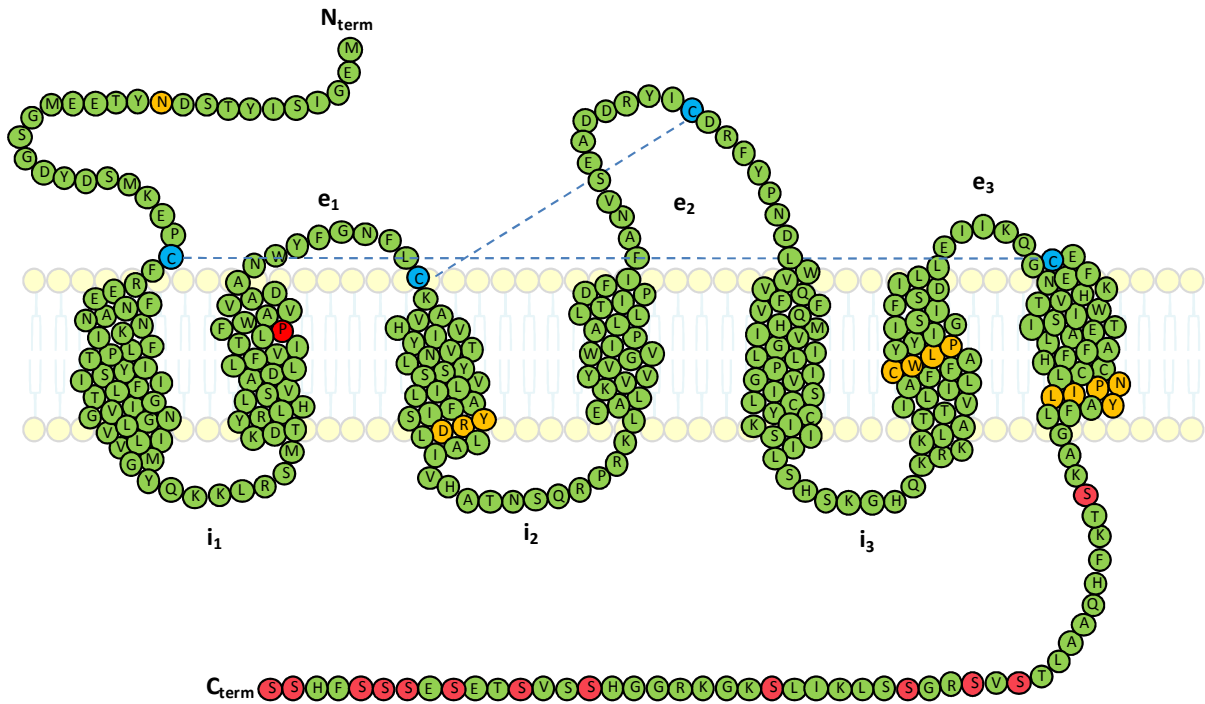


Figure 26. Représentation schématique du récepteur CXCR4. Les acides aminés représentés en jaunes sont des résidus hautement conservés au sein de la classe A des RCPG dont le CXCR4 fait partie : un site de N-glycosylation dans la partie N-terminale (N_{term}), le motif ERY à l'extrémité cytoplasmique du DTM3, le motif CFxP du DTM6 et NPxxY au sein du DTM7. Les 4 résidus cystéines participant aux ponts disulfures présents entre l'extrémité extracellulaire du DTM1 et du DTM7 et entre l'extrémité extracellulaire du DTM3 et la boucle e_2 apparaissent en bleu. En plus de ces motifs consensus, la queue C-terminale du CXCR4 présente des sites de phosphorylation (en vert), mis en évidence à l'aide du logiciel *Scansite* (<http://scansite3.mit.edu#home>). La proline en position 2.58 apparaît en rouge au sein du DTM2.

Comparée aux structures cristallographiques d'autres RCPG, la cavité formée par la partie extracellulaire des DTM du CXCR4 semble plus large, plus ouverte et plus extracellulaire. Plus précisément, l'extrémité extracellulaire du DTM1 est inclinée par rapport à l'axe central du RCPG de 9 et 3 Å de plus que ce qui est observé pour les récepteur β_2 -AD et A_{2A} AR, respectivement. De plus, le DTM2 adopte un tour d'hélice plus serré au niveau de la proline 2.58, conduisant à la rotation de la partie extracellulaire du DTM de 120° en comparaison aux autres RCPG cristallisés, qui possèdent une proline en position 2.59 (Rasmussen *et al.*, 2007) ou deux résidus glycine en position 2.59 et 2.60 (Palczewski *et al.*, 2000). Cette dernière donnée confirme l'hypothèse proposée par l'équipe du Dr Chabbert selon laquelle une délétion conduisant au repositionnement de la proline en 2.58 induirait un changement de conformation du DTM2, caractéristique des clusters de RCPG nommés SO, CHEM (auquel appartient CXCR4) et PUR (*cf.* Chapitre 1 § 4.3 et 4.4) (Devillé *et al.*, 2009; Pelé *et al.*, 2011).

Une étude de mutagenèse dirigée consistant au remplacement systématique de chacun des acides aminés du CXCR4 montre que les résidus W2.60 et D2.63 du DTM2, D187, F189 et N192 de l' e_2 , D6.58 du DTM6 et H7.32 du DTM7 sont impliqués dans la liaison du ligand

CXCL12. Parmi ces derniers, le résidu W2.60 est également impliqué dans la liaison des antagonistes utilisés dans les expériences de cristallographie (Wu *et al.*, 2010), est très conservé parmi les récepteurs de chimiokines, et est également impliqué dans la liaison du ligand au récepteur CCR5 (Tan *et al.*, 2013). Cette étude montre également que i) les résidus S3.47 du DTM3, Y5.58 du DTM5, Y7.53, F7.43 et A7.42 du DTM7 et W6.48 du motif CW_xP du DTM6 jouent un rôle important dans les mécanismes d'activation du récepteur, et ii) les résidus R3.50 et L5.56 sont critiques dans la liaison aux protéines G (Wescott *et al.*, 2016). Ainsi, le récepteur CXCR4 possède des similitudes avec le récepteur UT, notamment la présence de clusters de sérines au niveau de la queue C-terminale ainsi qu'une proline en position 2.58 du DTM2 qui confère un coude typique à cette hélice.

La première étude portant sur les voies de couplage du récepteur CXCR4 a montré, *via* l'utilisation d'anticorps dirigés contre les différentes sous-unités $G\alpha$, que celui-ci couple les protéines G_o , G_q et G_s mais pas les protéines G_i , G_z , G_{12} ou G_{13} (Maghazachi, 1997). Cependant, il a plus tard été démontré que CXCR4 pouvait stimuler la liaison de $GTP\gamma$ -S aux sous-unités $G\alpha_{i2}$ et $G\alpha_{oA}$ (Ling *et al.*, 1999) et promouvoir la voie de signalisation JAK/STAT (*Janus kinase/Signal transducer and activator of transcription*) *via* un couplage à G_i (Vila-Coro *et al.*, 1999). Très récemment, il a été montré sur des neurones de ganglions de la racine dorsale de Rat, que le SDF-1 α pouvait augmenter les courants calciques *via* les canaux calciques voltage dépendant Nav1.9 et Nav1.8, et que cet effet était totalement inhibé par l'application de PTX, suggérant une action du récepteur par l'activation des protéines G de la famille $G_{i/o}$ (Qiu *et al.*, 2016). Une étude récente de BRET a montré que l'application de SDF-1 α sur des cellules HEK293 exprimant le récepteur CXCR4 pouvait provoquer le recrutement de $G\alpha_{i1}$ au récepteur (Quoyer *et al.*, 2013), ainsi que la dissociation de la sous-unité $G\alpha_{i1}$ et du complexe $G\beta_1\gamma_1$ (Mona *et al.*, 2016). La diminution de la production d'AMPC, induit par la forskoline ou par la prostaglandine-1, suite à la stimulation par le SDF-1 α suggère un couplage du récepteur CXCR4 à la protéines G_i (Tripathi *et al.*, 2014; Walsh *et al.*, 2015). Il semble donc que le récepteur CXCR4 couple les protéines $G_{i/o}$ et notamment à la sous-unité $G\alpha_{i1}$.

Il a également été démontré que le SDF-1 α pouvait stimuler la migration de cellules Jurkat et de cellules métastatiques tumorales de sein par l'intermédiaire de l'activation de la petite protéine G Rho et d'un couplage à la protéine G_{13} (Tan *et al.*, 2006; Yagi *et al.*, 2011). Le même couple G_{13} /Rho semble responsable de la polymérisation de l'actine induite par la stimulation de CXCR4 exprimé par des cellules T humaines (Kumar *et al.*, 2011). Le couplage de CXCR4 à cette protéine G a également été observé par la technique de BRET,

qui a permis de mettre en évidence que l'application de SDF-1 α sur des cellules HEK293 induit un rapprochement du CXCR4 à la sous-unité G α_{13} (Quoyer *et al.*, 2013). Ainsi, si l'activation des protéines G $_q$ et G $_s$ n'a été observée que dans une seule étude, l'activation des protéines de la famille G $_{i/o}$ et G $_{13}$ semble clairement établie. Il apparaît donc qu'à la manière de l'UT, CXCR4 couple et active diverses protéines G responsables d'un large spectre d'effets cellulaires.

4. Localisations, signalisations et fonctions du récepteur UT

La présence de quantités importantes d'UT dans le système cardiovasculaire a conduit plusieurs groupes à rechercher l'expression des ARNm codant l'UT dans les différents tissus qui le composent (Tableau 7). Chez l'Homme ou les primates non humains, des niveaux élevés d'ARNm codant l'UT ont été relevés dans le myocarde (Douglas *et al.*, 2002), les oreillettes (Ames *et al.*, 1999 ; Elshourbagy *et al.*, 2002 ; Matsushita *et al.*, 2001 ; Totsune *et al.*, 2001) et les ventricules (Ames *et al.*, 1999 ; Maguire *et al.*, 2000 ; Totsune *et al.*, 2001).

Tissus	Homme	Singe	Rat	Souris
Système cardiovasculaire				
Cœur	Ames <i>et al.</i> , 1999; Totsune <i>et al.</i> , 2003; Douglas <i>et al.</i> , 2004b		Nothacker <i>et al.</i> , 1999; Gartlon <i>et al.</i> , 2001; Tzanidis <i>et al.</i> , 2003; Gong <i>et al.</i> , 2004; Maguire <i>et al.</i> , 2008; Doan <i>et al.</i> , 2012	Liu <i>et al.</i> , 1999; Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002
Myocarde	Douglas <i>et al.</i> , 2002		Dai <i>et al.</i> , 2008	
Oreillettes	Ames <i>et al.</i> , 1999; Matsushita <i>et al.</i> , 2001; Totsune <i>et al.</i> , 2003; Leonard <i>et al.</i> , 2009	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002	Zhang <i>et al.</i> , 2007; Hirose <i>et al.</i> , 2009	
Ventricules	Ames <i>et al.</i> , 1999; Maguire <i>et al.</i> , 2000; Totsune <i>et al.</i> , 2001	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002	Johns <i>et al.</i> , 2004; Zhang <i>et al.</i> , 2007; Maguire <i>et al.</i> , 2008; Hirose <i>et al.</i> , 2009	
Aorte thoracique	Ames <i>et al.</i> , 1999; Matsushita <i>et al.</i> , 2001; Leonard <i>et al.</i> , 2009	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002	Maguire <i>et al.</i> , 2008; Hirose <i>et al.</i> , 2009	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002
Artère basilaire			Porras-González <i>et al.</i> , 2014	
Système endocrinien				
Hypophyse	Totsune <i>et al.</i> , 2001		Jégou <i>et al.</i> , 2006	
Pancréas	Ames <i>et al.</i> , 1999; Douglas <i>et al.</i> , 2004b	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002; Nguyen <i>et al.</i> , 2012	Nguyen <i>et al.</i> , 2012	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002
Surrénales	Totsune <i>et al.</i> , 2001; Takahashi <i>et al.</i> , 2003; Zeng <i>et al.</i> , 2006; Morimoto <i>et al.</i> , 2008; Giuliani <i>et al.</i> , 2009	Nguyen <i>et al.</i> , 2012	Albertin <i>et al.</i> , 2006; Nguyen <i>et al.</i> , 2012	
Testicules	Douglas <i>et al.</i> , 2004b		Gartlon <i>et al.</i> , 2001	
Placenta	Totsune <i>et al.</i> , 2001			
Systèmes uro-génital et gastro-intestinal				
Reins	Maguire <i>et al.</i> , 2000; Matsushita <i>et al.</i> , 2001; Totsune <i>et al.</i> , 2001; 2003; Langham <i>et al.</i> , 2004	Nguyen <i>et al.</i> , 2012	Gartlon <i>et al.</i> , 2001; Song <i>et al.</i> , 2006a; Maguire <i>et al.</i> , 2008; Tian <i>et al.</i> , 2008; Hirose <i>et al.</i> , 2009;	Adebiyi, 2014

			Mori <i>et al.</i> , 2009; Nguyen <i>et al.</i> , 2012	
Vessie				Liu <i>et al.</i> , 1999; Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002
Estomac		Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002		
Foie			Gartlon <i>et al.</i> , 2001; Nguyen <i>et al.</i> , 2012	
Autres tissus ou cellules				
Rate			Gartlon <i>et al.</i> , 2001	
Poumons		Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002	Gartlon <i>et al.</i> , 2001; Nguyen <i>et al.</i> , 2012	
Muscles squelettiques	Douglas <i>et al.</i> , 2004b; Qi <i>et al.</i> , 2005; Maguire <i>et al.</i> , 2008	Nguyen <i>et al.</i> , 2012	Maguire <i>et al.</i> , 2008; Nguyen <i>et al.</i> , 2012	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002; Wang <i>et al.</i> , 2009
Cellules immunitaires	Boussette <i>et al.</i> , 2004; Segain <i>et al.</i> , 2007		Segain <i>et al.</i> , 2007	

Tableau 7. Localisation périphérique de l'UT chez l'Homme, le Singe, le Rat et la Souris.

A l'image de l'UII, l'expression de l'UT est particulièrement importante au niveau rénal chez le Rat (Gartlon *et al.*, 2001 ; Hirose *et al.*, 2009 ; Maguire *et al.*, 2008 ; Mori *et al.*, 2009 ; Nguyen *et al.*, 2012 ; Song *et al.*, 2006 ; Tian *et al.*, 2008) et l'Homme (Langham *et al.*, 2004 ; Maguire *et al.*, 2000 ; Matsushita *et al.*, 2001 ; Totsune *et al.*, 2001, 2003) avec toutefois des niveaux d'expression modérés chez le Singe (Nguyen *et al.*, 2012). L'UT est aussi présent dans le système endocrinien, notamment dans l'hypophyse, le pancréas ou la glande surrénale chez l'Homme (Ames *et al.*, 1999 ; Totsune *et al.*, 2001), le Singe et la Souris (Elshourbagy *et al.*, 2002). Dans une moindre mesure, des niveaux d'ARNm ont été détectés chez le Rat et l'Homme dans le testicule et les corps caverneux (d'Emmanuele di Villa Bianca *et al.*, 2010 ; Gartlon *et al.*, 2001) et l'hypophyse de Rat (Jégou *et al.*, 2006) et de la Daurade (Kalamarz-Kubiak *et al.*, 2014). Enfin, d'autres tissus périphériques présentent des niveaux d'expression significatifs d'UT, variables d'une espèce à l'autre (Tableau 7).

Largement exprimés dans le SNC, les ARNm codant l'UT sont particulièrement abondants au niveau du tronc cérébral et de la moelle épinière (Gartlon *et al.*, 2002 ; Jégou *et al.*, 2006 ; Liu *et al.*, 1999 ; Totsune *et al.*, 2001 ; 2003). Les autres régions du SNC, *i.e.* le cortex, l'hypothalamus ou le thalamus présentent des niveaux d'expression relativement faibles avec une variabilité inter-espèces. L'UT est aussi associé aux vaisseaux sanguins cérébraux, principalement dans les cellules endothéliales des microvaisseaux (Spinazzi *et al.*, 2006). Enfin, dans le tronc cérébral et l'hypothalamus de Rat, l'expression du récepteur a été relevée à la fois dans les neurones (Jégou *et al.*, 2006) et dans les astrocytes (Lin *et al.*, 2003a) (Tableau 8).

Tissus	Homme	Singe	Rat	Souris
Cerveau		Nguyen <i>et al.</i> , 2012	Clark <i>et al.</i> , 2001; Gartlon <i>et al.</i> , 2001; Jégou <i>et al.</i> , 2006; Maguire <i>et al.</i> , 2008; Nguyen <i>et al.</i> , 2012	
<i>Amygdale</i>			Jégou <i>et al.</i> , 2006	
<i>Bulbe olfactif</i>			Gartlon <i>et al.</i> , 2001; Jégou <i>et al.</i> , 2006	
<i>Cortex</i>	Maguire <i>et al.</i> , 2000 Totsune <i>et al.</i> , 2001		Gartlon <i>et al.</i> , 2001; Jégou <i>et al.</i> , 2006; Maguire <i>et al.</i> , 2008; Nguyen <i>et al.</i> , 2012	
<i>Hippocampe</i>			Gartlon <i>et al.</i> , 2001; Jégou <i>et al.</i> , 2006; Nguyen <i>et al.</i> , 2012	
<i>Hypothalamus</i>	Totsune <i>et al.</i> , 2001		Gartlon <i>et al.</i> , 2001; Lin <i>et al.</i> , 2003a; Jégou <i>et al.</i> , 2006; Nguyen <i>et al.</i> , 2012	
<i>Thalamus</i>			Jégou <i>et al.</i> , 2006	
Cervelet			Gartlon <i>et al.</i> , 2001; Jégou <i>et al.</i> , 2006; Maguire <i>et al.</i> , 2008; Nguyen <i>et al.</i> , 2012	
Tronc cérébral	Totsune <i>et al.</i> , 2001;		Gartlon <i>et al.</i> , 2001; Lin <i>et al.</i> , 2003a; Jégou <i>et al.</i> , 2006; Zhang <i>et al.</i> , 2007; Nguyen <i>et al.</i> , 2012	
Moelle épinière	Totsune <i>et al.</i> , 2001;	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002; Nguyen <i>et al.</i> , 2012	Gartlon <i>et al.</i> , 2001; Jégou <i>et al.</i> , 2006; Maguire <i>et al.</i> , 2008; Nguyen <i>et al.</i> , 2012	Liu <i>et al.</i> , 1999

Tableau 8. Localisation centrale de l'UT chez l'Homme, le Singe, le Rat et la Souris.

4.3. Pharmacologie de l'UT

Les puissantes propriétés vasoactives de l'UII ont rapidement conduit plusieurs groupes à développer des analogues urotensinergiques susceptibles d'être utilisés dans le traitement de pathologies du système cardiovasculaire. Les premiers travaux menés dans cette perspective ont consisté à caractériser la portion cyclique (hUII₄₋₁₁) biologiquement active des ligands naturels de l'UT, *i.e.* l'UII humaine (hUII) et l'URP, comme étant la séquence minimale biologiquement active des ligands naturels. La substitution du résidu Cys⁵ par une Ala entraîne une perte importante (200 à 1000 fois) de la puissance biologique (Flohr *et al.*, 2002 ; Labarrère *et al.*, 2003 ; Perkins *et al.*, 1990).

Le remplacement par une Ala ou par son énantiomère dextrogyre de chacun des trois résidus N-terminaux de l'UII n'a aucun impact sur l'activité biologique du peptide (Brkovic *et al.*, 2003 ; Flohr *et al.*, 2002 ; Kinney *et al.*, 2002 ; Labarrère *et al.*, 2003). De manière similaire, l'[Ala¹¹]UII-NH₂ et la [D-Val¹¹]UII-NH₂ conservent toutes deux des propriétés contractiles modérées, le second analogue est deux fois moins puissant que le premier, indiquant que l'orientation de la chaîne C-terminale est essentielle (Labarrère *et al.*, 2003).

Concernant la partie cyclique des peptides, les résultats montrent de façon unanime que toute modification structurale se traduit par un changement drastique de leur efficacité. A titre d'exemple, la substitution par une alanine ou par leur énantiomère dextrogyre des résidus Phe⁶, Trp⁷, Lys⁸ ou Tyr⁹ pour l'UII, et Phe³, Lys⁵ et Trp⁶ pour l'URP conduit systématiquement à des analogues inactifs (Brkovic *et al.*, 2003 ; Chatenet *et al.*, 2004 ; Labarrère *et al.*, 2003). Une perte d'activité biologique est également observée après remplacement des résidus Cys responsables de la formation du pont disulfure (Chatenet *et al.*, 2004 ; Guerrini *et al.*, 2005 ; Labarrère *et al.*, 2003). En revanche, le maintien de la structure cyclique à l'aide d'une unité alanyl-alanyl, en lieu et place des Cys formant le pont disulfure des ligands naturels, permet de conserver une activité agoniste des ligands synthétisés (Foister *et al.*, 2006). Ces données mettent clairement en évidence le rôle essentiel de la portion cyclique des peptides urotensinergiques. De façon intéressante, des « super agonistes » ont été obtenus après substitution de la Cys⁵ par une pénicillamine (Pen⁵) (Carotenuto *et al.*, 2014 ; Grieco *et al.*, 2002) (Tableau 10).

Sur la base de ces données, des modifications du domaine cyclique de l'UII et de l'URP ont été réalisées pour développer des antagonistes peptidiques de l'UT (Tableau 9). Les premiers candidats intéressants ont été obtenus par substitution de la Lys⁸ de l'hUII ou de la Lys⁵ de l'URP par une ornithine, un acide aminé dont la chaîne latérale est plus courte d'un carbone, permettant ainsi d'agir sur l'occupation du ligand sur le site de liaison du récepteur (Camarda *et al.*, 2002 ; Guerrini *et al.*, 2005 ; Vergura *et al.*, 2004) (Tableau 9). Testée sur la contraction d'anneaux d'aorte de rats induite par l'UII humaine, l'[Orn⁸]hUII se comporte comme un antagoniste compétitif tout en conservant une activité agoniste modérée sur la mobilisation calcique de cellules exprimant l'UT de Rat ou d'Homme (Camarda *et al.*, 2002). Par ailleurs, l'[Orn⁵]URP qui agit comme un antagoniste sur l'UT de Rat (Diallo *et al.*, 2008), conserve une activité agoniste résiduelle sur l'UT humain (Chatenet *et al.*, 2004 ; Desrues *et al.*, 2012) (Tableau 9). Ces différentes observations ont été mises à profit pour élaborer l'analogue [Pen⁵, D-Trp⁷, Orn⁸]hUII₄₋₁₁ ou urantide, un puissant antagoniste dépourvu d'activité intrinsèque sur des modèles d'aorte de rats (Camarda *et al.*, 2004 ; Patacchini *et al.*, 2003). Toutefois, testé *in vitro* sur des cellules CHO exprimant la forme humaine de l'UT, ce candidat potentiellement intéressant possède lui-aussi, dans ce modèle, une activité agoniste résiduelle (Camarda *et al.*, 2004).

D'autres antagonistes, non peptidiques, tels que le palosuran ou le SB-611812, ont été produits par des sociétés pharmaceutiques, et ont fait l'objet d'études pré-clinique et clinique (Tableau 9).

Nature	Composé		Espèce cible	Modèle expérimental	Références
	Nom	Activité			
Peptidique	[Pen ⁵]UII ₄₋₁₁ (P5U)	Agoniste	Rat	Contraction d'aorte	Carotenuto <i>et al.</i> , 2014
	[Orn ⁸]hUII	Agoniste	Homme	Mobilisation calcique	Camarda <i>et al.</i> , 2002
		Antagoniste	Rat	Mobilisation calcique Contraction d'aorte	
			Rat	Contraction d'aorte	
	[Orn ⁵]JURP	Antagoniste	Rat	Contraction d'aorte	Chatenet <i>et al.</i> , 2004; Diallo <i>et al.</i> , 2008
		Agoniste	Rat	Mobilisation calcique	Diallo <i>et al.</i> , 2008
			Rat	Contraction d'aorte	Chatenet <i>et al.</i> , 2004
	[D-W ⁴]JURP	Antagoniste	Rat	Contraction d'aorte	Chatenet <i>et al.</i> , 2004; Diallo <i>et al.</i> , 2008
		Agoniste	Rat	Mobilisation calcique	Diallo <i>et al.</i> , 2008
	[D-W ⁶]JURP	Antagoniste	Rat	Contraction d'aorte	Chatenet <i>et al.</i> , 2004
		Agoniste	Rat	Mobilisation calcique	Diallo <i>et al.</i> , 2008
	[Pen ⁵ , D-W ⁷ , Orn ⁸]hUII ₄₋₁₁ (urantide)	Antagoniste	Rat	Contraction d'aorte	Patacchini <i>et al.</i> , 2003; Camarda <i>et al.</i> , 2004; Behm <i>et al.</i> , 2006
			Rat/Homme	Mobilisation calcique	Camarda <i>et al.</i> , 2004
			Rat	Sécrétion de TGFβ et synthèse de collagène	Dai <i>et al.</i> , 2007
			Rat	Rougisement de l'oreille	Qi <i>et al.</i> , 2007
			Lapin	Rigidité des muscles papillaires du myocarde	Fontes-Sousa <i>et al.</i> , 2007
			Rat	Sécrétion d'insuline	Marco <i>et al.</i> , 2008
			Rat	Synthèse et sécrétion de collagène	Zhang <i>et al.</i> , 2008b
			Rat	Hypertrophie de cardiomyocytes	Gruson <i>et al.</i> , 2010; Gao <i>et al.</i> , 2010; Esposito <i>et al.</i> , 2011
			Homme	Motilité et invasion des cellules LNCaP	Grieco <i>et al.</i> , 2011
			Rat	Phosphorylation d'Akt et ERK	Chen <i>et al.</i> , 2012
			Rat	Cardio-protection	Gao <i>et al.</i> , 2012
			Agoniste	Homme	Mobilisation calcique
	Chat	Contraction d'aorte et d'artère fémorale		Behm <i>et al.</i> , 2006	
	Singe	Contraction d'artères rénale			
	[Pen ⁵ , D-W ⁷ , Dab ⁸]hUII ₄₋₁₁ (UFP-803)	Antagoniste	Rat	Mobilisation calcique	Camarda <i>et al.</i> , 2006
			Homme	Contraction d'aorte	
			Souris	Extravasation de plasma	
Agoniste		Rat	Mobilisation calcique Sécrétion de neurotransmetteurs	Ono <i>et al.</i> , 2008	
SB-710411	Antagoniste	Rat	Contraction d'aorte	Behm <i>et al.</i> , 2002; 2004; 2006	
			Formation d'IP ₃	Behm <i>et al.</i> , 2004a	
		Chat	Contraction d'artère fémorale	Behm <i>et al.</i> , 2004b; 2006	

	SB-710411	Antagoniste	Rat	Prolifération de cellules hépatiques Fibrose hépatique Sécrétion de TGFβ	Wang <i>et al.</i> , 2009	
		Agoniste	Singe	Contraction d'artère rénale et mésentérique	Behm <i>et al.</i> , 2004a; 2006	
				Formation d'IP ₃	Behm <i>et al.</i> , 2004a	
	GSK-248451	Antagoniste	Rat	Contraction d'aorte	Behm <i>et al.</i> , 2004b; 2006	
			Chat	Contraction d'aorte et d'artère fémorale		
			Singe	Contraction d'artères rénale et mésentérique		
		Agoniste	Rat	Contraction d'aorte		
	Urocontrine	Antagoniste	Rat	Contraction d'aorte	Chatenet <i>et al.</i> , 2012	
	Non-peptidique	AC7954 (Isochromanone)	Agoniste	Rat/Homme	R-SAT	Croston <i>et al.</i> , 2002
		FL68	Agoniste	Homme	R-SAT	Lehmann <i>et al.</i> , 2005
FL204		Agoniste	Homme	R-SAT	Lehmann <i>et al.</i> , 2007	
ACT-058362 (Palosuran)		Antagoniste	Homme	Mobilisation calcique Phosphorylation des MAPK	Clozel <i>et al.</i> , 2004	
			Rat	Contraction d'aorte	Clozel <i>et al.</i> , 2006	
			Rat	Flux sanguin rénal		
			Homme	Excrétion urinaire d'albumine	Sidharta <i>et al.</i> , 2006	
			Homme	Angiogenèse	Spinazzi <i>et al.</i> , 2006 Albertin <i>et al.</i> , 2009	
			Rat	Flux sanguin rénal Excrétion de sodium	Trebicka <i>et al.</i> , 2008	
			Rat	Fibrose pulmonaire	Onat <i>et al.</i> , 2012	
			Rat	Hypertension artérielle pulmonaire	Onat <i>et al.</i> , 2013; Pehlivan <i>et al.</i> , 2014	
SB-706375		Antagoniste	Souris/Rat/ Singe/ Homme	Mobilisation calcique	Douglas <i>et al.</i> , 2005	
			Rat	Contraction d'aorte		
SB-611812		Antagoniste	Rat	Resténose après angioplastie	Rakowski <i>et al.</i> , 2005	
				Pressions diastolique et systolique Œdème pulmonaire Hypertrophie des cardiomyocytes Dilatation ventriculaire	Bousette <i>et al.</i> , 2006a	
			Prolifération des fibroblastes cardiaques Fibrose myocardiaque Expression de collagène	Bousette <i>et al.</i> , 2006b		
GSK1562590	Antagoniste	Chat/ Homme	Contraction d'artère fémorale et d'aorte thoracique	Behm <i>et al.</i> , 2010		

Tableau 9. Principaux composés agonistes et antagonistes du récepteur UT.

4.4. Rôles du système urotensinergique à l'échelle cellulaire et moléculaire

L'ensemble des effets physiologiques globaux et/ou intégrés n'est volontairement pas abordé dans l'introduction de cette thèse afin de permettre une description du rôle pléiotrope de l'UT.

4.4.1. Effets du récepteur UT sur la prolifération, la survie, l'hypertrophie et la migration cellulaire

Historiquement, l'UII est connue pour ses effets hypertrophiques sur des cardiomyocytes en culture. De nombreuses études réalisées sur des lignées transfectées avec l'UT humain (Ziltener *et al.*, 2002) et des cellules natives qui expriment le récepteur, *i.e.* cellules épithéliales rénales de Porc (Matsushita *et al.*, 2003) et cellules musculaires lisses de Rat (Zhang *et al.*, 2012), démontrent par ailleurs que l'UII posséderait des propriétés promitogènes qui sont essentiellement relayées par la voie ERK (Tableau 10).

Parmi les voies de signalisation relatives à ERK et associées à l'UT, la transactivation de l'EGFR, sous la dépendance d'une production de *reactive oxygen species* (ROS) par la NADPH oxydase de type 2 (NOX2), a été décrite dans plusieurs modèles expérimentaux (Chen *et al.*, 2008 ; Sue *et al.*, 2009 ; Tsai *et al.*, 2009) ; l'activité de la NOX2 se fait en outre sous contrôle direct de l'UT (Djordjevic *et al.*, 2005). Les ROS lèvent l'inhibition exercée par la protéine SHP-2 sur l'EGFR et permettent la transduction du signal de prolifération cellulaire (Liu *et al.*, 2009 ; Tsai *et al.*, 2009). Ce phénomène de transactivation peut également être sous-tendu par l'activation d'une ADAM (*a disintegrin and metalloproteinase*) qui clive le précurseur de l'EGF, l'*heparin-binding EGF-like growth factor*, et libère le ligand qui active l'EGFR en conséquence (Onan *et al.*, 2004 ; Sue *et al.*, 2009) (Tableau 10).

Les effets promitogènes de l'UT sont également relayés par d'autres seconds messagers, comme les PLC et PI3K, par le biais d'un couplage du récepteur avec des protéines G sensibles à la PTX (Ziltener *et al.*, 2002), ou plus spécifiquement avec une protéine G de la famille $G_{i/o}$, comme cela a pu être observé sur des cellules recombinantes pour l'UT (Jarry *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2006b ; Ziltener *et al.*, 2008), des cultures d'astrocytes corticaux natifs de Rat (Desrues *et al.*, 2008 ; Jarry *et al.*, 2010) et des lignées de rhabdomyosarcome humain (Douglas *et al.*, 2004b). Dans ce dernier cas, les auteurs montrent qu'en présence de PTX, le signal calcique est diminué de 40%, ce qui suggère un double couplage G_q et $G_{i/o}$ du récepteur UT. L'UII peut aussi exercer des activités antimitogènes sur des cellules progénitrices cardiaques, chargées de reconstituer des portions tissulaires lésées (Chen *et al.*, 2014b). Dans

le contexte d'une hypertrophie de ces cellules, mimant une surcharge de pression intracardiaque, l'UII inhibe fortement la prolifération de ces cellules, un effet bloqué par l'urantide, un antagoniste peptidique de l'UT (Chen *et al.*, 2014b). Les effets cellulaires de l'UT seraient donc dépendants du contexte cellulaire et/ou physiologique ou pathologique pour un unique type cellulaire considéré, suggérant une signalisation particulièrement complexe du récepteur.

Effets cellulaires	Type cellulaire	Espèce	Voies de Transduction	Références	
Prolifération	CML vasculaires	Lapin	PKC, src, MAPK	Watanabe <i>et al.</i> , 2001	
	CML vasculaires	Rat	RhoA, ROCK	Sauzeau <i>et al.</i> , 2001	
	CHO-UT	Hamster	G _{i/o} , PI ₃ K, PLC, calmoduline, MEK, Ca ²⁺ extracellulaire	Ziltener <i>et al.</i> , 2002	
	Cellules épithéliales rénales	Porc	Ca ²⁺ (canaux voltage-dépendant), PKC, MAPK, ERK, c-myc	Matsushita <i>et al.</i> , 2003	
	CML des voies aériennes	Rat	PKC, MAPK, Ca ²⁺ , calcineurine	Chen <i>et al.</i> , 2001	
	Fibroblastes cardiaques		Transactivation de l'EGFR, ERK, ROS	Chen <i>et al.</i> , 2008	
	Cellules tubulaires		ROS, inhibition de SHP-2, transactivation de l'EGFR via HB-EGF	Sue <i>et al.</i> , 2009	
	CML		Ca ²⁺ , CaMK, ERK, PKD	Iglewski et Grant, 2010	
	Précurseurs endothéliaux		ERK, p38MAPK	Xu <i>et al.</i> , 2012	
	CML pulmonaires		ERK, TGFβ	Zhang <i>et al.</i> , 2012	
	CML pulmonaires		Homme	NOX, ROS, ERK, p38MAPK, c-jun, Akt, expression de PAI-1	Djordjevic <i>et al.</i> , 2005
				NOX4, ROS, FoxO3, JNK, MMP-2	Diebold <i>et al.</i> , 2011
	Astrocytes		Rat	PLC, Ca ²⁺ intra- et extracellulaire (canaux de type T), IP ₃ , G _{i/o}	Jarry <i>et al.</i> , 2010
	Fibroblastes			MAPK, expression de VEGF, production de collagène	Song <i>et al.</i> , 2012
	CML aortiques	ROS, inhibition de SHP-2, transactivation de l'EGFR		Tsai <i>et al.</i> , 2009	
	Cellules endothéliales ombilicales	Homme	p38MAPK, ERK	Lee <i>et al.</i> , 2014	
Précurseurs cardiaques	Souris	JNK, LRP6	Chen <i>et al.</i> , 2014		
Survie	CML vasculaires	Rat	N.D.	Esposito <i>et al.</i> , 2011	
	Cardiomyocytes		PI ₃ K, ERK	Chen <i>et al.</i> , 2012	
Hypertrophie	Cardiomyocytes-UT	Rat	G _q , Ras	Tzanidis <i>et al.</i> , 2003	
			Transactivation de l'EGFR via HB-EGF, ERK, p38MAPK	Onan <i>et al.</i> , 2004	
	ROS, inhibition de SHP-2, transactivation de l'EGFR		Liu <i>et al.</i> , 2009		
	PI ₃ K, Akt, GSK-3β		Gruson <i>et al.</i> , 2010		
Cardiomyocytes		ROS, NADPH oxydase, Akt, GSK-3β, PTEN	Chao <i>et al.</i> , 2014		

Migration, motilité	Monocytes	Homme	RhoA, ROCK	Segain <i>et al.</i> , 2007
	Progéniteurs endothéliaux	Rat	RhoA/ROCK, MLC	Xu <i>et al.</i> , 2009
	Adénocarcinome prostatique (LNCaP)	Homme	RhoA, FAK	Grieco <i>et al.</i> , 2011
	CML vasculaires		MEK	Matsusaka et Wakabayashi, 2006
	Fibroblastes vasculaires	Rat	PKC, ROCK, calcineurine, MAPK	Zhang <i>et al.</i> , 2008b; 2011
	Progéniteurs endothéliaux		N.D.	Yi <i>et al.</i> , 2012
	Carcinomes colorectaux	Homme	N.D.	Federico <i>et al.</i> , 2014
	Cancer de la vessie		N.D.	Franco <i>et al.</i> , 2014

Tableau 10. Voies de transduction associées à l'activation du récepteur UT et à l'implication dans les effets promitogènes, hypertrophiques et chimioattractants de l'UII. Akt, protéine kinase B ; CaMK, calmoduline kinase ; CHO-UT, lignée *chinese hamster ovary* transfectée avec la forme humaine du récepteur UT ; CML, cellules musculaires lisses ; EGFR, *epidermal growth factor receptor* ; ERK, *extracellular signal-regulated kinase* ; FAK, *focal adhesion kinase* ; FoxO3, *forkhead box O3* ; GSK-3 β , *glycogen synthase kinase 3 β* ; HB-EGF, *heparin-binding EGF-like growth factor* ; IL-8, interleukine 8 ; IP₃, inositol triphosphate ; LRP6, *low density lipoprotein receptor-related protein 6* ; JNK, c-Jun N-terminal kinase ; MAPK, *mitogen-activated protein kinase* ; MEK, *extracellular signal-regulated kinase* ; MLC, *myosin light chain* ; MMP-2, métalloprotéase matricielle de type 2 ; NOX, NADPH oxydase ; p38MAPK, p38 *mitogen-activated protein kinase* ; PAI-1, *plasminogen activator inhibitor-1* ; PI₃K, phosphoinositide-3 kinase ; PKC, protéine kinase C ; PKD, protéine kinase D ; PLC, phospholipase C ; PTEN, *phosphatase and tensin homolog* ; Ras, petites GTPases ; ROCK, *rho-associated protein kinase* ; ROS, *reactive oxygen species* ; SHP-2, *src-homology 2 containing tyrosine phosphatase* ; TGF- β , *transforming growth factor- β* ; VEGF, *vascular endothelial growth factor*. N.D., non déterminée.

Un nombre croissant de travaux indépendants plaident en faveur d'activités chimioattractantes de l'UII (Tableau 10) qui seraient, dans le cas de fibroblastes, de progéniteurs endothéliaux murins (Xu *et al.*, 2009 ; Zhang *et al.*, 2008b) ou encore de monocytes humains (Segain *et al.*, 2007), relayés par la voie Rho/ROCK. Sur ce dernier modèle, l'UII agirait en modifiant l'organisation du cytosquelette d'actine. L'utilisation sur des lignées humaines issues de tumeurs prostatiques ou colorectales, d'antagoniste de l'UT, d'inhibiteur de la voie Rho ou d'ARN interférents (shRNA : *small hairpin RNA*) dirigés contre l'UT se traduit par une baisse de la motilité cellulaire, suggérant un effet autocrine/paracrine de l'UII (Federico *et al.*, 2014 ; Grieco *et al.*, 2011). Quelques travaux mettent en cause d'autres éléments de signalisations intracellulaires telles que la PKC, les MAPK. Une étude récente menée au sein de l'équipe montre que la migration de cellules gliomales ou de cellules HEK293 exprimant le récepteur UT implique l'engagement des voies G₁₃/Rho et Rho kinases et G_{i/o}/PI3K, suggérant une régulation fine et complexe de la migration cellulaire (Lecointre *et al.*, 2015). L'inhibition, par l'UT, du processus autophagique est également un élément clé de la migration des cellules HEK293 exprimant le récepteur UT et gliomales U87, en permettant la formation de points focaux d'adhésion au

niveau du front de migration des cellules et l'extension de protrusions membranaires de types lamellipodes, éléments requis dans la migration chimiotactique (Coly *et al.*, 2016).

Les caractères prolifératifs et promigratoires du système urotensinergique le rapproche des systèmes des chimiokines, élargissant ainsi le champ thérapeutique de certaines pathologies caractérisées par ces événements cellulaires, comme les cancers invasifs ou métastatiques.

4.4.2. Effets du système Kiss1R sur la prolifération, la survie et la migration cellulaire

Découvertes pour leurs effets anti-métastatiques, le rôle des kisspeptines dans les fonctions cellulaires mises en jeu lors du développement tumoral, telles que la migration, la survie et la prolifération cellulaire, ont été étudiées. Cependant, les voies de transduction engagées par le système KP/Kiss1R restent très peu documentées.

Quelques études argumentent un effet antiprolifératif du Kiss1R sur des cellules souches du Singe Rhésus (Huma *et al.*, 2013), des cellules endothéliales HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*) (Golzar *et al.*, 2015) ou encore de cellules neuronales transfectées (Ziegler *et al.*, 2013). Aucun rôle antiprolifératif n'a été détecté sur différentes lignées de cancer du sein exprimant de manière endogène le récepteur Kiss1R (Ziegler *et al.*, 2013). L'effet antiprolifératif des kisspeptines peut-être corrélé à un effet pro-apoptotique. En effet, les kisspeptines augmentent l'apoptose de lymphocytes en activant l'expression de gènes proapoptotiques l'*endothelial monocyte activating polypeptide II* (Stathaki *et al.*, 2014), ou encore de cellules dérivées d'adénome hypophysaire (Martínez-Fuentes *et al.*, 2011). Deux études sur les cellules modèles HEK293 révèlent également un effet proapoptotique des kisspeptines, qui serait, selon les auteurs, relayés par une inhibition de Akt et la phosphorylation de ERK1/2 (Navenot *et al.*, 2009a) et l'activation des voies Rho et ROCK, dont l'implication dans les phénomènes de réorganisation du cytosquelette et dans la migration cellulaire sont connus (Navenot *et al.*, 2009b).

Le rôle du système Kiss1R sur l'inhibition du caractère métastatique de différents cancers a largement été démontré. Cependant, même si les mécanismes cellulaires associés à cet effet antimétastatique restent encore à découvrir, il a tout de même été mis en évidence que les kisspeptines inhibent la migration de cellules pancréatiques cancéreuses (Masui *et al.*, 2004). Il est à noter que la surexpression de Kiss1R au sein de cellules de cancer du sein entraîne une diminution de leur caractère invasif (Tan *et al.*, 2014), et que le KP-10 inhibe la migration de ces mêmes cellules induite par la chimiokine SDF-1 (Olbrich *et al.*, 2010). De la même manière, la kisspeptine KP-10 inhibe la migration de trophoblastes humains *via* une cascade

de signalisation impliquant la transactivation de l'EGFR, dépendante de ERK1/2 et de la kinase FAK (*focal adhesion kinase*) (Roseweir *et al.*, 2012). Une étude contradictoire avec ces données a mis en évidence que le récepteur Kiss1R peut promouvoir le caractère invasif de cellules de tumeur du sein par interaction directe et transactivation de l'EGFR (Zajac *et al.*, 2011). Ainsi, il apparaît que la plupart des effets antiprolifératifs, proapoptotiques et antimigratoires du Kiss1R passent par l'augmentation de la transcription de gènes ou par l'inhibition de l'activité de récepteurs à tyrosine kinase ou de RCPG. Très peu de preuves étayent l'hypothèse d'une action directe du récepteur Kiss1R, par l'intermédiaire de protéines G par exemple, sur ces événements cellulaires, comparativement au récepteur UT. L'absence de couplage à une large variété de protéines G peut éventuellement expliquer cette différence.

4.4.3. Effet du système SDF-1 α /CXCR4 sur la prolifération, la survie et la migration cellulaire

Historiquement, la première activité biologique décrite pour la chimiokine SDF-1 α fut sa capacité à induire une forte prolifération et chimioattraction des lymphocytes B (Bleul *et al.*, 1996 ; Nagasawa *et al.*, 1994). A cause de l'expression du couple SDF-1 α /CXCR4 dans de nombreuses tumeurs, les effets de ce système sur la prolifération et la migration cellulaire ont été étudiés dans des modèles cellulaires variés.

Ainsi, il a par exemple été montré que le SDF-1 α stimule la prolifération de cellules souches épidermiques (Guo *et al.*, 2015), de cellules vasculaires musculaires (Thomas *et al.*, 2015), ou encore de cellules de l'endomètre (Liu *et al.*, 2016). En accord avec ces données, la surexpression de CXCR4 augmente la prolifération de cellules squameuses issues d'un carcinome de l'œsophage (Uchi *et al.*, 2016) ; le micro-ARN miR-126, qui abolit l'expression de CXCR4, diminue la prolifération de cellules de cancer du colon (Yuan *et al.*, 2016) ; un siRNA ciblant CXCR4 antagonise l'effet prolifératif du SDF-1 α sur des cellules de l'endomètre (Liu *et al.*, 2016) et enfin, l'utilisation d'un anticorps ciblant le SDF-1 α diminue la prolifération de cellules vasculaires musculaires (Thomas *et al.*, 2015).

Certaines études se sont attelées à l'étude des voies de signalisation engagées par CXCR4 dans ses effets prolifératifs. Ainsi, il semble que la prolifération de cellules musculaires d'artère pulmonaire induite par SDF-1 α engage la voie des kinases PI3K et Akt (Wei *et al.*, 2015). Cette voie de signalisation PI3K/Akt semble aussi impliquée dans les effets antiapoptotiques du SDF-1 α sur une lignée de cellules épithéliales prostatiques (Kasina *et al.*, 2009). Sur cette même lignée, CXCR4 augmente la prolifération en engageant potentiellement deux voies distinctes : *i*) en transactivant le récepteur à tyrosine kinase EGFR

via l'activation des protéines ADAM par la src (Kasina *et al.*, 2009) et *ii*) en activant la phosphatase PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*) qui stimule les voies des MAPK, dont ERK1/2 (Begley *et al.*, 2015). Cette dernière étude a également démontré que la survie des cellules épithéliales prostatiques stimulée par le SDF-1 α serait relayée par la voie PI3K/Akt (Begley *et al.*, 2015). L'utilisation d'un anticorps dirigé contre CXCR4 et complètement humanisé induit l'apoptose de cellules de lymphome en diminuant l'activation des voies Akt et MAPK (Peng *et al.*, 2016). Ainsi, les effets prolifératifs et/ou antiapoptotiques de CXCR4 semblent engager les voies de la kinase PI3K et de la phosphatase PTEN, impliquées dans l'activation des voies dépendantes de ERK1/2 et Akt, mais aussi la transactivation de l'EGFR.

La migration cellulaire est un effet biologique caractéristique des chimiokines. Ainsi, il a été démontré que le système SDF-1 α est impliqué dans le caractère invasif et migratoire de nombreuses lignées cellulaires, telles que des lignées de cancer du larynx, de cellules de l'endomètre ou encore de cellules souches épidermiques (Guo *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2016; Niu *et al.*, 2015). Les voies de transduction engagées par CXCR4 impliquées dans la migration chimiotactique sont proches de celles relayées par l'UT. En effet, il a été montré que la stimulation du récepteur CXCR4 favorise la migration de cellules squameuses de carcinome de l'œsophage en engageant la voie de la kinase Akt comprenant les protéines RhoA, Rac-1 et Cdc42 (Guo *et al.*, 2016). Le rôle d'Akt dans la migration dépendante de CXCR4 a également été démontré pour des cardiomyocytes ventriculaires de Rat. Dans ce modèle, CXCR4 active Akt par le biais de la kinase PI3K (Zhou *et al.*, 2015).

Comme démontré pour l'UT, la migration chimiotactique des cellules Jurkat relayée par le CXCR4 semble être le résultat d'une régulation fine, qui engage à la fois la protéine G_i associée à la protéine Rac, et la protéine G₁₃, associée à l'activation de Rho et de la Rho kinase (Tan *et al.*, 2006). Dans différents modèles cellulaires (cellules HEK293 et cellules gliomales U87), la migration induite par le SDF-1 α passe par une inhibition du processus autophagique, permettant ainsi aux cellules de former des complexes d'adhésion à la matrice extracellulaire et de recruter suffisamment de membrane à leur front de migration afin de former des lamellipodes (Coly *et al.*, 2016).

Il est donc possible de faire un parallèle entre les voies de signalisation et les effets cellulaires du récepteur CXCR4 et ceux du récepteur UT, ce qui pousse à considérer l'UII, alors défini comme un peptide vasoactif, comme une chimiokine atypique.

Objectifs de Thèse

L'ensemble des domaines traités dans cette introduction, concernant la structure, les aspects phylogénétiques et évolutifs, les mécanismes d'activation, les voies de couplage et les fonctions des RCPG, indique à la fois une forme de conservation des structures et mode de signalisation, et aussi une diversification, permettant des spécialisations. Une des spécialisations importantes au cours de l'évolution est sans nul doute, les capacités de migration chimiotactique qui permettent la mise en place des organes et du système nerveux central, la vascularisation ou les réponses immunitaires.

Il est reconnu que ces processus impliquent les RCPG que l'on devrait même appeler récepteurs à 7 DTM car capables de coupler les protéines G ainsi que des protéines intracellulaires dont les β -arrestines. Cependant, réside encore des questionnements sur i) leur capacité à détecter des faibles concentrations/gradients moléculaires, ii) transduire le signal du domaine de liaison extracellulaire vers le domaine intracellulaire du récepteur, iii) les modes d'interaction des β -arrestines aux boucles cytosoliques. Les données récentes apportées notamment par les structures haute-résolution, indiquent que les RCPG sont des entités dynamiques qui adoptent de multiples conformations actives, capables de lier différents types de ligands, **d'activer de manière biaisée** les voies de couplage du récepteur, conduisant au **concept de sélectivité** fonctionnelle.

Les données d'autres laboratoires et de notre équipe, avaient en particulier permis de montrer que le récepteur urotensinergique UT, présente des capacités de liaison et de signalisation variées, relayant des effets multiples *in vitro* et *in vivo* parfois contradictoires, et que les deux ligands endogènes UII et URP, ainsi que des analogues peptidiques pouvaient exercer des actions agonistes entier ou partiel, suggérant des mécanismes différents, biaisés en fonction des structures de ces ligands. De plus, ce récepteur UT, bien que très longtemps décrit comme un acteur majeur du système cardiovasculaire, s'est montré récemment capable

d'exercer des rôles inflammatoire et chimioattractant majeurs, suggérant qu'il s'agit probablement d'une chimiokine peptidique.

L'objectif de ce travail de thèse visait donc à **i)** rechercher les différentes voies de couplage et activités cellulaires relayées par les agonistes endogènes du récepteur UT, ainsi que les analogues peptidiques controversés dans certains systèmes et **ii)** élucider si les fonctions chimiokines du récepteur UT de la famille SO, pouvaient être associées à la présence d'une proline en position 2.58, une signature structurale des récepteurs chimiokines de la famille CHEM et PUR, et à des signalisations spécifiques pour la migration chimiotactique directionnelle.

Partie 1

Biased signaling regulates the pleiotropic effects of the urotensin II receptor to modulate its cellular behaviors

Parmi de nombreux neuropeptides, l'UUI est encore actuellement considéré comme le peptide vasoactif le plus puissant. Ce peptide entraîne une grande variété de rôles physiopathologiques qui ne se limite pas au système cardiovasculaire. En effet, il a été démontré que l'UUI et son récepteur UT sont exprimés par différents tissus sains, mais aussi dans des tissus pathologiques, notamment tumoraux, tels que les phéochromocytomes, les carcinomes adrénocorticaux ou encore des tumeurs du système nerveux central comme les glioblastomes ou neuroblastomes. Cependant, bien que l'on ait caractérisé l'existence de deux peptides endogènes, l'UUI mais aussi l'URP, capables d'activer le récepteur UT de la classe A ou Rhodopsine des RCPG, les ligands peptidiques ou non peptidiques du récepteur UT « dits » antagonistes se sont montrés soit controversés dans leur activité, soit inefficaces *in vivo* dans des situations pathologiques. De plus, Il est apparu récemment, que l'UUI et l'URP pouvaient exercer des actions cellulaires et physiologiques parfois similaires, mais aussi distinctes suggérant finalement la nécessité d'une meilleure compréhension des mécanismes d'activation du récepteur UT en réponse à l'UUI et l'URP, ce qui permettrait d'en exploiter les propriétés pharmacologiques pour la mise au point de ligands d'intérêt thérapeutiques. Pour aborder ces différents aspects, nous avons tenté, en étroite collaboration avec le Dr Laurent Prézeau (IGF de Montpellier, France) et le Pr Richard Leduc (Université de Sherbrooke, Québec, Canada) de répondre aux questions suivantes :

Dans un modèle de cellules HEK293 recombinantes pour le récepteur UT humain,

- ◆ L'UUI et l'URP, à différentes concentrations, sont-ils capables d'activer les mêmes voies de couplage (dépendantes des protéines G et β -arrestines) associées à l'UT ?
- ◆ Présentent-ils les mêmes effets sur l'internalisation du récepteur et les seconds effecteurs de types ERK1/2 ?
- ◆ Quels sont les caractéristiques sélectives/biaisées des analogues peptidiques connus en tant que agonistes ou antagonistes sur ces différentes voies de couplage et d'internalisation du récepteur?
- ◆ À quelles activités biologiques relayées par l'UT, sont associées les biais de signalisations induits par certains analogues peptidiques?

Biased signaling regulates the pleiotropic effects of the urotensin II receptor to modulate its cellular behaviors

Cédric Brulé,^{*,†,‡,§,1} Nicolas Perzo,^{*,||,1} Jane-Eileen Joubert,^{||,1} Xavier Sainsily,^{*} Richard Leduc,^{*,2} Hélène Castel,^{||,2} and Laurent Prézeau^{†,‡,§,2,3}

*Department of Pharmacology, Institut de Pharmacologie de Sherbrooke, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada; [†]Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Unité Mixte de Recherche (UMR) 5203, Institut de Génomique Fonctionnelle, Montpellier, France; [‡]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U661, Montpellier, France; [§]UMR 5203, Universités de Montpellier 1 and 2, Montpellier, France; ^{||}INSERM, U982, Laboratory of Neuronal and Neuroendocrine Communication and Differentiation (DC2N), Astrocyte and Vascular Niche, Biomedical Research Institute (IRIB), Pôles de Recherche et d'Enseignement Supérieur (PRES) Normandy, Peptide Research Network of Excellence (PERENE), University of Rouen, Mont-Saint-Aignan, France

ABSTRACT Biased agonism by G-protein-coupled receptor ligands has opened up strategies for targeted physiological or therapeutic actions. We hypothesized that urotensin II (UII)-derived peptides displayed unexpected physiological effects because of such biased signaling on the UII human urotensin (hUT) receptor. We determined the coupling to G proteins and β -arrestins of the UII-activated hUT receptor expressed in HEK293 using bioluminescence resonance energy transfer (BRET) biosensors, as well as the production of IP1-3 and cAMP using homogenous time-resolved Forster resonance energy transfer (FRET) (HTRF)-based assays. The activated receptor coupled to G_{11} , G_{oA} , G_q , and G_{13} , excluding G_s , and recruited β -arrestins 1 and 2. Integration of these pathways led to a 2-phase kinetic phosphorylation of ERK1/2 kinases. The tested peptides induced three different profiles: UII, urotensin-related peptide (URP), and UII₄₋₁₁ displayed the full profile; [Orn⁵]UII and [Orn⁵]URP activated G proteins, although with pEC₅₀s 5–10× higher, and did not or barely recruited β -arrestin; urantide also failed to recruit β -arrestin but displayed a reversed rank order for G_i and G_q vs. G_o . pEC₅₀s (-8.79 ± 0.20 , -8.43 ± 0.21 , and -7.86 ± 0.36 , respectively, for urantide, -7.87 ± 0.10 , -7.23 ± 0.27 , and

-8.55 ± 0.19 , respectively, for [Orn⁵]URP) and was a partial agonist of all G-protein pathways. Interestingly, the peptides differently modulated cell survival but similarly induced cell migration and adhesion. Thus, we demonstrate biased signaling between β -arrestin and G proteins, and between G-protein subtypes, which dictates the receptor's cellular responses.—Brulé, C., Perzo, N., Joubert, J.-E., Sainsily, X., Leduc, R., Castel, H., Prézeau, L. Biased signaling regulates the pleiotropic effects of the urotensin II receptor to modulate its cellular behaviors. *FASEB J.* 28, 5148–5162 (2014). www.fasebj.org

Key Words: G-protein-coupled receptor · partial agonism · G-protein signaling · β -arrestin signaling

RESEARCH IN THE G-protein-coupled receptor (GPCR) field during the past decade has unveiled how complex cellular pleiotropic GPCR signaling can notably occur through functional selectivity/biased agonism effects. Indeed, a biased ligand activates some pathways and not others or activates various pathways with different potency rank orders (1). Thus, the agonism and antagonism/inverse agonism of a drug now have to be defined for each of the different pathways that a receptor targets. The physiological/pathological action of a biased compound will be specific, as it will selectively regulate only some of the pathways targeted by a given receptor's pleiotropic signaling profile. Relatively few studies have linked such complex signaling regula-

Abbreviations: BRET, bioluminescence resonance energy transfer; cAMP, cyclic adenosin monophosphate; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; ERK1/2, extracellular signal-regulated kinase 1/2; FBS, fetal bovine serum; FRET, Forster resonance energy transfer; GFP, green fluorescent protein; GPCR, G-protein-coupled receptor; HTRF, homogenous time-resolved FRET; hUT, human urotensin; IP1, inositol monophosphate; IP3, inositol triphosphate; PTX, pertussis toxin; RhoA, ras homolog gene family, member A; ROCK, Rho-associated protein kinase; RLuc, *Renilla luciferase*; SSC, side scatter; Tb, terbium; UII, urotensin II; UII₄₋₁₁, urotensin II₄₋₁₁; URP, urotensin-related peptide; UT, urotensin; VP, vasopressin; YFP, yellow fluorescent protein

¹ These authors contributed equally to this work.

² These authors contributed equally to this work.

³ Correspondence: Institut de Génomique Fonctionnelle, F-34000 Montpellier, France. E-mail: laurent.prezeau@igf.cnrs.fr doi: 10.1096/fj.14-249771

This article includes supplemental data. Please visit <http://www.fasebj.org> to obtain this information.

tion to the cellular and physiological behaviors of cells when activating a receptor with biased ligands (2), thereby explaining why some drugs did not induce the expected therapeutic benefits.

The cyclic peptide urotensin II (UII), the most potent vasoactive peptide in mammals, and its paralog urotensin-related peptide (URP; ref. 3) are both endogenous ligands of the GPCR urotensin (UT) receptor (4). The urotensinergic system might be a promising target in therapeutic drug development for cardiovascular diseases, as the UT system has been implicated to play a role in hypertension, heart failure, and cardiac fibrosis (5). However, the therapeutic use of UT ligands did not meet anticipations, likely because of the physiological complexity of the urotensinergic system: Administration of human UII leads to either potent vasodilator or cardiostimulant responses in human tissues (6, 7), and the effects of UII are dependent on the species/tissues investigated (8). In addition, UII and URP do not display identical functional pathophysiological implications, despite the presence of a fully conserved C-terminal cyclic amino acid sequence, CFWKYC, between the two peptides (this portion is the minimum sequence required to retain biological activity; ref. 9). The first UT receptor antagonists were obtained by modifying this cyclic domain, leading to the production of analogs such as [Om⁸]UII, [Om⁵]URP or urantide (10–12). In a disease context such as that of cardiovascular disease, these peptides did not always behave as antagonists, and they did not provide the expected benefits in diabetes (13) or asthma (14) either. Because this behavior was likely due to their signaling features, profiling and in-depth knowledge of UT-receptor coupling pathways is warranted.

The UT receptor undergoes pleiotropic signaling on its activation. Classically, the UT receptor couples to the G_{q/11} subtype of heterotrimeric G proteins (12), leading to an increase in inositol triphosphates (IP₃; ref. 13) and the mobilization of intracellular calcium (Ca²⁺; refs. 4, 14). In addition, it couples to G_{i/o} proteins, thereby affecting Ca²⁺ mobilization and extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) activation (15–17). UT-receptor activation leads to ras homolog gene family, member A (RhoA) stimulation during arterial smooth muscle contraction, cytoskeletal organization, and aortic smooth muscle cell proliferation (15, 18), which may involve G_{12/13} (16) or G_{q/11} (17). The regulation of these pathways by UT-receptor agonists and antagonists has not been directly or exhaustively addressed. Thus, the determination of a signaling profile of the UT receptor and its regulation by its cognate ligands will determine whether some of them are biased agonists, regulating some pathways and not others, thereby leading to specific cellular effects. These findings could help explain their pathophysiological effects.

In the present study, we determined a signaling profile of the UT receptor toward G-protein-dependent and -independent pathways in UT receptor-expressing HEK293 cells. Interestingly, we did not observe any coupling differences for UII and URP. However, we showed that synthetic peptide ligands induced different UT receptor-dependent pathway profiles, not only be-

having as full or partial agonists but also displaying biased signaling of specific pathways. Interestingly, the signaling profiles of these ligands were correlated with their effects on cellular processes, such as cell survival, indicating that determining the signaling profile induced by a ligand may explain its physiological effects and potential therapeutic interest.

MATERIALS AND METHODS

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), and penicillin/streptomycin were obtained from Life Technologies (Grand Island, NY, USA) and co-enterazine h from Promega (Charbonnières, France). pertussis toxin (PTX), U73122, and U73343 (Calbiochem) were provided by Merck (Darmstadt, Germany). The Gα₁₃-*Renilla* luciferase 2 (RLuc2), green fluorescent protein 10 (GFP10)-Gγ₁, GFP10-Gγ₂, Gβ₁, and Gβ₃ constructs were provided by Dr. Michel Bouvier (University of Montreal, Montreal, QC, Canada). The Gα₁-RLuc construct was generated as described previously, and Flag-Gβ₂ was generated as described for Flag-Gβ₁ (19). The Venus-tagged Gγ₂ fusion protein was provided by Dr. C. Galès (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U858, Toulouse, France). The plasmids coding for the SNAP-tagged UT receptor were obtained from Cisbio Bioassays (Codolet, France). The inositol monophosphate (IP₁), cyclic adenosine monophosphate (cAMP), and extracellular ERK1/2 assays were provided by Cisbio Bioassays. UII, URP, urantide, [Orr⁸]UII, [Orn⁵]URP, and UII₄₋₁₁ were purchased from Tocris Bioscience (Ellisville, MO, USA). Poly-l-ornithine, poly-l-lysine, and fibronectin were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France), Cell Tracker Green from Molecular Probes (Fisher Scientific, Illkirch, France), and FITC-annexin V from Invitrogen (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA). Control and β-arrestins 1 and 2 siRNAs were from Dharmacon (Fisher Scientific, St. Leon, Germany); the G_q inhibitor UBO-QIC was from the Institute of Pharmaceutical Biology (University of Bonn, Bonn, Germany). The anti-β-arrestins 1 and 2 antibodies and the anti-actin antibody were from Abcam (Paris, France).

Cell culture and transfection

Cell culture and transfection were performed as described previously (19). Briefly, HEK293 cells were grown in complete medium (DMEM supplemented with 10% v/v FBS, 100 U/ml penicillin, and 0.1 mg/ml streptomycin). Transient transfection was performed using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's recommended protocol. Control and β-arrestin 1 and 2 siRNAs were transfected into HEK293 cells using X-tremGENE or RNAiMax Lipofectamine siRNA (Invitrogen) transfection reagent or Amaxa nucleofection (Lonza, Levallois Perret, France) 24 h before transfection of the UT-receptor-expressing plasmid and 48–72 h before proliferation, ELISA, ERK, and Western blot experiments.

Binding

HEK293 cells stably expressing the human UT (hUT) receptor (HEK293-hUT) were washed and subjected to one freeze-thaw cycle before gentle scraping into washing buffer (20 mM Tris/HCl, pH 7.4, and 5 mM MgCl₂), centrifugation at 2500 g for 15 min at 4°C, and resuspension in binding buffer (20 mM Tris/HCl, pH 7.4; 5 mM MgCl₂; 0.1% BSA; and 0.01%

bacitracin). Dose displacement experiments were conducted by incubating broken cells (20 µg of proteins) for 1 h at room temperature with 0.5 nM ¹²⁵I-U11 and ligands. Bound radioactivity was separated from free ligand by filtration through glass-fiber filter plates (Millipore, Billerica, MA, USA) pre-soaked in binding buffer at 4°C and washed with ice-cold washing buffer. Receptor-bound radioactivity was evaluated using γ-radiation counting. B_{max} was estimated using radioligand saturation binding assays, by displacing the radiolabeled U11 by unlabeled U11.

Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) assay

HEK293 cells were cultured in DMEM supplemented with 10% (v/v) FBS, 100 IU/ml penicillin, and 100 IU/ml streptomycin at 37°C. For the G_q and G₁₃ biosensors, cells were transfected using polyethylenimine (PEI; 1 µg/ml) with plasmids encoding UT, G_{αq}-RLuc2 or G_{α13}, G_{αq}, and GFP10-G_{γ1}. The following day, transfected cells were washed with HBSS and dispensed into 96-well plates at a density of 200,000 cells/well. Then, ligands were added, followed by coelenterazine 400A (5 µM). BRET ratio measurements were collected using a MI1000 reader (Tecan, Durham, NC, USA). BRET² readings between RLuc2 and GFP10 were collected in the 400- to 450-nm (RLuc2) and 500- to 550-nm windows (GFP10). The BRET² signal was calculated as the ratio of light emitted by the acceptor, GFP10, over the light emitted by the donor, RLuc2. The G_{α13} and β-arrestin 1 or 2 experiments were performed as described previously (20). The transfected HEK293 cells were washed with PBS, and readout was performed on a Mithras LB940 plate reader (Berthold Technologies GmbH, Bad Wildbad, Germany) at 37°C after the addition of coelenterazine (5 µM) and ligand. The BRET ratio was calculated on the basis of the difference of the emission at 530 nm/485 nm of cotransfected RLuc and yellow fluorescent protein (YFP) fusion proteins and the emission at 530 nm/485 nm of the RLuc fusion protein alone.

IP1, cAMP, and ERK1/2 activation homogenous time-resolved Forster resonance energy transfer (FRET) (HTRF) assays

Measurement of IP1 and cAMP accumulation in HEK293 cells was performed using the IP-One terbium (Tb) and cAMP Dynamics 2 competitive immunoassay kits (Cisbio Bioassays), respectively, as described previously (19, 20). The IP-One assay uses a cryptate-labeled anti-IP1 monoclonal antibody and d2-labeled IP1. LiCl is added to the cell-stimulation buffer, causing the accumulation of IP1 on receptor activation. Prior to lysis and the addition of the IP1-Tb antibody and IP1-d2, the SNAP-tagged UT receptor-transfected HEK293 cells were treated with the indicated test compounds. The cAMP assay uses a cryptate-conjugated anti-cAMP monoclonal antibody and d2-labeled cAMP. Prior to lysis and the addition of the cAMP-cryptate-antibody and cAMP-d2, cells were cotransfected with the V2 receptor and treated with the indicated test compounds and vasopressin (VP) at a concentration of 0.1 nM (to stimulate G_{αs} coupling to V2). Measurement of ERK1/2 activation was performed using the Cellul'Erk immunoassay kit (Cisbio Bioassays), which uses a cryptate-labeled anti-ERK monoclonal antibody and a d2-labeled anti-phospho-ERK monoclonal antibody. The SNAP-tagged UT receptor-transfected cells were stimulated with the indicated ligands (1 µM). The cell lysates were transferred to a 384-well plate, and both antibodies were added; the read was performed 2 h later. For β-arrestin down-regulation, cells were transfected with a control siRNA or siRNAs directed against human β-arrestin 1 or 2 (200 pM) for 24 h and transfected with the Cmyc-tagged UT receptor plasmid.

Internalization assay

Briefly, the SNAP-tagged UT receptor-transfected cells were seeded in 96-well plates, and 24 h later, they were washed with cold Krebs buffer and incubated on ice with BG-Lumi4 Tb at a concentration of 100 nM for 1 h. The cells were washed and incubated with either U11 or its analog (10 µM) and diluted in fluorescein buffer (24 µM) at 37°C during readings, which were performed on an Infinite F500 reader (Tecan, Männedorf, Switzerland).

Counting/proliferation assay

Cmyc-tagged UT receptor-transfected HEK293 cells were grown in culture medium supplemented with 10% FBS for 24 h. The cells (125,000/well) were serum starved for 6 h, then incubated in the absence or presence of U11, URP, U11₄₋₁₁, [Orn⁸]U11, [Orn⁵]URP, or urantide (10⁻⁹ M each) for 24 h. When required, cells were coincubated for 24 h with the ligands and the G_q inhibitor UBO-QIC (10⁻⁶ M); or with the G₁₃ inhibitor PTX (20 µg/ml). For β-arrestin down-regulation, cells were transfected with a control siRNA or siRNAs directed against human β-arrestin 1 or 2 (200 pM, each condition) for 24 h and then transfected with the cMyc-tagged UT-receptor plasmid and the siRNA of interest again. After 24 h, cells were serum starved for 6 h and incubated with ligands for 24 h. For counting, cells were rinsed in PBS (37°C) and detached using accutase. The cell number was quantified by counting events using an electronic cell counter (Z2; Beckman Coulter, Roissy CDG, France).

Migration assay

Transwell filters (24 wells, Corning; Fisher Scientific) with 8 µm pores were coated with fibronectin (4°C). Cmyc-tagged UT receptor-transfected HEK293 cells were detached using accutase and resuspended in medium without SBF. Cells (100,000/125 µl/filter) were added to the upper chamber of the Transwell in the absence or presence of the compounds. The gradient was generated by filling the lower chamber with 600 µl of medium containing U11, URP, U11₄₋₁₁, [Orn⁸]U11, [Orn⁵]URP, or urantide (10⁻⁹ M each). The cells were incubated for 24 h (37°C) and rinsed with PBS, and the cells on the upper surface of the filter were removed using a cotton swab. Migrating cells were fixed and stained with eosin and hematoxylin, the filters were mounted on glass slides using Mowiol and microphotographed using a Nikon microscope (Nikon, Champigny-sur-Marne, France), and cells were counted using the "Cell counter" plug-in on ImageJ software (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Adhesion assay

After transfection, UT receptor-expressing HEK293 cells were preincubated for 30 min with Cell Tracker Green, detached using EDTA (1 mM), pelleted, and resuspended in medium without FBS in the absence or presence of U11, URP, U11₄₋₁₁, [Orn⁸]U11, [Orn⁵]URP or urantide (10⁻⁹ M each; 37°C, 30 min). The cells were plated at a density of 50,000 cells/well in fibronectin-coated 96-well plates (Costar, clear bottom/black side; Corning, Corning, NY, USA). After 30 min, the cells were washed, and the adherent cells were measured using a fluorescence plate reader (FL600; Bio-Tek, Colmar, France) at 535 nm.

Apoptosis/plasma membrane integrity analyses using flow cytometry

Loss of plasma membrane integrity can be assessed by measuring the externalization of phosphatidylserine using FITC-

annexin V binding. Light-scattering properties are correlated with the degree of granularity of the cells during flow cytometry, providing an indication of the morphological differences between viable and apoptotic cells. To quantify cells in the early and late stages of apoptosis, UT receptor-expressing HEK293 cells were stained with FITC-annexin V using flow cytometry. Briefly, after 24 h transfection, 125,000 cells/25 cm² flask were treated in the absence or presence of UII and URP or UII₄₋₁₁, [Orn⁸]UII, [Orn⁵]URP, or urantide (10⁻⁹ M each) for 24 h. The cells were washed in cold PBS and incubated with 2 ml of FITC-annexin V for 15 min in the dark at room temperature. Flow cytometric analyses were performed using a FacsCalibur flow cytometer (BD Biosciences, Pont de Claix, France). Green fluorescence was determined in the FL1 (530 nm) channel using CellQuest analysis software (Becton Dickinson Immunocytometry Systems; BD Biosciences). Representative results were shown as 2-dimensional density plots of increased side scatter (SSC) and annexin V-stained cells (BD Biosciences).

Statistical analyses

All of the statistical analyses were conducted using GraphPad Prism 4.00 software (GraphPad, San Diego, CA, USA). The data were analyzed using different statistical tests; *i.e.*, the Mann-Whitney *U* test. Multiple comparisons were performed using 1-way analysis of variance, followed by Dunn's or Dunnett *post hoc* tests. Values of *P* < 0.05 were considered significant.

RESULTS

Systematic analyses of UT receptor-mediated G-protein activation patterns

To determine a signaling profile for the UT receptor, we initially focused on its ability to engage G-protein-dependent pathways. In agreement with the literature (21), we observed that the endogenous UII peptide mobilized G_q pathways in hUT receptor-expressing HEK293 cells, which was assessed using either a BRET-based assay monitoring G_{αq}-RLuc/G_{γ1}-Venus complex formation/dissociation (Fig. 1A) or by measuring the production of IP1 metabolites using the IP1 HTRF assay (Fig. 1B and Supplemental Fig. S2A). The EC₅₀ values (2.2 and 0.8 nM, using BRET assay and IP1/IP3 assays, respectively; Fig. 1A and Table 1) and binding affinities [3.3 nM; Fig. 1H and Table 1 (22), B_{max} 7.45 ± 0.26 pmol/mg proteins] were in agreement with the ones described in the literature. UII-activated UT receptor did not increase the production of cAMP, indicating that it did not couple to G_s proteins compared to the well-described G_s-coupled V2 VP receptor (Fig. 1F), although both receptors were expressed at similar levels at the cell surface (Supplemental Fig. S1). We have shown that the UT receptor couples to G_{i/o}-protein-mediated pathways (23, 24). Here, in cells expressing the V2 receptor activated by VP, the elevated cAMP production was inhibited by activation of the cotransfected UT receptor (EC₅₀ 7.33 nM; Fig. 1D and Table 1) *via* PTX-sensitive G_{i/o} proteins (Supplemental Fig. S2B). The G_{i/o}-protein coupling was confirmed using BRET-based assays monitoring either G_{α11}-RLuc/G_{γ1} Venus or G_{αoA}-RLuc/G_{γ1} Venus complex formation/dissociation, with EC₅₀ values of 1.7 and 0.1 nM,

respectively (Fig. 1C, E and Table 1), while the V2 receptor could not couple to either of these G proteins (Supplemental Fig. S1C-F). Similarly, coupling to the G₁₃ protein pathway was observed with an EC₅₀ value of 0.4 nM under our conditions (Fig. 1G). Thus, the UT receptor displayed coupling to a wide panel of G proteins, including G_q, G₁₁, G_{oA}, and G₁₃, but not G_s. We then examined the extent of UT receptor coupling to G-protein-independent pathways.

Recruitment of β-arrestins 1 and 2

The recruitment of β-arrestins to the receptor was assessed by an increase in the BRET signal in HEK293 cells transiently expressing the hUT receptor, which was fused at its C-terminal to YFP and β-arrestin 1 or 2, both of which were fused to RLuc. Following UII application, both β-arrestins 1 and 2 were recruited by the hUT receptor, as well as by the V2 VP receptor (Fig. 2A). Interestingly, the EC₅₀ for β-arrestin 2 recruitment (0.1 nM) was the lowest of the pathways tested (Fig. 2B and Table 1). We also demonstrated that the hUT receptor was internalized on UII application (Fig. 2D), as observed in cells transiently expressing the hUT receptor fused at its N terminus to the SNAP domain (25). Indeed, this domain, labeled with BG-cryptate, led to a high collisional TR-FRET signal when the fluorescein dye was added to the medium at a high concentration (10 μM), which strongly quenched the fluorescence of the cryptate dye (26). The fluorescence of the BG-cryptate-labeled receptor increased when the receptor was internalized because the extracellular fluorescein molecules no longer quenched the dye. This observation is in agreement with the previously proposed β-arrestin 2 recruitment and internalization of the rat UT receptor following UII stimulation (27). Thus, the UT receptor displayed a wide signaling profile when activated by UII. We then addressed whether the other endogenous UT ligand, URP, induced a similar signaling profile.

UII and URP displayed the same signaling profile pattern

Of the 800 or so GPCRs, few are activated by two endogenous ligands. UII and URP have been reported to display either similar or different physiological effects, although it remains unclear whether the URP effects are all mediated by the UT receptor or involve an as yet uncharacterized receptor (24). We thus asked whether both ligands engage the same signaling pathways. Indeed, the G-protein-coupling profile determined for URP was identical to that of UII, with similar potencies and efficacies (Fig. 1 and Table 1). Moreover, URP induced the recruitment of both β-arrestins 1 and 2, with similar kinetics and EC₅₀ values (Fig. 2A-C and Table 1) and comparable UT-receptor internalization kinetics (Fig. 2D).

As summarized in Fig. 2E, when activated by either UII or URP, the UT receptor coupled to a variety of pathways, including G_q, G₁₁, G_{oA}, G₁₃, and β-arrestins 1 and 2, but not G_s. Thus, we speculated whether peptide ligands whose designs are based on UII and URP

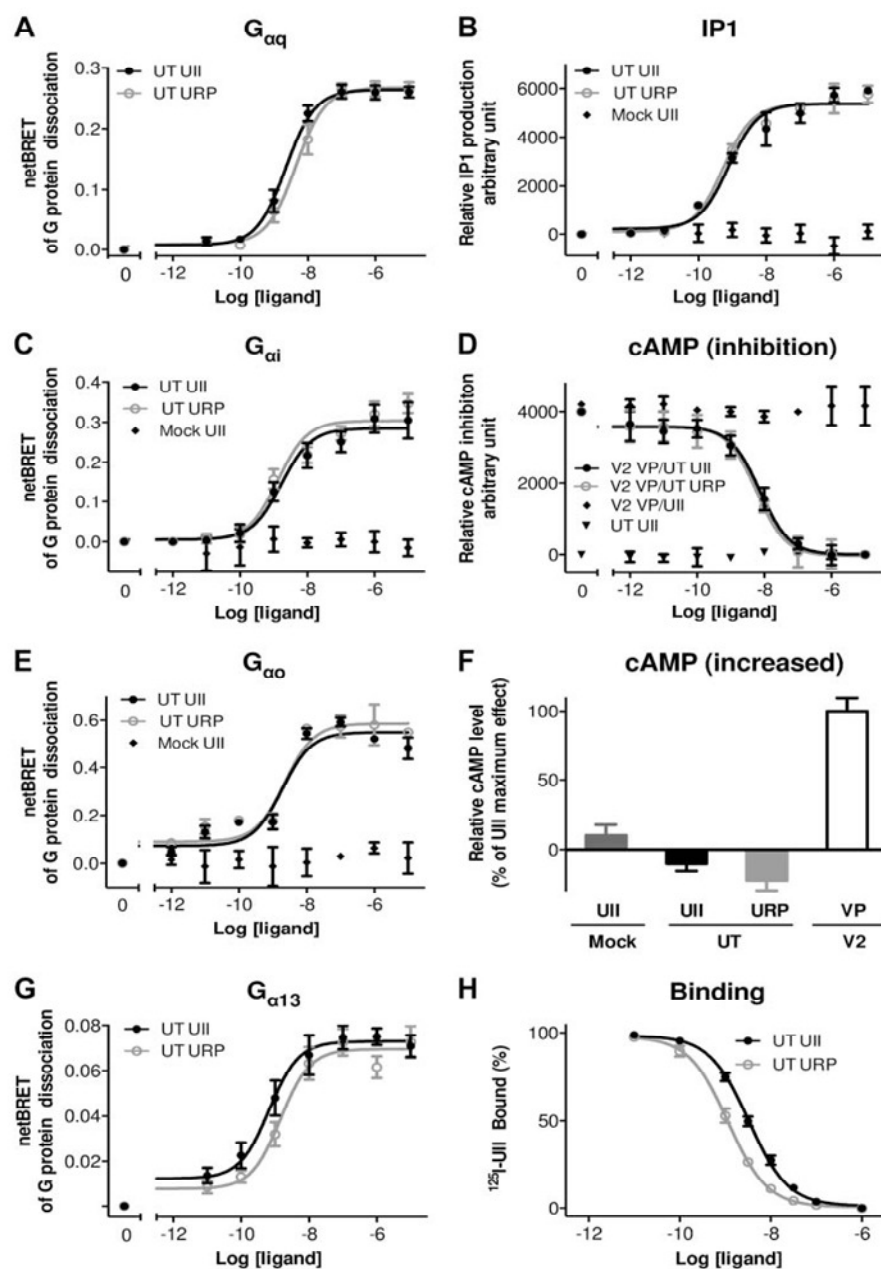


Figure 1. Binding and G-protein-coupling selectivity of the UT receptor after activation by its endogenous ligands. *A, C, E, G*) BRET assay signals after the application of increasing concentrations of U11 and URP in transfected HEK293 cells coexpressing combinations of hUT receptor with G protein subunits: $G_{\alpha q}$ -RLuc2/ $G\beta_1$ / $G\gamma_1$ -GFP10 (*A*), $G_{\alpha i}$ -RLuc1/ $G\beta_2$ / $G\gamma_2$ -Venus (*C*), $G_{\alpha o}$ -RLuc1/ $G\beta_2$ / $G\gamma_2$ -Venus (*E*), and $G_{\alpha 13}$ -RLuc2/ $G\beta_1$ / $G\gamma_1$ -GFP10 (*G*). Concentration-response curves revealed the agonist-induced variations in the BRET signal. *B*) Concentration-response curve for U11 or URP-mediated IP1 production in control HEK293 cells (mock treatment) and HEK293 cells transiently expressing the hUT receptor. *D*) Inhibition of cAMP production in HEK293 cells transiently expressing the hUT receptor, the hv2 receptor, or both in the presence of the indicated ligands. A constant concentration of VP (0.1 nM) increased the production of cAMP in cells expressing the hv2 receptor (diamond) and in cells expressing the hv2 and hUT receptors, in which coactivation of the hUT receptor by increasing the concentration of its ligands led to a concentration-response reduction in cAMP production (solid and open circles). *F*) No increase in cAMP production was mediated by the hUT receptor. Cells transfected with either an empty vector or vectors coding for either the hUT or hv2 receptors were stimulated by either U11, URP (1 μM), or VP (0.1 nM). Data are normalized to the maximal VP responses (100%). *H*) Binding analysis of U11 and URP in hUT receptor-expressing HEK293 cells. Cells were incubated for 1 h with the radiolabeled ligand ^{125}I -U11 (0.5 nM), which was

displaced by increasing concentrations of U11 or URP. Curves represent means \pm *sem* of ≥ 3 independent concentration-response experiments performed in triplicate (*A–E, G, and H*); bars correspond to means \pm *sem* obtained from ≥ 3 independent experiments conducted in triplicate (*F*).

sequences and are considered to be agonists, partial agonists, or antagonists displayed different profiles that could explain the data variations described in the literature (depending on the models used and the physiological effects tested).

Testing analogs on different signaling pathways

URP is an 8-residue peptide encoded by a gene that is distinct from the one encoding U11. Both peptides

conserve the same cyclic portion, while the first 3 N-terminal residues of U11 are replaced with a single Ala in URP (Fig. 3A). Thus, it seems that the length of the peptide is not crucial for coupling to the signaling pathways we discussed previously, confirming the crucial role of the cyclic portion. The majority of the tested peptides were modified in their cyclic sequence (Fig. 3A), most with a substitution at position 8 in U11 (position 5 in URP), which is known to be important for receptor binding (28). U11_{4–11} is a short peptide that

TABLE 1. Log pEC₅₀ values of UII and its analogs in the different signaling pathways

Peptide	Binding	G _{αq}	IP1	G _{αi}	G _{αo}	cAMP	G _{α13}	β-Arrestin 2
UII	8.48 ± 0.17	8.63 ± 0.14	9.18 ± 0.13	8.77 ± 0.14	8.72 ± 0.20	8.14 ± 0.16	9.18 ± 0.33	9.91 ± 0.14
URP	8.94 ± 0.28	8.36 ± 0.20	9.27 ± 0.14	8.88 ± 0.15	8.64 ± 0.14	8.24 ± 0.17	8.84 ± 0.30	9.76 ± 0.14
UII ₄₋₁₁	8.72 ± 0.17	8.43 ± 0.21	8.83 ± 0.07*	8.29 ± 0.15*	8.85 ± 0.18	8.52 ± 0.16	8.78 ± 0.43	9.83 ± 0.41
[Orn ⁸]UII	7.12 ± 0.33*	7.70 ± 0.20*	8.23 ± 0.16*	7.87 ± 0.08*	8.59 ± 0.23	7.79 ± 0.13*	8.28 ± 0.49*	8.69 ± 0.32*
[Orn ⁵]URP	7.63 ± 0.16*	7.23 ± 0.27*	7.89 ± 0.10*	7.87 ± 0.10*	8.55 ± 0.19	7.38 ± 0.17*	8.07 ± 0.29*	ND
Urantide	8.17 ± 0.37	8.43 ± 0.21	8.29 ± 0.11*	8.79 ± 0.20	7.86 ± 0.36*	8.11 ± 0.23	8.60 ± 0.29	ND

ND, not determined. *P < 0.05 vs. UII pEC₅₀.

corresponds to Asp₄-Val₁₁ of human UII. [Orn⁸]UII is a UII peptide in which Lys8 is replaced by an Orn residue, while [Orn⁵]URP is a URP peptide displaying the same Lys substitution. Finally, urantide is a UII₄₋₁₁-based peptide displaying the Orn8 substitution and two supplementary ones; *i.e.*, Pen5 substituted for Cys5 and D-Trp7 replacing L-Trp7. All of these peptides still bound UT receptor with high affinity (Fig. 4B and Table 1), indicating that the substitutions did not drastically affect the binding properties of the ligands; urantide bearing 3 substitutions displayed superior affinity to that of [Orn⁵]URP and [Orn⁸]UII.

Based on their efficacies (Figs. 1 and 4 and Table 1), UII, URP and the 4 analogs can be classified in 3 different signaling profile groups, *i.e.*, the UII, URP, and UII₄₋₁₁ group; the [Orn⁸]UII and [Orn⁵]URP group; and a third group, which consists of urantide only. Indeed, UII₄₋₁₁ has a signaling profile similar to that induced by UII in terms of efficacy and potency (Fig. 4 and Table 1). [Orn⁸]UII and [Orn⁵]URP bear identical Lysine substitutions within the cyclic portions of the peptides (Fig. 4A). Interestingly, the substitution slightly affected the efficacy of both peptides in all of the G protein-dependent pathways examined (Fig. 4A-F), although they displayed higher EC₅₀ values for the majority of these pathways, except for the G_o pathway (Fig. 4A-F and Table 1). However, although the coupling to β-arrestins of both peptides was highly affected, [Orn⁵]URP did not induce the recruitment of β-arrestin 2 at all, while [Orn⁸]UII behaved as a very weak partial agonist (Fig. 4G). In addition, [Orn⁸]UII still induced a small but significant internalization of the receptor, unlike [Orn⁵]URP (Fig. 4H). Thus, substitution of the lysine residue of the cyclic part of the peptides strongly affected their coupling to β-arrestins and receptor internalization, even if [Orn⁵]URP did not strikingly reproduce the complete loss observed for [Orn⁸]UII. The 3-residue substitution in urantide affected its efficacy in all of the pathways because it behaved as a partial agonist of G_q and G₁₃, as a weak partial agonist of G_i and G_o (Fig. 4A-F), and as a full antagonist of β-arrestin 2 recruitment (Fig. 4G and Supplemental Fig. S6). Moreover, the hUT receptor was not internalized when stimulated by urantide (Fig. 4H). This finding demonstrated that [Orn⁵]URP, [Orn⁸]UII, and urantide displayed a biased agonism activity toward G-protein *vs.* β-arrestin couplings. Interestingly, urantide displayed higher potency of G_i coupling than of G_o, in contrast with both the other peptide analogs, for which the potencies were reversed, and with UII and URP, which displayed similar potencies for both couplings (Fig. 4 and Table 1). Moreover, the potencies of urantide, UII, URP, and UII₄₋₁₁ for G_o coupling were very similar, while those of [Orn⁸]UII and [Orn⁵]URP were a log order of magnitude lower (Fig. 4A). Taken together, these data indicate that these ligands also displayed biased activity toward some of the three G_{β1}, G_o, and G_q proteins.

Finally, the substitutions in the conserved cyclic portion (Lys and the first Cys), in addition to the Trp residue of UII₄₋₁₁, modified the way the peptide activated the receptor and controlled its active states, which led to a different rank order of potencies and selective

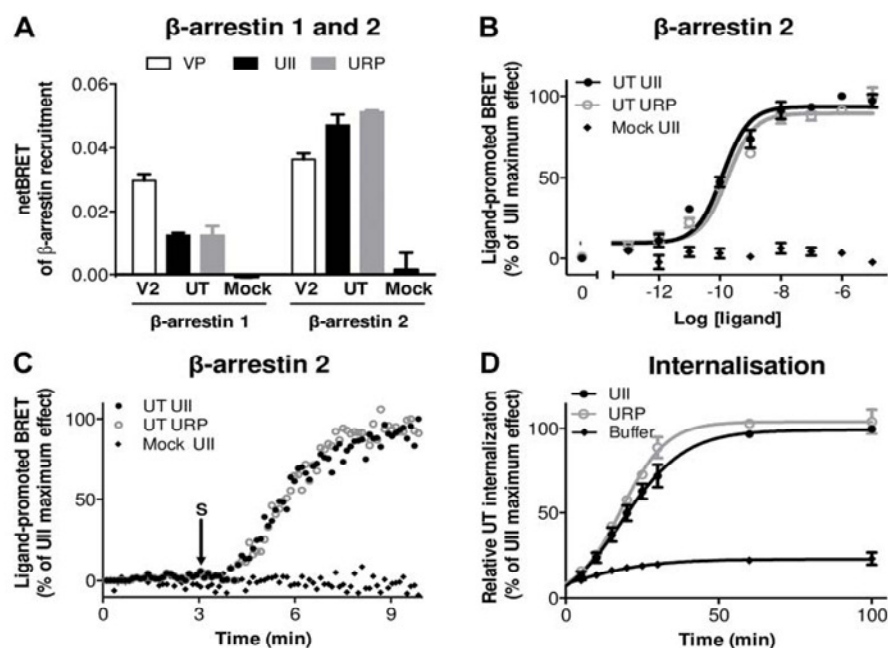


Figure 2. β -Arrestin recruitment and internalization of the hUT receptor after activation by its endogenous ligands. *A–C*) BRET assay signal in HEK293 cells transiently expressing the hUT receptor or the hV2 receptor fused to YFP and β -arrestin 1 or 2 fused to RLuc1 and stimulated with UII, URP, and VP, respectively. *A*) Cells were stimulated with the maximum concentration of UII, URP, or VP (1 μ M each). Bars correspond to means \pm *sem* obtained from ≥ 3 independent experiments conducted in triplicate. *B*) Concentration-response curves for UII- or URP-mediated β -arrestin 2 recruitment. Each

point was read 7 min after stimulation and normalized to the maximum effects of UII. Curves represent means \pm *sem* of ≥ 3 independent concentration-response experiments performed in triplicate. *C*) Kinetics of the BRET signal in cells stimulated by a 1 μ M concentration of either UII or URP (S, at 3 min). Data are normalized to the maximum UII response. Kinetics data are representative traces performed 3 times in parallel, all of which were repeated in 3 independent experiments. *D*) Relative internalization kinetics of the transiently expressed SNAP-hUT receptor in HEK293 cells when stimulated by either buffer or 1 μ M UII or URP. SNAP-hUT receptor was labeled with BG-cryptate for 1 h at 4°C. Thus, the cells were incubated in the presence of excess fluorescein at 37°C, generating a high FRET and quenching the cryptate fluorescence. Data are expressed as the ratio of the donor/FRET signal and are normalized to the maximum UII response, which was set as 100%. Curves represent means \pm *sem* of ≥ 3 independent kinetic experiments performed in triplicate. *E*) Schematic summary of the signaling profile of the hUT receptor.

coupling to G proteins and strongly affected β -arrestin recruitment and UT receptor internalization. These results indicated that these ligands would not generate identical cellular responses due to the combination of pathways they engage and how they activate them.

Peptides displayed different kinetic patterns of ERK1/2 phosphorylation

UII, URP, and UII₄₋₁₁ (1 μ M) promoted similar ERK1/2 phosphorylation kinetics in hUT-receptor-transfected HEK293 cells (Fig. 5A, D). The response curve of ERK1/2 phosphorylation increased signifi-

cantly after ~ 5 min. A second peak was observed at 15 min, and the response decreased over time. The first peak was dependent on the activation of both the $G_{i/o}$ and G_q pathways, as indicated by the fact that its amplitude was reduced by treatment with either the $G_{i/o}$ inhibitor, PTX (74 \pm 2 and 71 \pm 1.9% reductions for both URP and UII, respectively; Fig. 5B), or the PLC blocker, U73122 (26 \pm 1.9 and 25 \pm 3% reduction, respectively, for both URP and UII; Fig. 5C), while the inactive analog of the PLC inhibitor, U73343, did not alter ERK1/2 phosphorylation (Fig. 5C). The second ERK1/2 phosphorylation peak was less affected by treatment with either PTX or U73122, suggesting the

involvement of other signaling pathways. We again observed 3 types of responses because [Orn⁸]UII and [Orn⁵]URP triggered an early response, with a slightly reduced amplitude, while urantide provoked a significant reduction (63%) of the first peak of ERK1/2 phosphorylation compared to UII (Fig. 5D). These data confirm the involvement of G proteins during the early phase of ERK1/2 phosphorylation kinetics. When dealing with the later phase, all of the peptide analogs that contained Lys to Orn replacements displayed altered responses, which may have resulted from either their partial agonism of some of the G-protein pathways and/or their lack of β -arrestin recruitment. Actually, removing of β -arrestin proteins by specific siRNA treatment of the cells (Supplemental Fig. S3) decreased by half the later response (Fig. 5E), indicating the involvement of β -arrestins; while the early response was not affected, neither was the receptor expression (Supplemental Fig. S4). The fact that this decrease was only partial could be due to residual arrestin proteins or the involvement of other pathways. Moreover, although both [Orn⁵]URP and urantide did not recruit arrestin, their later ERK1/2 responses were different. Indeed, the urantide late response was more similar to that induced by [Orn⁸]UII, which still displayed a significant arrestin recruitment. Thus, the later phase likely involved several pathways, which were not all mobilized the same way by the different ligands (29). These data indicate that the signaling profile of the peptides directly affects their integrated cellular responses. We then explored whether physiological actions, such as cell migration, adhesion or survival, of these ligands were also biased.

Peptides exhibited differential agonist behavior on cell survival/apoptosis

The chemoattractant effects of UII on rat fibroblasts, endothelial progenitor cells, and human monocytes suggested the potential chemotactic behavior of the urotensinergic system (30–32). Thus, HEK293 cells stably expressing the hUT^{cMyc} receptor were seeded in the upper portion of Boyden chambers (Transwells) and allowed to migrate during a 24 h period in the absence or presence of gradient concentrations of ligands (bottom portion). Gradient concentrations of UII or URP (1 nM) induced significant increase in the migration of HEK293-UT^{cMyc} cells (292±64 and 275±45%), compared with HEK293-pCMV^{cMyc} (mock treatment) cells (Fig. 6A, left panel). Activating the hUT receptor with UII₄₋₁₁, [Orn⁸]UII, [Orn⁵]URP, or urantide (Fig. 6A, right panel) also led to cellular migration.

Because migration requires the formation of transient adhesive contacts with the extracellular matrix, we next investigated the adhesion properties of HEK293-UT^{cMyc} cells after 30 min treatment with the peptides. Homogenous concentration of UII or URP (1 nM) significantly increased cell adhesion (UII, 138.6±6.6%, $P<0.01$; URP, 138.6±4.9%, $P<0.01$; Fig. 6B, left panel). Similarly, UII₄₋₁₁, [Orn⁸]UII, [Orn⁵]URP, and urantide showed agonistic adhesive properties of 129.0 ± 6, 139.0 ± 5.1, 127.9 ± 6.7, and 128.1 ± 9.0%, respectively (Fig. 6B, right panel). Together, these observations

indicated that all of the ligands exhibited similar agonist behavior on UT receptor-expressing cell migration and adhesion, suggesting that the receptor signaling pathways involved in these mechanisms may be more likely to be related to G_{q/11}, G_{i/o}, and/or G₁₃ rather than to β -arrestin recruitment, receptor internalization, and ERK1/2 phosphorylation.

Reports have established that UII increased human adrenocortical and renal carcinoma cell numbers or rat cortical astrocyte counts, whereas no effect of UII or urantide was detected in a prostate cancer cell line (33). In the present study, 24 h treatment of hUT^{cMyc} cells with UII, URP, and UII₄₋₁₁ led to moderate, but significant, decreases in cell number of 22.1 ± 3.4, 21.9 ± 3.9, and 19.0 ± 2.5%, respectively (Fig. 6C). However, [Orn⁸]UII, [Orn⁵]URP, and urantide failed to significantly modify cell survival and/or proliferation (Fig. 6C). To further examine the relative contributions of the proapoptotic effects of UII, URP, or UII₄₋₁₁, we performed flow cytometric analyses of FITC-annexin V binding, a sensitive probe used for the identification of cells undergoing apoptosis. After a 24 h period of treatment, UII, URP, and, to a lesser extent, UII₄₋₁₁ (1 nM) enhanced the percentage of UT^{cMyc} cells binding FITC-annexin V (Fig. 6D). In contrast, [Orn⁸]UII, [Orn⁵]URP, and urantide did not affect early apoptosis in UT^{cMyc} cells. Thus, the

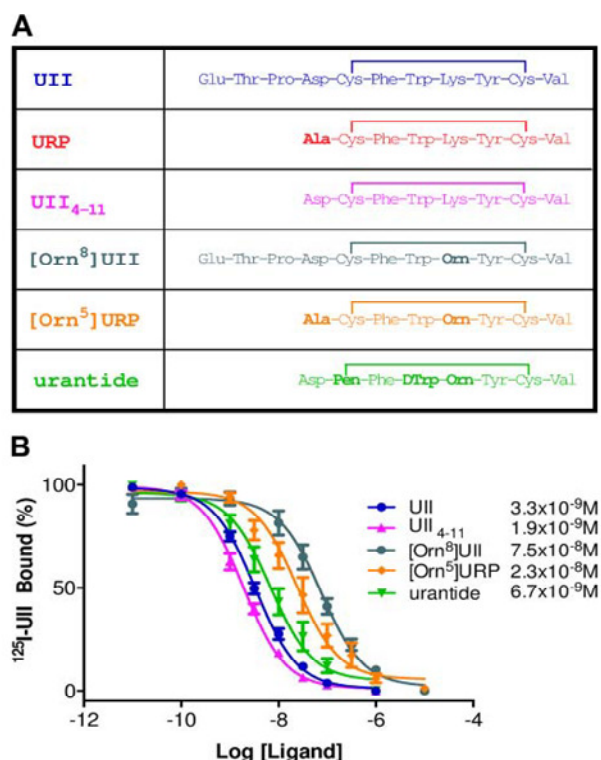
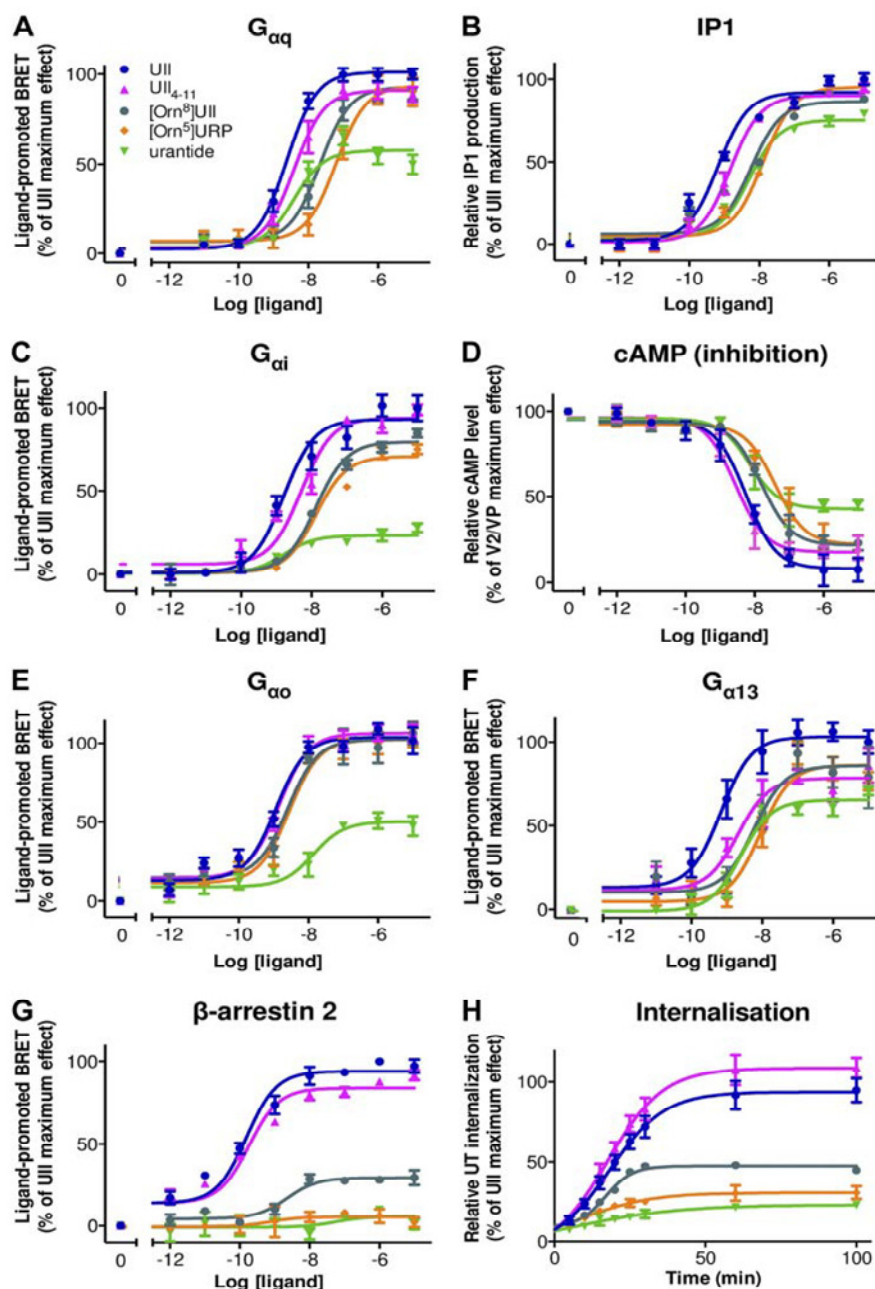


Figure 3. Sequence and binding features of UII analogs at the hUT receptor. A) Amino acid sequences of UII and its analogs, URP, UII₄₋₁₁, [Orn⁸]UII, [Orn⁵]URP and urantide. B) Binding analysis of UII and its analogs on the hUT receptor expressed in HEK293 cells, as described in Fig. 1H. Curves represent means ± sem of ≥3 independent kinetic experiments performed in triplicate.

Figure 4. Comparison of the signaling profiles induced by UII and its peptide analogs. *A, C, E, F*) G-protein BRET assays were performed as described in Fig. 1, after stimulation with increasing concentrations of UII or its peptide analogs. Data are normalized to the UII maximum effect. *B*) Concentration-response curves for UII- or peptide analog-mediated IP1 production, as in Fig. 1*B*. Data are normalized to the UII maximum effect. *D*) UT stimulation-mediated inhibition of cAMP production, as described in Fig. 1*D*, following the application of UII or its analogs. Data are normalized to the UII maximum effect. *G*) Concentration-response curves of β -arrestin 2 recruitment induced by UII and its analogs, performed as described in Fig. 2*B*. Data are normalized to the UII maximum effect. *H*) Relative internalization kinetics of UT, performed as described in Fig. 2*D*, following the application of 1 μ M UII or its analogs. Data are normalized to the maximum effects of UII. Curves represent means \pm sem of ≥ 3 independent kinetic experiments performed in triplicate.



Lys residue plays a key role in a specific UT receptor-associated route that mediates loss of cell survival. Ligands that did not induce apoptosis were not or poorly able to recruit β -arrestins (Fig. 4*G*), known to contribute to apoptosis. Interestingly, treatment of the cells with siRNAs against β -arrestin 1, β -arrestin 2, or both did not suppress the UII, URP, or UII₄₋₁₁-evoked cell loss (Fig. 7*B*), meaning that β -arrestins were not necessary or played a minor role in this effect. We then tested the potential involvement of $G_{\beta/\gamma}$ or G_o in UII-, URP-, or UII₄₋₁₁-induced loss of cell survival. UBO-QIC, a G_o inhibitor, completely blocked the ligand-induced cell death (Fig. 7*A*), which suggests that this pathway is likely permissive and also acts

in conjunction with other pathways mobilized by these ligands but not by [Orn⁸]UII, [Orn⁵]URP, and urantide.

DISCUSSION

In the present study, we determined a signaling profile for the UT receptor using 2 endogenous ligands (UII and URP) and 4 synthetic UT agonists or antagonists. Three main signaling profiles were obtained, which dictated the way the ligands regulate cellular responses, such as cell migration, cell adhesion, and cell survival (Fig. 8).

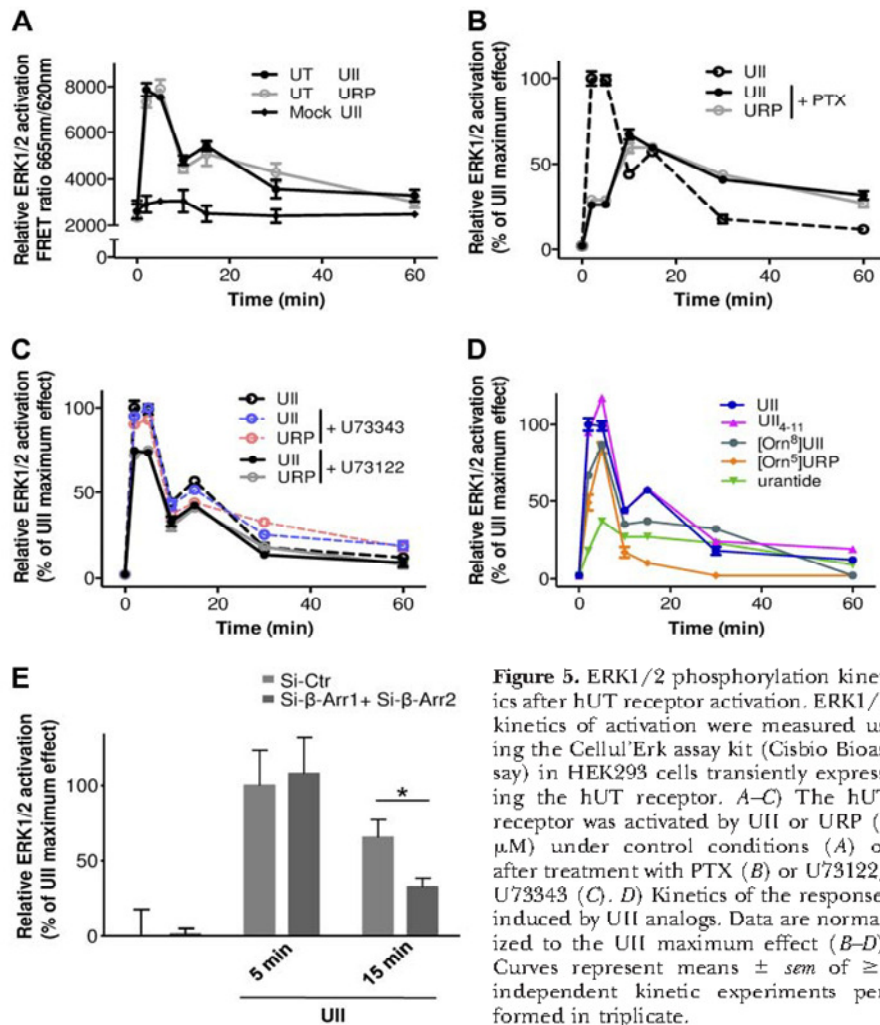


Figure 5. ERK1/2 phosphorylation kinetics after hUT receptor activation. ERK1/2 kinetics of activation were measured using the Cellul'Erk assay kit (Cisbio Bioassay) in HEK293 cells transiently expressing the hUT receptor. A–C) The hUT receptor was activated by URP or URP (1 μ M) under control conditions (A) or after treatment with PTX (B) or U73122/U73343 (C). D) Kinetics of the responses induced by URP analogs. Data are normalized to the URP maximum effect (B–D). Curves represent means \pm *sem* of ≥ 3 independent kinetic experiments performed in triplicate.

We first described the ability of URP and URP to induce hUT receptor-mediated coupling to 6 different signaling pathways (G_q , G_{i1} , $G_{o\alpha}$, G_{i3} , and β -arrestins 1 and 2, but not G_s) and to induce downstream events, namely, ERK1/2 and NF κ B phosphorylation (Supplemental Fig. S5) and receptor internalization. These results are in line with reports indirectly demonstrating UT receptor signaling *via* $G_{q/11}$ (21), PKC, p38MAPK, ERK1/2 and tyrosine kinases and RhoA/Rho-associated protein kinase (ROCK; ref. 34), and $G_{i/o}$ (15, 24). The demonstrated recruitment of β -arrestin 1 and 2 fits with our previous work, which suggests that β -arrestins are linked to UT receptor endocytosis (27). Furthermore, two main ERK1/2 phases were detected for both URP and URP and may be relayed *via* UT receptor activation to $G_{i/o}$ - and G_q -dependent coupling (Fig. 5) and β -arrestins, although other pathways likely play a role in this regulation. Our results indicate that an integration process for ERK1/2 activation occurs, illustrating that cellular responses result from the integration of specific sets of pathways mobilized by an activated receptor.

The signaling patterns of the endogenous and synthetic tested peptides could clearly be classified into 3 groups (Fig. 8A): group 1 was represented by the full agonists URP, URP, and URP₄₋₁₁; group 2 contained [Orn⁵]URP and [Orn⁵]URP; and group 3 consisted of urantide. Interestingly, despite the wide distribution of URP and URP in the cardiovascular, renal, and endocrine systems, their tissue localization and/or release sites do not totally overlap (3), which suggests that URP might not function only as a URP backup through activation of the UT receptor. Thus, although they display the same signaling profiles (Fig. 1), the two endogenous ligands URP and URP exert common and divergent physiological actions during rat astrocyte proliferation (24), intracellular calcium release (23), or atrial natriuretic peptide production (35). In our present work, the lack of differences in UT receptor signaling, cell migration, adhesion, and apoptosis on application of URP, URP, or URP₄₋₁₁ might be explained by our investigation of coupling events very close to the receptors, in contrast to the majority of the studies cited above addressing cellular or physiological effects, which

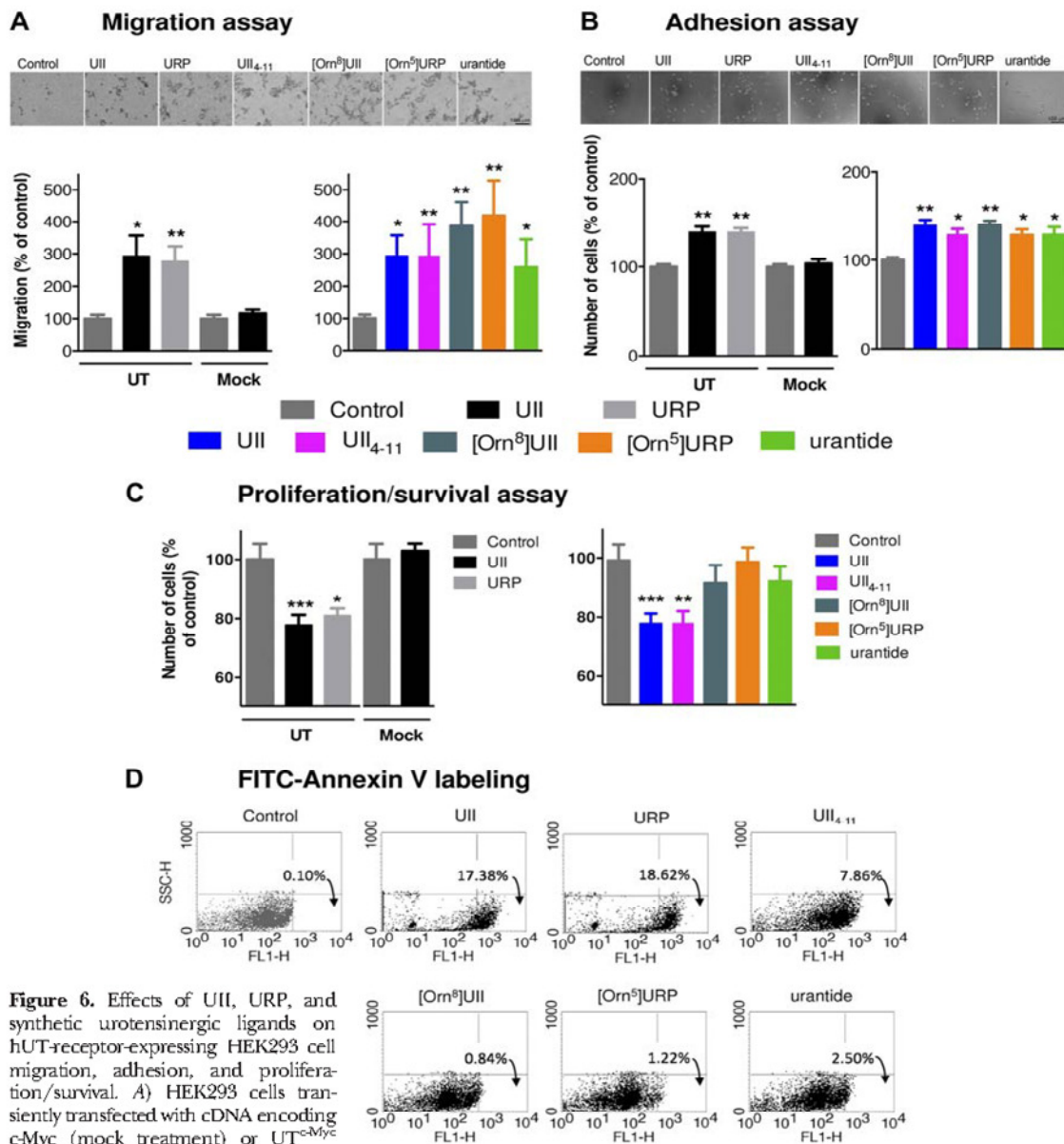


Figure 6. Effects of UII, URP, and synthetic wrotensinergic ligands on hUT-receptor-expressing HEK293 cell migration, adhesion, and proliferation/survival. *A*) HEK293 cells transiently transfected with cDNA encoding *c-Myc* (mock treatment) or UT^{c-Myc} (UT) were plated, as described in Materials and Methods, in the top chamber of a Transwell insert, and either UII and URP (1 nM) or UII, UII₄₋₁₁, [Orn⁸]UII, [Orn⁵]URP, and urantide (1 nM) were added to the bottom chamber for 24 h. Cell motility was evaluated by counting the cells in 10 random fields after eosin (0.2%)/hematoxylin (0.7%) counterstaining (top images). Histograms show the quantification of the migrating cells, expressed as the percentage compared to nontreated cells (control). Bars correspond to means \pm *sem* obtained from 3 independent experiments conducted in triplicate. *B*) Adhesion assays on fibronectin of HEK293 cells transfected with cDNA encoding *c-myc* (mock treatment) or UT^{c-myc} in the absence (control) or presence of UII and URP (1 nM) or UII, UII₄₋₁₁, [Orn⁸]UII, [Orn⁵]URP, and urantide (1 nM). Cells were preincubated for 30 min with the various treatments and allowed to adhere during a 30 min period, and the relative number of adhered cells was estimated by fluorescently measuring the levels of Cell Tracker Green (top images). Bars represent means \pm *sem* obtained from 3 independent experiments conducted in quadruplicate. *C*) HEK293 cells transiently transfected with cDNA encoding *c-myc* (mock) or UT^{c-myc} (UT) were incubated for 24 h in the absence or presence of UII and URP (1 nM, left) or UII, UII₄₋₁₁, [Orn⁸]UII, [Orn⁵]URP, and urantide (1 nM, right) and counted using a Coulter counter. Bars represent means \pm *sem* obtained from 3 independent experiments conducted in triplicate. *D*) Apoptotic events were determined by characterizing membrane integrity *via* binding of annexin V to phosphatidylserine. Results are shown as representative flow cytometric density dot plots representing the SSC (granularity)/FITC annexin V light-scatter gate of UT-expressing HEK293 cells in the absence (control) or presence of UII, URP, UII₄₋₁₁, [Orn⁸]UII, [Orn⁵]URP, and urantide (1 nM) during a 24 h period. Bottom right quadrant: cells with enhanced externalization of phosphatidylserine (annexin V-positive) are indicative of cells undergoing apoptosis (percentage of total cells). Top quadrants: cell granularity. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001 *vs.* corresponding control (absence of treatment); Mann-Whitney test.

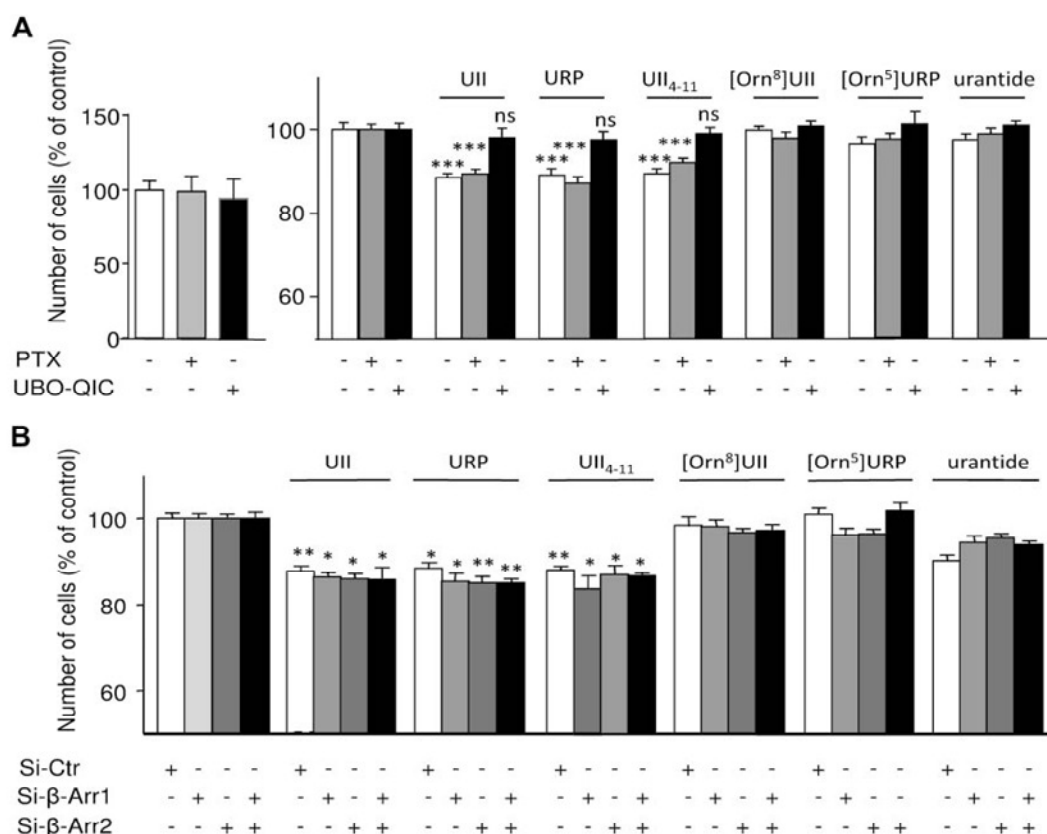


Figure 7. Role of $G_{1/0}$, G_q or β -arrestins 1 and 2 on the UII-, URP-, and synthetic wrotensinergic ligand-induced inhibition of hUT receptor-expressing HEK293 cell proliferation/survival. **A)** HEK293 cells transiently transfected with cDNA encoding *c-myc* (mock treatment) or *UT^{c-myc}* (receptor) were incubated for 24 h in the absence or presence of UII, URP, UII₄₋₁₁, [Orn⁸]UII, [Orn⁵]URP, and urantide (1 nM) and in the absence or the presence of the $G_{1/0}$ inhibitor PTX (20 μ g/ml) or the G_q inhibitor UBO-QIC (10⁻⁶ M) and counted using a Coulter counter. Left panel shows that neither PTX nor UBO-QIC affected survival of UT receptor-expressing HEK293 cells. **B)** HEK293 cells cotransfected with a control siRNA (si-Ctr) or a siRNA directed against the human β -arrestin 1 (si- β -Arr1), the human β -arrestin 2 (si- β -Arr2) or both. After 24 h, cells transiently transfected with cDNA encoding *c-myc* (mock treatment) or *UT^{c-myc}* (receptor) and with indicated si-RNA were incubated for 24 h in the absence or presence of UII, URP, UII₄₋₁₁, [Orn⁸]UII, [Orn⁵]URP, and urantide (1 nM). Bars represent means \pm *sem* obtained from ≥ 3 independent experiments conducted in triplicate. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. corresponding control; Mann-Whitney test with Dunnett posttest.

require either time, the coordinated action of several types of cells, or different receptor densities in native cells to occur. The timing of molecule binding may be of crucial importance, taking into account the fact that UII, and not URP (24), is considered to be an almost irreversible agonist (15), which suggests a role of the N-terminal sequence in the residence time of these peptides. Increased residence time of ligands alters receptor responses by inducing long-lasting action and different desensitization/internalization processes, surmounting competitive antagonist action, or overcoming clearance processes in tissues/organisms, leading to specific cellular or physiological responses (36). This might also apply to the biased peptides, and their residence time might have an impact on their biased signaling toward β -arrestins.

Interestingly, group 1 peptides had 5- to 10-fold more potent effects on β -arrestin coupling than on G-protein couplings (Fig. 8B). In contrast, group 2 peptides failed to recruit β -arrestins (Fig. 8A), although they engaged

the UT receptor in the activation of all G proteins, suggesting that group 2 peptides likely display a biased coupling to G proteins. This may explain some of the effects of [Orn⁸]UII, which displayed antagonistic properties in physiological rodent models, such as the rat aortic model (10, 12, 37) but conserved an agonist activity for calcium mobilization (10). Similarly, [Orn⁵]URP acted as an antagonist or an agonist (11, 23), depending on the cell model investigated. All of the determined EC₅₀ values for G-protein couplings of group 2 peptides were roughly a log order of magnitude higher than those of group 1 peptides (Fig. 8B), which may be related to a lower binding affinity and/or a lower G-protein coupling efficacy. In group 3, the urantide effect is even more complex. Indeed, urantide behaves mostly as a partial agonist, as its coupling efficacy is lower for all of the pathways than that of group 1 and 2 peptides (Fig. 8A). Urantide was first synthesized as an antagonist, a property that was clearly observed during β -arrestin recruitment (Supplemental

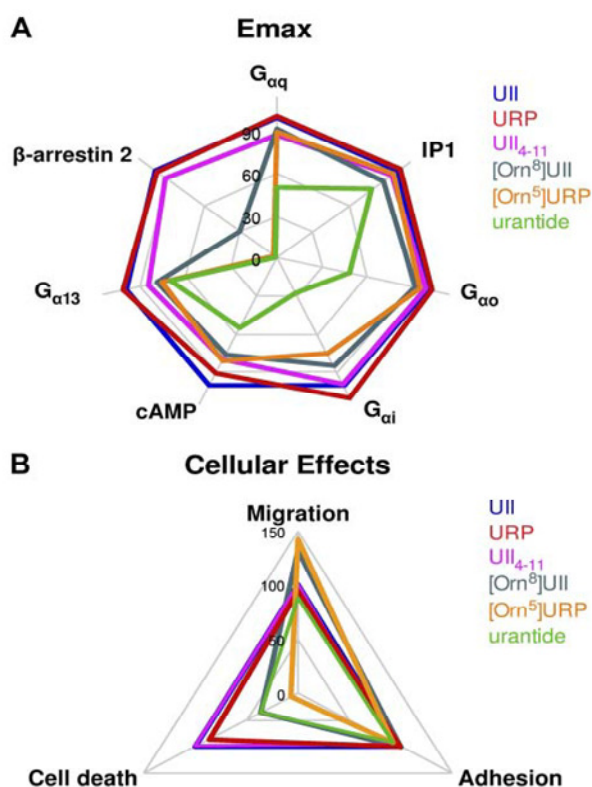


Figure 8. Recapitulative effects of U11 analogs on hUT receptor signaling. Radar graph representations summarizing the E_{max} of the different ligand-activated signaling pathways (A) or the ligand-induced cellular effects (B). Table 1 summarizes the pEC_{50} values of U11 and its analogs in the different signaling pathways.

Fig. S6). However, its partial agonism of all G-protein pathways means that it can act as either agonist or antagonist on these pathways, in contrast to reports showing its purely antagonistic properties (38). Moreover, although the other peptides displayed a similar or even a better EC_{50} value for G_o coupling than for G_i and G_q , urantide EC_{50} value for G_i (and to a lower extent its EC_{50} for G_q) was almost 10-fold lower than its EC_{50} value for G_o (Fig. 8B). These data indicate that urantide is biased, at least with respect to G_i and G_q vs. G_o and β -arrestin coupling. The majority of the biased ligands described in the literature distinguish between G-protein coupling vs. G-protein-independent signaling. Our results demonstrate that the UT receptor represents one example in which ligands can differentially favor one G-protein coupling over another.

We have not detected any signaling profile differences among U11, URP, and U11₄₋₁₁, indicating that the shorter sequences of URP and U11₄₋₁₁ did not affect their binding or coupling abilities. In contrast to the U11₅₋₁₁ peptide, which exhibited 200- to 1000-fold less efficiency (39), we showed that U11₄₋₁₁ is not only the minimal sequence required for biological activity but is also sufficient for full agonism. The signaling pattern induced by [Orn⁸]U11 and [Orn⁵]URP revealed that Lys is a key determinant of G-protein-independent UT

receptor signaling, the second phase of ERK1/2 phosphorylation, and receptor internalization, in addition to its known importance for receptor recognition and activation (23). The three supplementary substitutions in the cyclic sequence of urantide enable the peptide to achieve high affinity and biased activity, notably on G_i vs. G_o coupling. Indeed, we propose that the β -arrestin- and G-protein-biased profile is supported by the Lys⁸ to Orn⁸ substitution and that the affinity is enforced by the replacement of Cys³ with Pen³ because this substitution in U11₄₋₁₁ (P5U ligand) led to it acting as a super agonist. As a consequence, we suspect that Lys⁸, which at least partially contacts residues within transmembrane domains III and VII, plays a key role in the recruitment of β -arrestins and is a key determinant of the biased UT receptor signaling pathway. This hypothesis is supported by recent NMR studies examining β 2-adrenergic-receptor coupling, which suggested that the biased G-protein-independent β -arrestin pathway mainly involved helix VII (40). This opens the possibility of utilizing new strategies for the rational drug design of biased ligands for GPCRs.

The signaling profiles induced by the peptides dictate the integration of their signaling into cellular events, as observed for migration/adhesion and cell survival. The ligands tested induced cell migration and cell adhesion with similar intensities, indicating that they share pathways required for this effect. This finding fits with the involvement of the Rho/ROCK signaling pathway in UT receptor-induced cell migration and is likely related to the engagement of the G_{13} or G_q pathways (30). Only group 1 ligands U11, URP, and U11₄₋₁₁ reduced HEK293 cell numbers by decreasing cell proliferation or survival and/or increasing cell mortality, as suggested by the increase in annexin V labeling. Of note, the measured urotensinergic mitogenic effects may involve UT receptor-dependent ERK activation (17). One can speculate that β -arrestin recruitment and signaling play a role in these differential effects through its involvement in regulating MAPK, leading to apoptosis and cell death. But interestingly, alternative or simultaneous down-regulation of β -arrestins 1 and 2 did not prevent the U11, URP, and U11₄₋₁₁ ligand-induced cell death. The observed specific G_q involvement in this phenomenon opens a new level of complexity in the UT receptor-biased signaling pathways. It can be proposed that the second phase of the ERK activation also integrates two different routes. The first one would involve UT receptor internalization, β -arrestins recruited fully by U11, URP, and U11₄₋₁₁ and partially by [Orn⁸]U11. A second one would borrow an unidentified coupling cascade, possibly relayed by a G_o -dependent protein recruited fully by U11, URP, and U11₄₋₁₁, and partially probably by urantide, and which might lead to apoptosis. Accordingly, the GnRH receptor has been shown to couple to G_q , leading to inhibition of cell growth (41); the somatostatin receptor 2 might induce ERK activation through the G_q -like G_{14} protein (42), or muscarinic receptors can activate ERK5 phosphorylation in a β -arrestin-independent pathway (43), but no clear mechanism demonstrating a GPCR-coupled G_q /ERK/apoptosis in a β -arrestin-independent pathway has been described up to now.

Our study reinforces reports that attempted to link biased molecular mechanisms to cellular events (2), revealing the role of such mechanisms in regulating cellular processes. Biased agonism might control not only the G-protein *vs.* β -arrestin pathways but also selective G-protein pathways, indicating that biased agonism is even more complex than previously envisaged and increases the modes that control receptor-induced cellular responses, especially for receptors with a wide coupling spectrum, such as the UT receptor. This finding supports the recently reported biased ligands that selectively engaged β -arrestin conformations, enabling phenotypic switching from migration to proliferation (2).

Our work highlights the UT receptor pleiotropic behavior on activation by two endogenous ligands, UII and URP, as well as by synthetic peptides. The main novel findings reside in the demonstration that the UT receptor couples to G_i , G_o , G_q , and G_{13} , but not G_s proteins, and β -arrestin recruitment and internalization mechanisms; Lys⁸ of UII plays a key role in UT receptor- β -arrestin-biased signaling; biased activity between different G proteins exists; and a correlation exists between ligand-induced UT receptor signaling profiles and selective cell responses. The urotensinergic system has been linked to numerous pathophysiological states, including hypertension, atherosclerosis, heart failure, pulmonary hypertension, preeclampsia, diabetes, and renal or liver disease. Due to the unpredictable effects observed with urotensin ligands in the past, further research into this system's behavior using various ligand types will be greatly useful. **[F]**

The authors thank J. C. Bologna and M. Quilès, who set up the β -arrestin experiments, and J. C. Bologna, who taught C.B. the BRET technique. The authors also thank C. Hounsou for help with the experiments measuring the inhibition of cAMP production using the V2 receptor cotransfection method and C. Lecointre for technical assistance and experimental help for cell adhesion, migration, and proliferation assays. The authors also acknowledge Claire Vol, Odile Lecha, and Marion Vereecke for their technical help. The G_i , G_o , IPI, cAMP, β -arrestin, internalization, and ERK functional experiments were performed using the Arpege Pharmacology Screening Interactome platform facility at the Institut de Génomique Fonctionnelle (Montpellier, France). L.P.'s team was Equipe Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) DEQ20130326522. H.C. and J.E.J. were supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the University of Rouen, and Agence Nationale de la Recherche (ANR) Chemot-x ProG. C.B., N.P., and R.L. were supported by a Canadian Institute of Health Research (CIHR) grant. R.L., H.C., and L.P. are equal lead authors.

REFERENCES

1. Kenakin, T., and Christopoulos, A. (2013) Measurements of ligand bias and functional affinity. *Nat. Rev. Drug Discov.* **12**, 483
2. Zimmerman, B., Beaurait, A., Aguila, B., Charles, R., Escher, E., Claing, A., Bouvier, M., and Laporte, S. A. (2012) Differential beta-arrestin-dependent conformational signaling and cellular responses revealed by angiotensin analogs. *Sci. Signal* **5**, ra33
3. Sugo, T., Murakami, Y., Shimomura, Y., Harada, M., Abe, M., Ishibashi, Y., Kitada, C., Miyajima, N., Suzuki, N., Mori, M., and Fujino, M. (2003) Identification of urotensin II-related peptide

as the urotensin II-immunoreactive molecule in the rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **310**, 860–868

4. Ames, R. S., Sarau, H. M., Chambers, J. K., Willette, R. N., Aiyar, N. V., Romanic, A. M., Loudon, C. S., Foley, J. J., Sauermelch, C. F., Coatney, R. W., Ao, Z., Disa, J., Holmes, S. D., Stadel, J. M., Martin, J. D., Liu, W. S., Glover, G. I., Wilson, S., McNulty, D. E., Ellis, C. E., Elshourbagy, N. A., Shabon, U., Trill, J. J., Hay, D. W., Ohlstein, E. H., Bergsma, D. J., and Douglas, S. A. (1999) Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. *Nature* **401**, 282–286
5. Ong, K. L., Lam, K. S., and Cheung, B. M. (2005) Urotensin II: its function in health and its role in disease. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **19**, 65–75
6. Katano, Y., Ishihata, A., Aita, T., Ogaki, T., and Horie, T. (2000) Vasodilator effect of urotensin II, one of the most potent vasoconstricting factors, on rat coronary arteries. *Eur. J. Pharmacol.* **402**, R5–7
7. MacLean, M. R., Alexander, D., Stürat, A., Gallagher, M., Douglas, S. A., Ohlstein, E. H., Morecroft, I., and Pollard, K. (2000) Contractile responses to human urotensin-II in rat and human pulmonary arteries: effect of endothelial factors and chronic hypoxia in the rat. *Br. J. Pharmacol.* **130**, 201–204
8. Douglas, S. A. (2003) Human urotensin-II as a novel cardiovascular target: 'heart' of the matter or simply a fishy 'tail'? *Curr. Opin. Pharmacol.* **3**, 159–167
9. Leprince, J., Chatenet, D., Dubessy, C., Fournier, A., Pfeiffer, B., Scalbert, E., Renard, P., Pacaud, P., Oulyadi, H., Segalas-Milazzo, I., Guilhaudis, L., Davoust, D., Tonon, M. C., and Vaudry, H. (2008) Structure-activity relationships of urotensin II and URP. *Peptides* **29**, 658–673
10. Camarda, V., Guerrini, R., Kostenis, E., Rizzi, A., Calo, G., Hattenberger, A., Zucchini, M., Salvadori, S., and Regoli, D. (2002) A new ligand for the urotensin II receptor. *Br. J. Pharmacol.* **137**, 311–314
11. Chatenet, D., Dubessy, C., Leprince, J., Boullaran, C., Carlier, L., Segalas-Milazzo, I., Guilhaudis, L., Oulyadi, H., Davoust, D., Scalbert, E., Pfeiffer, B., Renard, P., Tonon, M. C., Lihmann, I., Pacaud, P., and Vaudry, H. (2004) Structure-activity relationships and structural conformation of a novel urotensin II-related peptide. *Peptides* **25**, 1819–1830
12. Vergura, R., Camarda, V., Rizzi, A., Spagnoli, M., Guerrini, R., Calo, G., Salvadori, S., and Regoli, D. (2004) Urotensin II stimulates plasma extravasation in mice via UT receptor activation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **370**, 347–352
13. Sidharta, P. N., Rave, K., Heinemann, L., Chiassi, E., Krahenbuhl, S., and Dingemans, J. (2009) Effect of the urotensin-II receptor antagonist palosuran on secretion of and sensitivity to insulin in patients with Type 2 diabetes mellitus. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **68**, 502–510
14. Portnoy, A., Kumar, S., Behm, D. J., Mahar, K. M., Noble, R. B., Throup, J. P., and Russ, S. F. (2013) Effects of urotensin II receptor antagonist, GSK1440115, in asthma. *Front. Pharmacol.* **4**, 54
15. Castel, H., Diallo, M., Chatenet, D., Leprince, J., Desrues, L., Schouft, M. T., Fontaine, M., Dubessy, C., Lihmann, I., Scalbert, E., Malagon, M., Vaudry, H., Tonon, M. C., and Gandolfo, P. (2006) Biochemical and functional characterization of high-affinity urotensin II receptors in rat cortical astrocytes. *J. Neurochem.* **99**, 582–595
16. Douglas, S. A., Naselsky, D., Ao, Z., Disa, J., Herold, C. L., Lynch, F., and Aiyar, N. V. (2004) Identification and pharmacological characterization of native, functional human urotensin-II receptors in rhabdomyosarcoma cell lines. *Br. J. Pharmacol.* **142**, 921–932
17. Ziltener, P., Mueller, C., Haenig, B., Scherz, M. W., and Nayler, O. (2002) Urotensin II mediates ERK1/2 phosphorylation and proliferation in GPR14-transfected cell lines. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* **22**, 155–168
18. Sauzeau, V., Le Mellionec, E., Bertoglio, J., Scalbert, E., Pacaud, P., and Loirand, G. (2001) Human urotensin II-induced contraction and arterial smooth muscle cell proliferation are mediated by RhoA and Rho-kinase. *Circ. Res.* **88**, 1102–1104
19. Ayoub, M. A., Damian, M., Gerspach, C., Ferrandis, E., Lavergne, O., De Wever, O., Baneres, J. L., Pin, J. P., and Prevost, G. P. (2009) Inhibition of heterotrimeric G-protein signaling by a small molecule acting on Galpha subunit. *J. Biol. Chem.* **284**, 29136–29145

20. Rives, M. L., Vol, C., Fukazawa, Y., Tinel, N., Trinquet, E., Ayoub, M. A., Shigemoto, R., Pin, J. P., and Prezeau, L. (2009) Crosstalk between GABA(B) and mGluR receptors reveals new insight into GPCR signal integration. *EMBO J.* **28**, 2195–2208
21. Tzanidis, A., Hannan, R. D., Thomas, W. G., Onan, D., Autelitano, D. J., See, F., Kelly, D. J., Gilbert, R. E., and Krum, H. (2003) Direct actions of urotensin II on the heart: implications for cardiac fibrosis and hypertrophy. *Circ. Res.* **93**, 246–253
22. Holleran, B. J., Domazet, I., Beaulieu, M. E., Yan, L. P., Guillemette, G., Lavigne, P., Escher, E., and Leduc, R. (2009) Identification of transmembrane domain 6 & 7 residues that contribute to the binding pocket of the urotensin II receptor. *Biochem. Pharmacol.* **77**, 1374–1382
23. Desrues, L., Lefebvre, T., Lecointre, C., Schouff, M. T., LepPrince, J., Compere, V., Morin, F., Proust, F., Gandolfo, P., Tonon, M. C., and Castel, H. (2012) Down-regulation of GABA(A) receptor via promiscuity with the vasoactive peptide urotensin II receptor. Potential involvement in astrocyte plasticity. *PLoS One* **7**, e36319
24. Jarry, M., Diallo, M., Lecointre, C., Desrues, L., Tokay, T., Chatenet, D., LepPrince, J., Rossi, O., Vaudry, H., Tonon, M. C., Prézeau, L., Castel, H., and Gandolfo, P. (2010) The vasoactive peptides urotensin II-related peptide regulate astrocyte activity through common and distinct mechanisms: involvement in cell proliferation. *Biochem. J.* **428**, 113–124
25. Maurel, D., Comps-Agrar, L., Brock, C., Rives, M. L., Bourrier, E., Ayoub, M. A., Bazin, H., Tinel, N., Durroux, T., Prezeau, L., Trinquet, E., and Pin, J. P. (2008) Cell-surface protein-protein interaction analysis with time-resolved FRET and snap-tag technologies: application to GPCR oligomerization. *Nat. Methods* **5**, 561–567
26. Alvarez-Curto, E., Prihandoko, R., Tautermann, C. S., Zwier, J. M., Pediani, J. D., Lohse, M. J., Hoffmann, C., Tobin, A. B., and Milligan, G. (2011) Developing chemical genetic approaches to explore G protein-coupled receptor function: validation of the use of a receptor activated solely by synthetic ligand (RASSL). *Mol. Pharmacol.* **80**, 1033–1046
27. Proulx, C. D., Simaan, M., Escher, E., Laporte, S. A., Guillemette, G., and Leduc, R. (2005) Involvement of a cytoplasmic tail serine cluster in urotensin II receptor internalization. *Biochem. J.* **385**, 115–123
28. Holleran, B. J., Beaulieu, M. E., Proulx, C. D., Lavigne, P., Escher, E., and Leduc, R. (2007) Photolabelling the urotensin II receptor reveals distinct agonist- and partial-agonist-binding sites. *Biochem. J.* **402**, 51–61
29. Cagnol, S., and Chambard, J. C. (2010) ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death–apoptosis, autophagy and senescence. *FEBS J.* **277**, 2–21
30. Segain, J. P., Rolli-Derkinderen, M., Gervois, N., Raingeard de la Bletiere, D., Loirand, G., and Pacaud, P. (2007) Urotensin II is a new chemotactic factor for UT receptor-expressing monocytes. *J. Immunol.* **179**, 901–909
31. Yi, K., Yu, M., Wu, L., and Tan, X. (2012) Effects of urotensin II on functional activity of late endothelial progenitor cells. *Peptides* **33**, 87–91
32. Zhang, Y. G., Li, J., Li, Y. G., and Wei, R. H. (2008) Urotensin II induces phenotypic differentiation, migration, and collagen synthesis of adventitial fibroblasts from rat aorta. *J. Hypertens.* **26**, 1119–1126
33. Grieco, P., Franco, R., Bozzuto, G., Toccaceli, L., Sgambato, A., Marra, M., Zappavigna, S., Migaldi, M., Rossi, G., Striano, S., Marra, L., Gallo, L., Cittadini, A., Bouti, G., Novellino, E., Molinari, A., Budillon, A., and Caraglia, M. (2011) Urotensin II receptor predicts the clinical outcome of prostate cancer patients and is involved in the regulation of motility of prostate adenocarcinoma cells. *J. Cell. Biochem.* **112**, 341–353
34. Rossowski, W. J., Cheng, B. L., Taylor, J. E., Datta, R., and Coy, D. H. (2002) Human urotensin II-induced aorta ring contractions are mediated by protein kinase C, tyrosine kinases and Rho-kinase: inhibition by somatostatin receptor antagonists. *Eur. J. Pharmacol.* **438**, 159–170
35. Ross, B., McKendry, K., and Giaid, A. (2010) Role of urotensin II in health and disease. *Am. J. Physiol.* **298**, R1156–R1172
36. Guo, D., Mulder-Krieger, T., AP, I. J., and Heitman, L. H. (2012) Functional efficacy of adenosine A(2)A receptor agonists is positively correlated to their receptor residence time. *Br. J. Pharmacol.* **166**, 1846–1859
37. Guerrini, R., Camarda, V., Marzola, E., Arduin, M., Calo, G., Spagnol, M., Rizzi, A., Salvadori, S., and Regoli, D. (2005) Structure-activity relationship study on human urotensin II. *J. Peptide Sci.* **11**, 85–90
38. Song, W., McDonald, J., Camarda, V., Calo, G., Guerrini, R., Marzola, E., Thompson, J. P., Rowbotham, D. J., and Lambert, D. G. (2006) Cell and tissue responses of a range of Urotensin II analogs at cloned and native urotensin II receptors. Evidence for coupling promiscuity. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **373**, 148–157
39. Labarrere, P., Chatenet, D., LepPrince, J., Marionneau, C., Loirand, G., Tonon, M. C., Dubessy, C., Scalbert, E., Pfeiffer, B., Renard, P., Calas, B., Pacaud, P., and Vaudry, H. (2003) Structure-activity relationships of human urotensin II and related analogues on rat aortic ring contraction. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **18**, 77–88
40. Liu, J. J., Horst, R., Katritch, V., Stevens, R. C., and Wuthrich, K. (2012) Biased signaling pathways in beta2-adrenergic receptor characterized by 19F-NMR. *Science* **335**, 1106–1110
41. White, C. D., Coetsee, M., Morgan, K., Flanagan, C. A., Millar, R. P., and Lu, Z. L. (2008) A crucial role for Galphq/11, but not Galphai/o or Galphas, in gonadotropin-releasing hormone receptor-mediated cell growth inhibition. *Mol. Endocrinol.* **22**, 2520–2530
42. Liu, A. M., and Wong, Y. H. (2005) Activation of nuclear factor [kappa]B by somatostatin type 2 receptor in pancreatic acinar AR42J cells involves G[alpha]14 and multiple signaling components: a mechanism requiring protein kinase C, calmodulin-dependent kinase II, ERK, and c-Src. *J. Biol. Chem.* **280**, 34617–34625
43. Sanchez-Fernandez, G., Cabezudo, S., Garcia-Hoz, C., Tobin, A. B., Mayor, F., Jr., and Ribas, C. (2013) ERK5 activation by Gq-coupled muscarinic receptors is independent of receptor internalization and beta-arrestin recruitment. *PLoS One* **8**, e84174

Received for publication January 20, 2014.
Accepted for publication August 18, 2014.

Supplementary Materials and Methods

NFκB assay

NFκB activation in HEK293 cells expressing the hUT receptor was monitored using Perkin Elmer's AlphaScreen SureFire assay. Briefly, cells were seeded in 96 well plates (5×10^4 cells). Five hours later, the cells were serum-starved overnight. The cells were then stimulated for 15 min with 1 μM UII or UII analogs. Then, the stimulation medium was removed, and the cells were lysed in 75 μl of lysis buffer. The cells were incubated at room temperature on a plate shaker for 10 min. Five microliters of lysate was used for the analyses. The readings were performed on a Perkin Elmer EnSpire 2300 multilabel reader.

ELISA assay

Receptor HA-tagged expression was measured using a classical ELISA protocol. Briefly, the cells were transiently transfected with 20 ng of corresponding cDNA encoding the receptor. After 24 hours, the cells were fixed with 4% PFA and permeabilized with 0.5% PBS + Tween. Then, the cells were blocked for 1 hour with 0.5% PBS + Tween + 1% SBF and incubated during a 1 hour period with an antibody that had been raised against HA and was HRP-coupled, which was diluted to 500 in blocking buffer. After 3 washes, expression was revealed using ECL and measured on a TECAN Infinite F500.

Western blotting

Cell lysates were prepared in ice-cold Lysis Buffer (20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% NP40, 1X protease and/or phosphatase inhibitor cocktails), mixed with Laemmli buffer and loaded onto 10% SDS-PAGE gel. Proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane. Membranes were blocked with 2% nonfat milk with the primary β-arrestin 1 or 2 and the anti-actin (Abcam) antibodies, overnight at 4°C, then with HRP-conjugated secondary antibodies (Santa-Cruz) for 2h at RT.

Supplementary Figure Legends

Supplementary Figure S1: Control of IP1 and BRET $G_{i/o}$ assay with the V2 receptor. A and B: In HEK293 cells transiently transfected with HA-tagged-hUT or -hV2 receptor encoding vectors or with the empty vector (mock), receptor cell surface expression was

assessed using anti-AH epitope ELISA (A), and IP1 production was estimated after a 20 min incubation with UII (1 μ M) or VP (1 μ M) (B), as described in Fig. 1B. Each bar corresponds to the mean \pm SEM obtained from at least 3 independent experiments conducted in triplicate. C, D, E, and F: $G_{\alpha i}$ (D) or $G_{\alpha o}$ (F) protein BRET signal (as described in Figs. 1C and E), induced by either UII (1 μ M) or VP (1 μ M), was assessed in HEK293 cells transiently transfected with hUT or hV2 receptor encoding vectors or the empty vector (mock). In parallel, ELISA anti-HA was performed under the same conditions for each of the two BRET assays (C and E). Each bar corresponds to the mean \pm SEM obtained from at least 3 independent experiments conducted in triplicate. * $p < 0.05$ compared to the UII pEC_{50} .

Supplementary Figure S2: Inhibition of the coupling of the hUT receptor to $G_{\alpha q}$ and $G_{\alpha i}$ using specific pathway inhibitors. A: IP1 production induced by UII or its peptide analogs, in HEK293 cells transiently expressing the hUT receptor (as described in Fig. 1B) was inhibited by pre-incubation for 4 hours with the PLC inhibitor U73122 but not by the inactive analog U73343. The data are normalized to the maximum effects of UII. B: $G_{\alpha i}$ protein BRET signal (as described in Fig. 1C), induced by UII or its peptide analogs (1 μ M), was inhibited by pre-incubation with PTX (300 nm/ml) for 12 hours. The data are normalized to the maximum effects of UII. Each bar corresponds to the mean \pm SEM obtained from at least 3 independent experiments conducted in triplicate.

Supplementary Figure S3: Western blotting. A. Western blot using anti β -arrestin 1&2 and anti-actin antibodies on HEK293 cells lysate, after transfection of cells with or without CTRL siRNA or Arr1&2 siRNAs. B. Quantification of the western blotting signal.

Supplementary Figure S4: UT receptor expression in HEK293 cells treated or not with CTRL or β -Arr1&2 siRNAs. UT receptor expression was determined as described in Supplementary Figure S1.

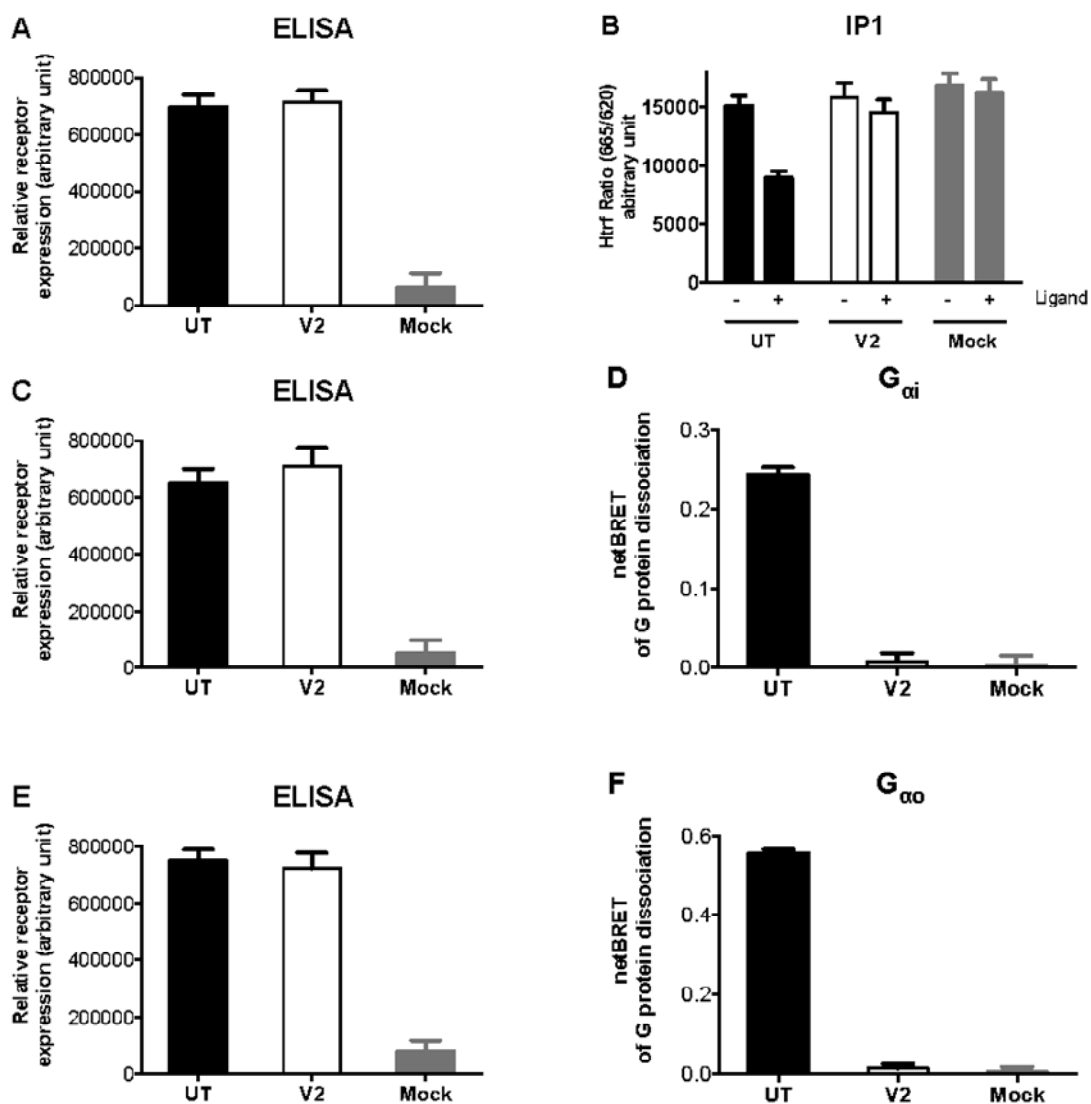
Supplementary Figure S5: NF κ B activation by UII and its peptide analogs. NF κ B activation was measured using a commercially available kit assay, as described in the Supp. M&M section, in HEK293 cells transiently expressing the hUT receptor. The hUT receptor was activated by UII or its peptide analogs. The data are normalized to the maximum effects of UII. Each bar corresponds to the mean \pm SEM obtained from at least 3 independent experiments conducted in triplicate.

Supplementary Figure 6: BRET assay of UII analog-induced β -arrestin-2 recruitment.

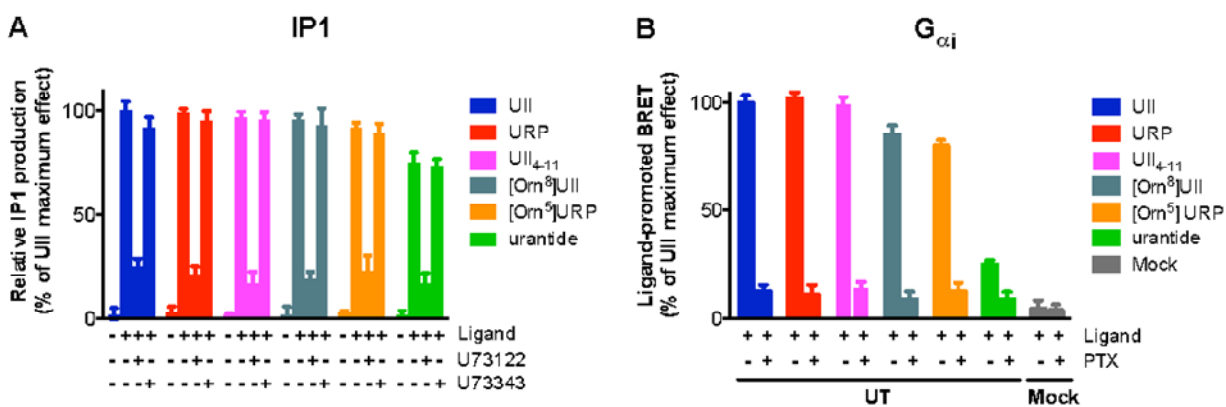
BRET assay signal in HEK293 cells transiently expressing the hUT receptor, as described in Fig. 2. A: Kinetics of the BRET signal in cells stimulated by 1 μ M UII or its peptide analogs (S, at 3 min). The data are normalized to the UII maximum response. The kinetics data are representative traces performed three times in parallel, all of which were repeated in three independent experiments. B: Concentration-response curves for UII-mediated β -arrestin-2 recruitment in the absence or presence of urantide (10 μ M) pre-incubation for 10 min, as described in the Supp. M&M section. Each point was read 7 min after stimulation and normalized to the maximum effects of UII. Each curve represents the mean \pm SEM of at least three independent dose-response experiments performed in triplicate.

Supplemental Data

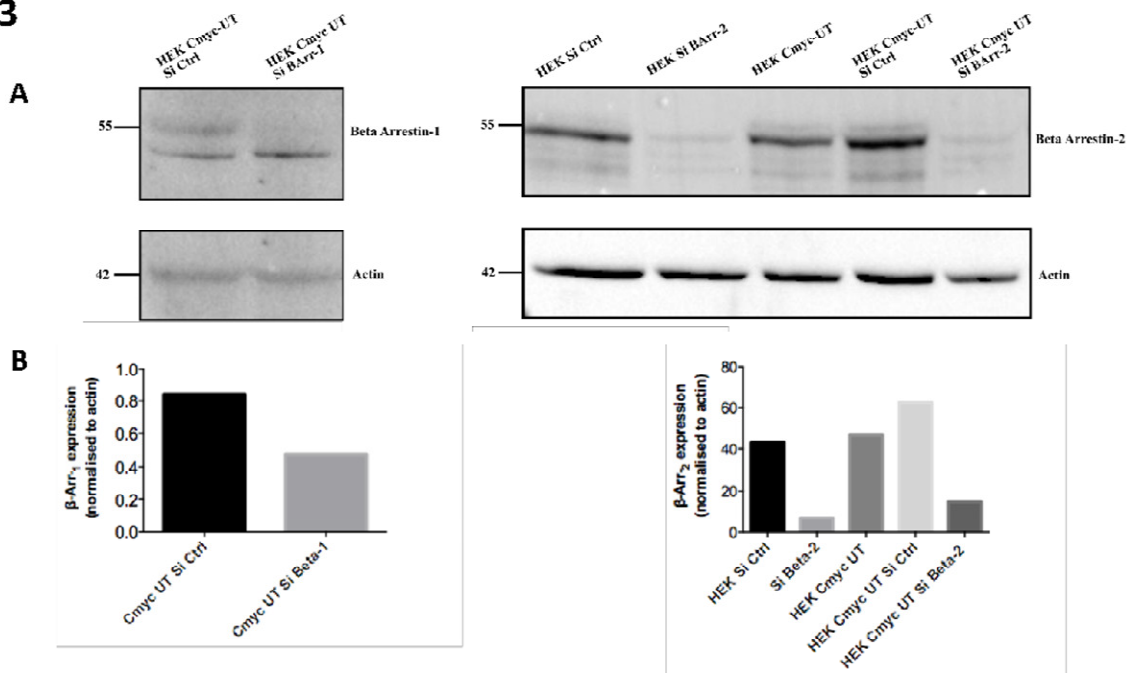
S1



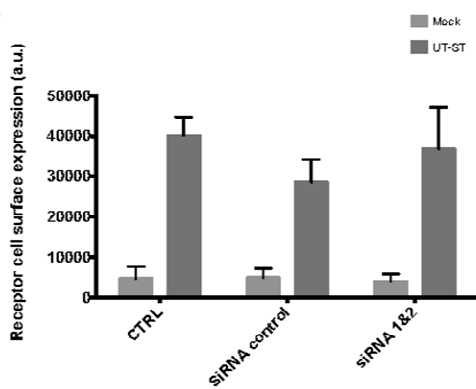
S2



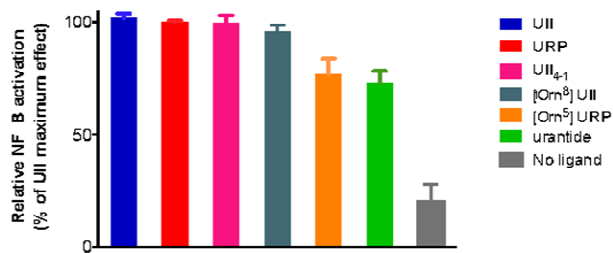
S3



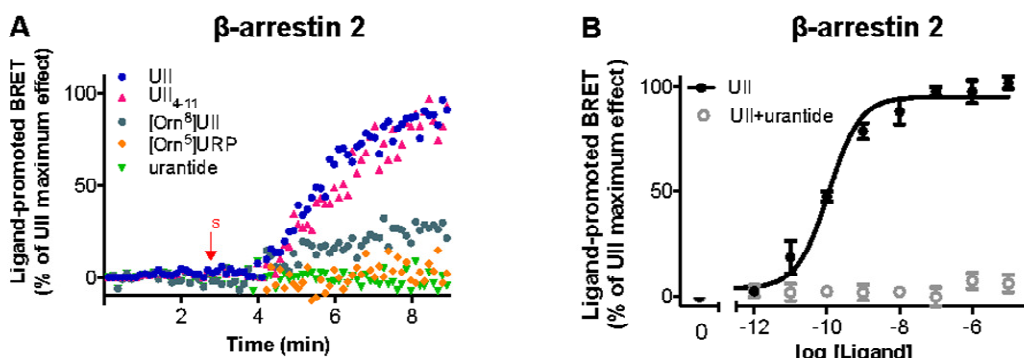
S4



S5



S6



Partie 2

A key evolutionary proline position - P2.58 - in G protein-coupled receptor controls adhesion and cell polarization during chemotaxis

Les résultats obtenus dans la première partie de ce travail de thèse permettent, en outre de montrer que le peptide UII présente les caractéristiques d'une chimiokine peptidique capable, *via* l'activation d'un récepteur unique, le récepteur UT, de stimuler les voies de couplages G_q mais aussi $G_{i/o}$ et G_{13} , importantes (Lecointre *et al.*, 2015, Annexe) dans la migration chimiotactique et les mécanismes d'adhésion cellulaire. Cette migration directionnelle chimiotactique implique en effet des étapes essentielles, la chimiosensibilité au gradient, la motilité et mais surtout la polarité cellulaire. Cette capacité migratoire directionnelle est essentielle pour un certain nombre de processus physiologique et pathologique, comme l'embryogenèse, le développement du système nerveux central, la réponse inflammatoire, l'angiogenèse ou les métastases et l'invasion des cellules cancéreuses.

Une des questions actuelles est encore de savoir comment les RCPGs peuvent détecter des gradients de concentration de ligands pour coupler les protéines $G\alpha\beta\gamma$ et contrôler de façon spatio-temporelle, en sélectionnant des voies de signalisation, les mécanismes d'adhésion et de contraction, qui conduisent au chimiotactisme. Nous abordons ici cette question sous un angle évolutif et postulons que la déletion ancestrale dans le DTM2 de RCPGs appartenant au groupe récepteurs PEP (Kiss1R) et présentant pour une majorité une proline en 2.59, provoque un repositionnement de cette proline en 2.58 chez les récepteurs du groupe G1 SO (dont l'UT) ou CHEM (tels que CXCR4). Ces récepteurs avec les autres récepteurs de ce groupe, sont bien connus pour leurs propriétés chimiotactiques. Ici, nous avons cherché à mieux comprendre le rôle de la P2.58, responsable d'une structure en coude du DTM2, par mutation unique de cette Pro en Ala ou insertion/délétion d'un codon dans les récepteurs Kiss1R, UT et CXCR4, dans les couplages et la polarisation cellulaire nécessaires au chimiotactisme.

Nous avons dans un modèle de cellules HEK293 recombinantes exprimant les récepteurs sauvages Kiss1R-P2.59, UT-P2.58 et CXCR4-P2.58 ou mutés Δ Kiss1R-P2.59A, Δ Kiss1R-P2.58, Δ UT-P2.58A, Δ UT-P2.59, Δ CXCR4-P2.58A, Δ CXCR4-P2.59, posé les questions suivantes :

- ◆ Quels sont les différentes voies de couplage associées aux récepteurs sauvages Kiss1R-P2.59 et UT-P2.58 ou CXCR4-P2.58, et quels sont leur rôle dans les mécanismes de migration/motilité et migration chimiotactique impliquant l'adhésion cellulaire?
- ◆ Peut-on envisager une compétence particulière des récepteurs P2.58, permettant la régulation dynamique de l'assemblage et désassemblage des points focaux d'adhésion ?
- ◆ Quelles peuvent-être les conséquences en terme structurale et moléculaire d'une délétion ou d'une insertion dans le DTM2, permettant le repositionnement de la Pro et les effets sur les couplages et la migration cellulaire ?

A key evolutionary proline position - P2.58 - in G protein-coupled receptors
controls adhesion and cell polarization during chemotaxis

Jane-Eileen Joubert^{1,2}, Laurence Desrues^{1,2}, Pierre-Michael Coly^{1,2}, Alexandre Mutel^{1,2},
Céline Lecointre^{1,2}, Nicolas Perzo¹, Laure Guilhaudis^{2,3}, Isabelle Milazzo^{2,3}, Pierrick
Gandolfo^{1,2}, Fabrice Morin^{1,2}, Laurent Prézeau⁴, Marie Chabbert⁵ and Hélène Castel^{1,2,*}

¹Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM, DC2N, 76000 Rouen, France

²Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), 76000 Rouen, France

³Normandie Univ, UNIROUEN, CNRS, COBRA, 76000 Rouen, France

⁴IGF, Institut of Functional Genomic, CNRS UMR 5203, Inserm U661, University of
Montpellier 1 and 2, Montpellier, France.

⁵UMR CNRS 6214, Inserm 1083, Faculté de Médecine 3, Angers, France.

Running title: Conserved proline in TM2 for chemotactic GPCR function

Key Words: GPCR, UT, Kiss1R, CXCR4, coupling, migration, adhesion, mutation

*Address for correspondence: Hélène Castel, Inserm U982, Laboratory of Neuronal and
Neuroendocrine Communication and Differentiation, DC2N, Astrocyte and Vascular Niche,
Biomedical Research Institute (IRIB), Université de Rouen Normandie, 76821 Mont-Saint-
Aignan, France

Tel: (33) 235-14-6630; Fax: (33) 235-14-6946.

E-mail: helene.castel@univ-rouen.fr;

Manuscript word count: 17,000 words

8 Figures and 5 Tables

Supplementary Information and 5 Supplementary figures

Abstract

Chemotaxis is currently known as the fundamental phenomenon highly conserved from bacteria to eukaryotic cells, implying cell directed migration along an extracellular chemical gradient whereas chemokinesis results from the stimulation of random cell migration in response to extracellular cues. G protein-coupled receptors (GPCRs) show the ability to detect variable small peptides or chemokine to direct chemotactic cell migration. An outstanding issue is how GPCR machinery may sense gradients of molecular ligands to couple $G\alpha\beta\gamma$ proteins and control in a spatiotemporal way, signaling events leading to chemotaxis.

We address this issue under an evolutionary angle and postulate that the ancestral deletion in TM2 of GPCR belonging to the PEP receptor group (Kiss1R) exhibiting, for most of them, a proline in 2.59, likely yields a repositioning of this proline in 2.58 of SO (urotensine II (UII)/UT) or CHEM (SDF-1 α /CXCR4) receptors, for most of them well known for their chemotactic behaviour. Here, we aimed to provide a better understanding of the role of P2.58 in UT and CXCR4 in chemotactic-induced mechanisms, by engineering the P2.59 prototype Kiss1R and the two P2.58 UT and CXCR4 receptors by single mutation of Pro to Ala or insertion/deletion to reposition the Pro.

We showed that wild-type and mutant Kiss1R, UT and CXCR4 expressed in HEK293 cells conserved expression levels and for most, binding capacities. The P2.58 UT and CXCR4 receptors activated by UII and SDF-1 α , exhibited $G_q/Ca^{2+}/IP_1$ and $G_{i/o}$ couplings and stimulated chemotactic migration *via* dynamic wave of assembly/disassembly of focal adhesions (FAs) associated with the selection of one prominent lamellipodia. In contrast, activation of the P2.59 Kiss1R receptor by Kisspeptin (KP-10) evoked $G_q/Ca^{2+}/IP_1$ couplings, and random migration through uncontrolled disassembly of FAs and production of many lamellipodia per cells. Single mutation or insertion/deletion mainly led to loss of G_q and/or G_{i1} and $G_{o\alpha}$ coupling capacities, establishing the key role of the proline in TM2 of Kiss1R, UT and CXCR4 in receptor activation, and showing that P2.59 to P2.58 repositioning likely plays a role in receptor re-sensitization, determinant for regulation of FAs assembly/disassembly and reduction of the number of lamellipodia.

Thus, we propose that P2.58 receptors expanding during evolution, acquired a key competence to favor cell chemotactic migration under external ligand signals. This would be associated with a dynamic of receptor desensitization/resensitization and localized adhesion-de-adhesion waves, selecting protrusions necessary for cell directed migration.

Introduction

Chemotaxis is currently known as the fundamental phenomenon highly conserved from bacteria to eukaryotic cells, implying cell directed migration along an extracellular chemical gradient (Artemenko *et al.*, 2014; Roussos *et al.*, 2011; Pierce *et al.*, 2010) whereas chemokinesis results from the stimulation of cell migration without clear directionality in response to symmetric or asymmetric extracellular cues leading to random migration (Petri *et al.*, 2009). This chemotactic directional migration involves three main steps consisting in gradient chemosensing, motility and mainly polarity (Swaney *et al.*, 2010). This ability is essential for a number of physiological and pathological processes including embryogenesis and wiring of the central nervous system (Theveneau *et al.*, 2012; Richardson *et al.*, 2010), the immune system inflammatory response (Sadik *et al.*, 2012), angiogenesis and cancer cell metastasis and invasion (Roussos *et al.*, 2011; Bravo-Cordero *et al.*, 2011).

It was first proposed that a local activation of the PI₃K induces local accumulation of PIP₃, stimulating guanine nucleotide-exchange factor GEF proteins leading to the recruitment of the active forms of the Rac and Cdc42 GTPases (Van Keymeulen *et al.*, 2006). These Rac and Cdc42 would allow the establishment of an intracellular molecular gradient leading to disequilibrium between the front and the rear of the cells (Jin *et al.*, 2000). Then Rac may catalyze the polymerization of actin, protrusion at the front edge of the cell and allow through a positive feedback, an accumulation of PIP₃. Cdc42 stabilizes the polarization by acting stabilizing microtubules whereas PTEN and myosin likely localize at the rear of the cell (Funamoto *et al.*, 2002; Lijima and Devreotes, 2002). During the extension of the lamellipodia at the polarized cell front, newborn adhesions (short half-life, 0.2 μm^2) corresponding to integrin aggregation and recruitment of actin, the focal adhesion kinase (FAK), talin and paxillin (Choi *et al.*, 2008) can evolve towards either disassembly, or a Rho-GTase-dependent formation of larger focal complexes (vinculin association, 1 μm^2) or mature focal adhesions (FA, α -actinin association) larger than 2 μm , during the directional migration (Choi, 2011; Lawson, 2012).

Intriguingly, even in the absence of stimulation, the cortical cytoskeleton of the chemotactic cell model *Dictyostelium* amoebae or human neutrophils display constitutive excitability which possibly underlies cell morphological changes and motility (Weiner *et al.*, 2007). It is indeed proposed that cell motility results from coupling of intrinsic signal transduction excitable networks and a cytoskeletal oscillatory network, and various guidance cues that modulate the threshold for triggering signal transduction events, integrated to control and direct the mode of migration (Xiong *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2013). Thus,

understanding how extracellular cues are integrated to regulate directional migration remains challenging.

While chemotaxis is a well conserved process, a wide variety of molecules, from small chemicals as cAMP to proteins, can act as chemoattractants (Artemenko *et al.*, 2014). Many of them were shown to bind membrane G protein-coupled receptors (GPCRs) such as the cAR1 specific of cAMP in *Dictyostelium* cells (Insall *et al.*, 1994) or chemokine GPCRs like Ca5R in human leucocytes (Wietz *et al.*, 2001; Sozzani *et al.*, 1999). Ligand binding on these GPCRs associated with the heterotrimeric $G\alpha\beta\gamma$ subunits, initiates receptor $G\alpha$ -GEF activity and $\beta\gamma$ release and/or G protein-independent signaling, leading to the activation of downstream effector networks.

In the human genome, GPCRs encoded by more than over 800 genes are the largest family of membrane receptors, classified into several sub-families based on sequence homology and/or common origin (Kolakowski, 1994; Fredriksson *et al.*, 2003; Bjarnadottir *et al.*, 2006). From the receptor sequences, Fredriksson *et al.* proposed a yet commonly used systematic classification system named GRAFS formed by the 5 distinct families of *Glutamate* (G), *Rhodopsine-like* (R), *Adhesion* (A), *Frizzled/Taste* (F) and *Secretin* (S). The Rhodopsine-like family showed a clear evolutionary success since containing around 90% of the GPCRs, and thus is divided into the α , β , γ and δ subclasses. The crystallographic structures of Rhodopsine-like family GPCRs indicate a common firm core corresponding to high conserved sequence motifs, *i.e.* E/DRY in the transmembrane (TM) 3, NPXXY on TM7, WXP on TM6, N2.50 in TM2 (X.50, according to the Ballesteros classification : X, numbering of TM; 50, the most conserved residue in the concerned TM) (Ballesteros and Weinstein, 1995), and a water network that can be seen in the binding pocket mediating ligand interactions with the receptor (Tautermann *et al.*, 2014). Indeed, the diversity of GPCR functions, and the propensity at mediating chemotaxis, can be related to the various molecular stimulating cues responsible for differential GPCRs conformations and then to the diversity of intracellular pathways they can activate as first effectors, *i.e.* $G\alpha$ and also $\beta\gamma$ proteins, β -Arrestins or G protein-coupled receptor kinases (GRK) (Deupi and Kobilka, 2007, 2010).

Alternate views were provided through ligand-based classification of Rhodopsine GPCRs highlighting the chemical pressure against which the receptors have evolved (Van der Horst *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2013) to explain differential GPCR-mediating mechanisms and more particularly chemotaxis. From phylogenetic analysis by means of an exploratory multivariate "multidimensionnal scaling" (MSD) analyzing the sequence space of non-olfactory Rhodopsine GPCRs and the mutational mechanisms driving their evolution, different

clustering of human GPCRs divided into four groups, characterized by their unusual proline positions in TM2 and TM5. Clusters concern the central group (G0) formed at least in part by the PEP (peptide) receptors, the G1 group including the phylogenetically related SO (somatostatin), CHEM (chemokine) and PUR (purinergic) receptors, the G2 group with Amin (amine) and AD (adenosine) receptors and the G3 group with the remaining receptors (Fig. 1A)(Pelé *et al.*, 2011; Chabbert *et al.*, 2012). Receptors belonging to SO, containing the urotensin II (UII) receptor UT, CHEM, including the SDF-1 α CXCR4 receptor and PUR (Fig. 1A and B) display a P2.58 pattern, specific of this group, resulting from a codon deletion in the TM2 of an ancestor receptor exhibiting a P2.59 pattern belonging to the precursor group G0, such as the OX2 receptor (Fig. 1A and B) or the kisspeptin (Kp-54 or KP-10) Kiss1R receptor of the PEP family (Fig. 1A) (Devillé *et al.*, 2009). Interestingly, previous predictive models (Pelé *et al.*, 2011) and crystal structures of the non-olfactory Rhodopsine-like GPCRs, clearly show a TM2 bulge structure in β 1/ β 2-adrenergic, 2A-adenosine or D3 dopamine receptors (G0 group) that possess a P2.59 whereas a kink structure is observed in CXCR4 and δ -Opioid receptors displaying a P2.58, near the ligand binding site (Van der Kant and Vriend, 2014). Experimental evidence of the CHEM-receptor CCR5 (Fig. 1A) suggests the importance of this TM2 region in receptor activation, and the key role of the conserved T2.56 neighboring the P2.58, in the receptor activation/function (Ji *et al.*, 1998; Govaerts *et al.*, 2003). In addition, mutation of P2.58 to A2.58 in the angiotensin-II AT-1 CHEM receptor (Fig. 1A), leads to a significant inhibition of transduction cascade (Reis *et al.*, 2007, Miura *et al.*, 2003). Together, it suggests a key role of this 2.58 proline position in the activation mechanisms of the SO, CHEM or PUR receptors.

These receptors are widely recognized as mediating chemotaxis, thus suggesting that proline kink in the P2.58 may have allowed the capacity of gradient sensitivity, cell polarization and/or directional migration. In the present study, we attempted to elucidate whether the key P2.58 position in the UT (SO) receptor and the CXCR4 (CHEM) allows a specific chemotactic skill. As a P2.59 receptor, we here focused on the Kiss1R as the indel event yielding P.58 receptors arose in ancestors of Kiss1R (Devillé *et al.*, 2009). We tried to mimic the “evolutionary” indels by site directed mutagenesis of the UT, CXCR4 and Kiss1R receptors, in order to mimic the biological process that led to the split between P2.58 and P2.59 receptors. We aim, by inserting one residue in the kinked elbow of CXCR4 and UT to favor a bulge structure or by deleting one residue in the bulge elbow of Kiss1R, to induce a kink structure (Fig. 1B-C and D). In addition the roles of the Pro were tested by mutation into Ala for each type of receptors. Expression levels and binding capacity of these receptors,

potential gain and loss of coupling capacities were evaluated in HEK293 cells. The ability to mediate chemotactic migration and adhesion *via* initiation/degradation of FA points, resulting to directional or random migratory properties was also investigated. We showed that the proline position in the TM2 of P2.58 and P2.59 receptors play a major role in G protein-dependent and independent couplings leading to chemotactic migration and destabilization of directed migration favoring random motility, respectively. It is proposed that P2.58 receptor-associated chemotactic migration would be associated to a wave of receptor desensitization/resensitization and localized adhesion-de-adhesion waves.

Materials and methods

Chemicals

Recombinant human SDF-1 α was obtained from R&D systems (Abingdon, United Kingdom), and the human UII and kisspeptin-10 (KP-10) were from Polypeptide Laboratories (Strasbourg, France). Fetal bovine serum (FBS), Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS), MEM non-essential amino acids, Trypsin-EDTA (0.05%) and antibiotic-antimycotic solutions were provided by GIBCO-Life Technologies (Fisher Scientific, Illkirch, France). Sodium pyruvate solution, fibronectin, poly-L-ornithine, ATP, probenecid, 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI), hematoxin, normal donkey serum and paraformaldehyde (PFA) were purchased from Sigma Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Mowiol 4-88 was from VWR (Fontenay-sous-bois, France). FuGene HD was obtained from Promega (Charbonnières-les bains, France). Cell line nucleofector kit V was from Lonza Sales Ltd (Basel, Switzerland). X-tremeGENE siRNA transfection reagent was obtained from Roche Diagnostics (Meylan, France). Lipofectamine 2000, one shot TOP10 chemically competent *E. Coli*, Alexa Fluor 594-conjugated antibody against mouse IgG and coelenterazine *h* were provided by Invitrogen/Life Technologies (Fisher Scientific). Transwells multiple well plates were from Corning (Fisher Scientific). The inositol monophosphate (IP₁) assay, the Tag-lite labelling buffer, the SNAP-Lumi4-terbium donor (BG-K2) and the Tag-lite red agonists KP-10 and SDF-1 α were obtained from Cisbio Bioassays (Condolet, France). SuperSignal ELISA Femto Substrate was from ThermoFisher. ECL Prime Western Blotting Detection Reagent was provided by GE Healthcare (Dutscher, Issy les Moulineaux, France). Antibodies raised against c-Myc, FAK, p-FAK (Tyr576/577), the horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies against rabbit, mouse and goat IgG were from Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany). Anti-paxillin (phospho Y31) antibody was purchased from Abcam (Cambridge, Great Britain). Anti-paxillin and anti-integrin β 1 antibodies were from Upstate and Chemicon, respectively (Millipore, Molsheim, France). Cell Tracker Green, Fluo4-AM, pluronic acid were obtained from Molecular Probe (Fisher Scientific). Primers were synthesized by Eurofins Genomics (Ebersberg, Allemagne). The G_q inhibitor UBO-QIC was from the Institute of Pharmacological Biology (University of Bonn, Bonn, Germany). SiRNA (control and G₁₃) were purchased from Dharmacon (GE Healthcare Europe, Velizy-Villacoublay, France). The plasmid pCMV-Myc and pEYFP-N1 were from BD Biosciences (Le Pont de Claix, France).

pEGFP-N2, ST-pRK5, $G\alpha_{i1}^{Rluc8}$, $G\alpha_{oa}^{Rluc8}$, $G\alpha_q^{Venus}$, β_2^{Flag} , γ_2^{Venus} , γ_2^{Rluc8} and β_2 -arrestin^{RLuc8} were provided by Dr Laurent Prézeau (IGF, Montpellier, France).

Plasmid constructs

The human UT-P2.58, CXCR4-P2.58 and Kiss1R-P2.59 receptor cDNAs inserted into pcDNA3.1 (cDNA Ressource Center, Detroit, MI, USA) were amplified and each PCR products were subcloned using the enzyme sites of pCMV-Myc, pEGFP-N2, pEYFP-N1 or ST-pRK5 described in Table 1. The Δ UT-P2.59^{Myc} and Δ CXCR4-P2.59^{Myc} mutant receptor cDNAs were constructed by oligonucleotide-directed mutagenesis (Quick-change site-directed mutagenesis kit, Agilent Technologies, Les Ulis, France) using the UT-P2.58^{Myc} and CXCR4-P2.58^{Myc} receptor cDNAs as a template with two oligonucleotides to insert an Ala in position 2.56 (Table XX). The Δ Kiss1R-P2.58^{Myc} mutant receptor cDNAs were constructed using the same mutagenesis kit using the Kiss1R-P2.59^{Myc} cDNAs as a template and two oligonucleotides to delete the Cys in position 2.56 (Table 2). The Δ UT-P2.58A, Δ CXCR4-P2.58A and Δ Kiss1R-P2.59A mutant receptor cDNAs were constructed by mutagenesis using the UT-P2.58, CXCR4-P2.58 or Kiss1R-P2.59 receptor cDNAs inserted into pcDNA3.1 as a template with two oligonucleotides to introduce an Ala in position 2.58 (Δ UT-P2.58A and Δ CXCR4-P2.58A) or 2.59 (Δ Kiss1R-P2.59A) instead of the Pro (Table 2). The mutant receptor cDNAs were then amplified and each PCR products were subcloned using the enzymes sites of pCMV-Myc, pEGFP-N2, pEYFP-N1 or ST-pRK5 described in Table 1. The sequences of all constructs were verified by sequencing (GATC Biotech, Köln, Germany).

Cell culture and transfection

HEK293 cell line (ATCC[®] CRL-1573[™]) was generously provided by L. Prézeau, C Barière and I. Bidaud (IGF, Montpellier, France). Cells were cultured in DMEM containing 1 mM sodium pyruvate, 1% antibiotic-antimycotic solution and 10% FBS at 37°C in a humidified incubator (5% CO₂). Transient transfections were performed using FuGene HD, Lipofectamine 2000 or Amaxa Cell Line Nucleofector kit V according to the manufacturer's recommended protocols. Control and G₁₃ siRNAs (2 µg) were transfected into HEK293 cells using the X-tremeGENE siRNA transfection reagent 24 h before and at the same time of the transfection with the receptor-expressing plasmid.

Cell-based ELISA

HEK293 cells (4 millions) were transfected with 4 μg empty pCMV-Myc (mock) or plasmid encoding c-Myc-tagged wild-type and mutant receptors using FuGene HD following manufacturer's instruction. For each transfection, the DNA (μg): FuGene HD (μl) mix ratio was 0.2. The following day, cells were dispensed on poly-L-ornithine-coated 96-wells plate (0.1 mg/mL; 100,000 cells/well) and incubated at 37°C (5% CO₂). Then, after 24 h, cells were treated or not with agonist ligands of the receptors of interest, fixed (4% PFA, 5 min at RT), washed with DPBS, and permeabilized or not with 0.05% Triton X-100. Non-specific binding sites were blocked with DPBS containing 1% FBS (30 min, RT). Primary antibody (Table 3) was then applied for 1h at RT. After washes with blocking buffer, cells were incubated with the corresponding horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody (Table 3) for 1h. After washes with DPBS, chemoluminescence was detected using SuperSignal ELISA Femto Substrate (ThermoFisher Scientific) and the InfinitePro200 plate reader (TECAN FRANCE, Lyon). Data are expressed as bioluminescence normalized to mock.

HTRF[®] ligand binding assay

HEK293 cells were dispensed into poly-L-ornithine-coated 96-wells plates at a density of 100,000 cells/well and transfected with 40 ng plasmid encoding ST-tagged wild-type or mutant receptors using Lipofectamine 2000 following manufacturer's instruction. For each transfection, the DNA (μg): Lipofectamine 2000 (μl) mix ratio was 0.2. Then, 24 hours later, the cell culture medium was replaced by 100 nM BG-K2 diluted in Tag-lite labeling medium and incubation was performed for 1h at 37°C in 5% CO₂ atmosphere in order to label ST-tagged receptors with terbium cryptate (Tb). The excess of BG-K2 was removed by washing cells three times with Tag-lite labeling medium. Saturation binding experiments were performed by incubating cells expressing Tb-labeled ST-tagged receptors with increasing concentrations of red ligands diluted in the Tag-lite labeling medium for 1h at 4°C. Signal was detected using the PHERAstar FS plate reader (BMG Labtech, Offenburg, Germany) on the ARPEGE pharmacology platform (Montpellier, France). The reader was equipped with an HTRF optic module allowing donor excitation at 337 nm and signal collection at both 665 and 620 nm. The signal was collected at both 665 and 620 nm. HTRF ratios were obtained by dividing the acceptor signal (665 nm) by the donor signal (620 nm).

Calcium measurement

HEK293 cells (2 millions) were transfected with 3 μ g plasmid encoding c-Myc-tagged wild-type or mutant receptors using Cell line nucleofector kit V (Lonza). Transfected cells were then seeded in poly-L-ornithine-coated 96-well plates at a density of 50,000 cells/wells and incubated for 48h at 37°C with 5% CO₂. Cells were washed twice with a modified HBSS supplemented with 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 10 mM HEPES and 2.5 mM probenidol (pH 7.4) and incubated with 2 μ M Fluo4-AM dye containing 20% pluronic acid for 1 h in 5% CO₂ atmosphere. Cells were rinsed twice with modified HBSS and the effect of graded concentrations of appropriate ligand on [Ca²⁺]_c was measured with a fluorimetric imaging plate reader FlexStation III (Molecular Devices, Wokingham, England) on PRIMACEN Platform (Mont-Saint-Aignan, France).

Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) assay

For BRET studies to measure G protein couplings, HEK293 cells were dispensed into poly-L-ornithine-coated 96-wells plates at a density of 100,000 cells/well and transfected with 40 ng plasmid encoding c-Myc-tagged wild-type or mutant receptors and at the same time with the different DNA combinations G α_{i1}^{Rluc8} (20 ng)/ β_2^{Flag} (10 ng)/ γ_2^{Venus} (10 ng), G α_{oa}^{Rluc8} (20 ng)/ β_2^{Flag} (10 ng)/ γ_2^{Venus} (10 ng) or G α_q^{Venus} (20 ng)/ β_2^{Flag} (10 ng)/ γ_2^{Rluc8} (10 ng) using Lipofectamine 2000. For BRET studies to investigate the interaction receptor/ β_2 -arrestin, HEK293 cells were transfected with 50 ng plasmid encoding eYFP-tagged wild-type or mutant receptors and 5 ng DNA encoding β_2 -arrestin^{Rluc8}. The following day, cells were washed twice with DPBS. Coelenterazine *h* substrate (10 μ l/well) was added at a final concentration of 5 μ M. Readings were then immediately performed after the addition of different ligands at room temperature and at 0.5-s intervals during several minutes using the Mithras LB 940 plate reader (Berthold Biotechnologies, Bad Wildbad, Germany) on the ARPEGE pharmacology platform. The plate reader allows the sequential integration of light signals detected with two filter settings (Rluc8 filter, 425 \pm 25 nm; and Venus or eYFP filter, 525 \pm 25 nm). BRET signal expressed in milliBRET units was calculated as the difference of emission at 530 nm/485 nm. For dose-response data, curves were fitted with a nonlinear regression using Prism software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

IP₁ production measurement

HEK293 cells were dispensed into poly-L-ornithine-coated 96-wells plates at a density of 100,000 cells/well and transfected with 40 ng plasmid encoding c-Myc-tagged wild-type or

mutant receptors using Lipofectamine 2000. Measurement of IP₁ accumulation in HEK293 cells was performed using the IP-One terbium (Tb) competitive immunoassay kit (Cisbio Bioassays). The IP-One assay uses a cryptate Tb-labeled anti-IP₁ monoclonal antibody (anti-IP₁-KTb) and a fluorescent d2-labeled IP₁ (IP₁-d2). Twenty four hours after transfection, cells were treated with various concentrations of the appropriate ligands (30 min, 37°C, 5% CO₂) in a stimulation buffer containing LiCl which induced the accumulation of IP₁ on receptor activation. Then, cells were incubated with IP₁-d2 and anti-IP₁-KTb in the dark at room temperature for 1h. The fluorescence emission of IP₁-d2 and anti-IP₁-KTb were measured after excitation at 337 nm, at 620 nm and 665 nm respectively, using a PHERAstar FS plate reader on the ARPEGE pharmacology platform. The HTRF intensity was calculated using the following formula and is expressed as arbitrary units:

$$\text{HTRF(intensity)} = ((\text{ratio } 665/620)_{\text{sample}} - (\text{ratio } 665/620)_{\text{background}}) \times 10^4.$$

Dose-response curves were fitted using Prism GraphPad software.

Migration assays

HEK293 cells (4 millions) were transfected with 4 µg empty pCMV-Myc (mock) or plasmid encoding c-Myc-tagged wild-type and mutant receptors using FuGene HD following manufacturer's instruction. Transwell filters with 8 µm pores were coated with human fibronectine (20 µg/ml; 12h; 4°C). Twenty four hours after transfection, cells were detached, resuspended in serum-free medium and seeded at a density of 100,000 cells/125 µL/filter on the upper chamber of the Transwells. The gradient was generated by filling the upper and/or the lower chamber with the appropriate ligand. After a 24-h incubation time, filters were rinsed with DPBS. Non-migrating cells were removed from the upper surface of the filter using a cotton swab while cells that migrated through the filter onto the lower surface were fixed with 4 successive baths of methanol (50, 70, 90 and 100%) and then stained with hematoxylin. Filter were removed and mounted on glass slides using Mowiol, and randomly photographed (10 fields/filter) using a Nikon microscope (Nikon, Champigny-sur-Marne, France). Cells on photographic fields were counted using the "Cell counter" plug-in on ImageJ software (U. S. National Institute of Health, Bethesda, MD, USA).

Adhesion assay

HEK293 cells (4 millions) were transfected with 4 µg plasmid encoding c-Myc-tagged wild-type or mutant receptor using FuGene HD. The following day, cells were incubated with Cell Tracker Green (30 min, 37°C, 5% CO₂), detached with trypsin-EDTA solution, pelleted

(100 g, 5 min) and resuspended in serum-free medium with or without appropriate ligands (10^{-9} M, 30 min, 37°C, 5% CO₂). Cells were then seeded onto fibronectine-coated 96-well plates at a density of 50,000 cells/well. After 30 min, cells were washed and fluorescence of adherent cells was measured at 535 nm using the InfinitePro200 plate reader.

Immunohistochemistry and image analysis

HEK293 cells (2 millions) were transfected with 3 µg plasmid encoded wild-type or mutant eGFP-fused receptor using Cell Line Nucleofector Kit V and plated onto 24-well plate containing fibronectin-coated glass microslides at the density of 75,000 cells/well. After a 24-hour incubation (37°C, 5% CO₂), cells were treated with the appropriate ligand for various time (0 to 60 min). Cells were then fixed with PFA (4%, 10 min), permeabilized with Triton X-100 (0.05%; 5 min) and the non-specific binding sites were blocked with normal donkey serum (2%, 1h, RT). The anti-paxillin antibody (Millipore, ref 05-417) was applied overnight at 4°C. After washes with DPBS, cells were incubated with Alexa Fluor 594-conjugated antibody against mouse IgG (2h at RT). Cells were then stain with DAPI (1 µg/mL, 10min) to label nuclei, mounted on glass slides and imaging by confocal microscopy (Leica TCS SP8 confocal laser scanning microscope). The number and size of focal adhesion complexes was calculated using a particle analysis plug-in after successive image treatment by ImageJ software. The proportion of cells exhibiting cytoplasmic and/or cell surface receptor-eGFP was also quantified in each situation.

Statistical analysis

Data are presented as the mean ± SEM for each group of samples. Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 5.00 software. Comparisons between 2 groups were performed using unpaired *t*-test or Mann and Whitney test.

Results

Experimental mutagenesis of GPCRs to mimic the evolutionary insertion/deletion leading to chemotactic receptor expression and sensitivity

Evolutionary information would help understand factors driving specific acquisition skills, such as chemotactic-motor mammalian cell coordination. Accordingly, a MDS representation of the GPCRs sequence space allows the clustering of four groups. In Figure 1A, a schematic representation of a deletion (gray arrow) that led to the split between the PEP receptors of the G0 group, and the SO receptors at the early stage of the animal evolution (Chabbert *et al.*, 2012). Also SO, CHEM and PUR receptors of the G1 groups are phylogenetically related and may have evolved from a common origin (Deville *et al.*, 2009; Pelé *et al.*, 2011). In G1 group-composed receptors characterized by a correlated mutation in TM2 and TM5 (*not shown*), the prototype CXCR4 (CHEM, green) and UT (SO, blue) receptors displayed the P2.58 pattern whereas the Kiss1R (magenta) exhibits an ancestral P2.59 (Fig. 1A, inset). As illustrated in the modeled cartoon view of CXCR4 (P2.58, *left panel*) and OX2 (P2.59, *right panel*) receptors (From Chabbert, *unpublished data*), the TM2 is slate and the Pro at 2.58 in CXCR4 is close to the carbonyl groups within a proline kink (a) and the Pro at 2.59 in OX2 is close to the carbonyl groups (b) within a bulge (Fig. 1B). To gain information on chemotactic receptors exhibiting the P2.58 pattern responsible for a kinked structure of TM2, we focused on the Kiss1R-P2.59 activated by the short form KP-10 (10 amino-acids), and on UT-P2.58 and CXCR4-P2.58 classically bound by the chemokine CXCL12/SDF-1 α spliced variant of 89-residue, and the 11 amino acid cyclic neuropeptide human UII, respectively (Fig. 1C). To mimic the evolutionary indel process, we engineered one codon deletion (C2.56) of the Kiss1R-2.59 leading to the production of the Δ Kiss1R-P2.58 and one codon (encoding Ala) insertion in between 2.56 and 2.57 positions of UT and CXCR4, leading to the Δ UT-P2.59 and the Δ CXCR4-P2.59 mutant receptors (Fig. 1D). In addition, the putative role of the proline in the TM2 of the 3 wild-type receptors also required the site-directed mutagenesis of the Pro in Ala at 2.59 in Kiss1R (Δ Kiss1R-P2.59A) or at 2.58 in UT (Δ UT-P2.58A) and CXCR4 (Δ CXCR4-P2.58A) (Fig. 1D). Modeled TM2 structures of Kiss1R (magenta), UT (blue) and CXCR4 (green) made by Chabbert *et al.* (*unpublished data*) confirmed the kink in P2.58- and the bulge in P2.59-containing helices (Fig. 1D).

A recent report by Chantreau *et al.* (2015) has investigated the effect on the introduction of a Pro residue in TM2 of the thyrotropin receptor (TSHR) belonging to the LGR family of the G3 group characterized by the absence of Pro in TM2. Some mutants failed to be efficiently addressed at the plasma membrane, suggesting a key impact on the receptor membrane

targeting or stabilization at the plasma membrane. Being part of the well conserved motif TXP, mutation of T2.56 in CCR5 (Govaerts *et al.*, 2001) may impair activation or yield constitutive activation, indicating a relatively conserved expression and binding capability. Thus, to verify that the wild-type and mutant receptors may be efficiently expressed, translocated at the plasma membrane and in capacity to bind their respective ligands, all receptor wild-type and mutant constructs were either Myc-epitope-tagged or snap-tagged (ST) and expressed through transitory transfection of HEK293 cells (Fig. 2A). We showed by means of an ELISA bioluminescent assay, that wild type Kiss1R-P2.59 and UT-P2.58, and in a less extent CXCR4-P2.58 were efficiently expressed at the cell surface of non-permeabilized cells (Fig. 2B). Interestingly, the P2.59A or P2.58A receptors displaying a single mutation, exhibited a similar level of plasma membrane expression than wild-types (Fig. 2B). However, the Δ Kiss1R-P2.58 appeared higher expressed both within the cytosol and cell surface whereas Δ UT-P2.59 and Δ CXCR4-P2.59 were found to be lower expressed at the cell surface than wild-type receptors (Fig. 2B). These observations led to the conclusion that Pro mutation in Ala or insertion/deletion of one codon leading to the repositioning of the Pro in TM2 of Kiss1R, UT or CXCR4 is permissive for expression and translocations of the receptor at the cell surface, important for investigation of their functional activity.

Interestingly, it was previously observed that the Pro to Ala mutation of the P2.58 of AT-1R (Miura *et al.*, 2002), did not markedly alter agonist affinity. We used the method of orthogonal labelling of protein complexes by fluorophore compatible with TR-FRET using the ST (Maurel *et al.*, 2008) technology. This ST held by wild-type and mutant receptors can be covalently labelled with the fluorescent non-cell permeable benzyl-guanine-Tb³⁺-cryptate derivatives to transfer energy with the KP-10-red or SDF-1-red as previously validated (Zwier *et al.*, 2010). In the process of writing the paper, experiments using the UII-red were not performed. The intensity of the TR-FRET was markedly increased with the increasing concentrations of the ligand signal and was clearly proportional to the expression levels of the wild-type (Kd=nd, Kiss1R-P2.59; Kd=38.9±6.9, CXCR4-P2.58) and mutant receptors (Kd=47.7±7.0, Δ Kiss1R-P2.58; Kd=5.0±0.7, Δ CXCR4-P2.58A; Fig. 2C) (Table 5). Of note, Kiss1R-P2.59 did not show a significant FRET signal intensity highlighting a low membrane expression likely combined with less affinity binding of KP-10-red (Fig. 2C) whereas the Δ CXCR4-P2.59, exhibiting similar amount at plasma membrane than the Δ CXCR4-P2.59A, displayed a diminished affinity for the SDF-1 α -red (Table 5, Fig. 2C). Together, it is originally proposed that, by using this strategy to follow tight interaction of the ligand to the N-terminus of the GPCRs, the Kiss1R-P2.59 did not transfer energy, suggesting either

absence of proximity between the ST-N-terminal fragment of this receptor and the ligand likely deeply bound within the receptor core, and/or absence of binding due to the low expression of the receptor at the cell surface. Interestingly, Δ Kiss1R-P2.59A and Δ Kiss1R-P2.58 displayed the same affinity values than CXCR4-P2.58, likely raising similar conformational changes of the extracellular portions of the P2.58 receptors. At this stage, we expect that UII remained able to bind the wild-type and mutant UT receptors.

Functional coupling properties of P2.59 and P2.58 GPCRs and their Pro to Ala mutants

Previous reports established that Kiss1R-P2.59 exhibits classical coupling to $G_q/PI_3/Ca^{2+}$ pathway and results in inhibition of chemotaxis to FBS (Kotani *et al.*, 2001, Ohtaki *et al.*, 2001), UT-P2.58 functions as a pleiotrope factor, activating $G_q/PLC/Ca^{2+}$, $G_{i/o}/PI_3K$ and $G_{13}/Rho/Rock$ cascades (Jarry *et al.*, 2010; Brulé *et al.*, 2014, Lecointre *et al.*, 2015), and CXCR4-P2.58 recruits $G_{i/o}/PI_3K$ and $G_{12/13}/Rac$ signaling (Horuk *et al.*, 1998, Zlotnik *et al.*, 2008, Wang *et al.*, 2012). Thus, in order to evaluate whether the deletion in Kiss1R-P2.59 would have allowed acquisition of some important G protein couplings involved in chemotactic receptor behavior, *i.e.* $G_{i/o}$ combined to $G_{12/13}$, we next investigated the panel of G proteins activated by wild-type and mutant receptors by using BRET-based biosensors directly monitoring the activation of G_{α_q} , G_{α_i} and G_{α_o} proteins ($G_{\alpha_{12/13}}$ being non available) occurring early and shortly after receptor activation (cartoon of Fig. 3A), as well as their direct effectors. As often observed, wild-type and mutant CXCR4 receptors expressed in HEK293 cells totally failed to recruit G_{α_q} , produce inositol phosphate IP_1 , and stimulate cytosolic Ca^{2+} concentration ${}_c[Ca^{2+}]$ (Fig. 3B, *Right*). However, the Kiss1R-P2.59 markedly coupled and activated G_{α_q} ($pEC_{50}=-8.17\pm 0.14$), IP_1 production ($pEC_{50}=-9.58\pm 0.15$) and ${}_c[Ca^{2+}]$ increase ($pEC_{50}=-7.78\pm 0.13$) and Δ Kiss1R-P2.59A or Δ Kiss1R-P2.58 lost G_q and Ca^{2+} -effector activations, still able to induce IP_1 production, but with a drastic shift affinity in the IP_1 assay (Table 5)(Fig. 3B, *Left*). UT-P2.58, originating from the SO family, also showed a net ability to recruit G_{α_q} , evoke IP_1 formation and generate ${}_c[Ca^{2+}]$ with affinities similar to that of Kiss1R-P.59 (Table 5) (Fig. 3B, *middle*). Interestingly, Δ UT-P2.58A and Δ UT-P2.59 failed to recruit G_q and Ca^{2+} , but kept the ability to induce IP_1 production with a drastic decrease of efficacy for the Pro to Ala UT mutant (Fig. 3B, *Middle*). Then, $G_{\alpha_{i1}}$ - and $G_{\alpha_{oA}}$ -Rluc dissociations from $G\beta\gamma$ -venus (Fig. 3A) were investigated in HEK cells expressing the wild-type and mutant receptors. Clearly, we confirmed that Kiss1R-P2.59 did not couple to $G_{i/o}$ proteins under stimulation by KP-10, and mutants of this receptor failed to allow this type of coupling (Table 5, Fig. 3C). In contrast and as attended, UT-P2.58 and CXCR4-P2.58

activated G_{ai} ($pEC_{50}=-9.03\pm0.38$, $pEC_{50}=-9.2\pm0.13$, respectively) and G_o recruitment with similar affinities ($pEC_{50}=-9.68\pm0.24$, $pEC_{50}=-9.52\pm0.52$, respectively). The deletion of one codon leading to $\Delta UT-P2.59$ and $\Delta CXCR4-P2.59$ provoked a total inhibition of the $G_{i/o}$ couplings, suggesting the major role of this proline in 2.58, for activation of $G_{ai/o}$ protein receptor coupling (Fig. 3C). Taken together, the data above provide evidence of a general loss of G_q/Ca^{2+} , $G_{i/o}$ couplings when changing position or mutating the proline in the three receptor types, but it would appear that this proline in either receptor may favor a subtle constitutive activity.

Chemotactic migratory and/or motility properties of the P2.58 and P2.59 receptors

Despite the almost complete loss of coupling to $G_{i/o}$ and G_q proteins, but also in the absence of the control of $G_{12/13}$ potential recruitment of the mutant receptors, the migratory potential of cells expressing wild-type Kiss1R or the chemotactic UT and CXCR4 receptors, was evaluated in the boyden chamber assay allowing ligand gradient concentration (Fig. 4A). Concentration gradient of KP-10, UII and SDF-1 α induced migration of cells expressing either Kiss1R-P2.59 or UT-P2.58 and CXCR4-P2.58 compared with HEK-pCMV^{Myc} (mock) and control (untreated) cells, respectively (Fig. 4B). We hypothesized that the P2.58 position plays a key role in the acquisition of specific “binding-activation” coupling properties of GPCRs leading to chemotactic behavior, meaning that a gain of migratory behavior was expected for the $\Delta Kiss1R-P2.58$ receptor and a loss of migration for $\Delta UT-P2.59$ and $\Delta CXCR4-P2.59$ was attempted. But, when the Pro was shifted in 2.58 or mutated in Ala, KP-10 failed to induce chemoattraction/motility of cells expressing $\Delta Kiss1R-P2.59A$ and $\Delta Kiss1R-P2.58$, respectively, whereas P2.58A or P2.59 mutants of UT and CXCR4 still conserved their ability to promote significant migration/motility (Fig. 4B), and even acquired increased motility (Table 5) (Fig. 4B). We next explored whether this enhanced migration for the $\Delta UT-P2.59$ or the loss of migration for the $\Delta Kiss1R-P2.58$ results from a shift in affinity for some coupling-induced migration. Thus dose-response curves generating by plotting the concentrations of the various agonists KP-10, UII or SDF-1 α in the bottom chamber, gave three distinct profiles of migration yielding the better functional affinity ($pEC_{50}=-10.41\pm0.58$) for UT-P2.58 showing a bell shaped curve suggestive of adhesion properties under gradient rupture as previously shown (Lecointre *et al.*, 2015) and similar affinities for Kiss1R-P2.59 and CXCR4-P2.58 ($pEC_{50}=-9.12\pm0.16$ vs $pEC_{50}=-8.12\pm0.4$). Interestingly, the $\Delta UT-P2.59$ likely exhibited a shift in affinity ($pEC_{50}=-9.49\pm0.3$) and more resembling that of the Kiss1R-P2.59 (Table 5, Fig. 4C). This last observation tends to suggest that although it is not possible to initiate

acquisition of some migratory chemotactic features in Kiss1R by generating an experimental deletion, the repositioning of the Pro in 2.59 in UT receptors (directly evolving from a common PEP receptor family), allows Kiss1R-P2.59-like migratory response.

GPCR-induced chemotaxis has been shown to depend on the $G_{\alpha i}$ and $G_{\beta\gamma}$ /PI3K pathway and/or involving $G_{\alpha 12/13}$ /Rho/Rac kinase cascade (Lecointre *et al.*, 2015), we examined whether inhibition of $G_{\alpha q}$ and $G_{\alpha 13}$ would be associated with the pro-migratory activity of Kiss1R and UT receptors. Downregulation of $G_{\alpha 13}$ through a specific siRNA previously validated (Lecointre *et al.*, 2015) failed to modify the marked amplitude of migratory response induced by KP-10 on Kiss1R-P2.59-expressing cells (Fig. 4D) or by UII towards Δ UT-P2.59-expressing cells, but totally abolished the UII-induced directional migration of UT-P2.58-expressing cells (Table 5, Fig. 4D). Conversely, when G_q was blocked by the specific inhibitor of the G_q /Ca²⁺ pathway UBO-QIC, validated on the ability of UII to provoke a $c[Ca^{2+}]$ mobilization (Fig. S1A), the Kiss1R-P2.59-expressing cells did not migrate towards KP-10, while UT-P2.58-expressing cells remained motile (Fig. 4E). Again, the Δ UTP2.59-mediating migration likely resembling the Kiss1R-P2.59 phenotype, was insensitive to the downregulation of $G_{\alpha 13}$ (siRNA) and totally blocked by UBO-QIC (Fig. 4D). These data reinforced the idea that the Δ UT-P2.59 can mimic the Kiss-1R-mediating migration relayed mainly by G_q instead of G_{13} proteins. Recently, studies have shown that p63RhoGEF can physically interact with $G_{\alpha q}$ to stimulate the GEF activity of p63RhoGEF (Goedhart *et al.*, 2013). Because it was demonstrated that the $G_{\alpha q}$ -p63RhoGEF interaction competes significantly with PLC β activation and $c[Ca^{2+}]$ increase, we verify whether this G_q /p63RhoGEF may be involved in the pro-migratory properties of KP-10. SiRNA directed against p63Rho-GEF did neither bias the Kiss1R-P2.59 or UT-P2.58-evoked $c[Ca^{2+}]$ rise discarding this potential mechanism in the non-classical KP-10 induced migration in a G_q -dependent manner (Fig. S1B). It was previously shown that chemotactic migration involves adhesion relayed at least in part by a pertussis toxin (PTX) $G_{i/o}$ protein (Lecointre *et al.*, 2015). PTX was then tested and slightly diminished the KP-10-induced Kiss1R-P2.59 cell migration but totally and partially abolish the UII-evoked UT-P2.58 and Δ UT-P2.59 cell migration, respectively (Fig. S2), suggesting that the residual motile behavior results from the acquisition of other couplings ($G_q?$) induced by the P2.59 position. However, the question remains about the chemotactic or pro-motile behavior of Kiss1R and wild-type or mutant UT receptors. Disruption of the ligand gradient in boyden chambers would affect directional cell migration by favoring random migration or motility in the case of chemokinesis receptor-mediating activity, or by inhibition of migration through reinforcement of homogenous

distribution of adhesions, suggestive of a receptor-exhibiting chemotactic behavior. Addition of KP-10, UII or SDF-1 α to the bottom and the upper compartments of the migration chamber produced a significant blockade of UT-P2.58 and CXCR4-P2.58 cell migration (Fig. 4F) or increase in the number of migrating Kiss1R-P2.59 and Δ UT-P2.59 cells compared with the non-treated condition, and similar to the gradient condition where ligands were only incubated in the bottom compartment (Fig. 4F). Together, it strongly suggests a reduction of cell motility and promotion of adhesion processes in the wild-type chemotactic UT and CXCR4 displaying the P2.58, or chemokinesis mechanism induced by the wild-type Kiss1R and the UT mutant yielding P2.59.

Controlled adhesion as a key signature of P2.58 chemotactic receptors

During chemotaxis, adherent cells exhibit a propensity to adhere to substratum as already reported for UT and CXCR4 (Lecointre *et al.*, 2015; Coly *et al.*, 2016; Monterrubio *et al.*, 2009; Glodek *et al.*, 2003), often accompanied by integrin activation clustering and FAK activation (Grieco *et al.*, 2011). Indeed, homogeneous concentrations of KP-10, UII or SDF-1 α were tested in the adhesion assay on cells expressing wild-type and mutant P2.59 and P2.58 GPCRs. Consistent with the previous observations suggesting chemokinesis mediated by P2.59 receptors, we showed that the wild-type Kiss1R-P2.59 or the mutant Δ UT-P2.59 and Δ CXCR4-P2.59 did not significantly reinforce cell–matrix adhesion after 15 min incubation in the presence of the respective receptor agonist (Fig. 5A). In contrast, the deletion leading to the mutant Δ KissR-P2.58 slightly but significantly allowed acquisition of cell adhesion properties (by 115.0 \pm 4.2%) to the fibronectin matrix, a mechanism similar to the UII- and SDF-1 α -mediated adhesion of UT-P2.58- (137.2 \pm 5.1) and CXCR4-P2.58- (269.4 \pm 14.3) expressing cells (Table 5; Fig. 5A). It was previously established the role G $\alpha_{i/o}$ $\beta\gamma$ on adhesion-induced by chemotactic-receptors (Lecointre *et al.*, 2015), but since Δ Kiss1R-P2.58 receptor was unable to induce dissociation of G $\alpha_{i/o}$ and $\beta\gamma$ G protein subunits, the coupling/effector mediating mature adhesion remain to be identified and how these adhesion points relay migration must be evaluated.

During cell migration, transient adhesive contacts occur at the leading edge of lamellipodia where integrins recruit proteins such as vinculin or paxillin to form immature adhesive contacts called focal complexes, and transition to mature FA is marked by increase in size (Jarjour *et al.*, 2011). A recent description of events occurring during protrusion emission establishes that nascent FAs rapidly recruit paxillin and FAK, that tension-engaged integrins promotes FAK activation and rapid tyrosine phosphorylation of paxillin (P-paxillin) (Case *et*

al., 2015). We used these dynamic oscillations in FAs by following paxillin, FAK and integrin accumulation. ELISA assays were performed with specific antibodies directed against total and phosphorylated forms of Paxillin (P-Paxillin), respectively, as described in Materials and Methods. Here, even if preliminary, treatments with KP-10 or UII after 30 min, appeared to stimulate P-Paxillin of $172.7\pm 22.5\%$ and $170.7\pm 19.0\%$ at 30 min on cells expressing specifically the Δ Kiss1R-P2.58 and UT-P2.58 receptors (Fig. 5B). When cells expressed the wild-type Kiss1R-P2.59 or the mutant Δ UT-P2.59, ligands failed to induce P-Paxillin, suggesting the absence of nascent focal complex adhesions when receptors exhibit a proline position in P2.59. Moreover, the number and size of mature FAs can be also evaluated by imaging paxillin staining in HEK-cells transiently transfected with cDNA encoding P2.59-^{eGFP} or P2.58^{e-GFP} receptors. We observed differences in the overall number of FA-paxillin-positive structures within the cells both at in the absence of stimulation (randomly distributed) in cells expressing Kiss1R-P2.59 and UT-P2.58 receptors (Fig. 5C). In the presence of homogenous KP-10 or UII treatments, cells harbored increased number of FAs after 30 min as illustrated by the larger and longer FAs in activated expressing cells (Fig. 5C), but interestingly, this stimulation appeared significantly present at 15 and 30 min, but transient for the Kiss1R-P2.59 and sustained for UT-P2.58 (Fig 5C and D). When basal level of FAs was compared between wild-type and mutant receptors, it appeared that the constitutive FAs complexes are significantly reduced in P2.58 receptors compared with P2.59 receptors, likely indicating basal control of the adhesion properties of cells under expression of P2.58 or P2.59 GPCRs, P2.58 leading to less adhesion (Fig. 5D). At this stage, KP-10 modestly stimulated FA number in Δ Kiss1R-P2.58 receptor-expressing cells at 30 min whereas UII evoked a non-attended significant inhibition of FAs of Δ UT-P2.59 cells at 15 and 30 min (Fig. 5D). Since it was proposed that migration results from nascent FA composed of talin-integrin-actin linkage evolving towards FA maturation initiated by FAK-dependent paxillin phosphorylation (Case *et al.*, 2015), we aimed to confirm a potential occurrence of FA maturation. We confirmed that the known chemotactic receptor UT-P2.58 evoked β 1 integrin activation of $144.0\pm 4.2\%$ and $149.1\pm 7.9\%$ (Fig. 5F) and phosphorylation of FAK by $170.7\pm 19.0\%$ and $134.9\pm 7.2\%$ (Fig. 5F) at 30 and 60 min respectively. When the Pro was repositioned in the Δ UT-P2.59, UII was totally inefficient in recruiting integrins and FAK activity (Fig. 5E and F). As a mirror experiment, the wild-type Kiss1R-P2.59 did not induce any effect on these two components, whereas the mutant Δ Kiss1R-P2.58 showed a tendency to both favored integrin clustering (Fig. 5E) and phospho-activation of FAK (Fig 5F). These data allow us to begin constructing a hypothesis about cell-specialization associated with the expression of P2.58 or

P2.59 GPCRs. Even in the absence of G protein couplings, P2.58 receptor would regulate a controlled maturation of FAs from nascent one, recruiting integrins and FAK, constituting a necessary step to induce chemotactic migration instead of P2.59-induced random motility involving short half-life formation of nascent adhesions.

Connection between receptor desensitization, adhesion and lamellipodia formation in P2.58 receptor-induced chemotactic migration

FAs direct migration in part by mechanically generating forces for movement, but rapid cycles of FA assembly and disassembly, or turnover, at the leading edge of migrating cells are necessary for productive FAs and directional migration (Gardel *et al.*, 2010; Geiger and Yamada, 2011; Wolfenson *et al.*, 2013). Thus, it can be questioned here how P2.58 and P2.59 receptors interfere with FA disassembly by spatiotemporal visualization of FA during ligand activation.

UT-P2.58 cells exposed to UII during 5 to 60 min, evoked a transient reduction of the number of adhesion points ($61.7 \pm 8\%$) at 5 min, a progressive increase level of FAs significant at 20 min ($152.5 \pm 15.3\%$, $P < 0.001$) (Fig. 6A, red and 6B), and then, the same level of FA number at 60 min than at 5 min $56.9 \pm 9.4\%$ (Fig. 6A and B), suggesting a “wave-like” adhesion number dynamic mediated by the P2.58 receptors. The transient decreased number of FAs is concomitant to a transient increase of the area of FAs at 5 min, then followed by reappearance of nascent-small sized FAs until 20 min of exposure (Fig. 6C). At 60 min, all large FAs were found absent while nascent ($>$ FAs significantly increased compared with the 20-min condition (Fig. 6C). However, we confirmed that Δ UT-P2.59 expressing cells displayed less adhesions in non-treated condition, and when activated, likely conserved the propensity to transiently inhibit the FAs number at 5 min ($34.2 \pm 5.5\%$) and 60 min ($54.2 \pm 5.4\%$) (Fig. 6A and B), paralleled by the slight decrease of the larger FAs complexes (Fig. 6C), likely evoking a dysregulation of the adhesion/deadhesion cycle. This may indicate that P.58 activates effector cascades that could be determinant for the regulation of mature FAs and nascent one, and directional migration.

It was originally proposed that most of the chemotactic GPCRs are uniformly distributed at the plasma membrane and that polarization of migration cells depends on asymmetric receptor activation along the gradient establishment rather than on its distribution (Blaser *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2007). An important process in localized receptor activation at the leading edge of the migrating cells may be endocytosis (Jekely *et al.*, 2005, Cao *et al.*, 2014), involving β -arrestins. Recently, novel roles of arrestins have emerged as regulators of cytoskeleton

proteins (Mittal *et al.*, 2013) or protein ubiquitination (Shenoy, 2014). Based on the hypothesis that desensitization and recycling of chemokine receptors are essential for chemotaxis, and that chemotaxis likely involves dynamic of adhesion/de-adhesion, we performed the quantification of the number of cells exhibiting UT-P2.58^{eGFP} or Δ UT-P2.59^{eGFP} fluorescence exclusively at the plasma membrane, at both plasma membrane and/or cytosolic compartments. It aimed to provide imaging the dynamic of the distribution of the P2.58 and P.59 receptors under 60-min-treated conditions with UII and during cell movement. In the absence of UII, a majority of cells presented an exclusive membrane surface labelling (Fig. 6A). After treatment, a progressive translocation of UT-P2.58 receptors within endocytic vesicles reaching 87.5% of cells after 10 min was detected (Fig. 6D). Surprisingly, the proportion of cells with both membrane and endocytosed receptors decreased from 50% (10 min) to 20.8% (15 min) whereas more receptors reached the cell surface (Fig. 6D). Again, at 20 and 60 min, a new phase of UT-P2.58 internalization occurred (Fig. 6D), confirming a wave profile for the receptor traffic between cytosol and membrane surface. Similar observations demonstrating a regulating cycle of adhesion formation and degradation, FA size and receptor endocytosis has been observed for the wild-type CXCR4-P.2.58, even if the kinetic of this wave appeared greatly slower (Fig. S3). Cell expressing the Δ UT-P2.59 did not show exclusive membrane expression, suggesting a constitutive endocytic activity, whereas, at 5 min stimulation, receptors appeared to be translocated to the cell surface in 30% of activated cells (Fig. 6D). Finally, the Δ UT-P2.59 progressively internalized in a higher proportion of cells reaching a maximum at 20 (84.6%) and 60 min (69.6%) (Fig. 6D), following a similar kinetic wave than adhesions. It has been shown that various receptors that required β -arrestins for chemotaxis and actin cytoskeleton reorganization also promote β -arrestin-dependent association with mitogen-activated protein kinases MAPK (DeFea *et al.*, 2007). In particular, many studies have suggested that β -arrestin-dependent ERK1/2 is important for actin reorganization and/or chemotaxis. Previous works (Brulé *et al.*, 2014, Lecointre *et al.*, 2015) and our preliminary experiments indicated that UII induces two phases of stimulation of phosphorylated forms of ERK1/2 (P-ERK-1/2) in cells expressing UT-P2.58, suggesting again, a wave activity of ERK (Fig. S4), whereas the Δ UT-P2.59 remained able to stimulate the first phase of ERK1/2 activation. Even if these data need to be confirmed, it suggests that the second phase of P-ERK, specific of P2.58 receptors, is β -arrestin-2-dependent as previously demonstrated (Brulé *et al.*, 2014).

To verify this assumption, recruitment of β -arrestin-2 to the receptors was assessed by an increase in the BRET signal in HEK cells transiently expressing UT-P2.58 and Δ UT-P2.59

fused to their C-terminal to YFP, and β -arrestin-2 fused to R-Luc. Following UII application, β -arrestin-2 was recruited by the UT-P2.58 after stimulation (Fig. 6E). However, in the same conditions, the Δ UT-P2.58A and the Δ UT-P2.59 failed to interact with β -arrestin-2 (Fig. 6E) indicating that the proline in TM2 of chemotactic receptors plays a major role in the recruitment of β -arrestin-2. Together, it can be proposed that the Pro position in 2.58 in the prototypic chemotactic UT is involved in the regulation of the wave of plasma membrane distribution of the receptor, the cycle of adhesion assembly and disassembly during the time of ligand-exposure.

In order to verify whether the receptors exhibiting the Pro in P2.59 may act differently on this complex regulation system, similar experiments were conducted with the PEP receptor Kiss1R prototype. Kiss1R-P2.59 cells exposed to KP-10 during 5 to 60 min, evoked a first peak of adhesion point ($190.6 \pm 16.4\%$, 5 min) followed by a relative stabilized higher level of FAs as illustrated in the imaging panel (Fig. 7A, red) and on quantification histograms (Fig. 7B). Again, as already detected in the Figure 5C, the Δ Kiss1R-P2.58 when activated, provoked a decreased number of the total FAs/cell area (Fig. 7B). These two types of adhesive-mediating effects were accompanied by an increase of the area of the FAs suggestive of initiation of maturation with size $> 0.1 \mu\text{m}^2$ markedly increased and remained constant during the treatment period (60 min) (Fig. 7C). In Δ Kiss1R-P2.58 cells, a tendency to a slight and transitory size enhancement can be detected (Fig. 7C), suggesting a potential delayed adhesion capability (Fig. 7C). The localization of the Δ Kiss1R-P2.58 likely at the plasma membrane during all the treatment period strongly indicates alteration in the mutant trafficking and thus a clear connection between receptor activated-state at the membrane surface and adhesion FA areas. We also evaluated the level of endocytosed/internalized wild-type and mutant Kiss1R receptors in HEK293 cells in non-treated and 60-min-treated conditions. In the absence of receptor activation, it was already observed among the total of cells evaluated, more than 50% exhibiting a clear internalized phenotype (intracellular and membrane and intracellular labellings). After treatment (KP-10), a net increase of the distribution of the Kiss1R-P2.59 at the plasma membrane after 5 min, and a return to the cytosolic distribution similar to control occurred until 20 min (Fig. 7D). Then a marked internalized profile of the receptor after 60 min of homogenous exposure to KP-10 (Fig. 7D) was shown, suggesting a relative resistance to ligand-induced internalization until more than 1h continuous activation. In cells expressing Δ Kiss1R-P2.58, almost all receptors were expressed at the plasma membrane in control and treated conditions, except at 20 and 60 min post-treatment showing endocytosed receptors in 30% and 82.1% of cells (Fig. 7D).

According to this observation, our preliminary experiment failed to demonstrate the interaction of β -Arrestin 2 of the wild-type Kiss1R-P2.59 but also of the Δ Kiss1R-P2.59A and Kiss1R-P2.58 after 15 min stimulation with KP-10, even if we may expect a slight tendency whatever the condition, needing to be confirmed (Fig. 7E). Thus, we propose that even if the Δ Kiss1R-P2.58 would have probably lost its G_q couplings and traffic regulation, it seems that a faint competence has been obtained leading to a rebound in adhesion number, FA size, and in endocytosis at 20 min, suggesting a functional activity acquisition due to the P2.58 positioning.

We then aimed at determining the potential link between this cycle of receptor endocytosis and cell migration/motility. Indeed, extensive experimental evidence of lamellipodia are the site of protrusion (Pollard and Borisy, 2003), and formation for most cell-matrix adhesions (Webb *et al.*, 2002) where integrin binding to extracellular matrix proteins and subsequent clustering leads to the formation of nascent focal complexes. To discriminate random type motility or chemokinesis mediated by the Kiss1R-P2.59 from chemotaxis mediated by the UT-P2.58, we evaluated the number of cell lamellipodia during the course of the treatments of cells expressing P2.58 and P2.59 receptors. At basal condition (non-treated), cells expressing UT-P2.58 and Δ UT-P2.59 receptors exhibited zero or one lamellipodia at 98% and 80%, respectively (Fig. 8A and B). During the course of the treatment with UII, the proportion of cells with one lamellipodia increased and stabilized until 60 min, while those with two lamellipodia transiently rose until 10 min, and then decreased reaching control values for UT-P2.58 (Fig. 8A). For Δ UT-P2.59, the number of cells with more than 2 lamellipodia progressively increased during the treatment when the number of cells with only one lamellipodia was depressed after 15 min stimulation. The regression of the probability to display more than two lamellipodia appeared concomitant to resensitization of the receptor at the plasma membrane, while specific of P2.58 receptors (Fig. 8A and B). In cells expressing Kiss1R-P2.59, KP-10 evoked a stimulation of the proportion of cells with more than 2 lamellipodia from 39% (control) to 69.2% (5 min) and maintained until 20 min (70%) at the expense of 0 or 1 lamellipodia-containing cells (Fig. 8C and D). Of note, when receptors internalized at 60 min, cells appeared to express only one lamellipodia (Fig. 8D). Again, in Δ Kiss1R-P2.58 cells, no important reactivity was observed, except, the tendency to emit one lamellipodia, concomitantly to the disappearance of the receptors from the plasma membrane at 20 min of treatment (Fig. 8D).

Thus, the specificity of the temporal regulation of receptor trafficking and adhesion assembly and disassembly leading to the selection of one lamellipodia at the expense of more

than one, belongs to the P2.58 receptors likely allowing directional cell migration. The absence of regulation of FA degradation associated with no controlled desensitization/re-sensitization of P2.59 receptors, allow random motility *via* the development of a number of lamellipodia per cells.

Discussion

A large family of GPCRs shows the ability to detect variable small peptides or chemokine to direct chemotactic cell migration. One of the current goal is to understand how GPCR machinery may sense gradients of molecular ligands to couple $G\alpha\beta\gamma$ proteins and control, in a spatiotemporal way, signaling events leading to chemotaxis. We address the issue of the role of chemoattractant receptors under an evolutionary angle. Indeed, it is here postulated that the ancestral deletion in TM2 of G0 receptor family including the PEP (Kiss1R-P2.59) subclass exhibiting for a majority a P2.59 (Fig. 1A), likely yields a P2.58 in receptors of G1 group with SO (UT), CHEM (CXCR4) or PUR (Fig. 1A). Based on an original method of receptor classification, detailed analysis of helical distortions and crystallographic structures of Rhodopsine GPCRs confirming a kink structure of TM2 in P2.58 receptors (Fig. 1B), we intend to provide new insights into chemotactic receptors and a better understanding of their activation mechanism. Engineering the P2.50 prototype Kiss1R and the two P2.58 UT and CXCR4 prototypes by single mutation of Pro to Ala or insertion/deletion to reposition the Pro, was performed to gain information on the receptor folding, binding properties, couplings and involvement in migration/adhesion. Our work highlights the major role in PEP, SO and CHEM GPCRs of the proline in TM2, in activation and G protein couplings, and the key impact of its repositioning from P2.58 to P2.59 regulating spatiotemporally cell surface receptor availability and adhesion/deadhesion properties, likely responsible for a switch, *i.e.* chemotactic behaviour to chemokinesis random migratory properties.

Specific signalling of the chemotactic UT-P2.58 and CXCR4-P2.58 compared with the peptide receptor Kiss1R-P2.59

We demonstrate that activation of UT-P2.58 and CXCR4-P2.58 expressed in HEK293 cells by UII and SDF-1 α , respectively, induces various couplings to different signaling pathways. For the UII/UT-P2.58 system, we observe normal traffic to the plasma membrane, recruitment of G_q , $c[Ca^{2+}]$ and polyphosphoinositid mobilization, G_{i1} and G_{oA} , and β -Arrestin-2 and downstream events, including a potential $G_{\alpha13}$ activation, two phases of ERK activation and two phases of endocytic/internalization processes. These data are in agreement with the previous studies demonstrated UT-P2.58 receptor direct couplings to G_q , G_{i1} , G_{oA} , G_{13} proteins and β -Arrestin 1 and 2, and the downstream events ERK1/2 (Brulé *et al.*, 2014) or indirect signaling *via* $G_{q/11}$ and $G_{i/o}$ proteins (Tzanidis *et al.*, 2003; Jarry *et al.*, 2010), protein kinase C, P38, MAPK, ERK1/2 and Rho/ROCK cascades (Rossowski *et al.*, 2002; Grieco *et*

al., 2011; Lecointre *et al.*, 2015). However, for the SDF-1/CXCR4 system, it is rather shown the non-coupling to G_q and the absence of stimulation of ${}_c[Ca^{2+}]$ and IP_1 production, while couplings to G_{i1} and G_{oA} proteins, recruitment of β -Arrestin 2 but also cyclic control of cell surface expression during activation, and concomitant adhesion disassembly. These observations indicate that in HEK293 cells expressing human recombinant receptors, common couplings/functions can be found between CXCR4-P2.58 and UT-P2.58. Indeed a number of studies previously demonstrating that several CXCR4-mediated effects are relayed by $G_{\alpha i}$ and $G_{\beta\gamma}$ proteins as well as β -Arrestin 2 (Busillo and Benovic, 2007), or GRKs (Busillo *et al.*, 2010) inducing uncoupling from G protein and receptor recycling or internalization (Pozzobon *et al.*, 2016). However, our CXCR4-P2.58 signaling studies otherwise stress distinct properties than UT-P2.58, as exemplified by the absence of specific $G_q/Ca^{2+}/PLC$ pathway. This aspect appears to be in controversy with the previous studies, demonstrating that $G_{\beta\gamma}$ dimer would trigger PLC- β activation, hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) into inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) and then IP3 production leading to Ca^{2+} mobilization (Mellado *et al.*, 2001; Rubin, 2009). But clearly, there is still much to know about how specific G protein composition contributes to cell-specific responses to SDF-1 α . Here, we do not detect G_q as well as Ca^{2+} couplings, this may be explained by i) a potential activation involving sequential G_i - G_q effects, as for the adrenergic receptor where initial $G_s/cAMP/PKA$ activity mediates receptor phosphorylation leading to a switch towards G_i (Daaka *et al.*, 1997), and/or ii) the potential co-expression/heterodimerization with other receptors blocking or favoring the SDF-1 α -induced ${}_c[Ca^{2+}]$ increase, as reported for the CXCR4-CXCR7 (Levoye *et al.*, 2009) and the CXCR4-CCR5 heterodimers (Contento *et al.*, 2008). Thus, even if the G_{i10} and β -Arrestin 2 couplings of CXCR4 appears compatible with the well-known mechanisms described in the literature (Pozzobon *et al.*, 2016), we chose here the UII/UT system as a good candidate/prototype for P2.58 receptor-mediating signaling pathways for chemotaxis. As comparison, we made the option to work on the Kiss1R-P2.59 receptor for comparison with UT and CXCR4. Our work, clearly demonstrate the Kiss1R-P2.59- $G_{\alpha q}$ coupling, PIP metabolism and ${}_c[Ca^{2+}]$ mobilization, but also the ras-ERK1/2 pathway. In contrast, Kiss1R failed to recruit G_{i1} and G_{oA} , and also, in our study, β -arrestin 2 in HEK293 cells. These are, globally, in total agreement the classically established $G_q/PLC/Ca^{2+}/PKC$ couplings, and ERK1/2 activation (Cvetkovic *et al.*, 2013; Castano *et al.*, 2009). Concerning the difficulty here to measure β -arrestin 2 coupling to the Kiss1R-P2.59, associated to the very surprising inability to bind the KP-10 in our HTRF technological strategy can be explained by the constitutive associated GRK2 and/or β -Arrestin 1 and 2 to

the receptor, and the potential constitutive G protein-uncoupled Kiss1R- β -arrestin dependent internalization (Pampillo *et al.*, 2009). Accordingly, recent studies proposed that the bulk of internalized Kiss1R is rapidly recycled back to the cell surface with little being targeted for degradation (Bianco *et al.*, 2011). Thus, Kiss1R-P2.59 may be dynamically recycled providing a constant amount of binding and signaling of Kiss1R upon KP-10 stimulation (Bianco *et al.* 2011). Collectively, our data establish similarities and differences in the signaling pathways activated by P2.58 and P2.59 receptors, strengthening the central node of the $G_{\alpha i} \beta \gamma$ and β -Arrestin 2 in P2.58 receptors, in the absence of the evaluation here of the $G_{\alpha 12/\alpha 13}$ protein couplings. Thus, the question on how these P2.58 receptors control specifically chemotaxis instead of their slight differences, remains to be clarified.

Events shared by chemotactic UT-P2.58 and CXCR4-P2.58 to allow cell chemotaxis versus chemokinesis

Chemoattractant GPCRs such as CXCRs, formyl-Met-Leu-Phe (fMLP), C5a, AT-1 or leukotriene B₄, from a subfamily that all couple a PTX-sensitive cAMP-inhibitory $G_{\alpha i}$ protein, induce directed cell migration. Here, we confirmed the pleiotropic activity of UT-P2.58, recently associated with a major role in cell migration and survival (Brulé *et al.*, 2014, Grieco *et al.*, 2011). More specifically, we previously demonstrated in glioma cells, that a gradient concentration of UII induces a G_{13} /Rho/ROCK cascade in the one hand, and a $G_{i/o}$ /PI3K pathway in another hand, mediating chemotactic migration (Lecointre *et al.*, 2015). These findings were highly consistent with the previously proposed multiple coupling to $G_{\alpha 13}$ /ROCK and $G_{\alpha i/o}$ /PI3K cascades displayed by the professional chemotactic CXCR4 (Tan *et al.*, 2006; Rubin, 2009). In contrast, activation of Kiss1R-P2.59 was almost systematically described as a metastasis suppressing factors in melanoma, breast cancer (Lee *et al.*, 1996; Lee and Welch, 1997) or ovarian carcinoma cells (Jiang *et al.*, 2005). For instance, activation of Kiss1R-P2.59 by KP leads to G_q coupling and subsequent inhibition/modification of cell migration and invasion (Li *et al.*, 2012; Navenot *et al.*, 2009).

In the present study, we tested the effect of UII and SDF-1 or KP-10 at activating UT-P2.58, CXCR4-P2.58 or KISS1R-P2.59 in their ability to induce chemotaxis and/or chemokinesis of recombinant HEK cells. In the boyden chamber assay, UII and SDF-1 mediate chemotactic migration whereas KP-10 rather induces chemokinesis, being able to relay motility even in the presence of homogenous concentrations. It shows for the first time the difference between P2.58 receptors, mediating polarized cell migration involving adhesion to the matrix component, and a P2.59 receptor stimulating motility even in homogenous

concentrations of ligands, suggesting less controlled adhesive properties. Thus, this key aspect may constitute part of the old-age question on how receptor homogeneously distributed at the plasma membrane may regulate polarization of the cells and the moving in one direction. It means that signaling molecules involved in cytoskeleton reorganization must be temporally regulated and spatially controlled. Among these proteins, those forming nascent adhesions and mature FAs were recently described as signaling hubs for chemotaxis (Case *et al.*, 2015). As attended for chemotactic receptors, we measured increased adhesion of cells after 15 min incubation of cells expressing UT-P2.58 and CXCR4-P2.58 (and not 30 min, *not shown*) with UII and SDF-1 α , and in the case of UT, the activation of the P-paxillin and the number of FAs, and then recruitment of β 1 integrins associated with a tendency to stimulate FAK. In contrast, even if Kiss1R-P2.59 also increased the number of FAs, cells did not show clear adhesion at 15 min, and neither factors involved in the formation of FAs were seen to be specifically involved, suggesting that some adhesion points can be constitutively formed to allow motility, but that Kiss1R-P.59 mainly favors traction forces.

Our preliminary experiments suggest that the directional migration evoked by UT-P2.58 required directly or indirectly $G_{\alpha 13}$ and not $G_{\alpha q}$ activation whereas cell motility resulting from the Kiss1R-P2.59 is totally dependent on $G_{\alpha q}$ protein. This original observation can be implemented by the previous data indicating that the P2.58 receptors PAR-2 and AT-1, known to be also coupled to $G_{\alpha q}$, would mediate chemotaxis independent of G_q proteins, and in the case of PAR-2, receptor-induced chemotaxis may even be antagonized by G_q (DeFea, 2007). Indeed, chemotaxis mediated by these two receptors has been shown to involve β -Arrestins (Hunton *et al.*, 2005; Ge *et al.*, 2004). According to this, UT-P2.58 and CXCR4-P2.58 were able to recruit β -Arrestin 2 and also, their endocytic/internalized behavior was shown to be regulated in two phase manner, a short-term disappearance from the cell surface, followed by a transitory return to the plasma membrane, and then a new phase of endocytosis, under continuous ligand activation at low desensitized concentrations (10^{-9} M). This is probably connected to the previous studies showing that desensitization and recycling of chemotactic receptors are essential for maintaining polarity, and that β -arrestins may serve as a scaffold for proteins involved in cytoskeleton reorganization (Caterina *et al.*, 1995; Xiao *et al.*, 1997). In our study, few minutes following the activation of UT-P2.58, less receptors are detected at the plasma membrane, associated with diminished number but increased size of FA, and a second transient phase then consists in recycling of UT-P2.58 (15 min) to the plasma membrane, concomitant with the increased number of FAs, and the enhancement of the nascent adhesions. In addition, in the meantime, cells likely suppress lamellipodia to allow

a majority of cells with one lamellipodia, important for cell polarization. Even if we need to perform addition experiments, we expect that the second phase of ERK1/2, previously described in the paper of Brulé *et al.* (2014) and confirmed here, is tightly connected with this transient cycle of cell adhesion allowing chemotactic migration. Accordingly, cell migration was previously shown to be governed by succession of adhesion and de-adhesion steps and a balance with this two processes is required for an optimal cell movement (Hautaniemi *et al.*, 2005).

During 60 min of Kiss1R-P2.59 ligand exposure, increased number of FAs without phasic regulation of the expression of the receptor at the plasma membrane, associated with the cyclic reduction of FAs area and synthesis of nascent focal complexes, would favor chemokinesis. Also, cells exhibit more than one lamellipodia during receptor activation, suggesting that cells would be more prone to move randomly, with less efficiency in term of directionality. Together, by comparing our data on P2.58 and P.59 receptors, a dynamic wave involving connection between receptor desensitization and resensitization, increased FAs size (suggestive of maturation) and neo-formation of tight adhesions, associated with selection of the number of lamellipodia, strongly support the definition of cell chemotaxis. This synthesis has to bring closer to recent publications demonstrating that i) β -arrestin 2 facilitates recycling of δ -opioid receptor (δ -OR) after binding to low internalizing agonist potentially involving G $\beta\gamma$ proteins (Audet *et al.*, 2012; Pradan *et al.*, 2016), ii) FA turnover at the leading edge of migrating cells may involve inhibition of autophagy leading to absence of degradation of phosphorylated FA proteins (Kenific *et al.*, 2016), and iii) activated ERK1/2 at the plasma membrane may facilitate binding of mcalpains to PIP2, and therefore its localization at the rear plasma membrane, being centrally involved in directional cell migration (Shao *et al.*, 2006; Leloup *et al.*, 2010). Considering that our recent original study established that UT-P2.58 and CXCR4-P.2.58 stimulate mcalpain activity and inhibit autophagy, to favor chemotactic migration (Coly *et al.*, 2016), we proposed the following model for the number of chemotactic P2.58 GPCRs: Low desensitizing agonist of receptor likely evokes G $\alpha i/\beta\gamma$ protein activation, as well as G α_{13} , leading to a diminished cAMP and PKA activity, as well as ERK1/2 activation, responsible for a first wave of activation important for adhesion at the leading edge and membrane ruffling, followed by binding of β -Arrestin 2, recycling of the receptor to the plasma membrane, initiation of reactivation of ERK1/2 combined with the concomitantly inhibited state of PKA, may lead to mcalpain-activation at rear or side edge of cells, may favor local FA disassembly, elimination of proximal protrusion to direct polarized migration (Fig. 9). Of course, additional mechanisms such as FAK signaling (Webb *et al.*,

2004) are also implicated in FA disassembly. The random motility stimulated by Kiss1R-P2.59, that can be related to the KP-induced morphological changes of cells previously described (Navenot *et al.*, 2009), is shown to be dependent on G_q signaling cascade, likely favoring adhesion and migration. We propose that it may involve Rho A and Rac-dependent cell contraction (Kato *et al.*, 1998; Chikumi *et al.*, 2002; Vogt *et al.*, 2003) and migration. In the context of Rac and downstream effectors, being involved in collective behavior of multiple self-organizing waves, we hypothesize that Kiss1R-P2.59 receptors as other members of the same family, would be involved in “pushing” such endogenous dynamic.

Impact of the mutation of the proline or insertion/deletion in activation of P2.58 and P2.59 receptors

Based on the hypothetical scheme important to better understand the subtle differences between sensing a gradient and moving towards the good direction (chemotaxis), or accelerating movements in a random way (chemokinesis), we here aimed to decipher whether the P2.58 would allow a high sensitivity to changes in ligand concentration and/or accompany the cycle of desensitization/resensitization essential for directional migration. Indeed, P2.58A or P2.59A mutations, but also originally, insertion and deletion to reposition the Pro from 2.58 to 2.59 in UT and CXCR4) and P2.59 to P2.58 in Kiss1R have been conducted. These mutants were correctly folded at the plasma membrane likely allowing binding, more particularly for the Δ Kiss1R-P2.58, suggesting that this proline in PEP, SO and CHEM receptors is not essential for reticulum sorting or membrane expression. It is interesting to note that P2.58 mutations into P2.59 impact while maintaining, binding of SDF-1 α whereas P2.59 mutants exhibited a large increased conformational change during agonist binding. Accordingly, mutation of the Pro to Ala in the TXP motif into CCR5 decreased ligand binding and signaling (Arias *et al.*, 2003) while into the AT-1, it does not result in diminish affinity for the agonist, but clear decrease in signaling transduction (Reis *et al.*, 2007). This is closed to our results demonstrating that Δ UT-P2.58A/P2.59 and Δ CXCR4-P2.58A/P2.59 mutant receptors completely lost direct G_i and G_o couplings, while the affinity for the direct G_q coupling is clearly shifted but conserved, and then G α 13 activation would have been also lost, suggesting a strong importance of this proline for the G_{i/o} as well as G₁₃ but also G_q protein couplings. However, It is interesting to observe that IP₁ production remains to be detected for UT receptor mutants allowing G_q-dependent motile behavior. When the Pro is mutated or repositioned in Δ Kiss1R-P2.59A and Δ Kiss1R-P2.58, direct G_q coupling is almost abolished, a coupling that appears involved in the motile behavior of Kiss1R-P2.59. Together,

we can say that P2.58 and P2.59 positions mediate receptor activation and are important for the specific $G_{i/o}$ couplings in P2.58 receptors, or for G_q recruitment in P2.59 receptors. In addition, we also demonstrated for the first time that P2-58-induced recruitment of β -Arrestin 2 was abolished in the Δ P2.59 mutants, in the same way than for the wild-type Kiss1R-P2.59 receptor. This last aspect remains to be clarified, and also may be specific to Kiss1R since β -Arrestin 2 has been shown to be recruited by a number of G0 receptor family (Ren *et al.*, 2005).

The choice of the Kiss1R as prototype of P2.59 (PEP) and UT (SO) and CXCR4 (CHEM) as prototype of P2.58 receptors, enabled UT to have an optimal position, likely having conserved the G_q coupling for its ancestral KISS receptor family, and acquired specific $G_{i/o}$ couplings (and others, $G_{\alpha 13}$) to mediate chemotactic behavior. Thus, this is probably the reason why the Δ UT-P2.59 mutant, even if it not reproduces the behavior of the Kiss1R-P2.59 because of the key role of the Pro in TM2, at least in part mimics some Kiss1R-mediating activities. It relies on conserved G_q -mediating cell motility, loss of cell adhesion properties, and cyclic reinsertion of the receptor to the plasma membrane important for FA disassembly and selection of lamellipodia. Reversely, we were less successful with the Δ Kiss1R-P2.58 mutant because it did not acquire a detectable $G_{\alpha i/o}$ coupling, lost G_q coupling (even if IP1 metabolism can be detected), nevertheless, exhibited tight ability to show an onset of regulated adhesion properties, with a reduced number of lamellipodia associated with ERK1/2 activation and receptor endocytosis in a G-protein independent way. This hypothesis is also supported by the works establishing that different signaling pathways can be decoupled (Liu *et al.*, 2012). At this stage, we think that it will be very important to test the potential β -Arrestin 2 acquired coupling during the kinetic of activation of the Δ Kiss1R-P2.58 because previous studies demonstrated that β -Arrestin 2-deficient leucocytes were impaired in chemotaxis evoked by AT-1- and PAR-2- $G_{\alpha q}$ receptors (Hunton *et al.*, 2005; Ge *et al.*, 2004).

In summary, we propose that the P2.58 repositioning in Rhodopsin Class family GPCRs allow, first, a propensity to be engaged with β -arrestin 2, and for low desensitized ligand concentration, to strengthen the engagement between P2.58 receptor and β -arrestin 2, at the cells membrane then encouraging receptor reinsertion. This mechanism, again would allow sequestration for instance of ERK1/2 at the plasma membrane with other potential partners (See for review DeFea, 2007), important for localized adhesion or deadhesion and chemotactic behavior. However, the acquisition of the $G_{i/o}$ coupling would be more complex and probably involved during evolutionary processes, over correlated mutations.

Potential receptor conformational changes leading to acquisition of the β -Arrestin 2 resensitizing phenotype of P2.58 receptors?

In the absence of any molecular modeling of the wild-type Kiss1R-P2.59 or UT-P2.58 or CXCR4-P2.58 versus the insertion/deletion respective mutants, we tentatively make a proposition concerning structural aspects of the role of the proline in P2.59 or P2.58 in TM2 of G0 and G1 receptor groups (Devillé *et al.*, 2009). Modeling and crystallographic studies led to the establishment that the unusual proline pattern in TM2 (P2.58, P.2.59 or P2.60) or even no proline, led to a distortion, either resulting in a bulge (P2.59) or a kink (P2.58) structure (Cherezov *et al.*, 2007; Rasmussen *et al.*, 2007; Warne *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2010; Devillé *et al.*, 2009; Fenalti *et al.*, 2014). The helical distortions may play a major role in the overall fold of GPCRs. In fact most GPCRs possess α -Bulges in TM2 and TM5 (Rey *et al.*, 2010; Cartiailler *et al.*, 2004), probably also observable in most other GPCR helices (Van der Kant and Vriend, 2014). These bulges appear to be a prominent feature of GPCRs, and thus the presence or absence of this bulge, may be directly linked to a specific activation process. In our study, modeling of localized proline in TM2, confirmed a bulge structure in the wild-type Kiss1R-P2.59 and the mutant Δ UT-P2.59 and Δ CXCR4-P2.59, and a kink structure of the wild-type UT-P2.58 and CXCR4-P2.58 as well as the mutant Δ Kiss1R-P.58 receptors, suggesting that our interpretation on the ability of P2.59 to lose a specific- β -arrestin (and also $G_{i/o}$) coupling, would be attributed to the kink structure of TM2.

Ultimately, ligand binding features (low gradient or highly desensitizing concentrations) occurring in P2.58 receptors can mediate differential signaling events and cell activities, likely resembling to biased behavior. Analysis of active and inactive crystal structures, has led to the proposal of common activation mechanisms for Rhodopsine class GPCRs which stress the central hydrophobic core (Tehan *et al.*, 2014) or TM3 as a central hub in the core (Dalton *et al.*, 2015). However Activation of either G protein or β -arrestin signaling pathway has been shown to result from different conformational changes of receptors, but appears to be in general, a relatively conserved mechanism between, for instance, P2.59 and P2.58 GPCRs. It is proposed that G protein coupling involves a conformational switch of two interacting side chains (Valentin-Hansen *et al.*, 2012) leading to straightening of TM3, kinking of TM6 and opening of the G protein binding site at the intracellular surface of the receptor (Tautermann *et al.*, 2014), whereas β -Arrestin 2 recruitment may implicate the TM1-TM2 and TM7-water network and N^{a+} binding. Comparing the crystal structure of the muscarinic receptor M2R (G0 group, Fig. 1A) and the δ OR (SO, Fig. 1A), the internal water network, connecting the ligand binding site to the intracellular interface, and the Na^+ binding site, involving the well-

known motif NPXXY motif on TM7, the WXP motif on TM6 and also importantly, the N2.50 motif on TM2, are conserved (Gutierrez-de-Teran, et al., 2013). Negative allosteric effects of Na⁺ on ligand binding and stability has been already shown in α -adrenergic receptor (G0 group) (Goblyos and Ijzerman, 2010; Parker *et al.*, 2008; Magnani *et al.*, 2008). Thus, the mechanism distinguishing P2.58 from P2.59 receptors, in their specific potential propensity to be couple to β -arrestins in a certain manner, may be rather subtle variations in hydrogen bonding engaged with and surrounding N^{at} between notably N2.50 (TM2) and S3.39 (TM3). In δ OR, Na⁺ is also coordinated by the non-conserved N3.35 side chain that when mutated, evoked a constitutive selective activity toward β -arrestin 2 (Fenalti *et al.*, 2014). We can propose that the polar residues (as N but also T or G) at the 3.35, conserved in opioid-, PAR1-, CXCR4- but also UT-type P2.58 receptors, may constitute a key specific feature allowing high sensitivity for ligand binding and β -arrestin 2 coupling mediating signaling events. In P2.59 or P2.60 receptors including KISS1R, we follow the previously proposed mechanism suggesting that high affinity binding and the presence of N^{at} are indeed mutually exclusive, consistent with the observed negative allosteric effects of N^{at} on binding of agonist of this GPCR group family (Parker *et al.*, 2008).

In conclusion, our work led to a general view on evolutionary related Rhodopsin class GPCRs resulting from deletion in TM2, splitting P2.58 (UT or CXCR4) receptors from peptide receptors (Kiss1R) which possess for some a P2.59. We propose that the kink structure of TM2 of the SO, CHEM and potentially PUR family GPCRs, favors specific competence acquisition at least residing in high ligand sensitivity, β -arrestin 2 coupling in receptor-bound state, desensitization/resensitization of receptor leading to assembly/disassembly of FA to mediate chemotactic cell migration. This specific behavior would finely introduce a break in cell signaling waves occurring during cell migration.

References

- Arias, D.A., Navenot, J.-M., Zhang, W., Broach, J., Peiper, S.C., 2003. Constitutive Activation of CCR5 and CCR2 Induced by Conformational Changes in the Conserved TXP Motif in Transmembrane Helix 2. *J. Biol. Chem.* 278, 36513–36521. doi:10.1074/jbc.M303739200
- Artemenko, Y., Lampert, T.J., Devreotes, P.N., 2014. Moving towards a paradigm: common mechanisms of chemotactic signaling in Dictyostelium and mammalian leukocytes. *Cell. Mol. Life Sci.* 71, 3711–3747. doi:10.1007/s00018-014-1638-8
- Audet, N., Charfi, I., Mnie-Filali, O., Amraei, M., Chabot-Doré, A.-J., Millicamps, M., Stone, L.S., Pineyro, G., 2012. Differential association of receptor-G $\beta\gamma$ complexes with β -arrestin2 determines recycling bias and potential for tolerance of δ opioid receptor agonists. *J. Neurosci.* 32, 4827–4840. doi:10.1523/JNEUROSCI.3734-11.2012
- Ballesteros, J.A., Weinstein, H., 1995. [19] Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors, in: Sealfon, S.C. (Ed.), *Methods in Neurosciences, Receptor Molecular Biology*. Academic Press, pp. 366–428.
- Bianco, S.D.C., Vandepas, L., Correa-Medina, M., Gereben, B., Mukherjee, A., Kuohung, W., Carroll, R., Teles, M.G., Latronico, A.C., Kaiser, U.B., 2011. KISS1R intracellular trafficking and degradation: effect of the Arg386Pro disease-associated mutation. *Endocrinology* 152, 1616–1626. doi:10.1210/en.2010-0903
- Bjarnadóttir, T.K., Gloriam, D.E., Hellstrand, S.H., Kristiansson, H., Fredriksson, R., Schiöth, H.B., 2006. Comprehensive repertoire and phylogenetic analysis of the G protein-coupled receptors in human and mouse. *Genomics* 88, 263–273. doi:10.1016/j.ygeno.2006.04.001
- Blaser, H., Reichman-Fried, M., Castanon, I., Dumstrei, K., Marlow, F.L., Kawakami, K., Solnica-Krezel, L., Heisenberg, C.-P., Raz, E., 2006. Migration of zebrafish primordial germ cells: a role for myosin contraction and cytoplasmic flow. *Dev. Cell* 11, 613–627. doi:10.1016/j.devcel.2006.09.023
- Bravo-Cordero, J.J., Hodgson, L., Condeelis, J., 2012. Directed cell invasion and migration during metastasis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 24, 277–283. doi:10.1016/j.ceb.2011.12.004
- Brulé, C., Perzo, N., Joubert, J.-E., Sainsily, X., Leduc, R., Castel, H., Prézeau, L., 2014. Biased signaling regulates the pleiotropic effects of the urotensin II receptor to modulate its cellular behaviors. *FASEB J* 28, 5148–5162. doi:10.1096/fj.14-249771
- Busillo, J.M., Armando, S., Sengupta, R., Meucci, O., Bouvier, M., Benovic, J.L., 2010. Site-specific phosphorylation of CXCR4 is dynamically regulated by multiple kinases and results in differential modulation of CXCR4 signaling. *J. Biol. Chem.* 285, 7805–7817. doi:10.1074/jbc.M109.091173

- Busillo, J.M., Benovic, J.L., 2007. Regulation of CXCR4 signaling. *Biochim. Biophys. Acta* 1768, 952–963. doi:10.1016/j.bbamem.2006.11.002
- Cao, X., Yan, J., Shu, S., Brzostowski, J.A., Jin, T., 2014. Arrestins function in cAR1 GPCR-mediated signaling and cAR1 internalization in the development of *Dictyostelium discoideum*. *Mol. Biol. Cell* 25, 3210–3221. doi:10.1091/mbc.E14-03-0834
- Cartailler, J.-P., Luecke, H., 2004. Structural and functional characterization of pi bulges and other short intrahelical deformations. *Structure* 12, 133–144.
- Case, L.B., Baird, M.A., Shtengel, G., Campbell, S.L., Hess, H.F., Davidson, M.W., Waterman, C.M., 2015. Molecular mechanism of vinculin activation and nanoscale spatial organization in focal adhesions. *Nat Cell Biol* 17, 880–892. doi:10.1038/ncb3180
- Castaño, J.P., Martínez-Fuentes, A.J., Gutiérrez-Pascual, E., Vaudry, H., Tena-Sempere, M., Malagón, M.M., 2009. Intracellular signaling pathways activated by kisspeptins through GPR54: do multiple signals underlie function diversity? *Peptides* 30, 10–15. doi:10.1016/j.peptides.2008.07.025
- Caterina, M.J., Devreotes, P.N., Borleis, J., Hereld, D., 1995. Agonist-induced loss of ligand binding is correlated with phosphorylation of cAR1, a G protein-coupled chemoattractant receptor from *Dictyostelium*. *J. Biol. Chem.* 270, 8667–8672.
- Chabbert, M., Castel, H., Pele, J., Deville, J., Legendre, R., Rodien, P., 2012. Evolution of class A G-protein-coupled receptors: implications for molecular modeling. *Curr. Med. Chem.* 19, 1110–1118.
- Chantreau, V., Taddese, B., Munier, M., Gourdin, L., Henrion, D., Rodien, P., Chabbert, M., 2015. Molecular Insights into the Transmembrane Domain of the Thyrotropin Receptor. *PLOS ONE* 10, e0142250. doi:10.1371/journal.pone.0142250
- Cherezov, V., Rosenbaum, D.M., Hanson, M.A., Rasmussen, S.G.F., Thian, F.S., Kobilka, T.S., Choi, H.-J., Kuhn, P., Weis, W.I., Kobilka, B.K., Stevens, R.C., 2007. High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* 318, 1258–1265. doi:10.1126/science.1150577
- Chikumi, H., Vázquez-Prado, J., Servitja, J.-M., Miyazaki, H., Gutkind, J.S., 2002. Potent Activation of RhoA by Gαq and Gq-coupled Receptors. *J. Biol. Chem.* 277, 27130–27134. doi:10.1074/jbc.M204715200
- Cho, S.-G., Li, D., Tan, K., Siwko, S.K., Liu, M., 2012. KiSS1 and its G-protein-coupled receptor GPR54 in cancer development and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 31, 585–591. doi:10.1007/s10555-012-9367-7
- Choi, C.K., Vicente-Manzanares, M., Zareno, J., Whitmore, L.A., Mogilner, A., Horwitz, A.R., 2008. Actin and alpha-actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent

- adhesions in a myosin II motor-independent manner. *Nat. Cell Biol.* 10, 1039–1050. doi:10.1038/ncb1763
- Choi, C.K., Zareno, J., Digman, M.A., Gratton, E., Horwitz, A.R., 2011. Cross-correlated fluctuation analysis reveals phosphorylation-regulated paxillin-FAK complexes in nascent adhesions. *Biophys. J.* 100, 583–592. doi:10.1016/j.bpj.2010.12.3719
- Coly, P.-M., Perzo, N., Le Joncour, V., Lecointre, C., Schouft, M.-T., Desrues, L., Tonon, M.-C., Wurtz, O., Gandolfo, P., Castel, H., Morin, F., 2016. Chemotactic G protein-coupled receptors control cell migration by repressing autophagosome biogenesis. *Autophagy* 0. doi:10.1080/15548627.2016.1235125
- Contento, R.L., Molon, B., Boullaran, C., Pozzan, T., Manes, S., Marullo, S., Viola, A., 2008. CXCR4-CCR5: a couple modulating T cell functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 10101–10106. doi:10.1073/pnas.0804286105
- Cvetkovic, D., Dragan, M., Leith, S.J., Mir, Z.M., Leong, H.S., Pampillo, M., Lewis, J.D., Babwah, A.V., Bhattacharya, M., 2013. KISS1R induces invasiveness of estrogen receptor-negative human mammary epithelial and breast cancer cells. *Endocrinology* 154, 1999–2014. doi:10.1210/en.2012-2164
- Daaka, Y., Luttrell, L.M., Lefkowitz, R.J., 1997. Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* 390, 88–91. doi:10.1038/36362
- Dalton, J.A., Lans, I., Giraldo, J., 2015. Quantifying conformational changes in GPCRs: glimpse of a common functional mechanism. *BMC Bioinformatics* 16. doi:10.1186/s12859-015-0567-3
- DeFea, K.A., 2007. Stop that cell! Beta-arrestin-dependent chemotaxis: a tale of localized actin assembly and receptor desensitization. *Annu. Rev. Physiol.* 69, 535–560. doi:10.1146/annurev.physiol.69.022405.154804
- Deupi, X., Dölker, N., López-Rodríguez, M.L., Campillo, M., Ballesteros, J.A., Pardo, L., 2007. Structural models of class a G protein-coupled receptors as a tool for drug design: insights on transmembrane bundle plasticity. *Curr Top Med Chem* 7, 991–998.
- Deupi, X., Kobilka, B.K., 2010. Energy Landscapes as a Tool to Integrate GPCR Structure, Dynamics, and Function. *Physiology* 25, 293–303. doi:10.1152/physiol.00002.2010
- Devillé, J., Rey, J., Chabbert, M., 2009. An indel in transmembrane helix 2 helps to trace the molecular evolution of class A G-protein-coupled receptors. *J. Mol. Evol.* 68, 475–489. doi:10.1007/s00239-009-9214-9
- Fenalti, G., Giguere, P.M., Katritch, V., Huang, X.-P., Thompson, A.A., Cherezov, V., Roth, B.L., Stevens, R.C., 2014. Molecular control of δ -opioid receptor signalling. *Nature* 506, 191–196. doi:10.1038/nature12944

- 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. *Mol. Pharmacol.* 63, 1256–1272. doi:10.1124/mol.63.6.1256
- Funamoto, S., Meili, R., Lee, S., Parry, L., Firtel, R.A., 2002. Spatial and temporal regulation of 3-phosphoinositides by PI 3-kinase and PTEN mediates chemotaxis. *Cell* 109, 611–623.
- Ge, L., Shenoy, S.K., Lefkowitz, R.J., DeFea, K., 2004. Constitutive protease-activated receptor-2-mediated migration of MDA MB-231 breast cancer cells requires both beta-arrestin-1 and -2. *J. Biol. Chem.* 279, 55419–55424. doi:10.1074/jbc.M410312200
- Geiger, B., Yamada, K.M., 2011. Molecular architecture and function of matrix adhesions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3. doi:10.1101/cshperspect.a005033
- Glodek, A.M., Honczarenko, M., Le, Y., Campbell, J.J., Silberstein, L.E., 2003. Sustained activation of cell adhesion is a differentially regulated process in B lymphopoiesis. *J. Exp. Med.* 197, 461–473.
- Göblyös, A., Ijzerman, A.P., 2011. Allosteric modulation of adenosine receptors. *Biochim. Biophys. Acta* 1808, 1309–1318. doi:10.1016/j.bbamem.2010.06.013
- Govaerts, C., Blanpain, C., Deupi, X., Ballet, S., Ballesteros, J.A., Wodak, S.J., Vassart, G., Pardo, L., Parmentier, M., 2001. The TXP motif in the second transmembrane helix of CCR5. A structural determinant of chemokine-induced activation. *J. Biol. Chem.* 276, 13217–13225. doi:10.1074/jbc.M011670200
- Govaerts, C., Bondue, A., Springael, J.-Y., Olivella, M., Deupi, X., Poul, E.L., Wodak, S.J., Parmentier, M., Pardo, L., Blanpain, C., 2003. Activation of CCR5 by Chemokines Involves an Aromatic Cluster between Transmembrane Helices 2 and 3. *J. Biol. Chem.* 278, 1892–1903. doi:10.1074/jbc.M205685200
- Gradel, K.O., Nørgaard, M., Schønheyder, H.C., Dethlefsen, C., Ejlersen, T., Kristensen, B., Nielsen, H., 2010. Salmonella or Campylobacter gastroenteritis prior to a cancer diagnosis does not aggravate the prognosis: a population-based follow-up study. *APMIS* 118, 136–142. doi:10.1111/j.1600-0463.2009.02571.x
- Grieco, P., Franco, R., Bozzuto, G., Toccaceli, L., Sgambato, A., Marra, M., Zappavigna, S., Migaldi, M., Rossi, G., Striano, S., Marra, L., Gallo, L., Cittadini, A., Botti, G., Novellino, E., Molinari, A., Budillon, A., Caraglia, M., 2011. Urotensin II receptor predicts the clinical outcome of prostate cancer patients and is involved in the regulation of motility of prostate adenocarcinoma cells. *J. Cell. Biochem.* 112, 341–353. doi:10.1002/jcb.22933
- Gutiérrez-de-Terán, H., Massink, A., Rodríguez, D., Liu, W., Han, G.W., Joseph, J.S., Katritch, I., Heitman, L.H., Xia, L., Ijzerman, A.P., Cherezov, V., Katritch, V., Stevens, R.C., 2013. The role of a sodium ion binding site in the allosteric modulation of the A(2A)

- adenosine G protein-coupled receptor. *Structure* 21, 2175–2185. doi:10.1016/j.str.2013.09.020
- Hautaniemi, S., Kharait, S., Iwabu, A., Wells, A., Lauffenburger, D.A., 2005. Modeling of signal-response cascades using decision tree analysis. *Bioinformatics* 21, 2027–2035. doi:10.1093/bioinformatics/bti285
- Horuk, R., 1998. Chemokines beyond inflammation. *Nature* 393, 524–525. doi:10.1038/31116
- Huang, X., Shen, J., Cui, M., Shen, L., Luo, X., Ling, K., Pei, G., Jiang, H., Chen, K., 2003. Molecular dynamics simulations on SDF-1alpha: binding with CXCR4 receptor. *Biophys. J.* 84, 171–184. doi:10.1016/S0006-3495(03)74840-1
- Hunton, D.L., Barnes, W.G., Kim, J., Ren, X.-R., Violin, J.D., Reiter, E., Milligan, G., Patel, D.D., Lefkowitz, R.J., 2005. Beta-arrestin 2-dependent angiotensin II type 1A receptor-mediated pathway of chemotaxis. *Mol. Pharmacol.* 67, 1229–1236. doi:10.1124/mol.104.006270
- Iijima, M., Devreotes, P., 2002. Tumor suppressor PTEN mediates sensing of chemoattractant gradients. *Cell* 109, 599–610.
- Insall, R.H., Soede, R.D., Schaap, P., Devreotes, P.N., 1994. Two cAMP receptors activate common signaling pathways in *Dictyostelium*. *Mol. Biol. Cell* 5, 703–711.
- Jarjour, A.A., Durko, M., Luk, T.L., Marçal, N., Shekarabi, M., Kennedy, T.E., 2011. Autocrine netrin function inhibits glioma cell motility and promotes focal adhesion formation. *PLoS ONE* 6, e25408. doi:10.1371/journal.pone.0025408
- Jarry, M., Diallo, M., Lecointre, C., Desrues, L., Tokay, T., Chatenet, D., Leprince, J., Rossi, O., Vaudry, H., Tonon, M.-C., Prézeau, L., Castel, H., Gandolfo, P., 2010. The vasoactive peptides urotensin II and urotensin II-related peptide regulate astrocyte activity through common and distinct mechanisms: involvement in cell proliferation. *Biochem. J.* 428, 113–124. doi:10.1042/BJ20090867
- Ji, K., Ye, L., Mason, M.D., Jiang, W.G., 2013. The Kiss-1/Kiss-1R complex as a negative regulator of cell motility and cancer metastasis (Review). *Int. J. Mol. Med.* 32, 747–754. doi:10.3892/ijmm.2013.1472
- Ji, T.H., Grossmann, M., Ji, L., 1998. G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J. Biol. Chem.* 273, 17299–17302.
- Jiang, T., Zhang, S., Lin, B., Meng, L., Gao, H., 2005. [Expression and clinical significance of KISS-1 and GPR54 mRNA in endometrial carcinoma]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 27, 229–231.

- Jin, T., Xu, X., Hereld, D., 2008. Chemotaxis, chemokine receptors and human disease. *Cytokine* 44, 1–8. doi:10.1016/j.cyto.2008.06.017
- Katoh, H., Aoki, J., Yamaguchi, Y., Kitano, Y., Ichikawa, A., Negishi, M., 1998. Constitutively Active G α 12, G α 13, and G α q Induce Rho-dependent Neurite Retraction through Different Signaling Pathways. *J. Biol. Chem.* 273, 28700–28707. doi:10.1074/jbc.273.44.28700
- Kenific, C.M., Stehbens, S.J., Goldsmith, J., Leidal, A.M., Faure, N., Ye, J., Wittmann, T., Debnath, J., 2016. NBR1 enables autophagy-dependent focal adhesion turnover. *J. Cell Biol.* 212, 577–590. doi:10.1083/jcb.201503075
- Kolakowski, L.F., 1994. GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Recept. Channels* 2, 1–7.
- Kotani, M., Detheux, M., Vandenberghe, A., Communi, D., Vanderwinden, J.M., Le Poul, E., Brézillon, S., Tyldesley, R., Suarez-Huerta, N., Vandeput, F., Blanpain, C., Schiffmann, S.N., Vassart, G., Parmentier, M., 2001. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J. Biol. Chem.* 276, 34631–34636. doi:10.1074/jbc.M104847200
- Lawson, C., Lim, S.-T., Uryu, S., Chen, X.L., Calderwood, D.A., Schlaepfer, D.D., 2012. FAK promotes recruitment of talin to nascent adhesions to control cell motility. *J. Cell Biol.* 196, 223–232. doi:10.1083/jcb.201108078
- Lecointre, C., Desrues, L., Joubert, J.E., Perzo, N., Guichet, P.-O., Le Joncour, V., Brulé, C., Chabbert, M., Leduc, R., Prézeau, L., Laquerrière, A., Proust, F., Gandolfo, P., Morin, F., Castel, H., 2015. Signaling switch of the urotensin II vasosactive peptide GPCR: prototypic chemotactic mechanism in glioma. *Oncogene* 34, 5080–5094. doi:10.1038/onc.2014.433
- Lee, J.H., Miele, M.E., Hicks, D.J., Phillips, K.K., Trent, J.M., Weissman, B.E., Welch, D.R., 1996. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J. Natl. Cancer Inst.* 88, 1731–1737.
- Lee, J.-H., Welch, D.R., 1997. Identification of highly expressed genes in metastasis-suppressed chromosome 6/human malignant melanoma hybrid cells using subtractive hybridization and differential display. *Int. J. Cancer* 71, 1035–1044. doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19970611)71:6<1035::AID-IJC20>3.0.CO;2-B
- Leloup, L., Shao, H., Bae, Y.H., Deasy, B., Stolz, D., Roy, P., Wells, A., 2010. m-Calpain activation is regulated by its membrane localization and by its binding to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* 285, 33549–33566. doi:10.1074/jbc.M110.123604

- Levoye, A., Balabanian, K., Baleux, F., Bachelierie, F., Lagane, B., 2009. CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling. *Blood* 113, 6085–6093. doi:10.1182/blood-2008-12-196618
- Li, Q., Roa, A., Clarke, I.J., Smith, J.T., 2012. Seasonal variation in the gonadotropin-releasing hormone response to kisspeptin in sheep: possible kisspeptin regulation of the kisspeptin receptor. *Neuroendocrinology* 96, 212–221. doi:10.1159/000335998
- Lin, H., Sassano, M.F., Roth, B.L., Shoichet, B.K., 2013. A pharmacological organization of G protein-coupled receptors. *Nat. Methods* 10, 140–146. doi:10.1038/nmeth.2324
- Liu, J., Zhao, Y., Sun, Y., He, B., Yang, C., Svitkina, T., Goldman, Y.E., Guo, W., 2012. Exo70 stimulates the Arp2/3 complex for lamellipodia formation and directional cell migration. *Curr. Biol.* 22, 1510–1515. doi:10.1016/j.cub.2012.05.055
- Magnani, F., Shibata, Y., Serrano-Vega, M.J., Tate, C.G., 2008. Co-evolving stability and conformational homogeneity of the human adenosine A2a receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 10744–10749. doi:10.1073/pnas.0804396105
- Mellado, M., Rodríguez-Frade, J.M., Vila-Coro, A.J., Fernández, S., Martín de Ana, A., Jones, D.R., Torán, J.L., Martínez-A, C., 2001. Chemokine receptor homo- or heterodimerization activates distinct signaling pathways. *EMBO J.* 20, 2497–2507. doi:10.1093/emboj/20.10.2497
- Mittal, N., Roberts, K., Pal, K., Bentolila, L.A., Fultz, E., Minasyan, A., Cahill, C., Pradhan, A., Conner, D., DeFea, K., Evans, C., Walwyn, W., 2013. Select G-protein-coupled receptors modulate agonist-induced signaling via a ROCK, LIMK, and β -arrestin 1 pathway. *Cell Rep* 5, 1010–1021. doi:10.1016/j.celrep.2013.10.015
- Miura, S., Karnik, S.S., 2002. Constitutive Activation of Angiotensin II Type 1 Receptor Alters the Orientation of Transmembrane Helix-2. *J. Biol. Chem.* 277, 24299–24305. doi:10.1074/jbc.M202743200
- Miura, S., Zhang, J., Boros, J., Karnik, S.S., 2003. TM2-TM7 Interaction in Coupling Movement of Transmembrane Helices to Activation of the Angiotensin II Type-1 Receptor. *J. Biol. Chem.* 278, 3720–3725. doi:10.1074/jbc.M211338200
- Monterrubio, M., Mellado, M., Carrera, A.C., Rodríguez-Frade, J.M., 2009. PI3K γ activation by CXCL12 regulates tumor cell adhesion and invasion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 388, 199–204. doi:10.1016/j.bbrc.2009.07.153
- Navenot, J.-M., Fujii, N., Peiper, S.C., 2009. KiSS1 Metastasis Suppressor Gene Product Induces Suppression of Tyrosine Kinase Receptor Signaling to Akt, Tumor Necrosis Factor Family Ligand Expression, and Apoptosis. *Mol Pharmacol* 75, 1074–1083. doi:10.1124/mol.108.054270

- Ohtaki, T., Shintani, Y., Honda, S., Matsumoto, H., Hori, A., Kanehashi, K., Terao, Y., Kumano, S., Takatsu, Y., Masuda, Y., Ishibashi, Y., Watanabe, T., Asada, M., Yamada, T., Suenaga, M., Kitada, C., Usuki, S., Kurokawa, T., Onda, H., Nishimura, O., Fujino, M., 2001. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* 411, 613–617. doi:10.1038/35079135
- Pampillo, M., Camuso, N., Taylor, J.E., Szereszewski, J.M., Ahow, M.R., Zajac, M., Millar, R.P., Bhattacharya, M., Babwah, A.V., 2009. Regulation of GPR54 signaling by GRK2 and {beta}-arrestin. *Mol. Endocrinol.* 23, 2060–2074. doi:10.1210/me.2009-0013
- Parker, M.S., Wong, Y.Y., Parker, S.L., 2008. An ion-responsive motif in the second transmembrane segment of rhodopsin-like receptors. *Amino Acids* 35, 1–15. doi:10.1007/s00726-008-0637-6
- Pelé, J., Abdi, H., Moreau, M., Thybert, D., Chabbert, M., 2011. Multidimensional scaling reveals the main evolutionary pathways of class A G-protein-coupled receptors. *PLoS ONE* 6, e19094. doi:10.1371/journal.pone.0019094
- Petrie, R.J., Doyle, A.D., Yamada, K.M., 2009. Random versus directionally persistent cell migration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 538–549. doi:10.1038/nrm2729
- Pollard, T.D., Borisy, G.G., 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112, 453–465.
- Pozzobon, T., Goldoni, G., Viola, A., Molon, B., 2016. CXCR4 signaling in health and disease. *Immunol. Lett.* 177, 6–15. doi:10.1016/j.imlet.2016.06.006
- Prabhu, V.V., Sakthivel, K.M., Guruvayoorappan, C., 2013. Kisspeptins (KiSS-1): essential players in suppressing tumor metastasis. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 14, 6215–6220.
- Pradhan, A.A., Perroy, J., Walwyn, W.M., Smith, M.L., Vicente-Sanchez, A., Segura, L., Bana, A., Kieffer, B.L., Evans, C.J., 2016. Agonist-Specific Recruitment of Arrestin Isoforms Differentially Modify Delta Opioid Receptor Function. *J. Neurosci.* 36, 3541–3551. doi:10.1523/JNEUROSCI.4124-15.2016
- Rasmussen, S.G.F., Choi, H.-J., Rosenbaum, D.M., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Edwards, P.C., Burghammer, M., Ratnala, V.R.P., Sanishvili, R., Fischetti, R.F., Schertler, G.F.X., Weis, W.I., Kobilka, B.K., 2007. Crystal structure of the human β_2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 450, 383–387. doi:10.1038/nature06325
- Reis, R.I., Santos, E.L., Pesquero, J.B., Oliveira, L., Schanstra, J.P., Bascands, J.-L., Pecher, C., Paiva, A.C.M., Costa-Neto, C.M., 2007. Participation of transmembrane proline 82 in angiotensin II AT1 receptor signal transduction. *Regulatory Peptides* 140, 32–36. doi:10.1016/j.regpep.2006.11.028
- Ren, X.-R., Reiter, E., Ahn, S., Kim, J., Chen, W., Lefkowitz, R.J., 2005a. Different G protein-coupled receptor kinases govern G protein and beta-arrestin-mediated signaling of

- V2 vasopressin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 1448–1453. doi:10.1073/pnas.0409534102
- Ren, X.-R., Reiter, E., Ahn, S., Kim, J., Chen, W., Lefkowitz, R.J., 2005b. Different G protein-coupled receptor kinases govern G protein and beta-arrestin-mediated signaling of V2 vasopressin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 1448–1453. doi:10.1073/pnas.0409534102
- Rey, J., Deville, J., Chabbert, M., 2010. Structural determinants stabilizing helical distortions related to proline. *J. Struct. Biol.* 171, 266–276. doi:10.1016/j.jsb.2010.05.002
- Richardson, B.E., Lehmann, R., 2010. Mechanisms guiding primordial germ cell migration: strategies from different organisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 37–49. doi:10.1038/nrm2815
- Rossowski, W.J., Cheng, B.-L., Taylor, J.E., Datta, R., Coy, D.H., 2002. Human urotensin II-induced aorta ring contractions are mediated by protein kinase C, tyrosine kinases and Rho-kinase: inhibition by somatostatin receptor antagonists. *Eur. J. Pharmacol.* 438, 159–170.
- Roussos, E.T., Condeelis, J.S., Patsialou, A., 2011. Chemotaxis in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 11, 573–587. doi:10.1038/nrc3078
- Rubin, J.B., 2009. Chemokine Signaling in Cancer: One Hump or Two? *Seminars in cancer biology* 19, 116. doi:10.1016/j.semancer.2008.10.001
- Sadik, C.D., Luster, A.D., 2012. Lipid-cytokine-chemokine cascades orchestrate leukocyte recruitment in inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 91, 207–215. doi:10.1189/jlb.0811402
- Segain, J.-P., Rolli-Derkinderen, M., Gervois, N., Raingeard de la Blétière, D., Loirand, G., Pacaud, P., 2007. Urotensin II is a new chemotactic factor for UT receptor-expressing monocytes. *J. Immunol.* 179, 901–909.
- Shao, H., Chou, J., Baty, C.J., Burke, N.A., Watkins, S.C., Stolz, D.B., Wells, A., 2006. Spatial localization of m-calpain to the plasma membrane by phosphoinositide biphosphate binding during epidermal growth factor receptor-mediated activation. *Mol. Cell. Biol.* 26, 5481–5496. doi:10.1128/MCB.02243-05
- Shenoy, S.K., 2014. Arrestin interaction with E3 ubiquitin ligases and deubiquitinases: functional and therapeutic implications. *Handb Exp Pharmacol* 219, 187–203. doi:10.1007/978-3-642-41199-1_10
- Shenoy, S.K., Lefkowitz, R.J., 2011. β -arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction. *Trends in Pharmacological Sciences* 32, 521–533. doi:10.1016/j.tips.2011.05.002

- Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., Mantovani, A., 1999. The role of chemokines in the regulation of dendritic cell trafficking. *J. Leukoc. Biol.* 66, 1–9.
- Spinazzi, R., Albertin, G., Nico, B., Guidolin, D., Di Liddo, R., Rossi, G.P., Ribatti, D., Nussdorfer, G.G., 2006. Urotensin-II and its receptor (UT-R) are expressed in rat brain endothelial cells, and urotensin-II via UT-R stimulates angiogenesis in vivo and in vitro. *Int. J. Mol. Med.* 18, 1107–1112.
- Swaney, K.F., Huang, C.-H., Devreotes, P.N., 2010. Eukaryotic chemotaxis: a network of signaling pathways controls motility, directional sensing, and polarity. *Annu Rev Biophys* 39, 265–289. doi:10.1146/annurev.biophys.093008.131228
- Tan, W., Martin, D., Gutkind, J.S., 2006. The Gα13-Rho Signaling Axis Is Required for SDF-1-induced Migration through CXCR4. *J. Biol. Chem.* 281, 39542–39549. doi:10.1074/jbc.M609062200
- Tautermann, C.S., 2014. GPCR structures in drug design, emerging opportunities with new structures. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24, 4073–4079. doi:10.1016/j.bmcl.2014.07.009
- Tehan, B.G., Bortolato, A., Blaney, F.E., Weir, M.P., Mason, J.S., 2014. Unifying family A GPCR theories of activation. *Pharmacol. Ther.* 143, 51–60. doi:10.1016/j.pharmthera.2014.02.004
- Theveneau, E., Mayor, R., 2012. Neural crest migration: interplay between chemorepellents, chemoattractants, contact inhibition, epithelial-mesenchymal transition, and collective cell migration. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 1, 435–445. doi:10.1002/wdev.28
- Tzanidis, A., Hannan, R.D., Thomas, W.G., Onan, D., Autelitano, D.J., See, F., Kelly, D.J., Gilbert, R.E., Krum, H., 2003. Direct actions of urotensin II on the heart: implications for cardiac fibrosis and hypertrophy. *Circ. Res.* 93, 246–253. doi:10.1161/01.RES.0000084382.64418.BC
- Valentin-Hansen, L., Holst, B., Frimurer, T.M., Schwartz, T.W., 2012. PheVI:09 (Phe6.44) as a sliding microswitch in seven-transmembrane (7TM) G protein-coupled receptor activation. *J. Biol. Chem.* 287, 43516–43526. doi:10.1074/jbc.M112.395137
- van der Horst, E., Peironcely, J.E., Ijzerman, A.P., Beukers, M.W., Lane, J.R., van Vlijmen, H.W.T., Emmerich, M.T.M., Okuno, Y., Bender, A., 2010. A novel chemogenomics analysis of G protein-coupled receptors (GPCRs) and their ligands: a potential strategy for receptor de-orphanization. *BMC Bioinformatics* 11, 316. doi:10.1186/1471-2105-11-316
- van der Kant, R., Vriend, G., 2014a. Alpha-Bulges in G Protein-Coupled Receptors. *International Journal of Molecular Sciences* 15, 7841–7864. doi:10.3390/ijms15057841
- van der Kant, R., Vriend, G., 2014b. Alpha-Bulges in G Protein-Coupled Receptors. *Int J Mol Sci* 15, 7841–7864. doi:10.3390/ijms15057841

- Van Keymeulen, A., Wong, K., Knight, Z.A., Govaerts, C., Hahn, K.M., Shokat, K.M., Bourne, H.R., 2006. To stabilize neutrophil polarity, PIP3 and Cdc42 augment RhoA activity at the back as well as signals at the front. *J. Cell Biol.* 174, 437–445. doi:10.1083/jcb.200604113
- Vogt, S., Grosse, R., Schultz, G., Offermanns, S., 2003. Receptor-dependent RhoA Activation in G12/G13-deficient Cells GENETIC EVIDENCE FOR AN INVOLVEMENT OF Gq/G11. *J. Biol. Chem.* 278, 28743–28749. doi:10.1074/jbc.M304570200
- Wang, S.-C., Hong, J.-H., Hsueh, C., Chiang, C.-S., 2012. Tumor-secreted SDF-1 promotes glioma invasiveness and TAM tropism toward hypoxia in a murine astrocytoma model. *Lab. Invest.* 92, 151–162. doi:10.1038/labinvest.2011.128
- Warne, T., Serrano-Vega, M.J., Baker, J.G., Moukhametzianov, R., Edwards, P.C., Henderson, R., Leslie, A.G.W., Tate, C.G., Schertler, G.F.X., 2008. Structure of a β 1-adrenergic G protein-coupled receptor. *Nature* 454, 486–491. doi:10.1038/nature07101
- Webb, D.J., Donais, K., Whitmore, L.A., Thomas, S.M., Turner, C.E., Parsons, J.T., Horwitz, A.F., 2004. FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat. Cell Biol.* 6, 154–161. doi:10.1038/ncb1094
- Webb, D.J., Parsons, J.T., Horwitz, A.F., 2002. Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells -- over and over and over again. *Nat. Cell Biol.* 4, E97-100. doi:10.1038/ncb0402-e97
- Weiner, O.D., Marganski, W.A., Wu, L.F., Altschuler, S.J., Kirschner, M.W., 2007. An actin-based wave generator organizes cell motility. *PLoS Biol.* 5, e221. doi:10.1371/journal.pbio.0050221
- Wolfenson, H., Lavelin, I., Geiger, B., 2013. Dynamic regulation of the structure and functions of integrin adhesions. *Dev. Cell* 24, 447–458. doi:10.1016/j.devcel.2013.02.012
- Wu, B., Chien, E.Y.T., Mol, C.D., Fenalti, G., Liu, W., Katritch, V., Abagyan, R., Brooun, A., Wells, P., Bi, F.C., Hamel, D.J., Kuhn, P., Handel, T.M., Cherezov, V., Stevens, R.C., 2010. Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science* 330, 1066–1071. doi:10.1126/science.1194396
- Xiao, Z., Zhang, N., Murphy, D.B., Devreotes, P.N., 1997. Dynamic distribution of chemoattractant receptors in living cells during chemotaxis and persistent stimulation. *J. Cell Biol.* 139, 365–374.
- Xiong, Y., Kabacoff, C., Franca-Koh, J., Devreotes, P.N., Robinson, D.N., Iglesias, P.A., 2010. Automated characterization of cell shape changes during amoeboid motility by skeletonization. *BMC Syst Biol* 4, 33. doi:10.1186/1752-0509-4-33

Xu, X., Meier-Schellersheim, M., Yan, J., Jin, T., 2007. Locally controlled inhibitory mechanisms are involved in eukaryotic GPCR-mediated chemosensing. *J. Cell Biol.* 178, 141–153. doi:10.1083/jcb.200611096

Zlotnik, A., 2008. New insights on the role of CXCR4 in cancer metastasis. *J. Pathol.* 215, 211–213. doi:10.1002/path.2350

Acknowledgements

We grateful the PRIMACEN platform (University of Rouen, France) for imaging equipments and the member of the Arpège platform led by L. Prézeau (IGF Montpellier, France). This work was supported ANR, Inserm, University Rouen Normandie, Normandie Région, Institute on Innovative and Biomedical Research (IRIB), J.E.J., P.M.C, C.L., A.M. were recipients of a fellowship from the Haute-Normandy or French ministry.

Financial disclosure

The authors have no financial relationships relevant to this article to disclose.

Conflicts of interest

The authors have no conflicts of interests to disclose.

Table 1: Oligonucleotides and enzymes used for subcloning of Kiss1R-P2.59 and Δ Kiss1R-P2.59A or Δ Kiss1R-P2.58 mutants.

cDNA	Subcloning	Primers	Enzymes
Kiss1R ^{Myc} -P2.59	pCMV-Myc	<i>forward</i> : ATCGGAATTCATGCACACCGTGGCTACGTCC <i>reverse</i> : ATCGCTCGAGTCAGAGAGGGGCGTTGTCCT	EcoRI/XhoI
Kiss1R ST -P2.59	ST-pRK5	<i>forward</i> : ATCGGATATCATGCACACCGTGGCTACGTCCGG <i>reverse</i> : ATGCTCTAGAATCAGAGAGGGGCGTTGTCCTCCC	EcoRV/XbaI
Kiss1R ^{eGFP} -P2.59	pEGFP-N2	<i>forward</i> : ATCGGAATTCATGCACACCGTGGCTACGTCC <i>reverse</i> : ATCGGGATCCCCGAGAGGGGCGTTGTCCTCCC	EcoRI/BamHI
Kiss1R ^{eYFP} -P2.59	pEYFP-N1	<i>forward</i> : ATCGGAATTCATGCACACCGTGGCTACGTCC <i>reverse</i> : ATCGGGATCCCCGAGAGGGGCGTTGTCCTCC	EcoRI/BamHI
Δ Kiss1R ST -P2.58	ST-pRK5	<i>forward</i> : ATCGGATATCATGCACACCGTGGCTACGTCCGG <i>reverse</i> : ATGCTCTAGAATCAGAGAGGGGCGTTGTCCTCCC	EcoRV/XbaI
Δ Kiss1R ^{eGFP} -P2.58	pEGFP-N2	<i>forward</i> : ATCGGAATTCATGCACACCGTGGCTACGTCC <i>reverse</i> : ATCGGGATCCCCGAGAGGGGCGTTGTCCTCCC	EcoRI/BamHI
Δ Kiss1R ^{eYFP} -P2.58	pEYFP-N1	<i>forward</i> : ATCGGAATTCATGCACACCGTGGCTACGTCC <i>reverse</i> : ATCGGGATCCCCGAGAGGGGCGTTGTCCTCC	EcoRI/BamHI
Δ Kiss1R ^{Myc} -P2.59A	pCMV-Myc	<i>forward</i> : ATCGGAATTCATGCACACCGTGGCTACGTCC <i>reverse</i> : ATCGCTCGAGTCAGAGAGGGGCGTTGTCCT	EcoRI/XhoI
Δ Kiss1R ST -P2.59A	ST-pRK5	<i>forward</i> : ATCGGATATCATGCACACCGTGGCTACGTCCGG <i>reverse</i> : ATGCTCTAGAATCAGAGAGGGGCGTTGTCCTCCC	EcoRV/XbaI
Δ Kiss1R ^{eGFP} -P2.59A	pEGFP-N2	<i>forward</i> : ATCGGAATTCATGCACACCGTGGCTACGTCC <i>reverse</i> : ATCGGGATCCCCGAGAGGGGCGTTGTCCTCCC	EcoRI/BamHI
Δ Kiss1R ^{eYFP} -P2.59A	pEYFP-N1	<i>forward</i> : ATCGGAATTCATGCACACCGTGGCTACGTCC <i>reverse</i> : ATCGGGATCCCCGAGAGGGGCGTTGTCCTCC	EcoRI/BamHI

Table 2: Oligonucleotides and enzymes used for subcloning of UT-P2.58 and Δ UT-P2.58A or Δ UT-P2.59 mutants.

cDNA	Subcloning	Primers	Enzymes
UT ^{Myc} -P2.58	pCMV-Myc	<i>forward</i> : ATGCGAATTCGGATGGCGCTACCCCCGAGT <i>reverse</i> : AAACCTCGAGTCACGCCGGGGCCCTGGG	EcoRI/XhoI
UT ST -P2.58	ST-pRK5	<i>forward</i> : ATGCACGCGTATGGCGCTGACCCCCGAGTCCC <i>reverse</i> : ATGCTCTAGAATCAGCCGGGGCCCTGGGACC	MluI/XbaI
UT ^{eGFP} -P2.58	pEGFP-N2	<i>forward</i> : ATGCGAATTCGGATGGCGCTACCCCCGAGT <i>reverse</i> : ATCGGGATCCCCGCGGGGGCCCTGGGACC	EcoRI/BamHI
UT ^{eYFP} -P2.58	pEYFP-N1	<i>forward</i> : ATGCGAATTCGGATGGCGCTACCCCCGAGT <i>reverse</i> : ATCGGGATCCCCGCGGGGGCCCTGGGACC	EcoRI/BamHI
Δ UT ST -P2.59	ST-pRK5	<i>forward</i> : ATGCACGCGTATGGCGCTGACCCCCGAGTCCC <i>reverse</i> : ATGCTCTAGAATCAGCCGGGGCCCTGGGACC	MluI/XbaI
Δ UT ^{eGFP} -P2.59	pEGFP-N2	<i>forward</i> : ATGCGAATTCGGATGGCGCTACCCCCGAGT <i>reverse</i> : ATCGGGATCCCCGCGGGGGCCCTGGGACC	EcoRI/BamHI
Δ UT ^{eYFP} -P2.59	pEYFP-N1	<i>forward</i> : ATGCGAATTCGGATGGCGCTACCCCCGAGT <i>reverse</i> : ATCGGGATCCCCGCGGGGGCCCTGGGACC	EcoRI/XhoI
Δ UT ^{Myc} -P2.58A	pCMV-Myc	<i>forward</i> : ATGCGAATTCGGATGGCGCTACCCCCGAGT <i>reverse</i> : AAACCTCGAGTCACGCCGGGGCCCTGGG	EcoRI/XhoI
Δ UT ST -P2.58A	ST-pRK5	<i>forward</i> : ATGCACGCGTATGGCGCTGACCCCCGAGTCCC <i>reverse</i> : ATGCTCTAGAATCAGCCGGGGCCCTGGGACC	MluI/XbaI
Δ UT ^{eGFP} -P2.58A	pEGFP-N2	<i>forward</i> : ATGCGAATTCGGATGGCGCTACCCCCGAGT <i>reverse</i> : ATCGGGATCCCCGCGGGGGCCCTGGGACC	EcoRI/BamHI
Δ UT ^{eYFP} -P2.58A	pEYFP-N1	<i>forward</i> : ATGCGAATTCGGATGGCGCTACCCCCGAGT <i>reverse</i> : ATCGGGATCCCCGCGGGGGCCCTGGGACC	EcoRI/BamHI

Table 3: Oligonucleotides and enzymes used for subcloning of CXCR4-P2.58 and CXCR4-P2.58A or Δ CXCR4-P2.59 mutants.

cDNA	Subcloning	Primers	Enzymes
CXCR4 ^{Myc} -P2.58	pCMV-Myc	<i>forward</i> : ATCGGAATTCATGGAGGGGATCAGTATATACACTT <i>reverse</i> : ATCGCTCGAGTTAGCTGGAGTGAAAACCTGAAGAC	EcoRI/XhoI
CXCR4 ST -P2.58	ST-pRK5	<i>forward</i> : ATGCACGCGTATGGAGGGGATCAGTATATACAC <i>reverse</i> : ATGCTCTAGAATTAGCTGGAGTGAAAACCTGAAGA	MluI/XbaI
CXCR4 ^{eGFP} -P2.58	pEGFP-N2	<i>forward</i> : ATCGGAATTCCTTATGGAGGGGATCAGTATATACACTT <i>reverse</i> : ATCGGGTACCCGCTGGAGTGAAA	EcoRI/KpnI
CXCR4 ^{eYFP} -P2.58	pEYFP-N1	<i>forward</i> : ATCGGAATTCCTTATGGAGGGGATCAGTATATACACTT <i>reverse</i> : ATCGGGTACCCGCTGGAGTGAAAACCTGAAGACTC	EcoRI/KpnI
Δ CXCR4 ST -P2.59	ST-pRK5	<i>forward</i> : ATGCACGCGTATGGAGGGGATCAGTATATACAC <i>reverse</i> : ATGCTCTAGAATTAGCTGGAGTGAAAACCTGAAGA	MluI/XbaI
Δ CXCR4 ^{eGFP} -P2.59	pEGFP-N2	<i>forward</i> : ATCGGAATTCCTTATGGAGGGGATCAGTATATACACTT <i>reverse</i> : ATCGGGTACCCGCTGGAGTGAAA	EcoRI/KpnI
Δ CXCR4 ^{eYFP} -P2.59	pEYFP-N1	<i>forward</i> : ATCGGAATTCCTTATGGAGGGGATCAGTATATACACTT <i>reverse</i> : ATCGGGTACCCGCTGGAGTGAAAACCTGAAGACTC	EcoRI/KpnI
Δ CXCR4 ^{Myc} -P2.58A	pCMV-Myc	<i>forward</i> : ATCGGAATTCATGGAGGGGATCAGTATATACACTT <i>reverse</i> : ATCGCTCGAGTTAGCTGGAGTGAAAACCTGAAGAC	EcoRI/XhoI
Δ CXCR4 ST -P2.58A	ST-pRK5	<i>forward</i> : ATGCACGCGTATGGAGGGGATCAGTATATACAC <i>reverse</i> : ATGCTCTAGAATTAGCTGGAGTGAAAACCTGAAGA	MluI/XbaI
Δ CXCR4 ^{eGFP} -P2.58A	pEGFP-N2	<i>forward</i> : ATCGGAATTCCTTATGGAGGGGATCAGTATATACACTT <i>reverse</i> : ATCGGGTACCCGCTGGAGTGAAA	EcoRI/KpnI
Δ CXCR4 ^{eYFP} -P2.58A	pEYFP-N1	<i>forward</i> : ATCGGAATTCCTTATGGAGGGGATCAGTATATACACTT <i>reverse</i> : ATCGGGTACCCGCTGGAGTGAAAACCTGAAGACTC	EcoRI/KpnI

Table 4: Antibodies used for cell-based ELISA assay.

primary antibody	reference	secondary antibody	reference
c-Myc antibody	Santa cruz (sc-40)	goat anti-mouse IgG-HRP	Santa Cruz (sc-2005)
FAK antibody	Santa cruz (sc-558)	goat anti-rabbit IgG-HRP	Santa Cruz (sc-2004)
p-FAK antibody (Tyr576/577)	Santa cruz (sc-21831)	rabbit anti-goat IgG-HRP	Santa cruz (sc-2768)
anti-Paxillin antibody	Millipore (05-417)	goat anti-mouse IgG-HRP	Santa Cruz (sc-2005)
anti-Paxillin (phospho Y31)	Abcam (ab32115)	goat anti-rabbit IgG-HRP	Santa Cruz (sc-2004)
anti-integrin β 1 antibody	Millipore (MAB1981)	goat anti-mouse IgG-HRP	Santa Cruz (sc-2005)

Table 5. Summary of log pEC₅₀ and maximum effects of KP-10, UII and SDF-1α in signaling pathways and cellular

	Kiss1R			UT			CXCR4		
	Kiss1R-P2.59	ΔKiss1R-P2.59A	ΔKiss1R-P2.58	UT-P2.58	ΔUT-P2.58A	ΔUT-P2.59	CXCR4-P2.58	ΔCXCR4-P2.58A	ΔCXCR4-P2.59
Receptor cell expression									
Total	297,0 ± 120,5	263,8 ± 79,4	418,2 ± 108,4	643,9 ± 11,5	562,5 ± 24,7	512,1 ± 27,0	600,0 ± 180,3	542,8 ± 164,5	302,2 ± 94,3
Cell surface	251,9 ± 13,3	272,5 ± 11,8	430,4 ± 14,3	567,9 ± 29,3	363,0 ± 19,4	329,0 ± 40,1	367,2 ± 105,7	276,8 ± 82,8	201,4 ± 60,9
Receptor ligand binding									
Expression	678,8 ± 25,0	3158,2 ± 98,6	4660,0 ± 242,9	–	–	–	4002,0 ± 155,8	809,1 ± 29,5	1077,0 ± 39,9
B _{max}	nd	20,2 ± 4,0	29,5 ± 2,7	–	–	–	31,4 ± 3,2	12,6 ± 0,5	nd
K _d	nd	29,0 ± 7,1	47,7 ± 7,0	–	–	–	38,9 ± 6,9	5,0 ± 0,7	nd
pEC ₅₀ (n=3)	-8,17 ± 0,14	nd	nd	-9,74 ± 0,14	nd	nd	–	–	–
Gq coupling									
control	–	–	–	–	–	–	282,4 ± 9,1	252,2 ± 24,5	268,0 ± 17,7
maximal effect	–	–	–	–	–	–	283,2 ± 6,5	257,6 ± 25,1	272,6 ± 14,5
IP ₁ metabolism									
pEC ₅₀ (n=3)	-9,58 ± 0,15	-7,13 ± 0,20	-7,25 ± 0,22	-9,84 ± 0,20	-9,58 ± 0,20	-7,98 ± 0,42	nd	nd	nd
Calcium mobilization									
control	-7,78 ± 0,13	nd	nd	-8,67 ± 0,16	nd	nd	–	–	–
maximal effect	–	–	–	–	–	–	100,0 ± 1,23	100,0 ± 1,07	100,0 ± 1,97
Gi coupling									
pEC ₅₀ (n=3)	–	–	–	-9,03 ± 0,38	nd	nd	87,97 ± 0,73	88,91 ± 0,05	95,64 ± 0,07
control	412,2 ± 32,0	443,7 ± 48,3	446,8 ± 44,6	–	–	–	–	–	–
maximal effect	392,9 ± 30,5	465,9 ± 44,2	447,8 ± 35,4	–	–	–	–	–	–
Go coupling									
pEC ₅₀ (n=3)	–	–	–	-9,68 ± 0,24	nd	nd	-9,52 ± 0,52	-12,1 ± 6,23	nd
control	310,1 ± 17,3	335,8 ± 14,0	337,00 ± 21,7	–	–	–	–	–	–
maximal effect	300,5 ± 22,2	339,5 ± 12,1	347,5 ± 23,0	–	–	–	–	–	–
Chemotaxis									
control (n=3)	100,0 ± 7,9	100,0 ± 12,0	100,0 ± 5,71	100,0 ± 10,8	100,0 ± 10,1	100,0 ± 9,2	100,0 ± 11,9	100,0 ± 9,2	100,0 ± 12,8
treated (n=3)	179,1 ± 14,7	123,5 ± 14,7	113,9 ± 11,4	359,0 ± 53,2	338,5 ± 56,5	475,1 ± 27,7	321,3 ± 43,0	414,8 ± 85,8	335,9 ± 76,3
pEC ₅₀ (n=1)	-9,12 ± 0,16	–	nd	-10,41 ± 0,58	–	-9,49 ± 0,3	-8,12 ± 0,4	–	-8,36 ± 0,1
Chemokinesis									
situation 1	100,0 ± 11,0	–	100,0 ± 51,6	100,0 ± 14,1	–	100,0 ± 26,3	100,0 ± 19,6	–	100,0 ± 12,6
situation 2	441,7 ± 42,8	–	137,7 ± 41,8	290,7 ± 20,0	–	445,7 ± 62,8	800,0 ± 272,8	–	219,0 ± 66,5
situation 3	420,5 ± 40,6	–	60,5 ± 5,1	130,3 ± 23,4	–	448,7 ± 50,0	327,8 ± 161,1	–	130,4 ± 32,8

Legend to Figures

Figure 1: Schematic representation of the different GPCR group families, the TM2 structure and the strategy for proline mutation or insertion/deletion. (A) (*upper panel*) Sequence alignment of TM2 of Kiss1R-P2.59, UT-P2.58 and CXCR4-P2.58 receptors following the sequence numbering system of Ballesteros and Weinstein. The most conserved residue of TM2 (aspartate (D) highlighted in orange) is assigned number 50. Proline residues of wild-type UT and CXCR4 (red) are in position 58 whereas proline of Kiss1R is in position 59. (*lower panel*) Schematic representation of PEP (purple, G0 group), SO (blue), CHEM (green) and PUR (brown) clusters (all from G1 group) phylogenetic families. Each receptor constituting those clusters are indicated, as well as percentage of the receptors presenting proline in P2.58, P2.59, P2.60 or no proline (NoP). Representative receptors, *i.e.* Kiss1R, UT and CXCR4 from PEP, SO and CHEM, respectively are indicated in the corresponding color. (B) Cartoon view of CXCR4 (P2.58, *left panel*) and OX2 (P2.59, *right panel*) receptors From Chabbert et al. (*unpublished data*). TM2 is slate. The TM2 proline (green) and the preceding oxygens (red) are shown as spheres. In CXCR4, P2.58 is close to the carbonyl groups at positions -3 and -4 (proline kink). In OX2, P2.59 is close to the carbonyl groups at positions -4 and -5 (bulge). (C) Three-dimensional structure by nuclear magnetic resonance and modelization (From Milazzo et al., *unpublished*) and sequences of Kiss1R-P2.59, UT-P2.58 and CXCR4-P2.58 receptor ligands. Kiss1R-P2.59 receptor may bind Kisspeptins of 54- (KP-54) or 10 (KP-10) amino acids. Urotensin II (UII), the endogenous ligand of UT-P2.58 is an 11-amino acid peptide with a disulfure bridge between cysteine 5 and 10. Stromal-derived Factor-1 α (SDF-1 α), a 89-residue peptide with 2 disulfide bridges, binds CXCR4-P2.58 receptors. Disulfide bridges are highlighted in black. (D) (*left panel*) Sequence alignment of TM2 in wild-type and mutant receptors. Proline residues are in red. Proline in position P2.59 of Δ Kiss1R-P2.59A receptor was substituted by an alanine (A). Proline in position P2.58 of Δ UT-P2.58A and Δ CXCR4-P2.58A receptors was replaced by an alanine (A). A deletion of the residue C2.56 occurred in Δ Kiss1R-P2.58 receptor. In the contrary, an alanine was inserted between the residues in position 55 and 56 in Δ UT-P2.59 and Δ CXCR4-P2.59 receptors. (*right panel*) TM2 helix modeling of Kiss1R-P2.59 (light purple), UT-P2.58 (light blue), CXCR4-P2.58 (light green) receptors and their respective mutants, Δ Kiss1R-P2.58 (dark purple), Δ UT-P2.59 (dark blue) and Δ CXCR4-P2.59 (dark green). According to the position of the proline P2.58 or P2.59, structure of the helix present a kink or a bulge.

Figure 2: Membrane expression and binding of wild-type and mutant Kiss1R, UT and CXCR4 receptors. (A) Schematic representation depicting ligand binding and wild-type and mutant Kiss1R, UT and CXCR4 receptor trafficking to the plasma membrane. (B) The expression of Kiss1R-P2.59, UT-P2.58, CXCR4-P2.58 and their respective mutants on total cell (permeabilized) or at the cell surface (non-permeabilized) was assessed by ELISA, 48 hours after transfection. HEK293 cells were transiently transfected with cDNA encoding pCMV-Myc (Mock), Kiss1R^{Myc}-P2.59, Δ Kiss1R^{Myc}-P2.59A, or Δ Kiss1R^{Myc}-P2.58, (*left panel*), pCMV-Myc (Mock), UT^{Myc}-P2.58, Δ UT^{Myc}-P2.58A, Δ UT^{Myc}-P2.59, (*middle panel*), and pCMV-Myc (Mock), CXCR4^{Myc}-P2.58, Δ CXCR4^{Myc}-P2.58A, Δ CXCR4^{Myc}-P2.59, (*right panel*). The wild-type and mutant receptors were significantly expressed at the plasma membrane and showed almost similar expression than wild-type corresponding receptors. Bioluminescence data are normalized to mock values. Bar graph represents mean \pm SEM obtained from 3 independent experiments. (C) (*left panel*) Histograms represent the fluorescence corresponding to Tb-labeled cell surface receptors on snap-tagged (ST)-Kiss1R-P2.59, Δ Kiss1R-P2.59A or Δ Kiss1R-P2.58 or empty vector (Mock) transiently transfected in HEK293 cells. For each panel, data are mean \pm SEM from 3 independent experiments. Saturation binding experiments of KP-10-red was monitored by HTRF. (*right panel*) Histograms represent the fluorescence corresponding to Tb-labeled cell surface receptors on snap-tagged (ST) CXCR4-P2.58, Δ CXCR4-P2.58A or Δ CXCR4-P2.59 or empty vector (Mock) transiently transfected in HEK293 cells. Saturation binding experiments of SDF-1 α -red was monitored by HTRF. For each panel, data are mean \pm SEM from 3 independent experiments.

Figure 3: Direct couplings of wild-type and mutant Kiss1R, UT and CXCR4 receptors.

(A) Schematic representation depicting the BRET strategy to measure the potential receptor G protein couplings. (B) (*upper panel*) G_q coupling was investigated by BRET between G_{αq}^{Venus} and γ_2^{RLuc8} , in HEK293 co-expressing Kiss1R^{Myc}-P2.59, Δ Kiss1R^{Myc}-P2.59A or Δ Kiss1R^{Myc}-P2.58, (*left*), UT^{Myc}-P2.58, Δ UT^{Myc}-P2.58A or Δ UT^{Myc}-P2.59 (*middle*), in combination with G_{αq}^{Venus}, β_2^{Flag} and γ_2^{RLuc8} protein subunits in the presence of increasing concentrations of the appropriate ligands KP-10 or UII. No significant decreasing BRET signal was detected between G_{αq}^{Venus} and γ_2^{RLuc8} in HEK293 expressing CXCR4^{Myc}-P2.58, Δ CXCR4^{Myc}-P2.58A or Δ CXCR4^{Myc}-P2.59 receptors in the absence or presence of SDF-1 α (10⁻⁷ M) (*right*). Data are mean \pm SEM from 3 independent experiments. (*middle*

panel) IP₁ production mediated by increasing concentrations of KP-10, and UII and SDF-1 α (10⁻⁷ M) ligands in HEK293 cells expressing Kiss1R^{Myc}-P2.59, Δ Kiss1R^{Myc}-P2.59A or Δ Kiss1R^{Myc}-P2.58 (left), UT^{Myc}-P2.58, Δ UT^{Myc}-P2.58A or Δ UT^{Myc}-P2.59 (middle), CXCR4^{Myc}-P2.58, Δ CXCR4^{Myc}-P2.58A or Δ CXCR4^{Myc}-P2.59 (right). Data are mean \pm SEM from 3 independent experiments. (lower panel) Ca²⁺ responses induced by various concentrations of KP-10 (left) or UII (middle) was monitored in HEK293 cells expressing Kiss1R^{Myc}-P2.59, Δ Kiss1R^{Myc}-P2.59A or Δ Kiss1R^{Myc}-P2.58 (left) and UT^{Myc}-P2.58, Δ UT^{Myc}-P2.58A or Δ UT^{Myc}-P2.59 (middle). Data are expressed as the mean percentage of the maximal response induced by receptors. Mean \pm SEM from 3 independent experiments. No significant Ca²⁺ increase was detected in HEK293 expressing CXCR4^{Myc}-P2.58, Δ CXCR4^{Myc}-P2.58A or Δ CXCR4^{Myc}-P2.59 receptors in the absence or presence of SDF-1 α (10⁻⁷ M) (right). Data are mean \pm SEM from 1 or 2 independent experiments. (C) G_i and G_o couplings were investigated by BRET signal between G α_{i1} ^{Rluc8} and γ_2 ^{Venus}, or G α_{oa} ^{Rluc8} and γ_2 ^{Venus} in HEK293 co-expressing Kiss1R^{Myc}-P2.59, Δ Kiss1R^{Myc}-P2.59A or Δ Kiss1R^{Myc}-P2.58, (left), UT^{Myc}-P2.58, Δ UT^{Myc}-P2.58A or Δ UT^{Myc}-P2.59 (middle), CXCR4^{Myc}-P2.58, Δ CXCR4^{Myc}-P2.58A or Δ CXCR4^{Myc}-P2.59 (right) in combination with G α_{i1} ^{Rluc8}, β_2 ^{Flag} and γ_2 ^{Venus} (upper panel) or G α_{oa} ^{Rluc8}, β_2 ^{Flag} and γ_2 ^{Venus} (lower panel) protein subunits. No significant reduction of BRET signal was detected between G α_{i1} ^{Rluc8} and γ_2 ^{Venus}, or G α_{oa} ^{Rluc8} and γ_2 ^{Venus} in HEK293 expressing Kiss1R^{Myc}-P2.59, Δ Kiss1R^{Myc}-P2.59A or Δ Kiss1R^{Myc}-P2.58 receptors in the absence or the presence of KP-10 (10⁻⁷ M). In HEK293 co-expressing UT^{Myc}-P2.58, Δ UT^{Myc}-P2.58A or Δ UT^{Myc}-P2.59 (middle) and CXCR4^{Myc}-P2.58, Δ CXCR4^{Myc}-P2.58A or Δ CXCR4^{Myc}-P2.59 (right), BRET signal between G α_{i1} ^{Rluc8} and γ_2 ^{Venus}, or G α_{oa} ^{Rluc8} and γ_2 ^{Venus} was monitored in the presence of increasing concentrations of UII or SDF-1 α . Data are mean \pm SEM from 3 independent experiments.

Figure 4: Chemotactic or chemokinetic migration of cells expressing wild-type or mutant Kiss1R, UT and CXCR4 receptors. (A) Schematic representation depicting potential involvement of G_q or G₁₃ in wild-type and mutant of Kiss1R, UT and CXCR4 receptor-induced migration. siRNA (G _{α 13}) or inhibitor (UBO-QIC) strategies used in those experiments are also represented. (B) HEK293 transiently transfected with cDNA encoding pCMV-Myc (Mock), Kiss1R^{Myc}-P2.59, Δ Kiss1R^{Myc}-P2.59A or Δ Kiss1R^{Myc}-P2.58, (left), UT^{Myc}-P2.58, Δ UT^{Myc}-P2.58A or Δ UT^{Myc}-P2.59 (middle), CXCR4^{Myc}-P2.58, Δ CXCR4^{Myc}-P2.58A or Δ CXCR4^{Myc}-P2.59 (right) were loaded in the upper chamber of modified Boyden chamber (transwell), and the appropriate KP-10, UII or SDF-1 α ligands (10⁻⁹ M, each) were

added in the lower chamber for 24 h. Microphotographs show cells that migrated onto the lower surface of the transwell membrane under control or treated conditions (*upper panel*). Cell motility was evaluated by counting cells in 10 random fields after hematoxylin counterstaining. Histograms are quantification of the migrating cells expressed as the percentage as compared with untreated cells (control). Each bar corresponds to mean \pm SEM obtained from 3 representative experiments. One-way analysis of variance, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-test; ns, not significant; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ (*lower panel*). (C) HEK293 transiently transfected with cDNA encoding Kiss1R^{Myc}-P2.59, Δ Kiss1R^{Myc}-P2.59A or Δ Kiss1R^{Myc}-P2.58, (*left*), UT^{Myc}-P2.58, Δ UT^{Myc}-P2.58A or Δ UT^{Myc}-P2.59 (*middle*), CXCR4^{Myc}-P2.58, Δ CXCR4^{Myc}-P2.58A or Δ CXCR4^{Myc}-P2.59 (*right*) were exposed to increasing concentrations of the appropriate KP-10, UII or SDF-1 α ligands in the lower chamber of Transwell for 24 h. Graphs represent mean \pm SEM obtained from 1 representative experiment in triplicate. (D) Control siRNA and siRNA directed against human G $_{\alpha 13}$ (si-G $_{13}$) were co-transfected into HEK293 with plasmid encoding Kiss1R^{Myc}-P2.59, Δ Kiss1R^{Myc}-P2.58, UT^{Myc}-P2.58 or Δ UT^{Myc}-P2.59. Twenty four hours after transfection, cells were added onto Transwells and treated in the absence or presence of KP-10 or UII (10^{-9} M, 24 h). Histograms are quantification of the migrating cells expressed as the percentage as compared with control. Each bar corresponds to mean \pm SEM obtained from 1 representative experiment in triplicate. (E) HEK293 cells were transiently transfected with plasmid encoding pCMV-Myc (Mock), Kiss1R^{Myc}-P2.59, Δ Kiss1R^{Myc}-P2.59A, Δ Kiss1R^{Myc}-P2.58, UT^{Myc}-P2.58, Δ UT^{Myc}-P2.58A or Δ UT^{Myc}-P2.59. Twenty four hours after transfection, cells were loaded in the upper chamber of the transwell in the absence or the presence of the G $_q$ inhibitor UBO QIC (10^{-6} M) and treated in the absence or the presence of KP-10 or UII (10^{-9} M, 24 h). Histograms are quantification of the migrating cells expressed as the percentage as compared with control. Each bar corresponds to mean \pm SEM obtained from 3 experiments in triplicate. One-way analysis of variance, followed by Sidak post-test; *** $P < 0.001$. (F) HEK293 expressing Kiss1R-P2.59 or Δ Kiss1R-P2.58 (*left*), UT-P2.58, or Δ UT-P2.59 (*middle*), and CXCR4-P2.58 or Δ CXCR4-P2.59 (*right*) were loaded in the upper chamber of transwell exposed without (1) or with the appropriate KP-10, UII or SDF-1 α ligands (10^{-9} M each; 24 h) in the lower chamber of the transwell (2) or in both upper and lower chambers (3). Histograms are quantification of the migrating cells expressed as the percentage as compared with control. Each bar corresponds to mean \pm SEM obtained from 2 experiments in triplicate.

Figure 5: Wild-type and mutant Kiss1R, UT and CXCR4-induced cell adhesion and focal adhesion formation. (A) Adhesion on fibronectin of HEK293 cells transfected with pCMV-Myc (Mock), Kiss1R-P2.59, Δ Kiss1R-P2.59A or Δ Kiss1R-P2.58 (*left*), UT-P2.58, Δ UT-P2.58A or Δ UT-P2.59 (*middle*), and CXCR4-P2.58, Δ CXCR4-P2.58A or Δ CXCR4-P2.59 in the absence or the presence of appropriate KP-10, UII or SDF-1 α ligands (10^{-9} M each; 30 min). Bar graph represents mean \pm SEM obtained from 2 to 3 experiments. (B) Paxillin activation following the application of KP-10, UII or KP-10 (10^{-9} M) on pCMV-Myc (Mock), Kiss1R-P2.59, Δ Kiss1R-P2.59A or Δ Kiss1R-P2.58 (*left*) and UT-P2.58, Δ UT-P2.58A or Δ UT-P2.59 (*right*) expressing cells was assessed by ELISA, 48 hours after transfection. Cells were treated with the appropriate ligands for 30 or 60 minutes. Activation of paxillin was evaluated by measuring the ratio of bioluminescence after anti-phospho-paxillin (P-paxillin, Tyr31) and anti-paxillin antibodies in non permeabilized cells. Results are expressed as percentage of control in the absence of ligand. Bar graph represents mean \pm SEM obtained from one to 3 experiments in quadruplicate. (C) Immunofluorescence analysis of the number of focal adhesion (FA) points labeled with an antibody directed against paxillin (red) in HEK293 cells expressing Kiss1R^{eGFP}-P2.59 or Δ Kiss1R^{eGFP}-P2.58 (green, *upper panel*) and UT^{eGFP}-P2.58 or Δ UT^{eGFP}-P2.59 (green, *lower panel*), in the absence or the presence of KP-10 or UII (10^{-9} M; 30 min). Merge images allowed visualization of receptors and paxillin in the plasma and cytosolic compartments (green, red and yellow). Nuclei (blue) were counterstained with DAPI. Scale bars indicate 20 μ m. (D) Scatter plots represent the quantification of focal adhesion points per cell area in control condition in HEK293 cells expressing Kiss1R^{eGFP}-P2.59 or Δ Kiss1R^{eGFP}-P2.58 in the absence or presence of KP-10 (10^{-9} M, 15 and 30 min) (*upper panel*), or in HEK293 cells expressing UT^{eGFP}-P2.58 or Δ UT^{eGFP}-P2.59 in the absence or the presence of UII (10^{-9} M, 15 and 30 min) (*middle panel*) or in HEK293 cells expressing receptors with proline in position 2.58 (*lower panel, left side*) or in position 2.58 (*lower panel, right side*). Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-test; ns, not significant; *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. (E) FAK activation following the application of KP-10 or UII on Kiss1R-P2.59 or UT-P2.58 and their respective mutants on permeabilized cell was assessed by ELISA 48 hours after transfection. HEK293 cells were transiently transfected with cDNA encoding pCMV-Myc (Mock), Kiss1R-P2.59, Δ Kiss1R-P2.59A or Δ Kiss1R-P2.58 (*left*), UT-P2.58, Δ UT-P2.58A or Δ UT-P2.59 (*right*). Cells were treated with KP-10 or UII (10^{-9} M) for 30 or 60 minutes. Activation of FAK was evaluated by measuring the ratio of bioluminescence after anti-phospho-FAK (P-FAK, Tyr576/577) and anti-FAK antibodies. Results are expressed as percentage of control in the absence of KP-10

or UII. Bar graph represents mean \pm SEM obtained from one representative experiment in quadruplicate. (F) The expression of β 1-integrin on HEK293 cells transfected with cDNA encoding c-Myc-tagged pCMV-Myc (Mock), Kiss1R-P2.59, Δ Kiss1R-P2.59A or Δ Kiss1R-P2.58 (*left*) and UT-P2.58, Δ UT-P2.58A or Δ UT-P2.59 receptors (*right*) was assessed by ELISA, 48 hours after transfection. Cells were treated with the appropriate KP-10 or UII ligands (10^{-9} M, each) for 30 or 60 minutes. The expression of β 1-integrin was evaluated by measuring the ratio of bioluminescence after anti- β 1-integrin and anti-c-Myc antibodies in permeabilized and non permeabilized cells, respectively. Results are expressed as percentage of control in the absence of ligand. Bar graph represents mean \pm SEM obtained from one to 3 experiments in quadruplicate.

Figure 6: Dynamic wave of focal adhesion formation and UT-P2.58 or Δ UT-P2.59 receptor trafficking. (A) Immunofluorescence analysis of the number of FA points labeled with an antibody directed against paxillin (red) in HEK293 cells expressing UT^{eGFP}-P2.58 or Δ UT^{eGFP}-P2.59 (green) in the absence or presence of UII administered for 5 to 60 min. Merge images allowed visualization of receptors and paxillin in the plasma and cytosolic compartments (yellow). Nuclei (blue) were counterstained with DAPI. Scale bars indicate 40 μ m. White squares on the pictures illustrates the specific cell area enlarged on the right panel (zoom). Scale bars indicate 15 μ m. (B and C) Quantification of FA points per cell (B) and distribution of FA areas (C) in HEK293 cells expressing UT^{eGFP}-P2.58 or Δ UT^{eGFP}-P2.59 in the absence or presence of UII (10^{-9} M) administered for 5 to 60 min. Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-test; *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. (B) FA areas are measured using a successive image treatments, and the proportion of FA comprised between 0 to 0.1 μ m² (white), 0.1 to 0.2 μ m² (light grey), 0.2 to 1 μ m² (dark grey) and higher than 1 μ m² (black) were quantified and represented for each time treatment. (D) Percentages of cells presenting a receptor membrane labeling (white), membrane and intracellular labelings (grey) or exclusively intracellular labeling (black) were quantified. (E) The interaction between receptor and β -Arrestin 2 was investigated on HEK293 cells transfected with plasmid encoding eYFP-tagged UT-P2.58, Δ UT-P2.58A or Δ UT-P2.59 receptor in combination with cDNA encoding β -Arrestin 2^{Rluc8}. BRET signal between eYFP-tagged receptors and β -Arrestin 2^{Rluc8} was monitored in the presence of increasing concentrations of UII. Data are mean \pm SEM from 3 independent experiments.

Figure 7: Dynamic wave of focal adhesion formation and Kiss1R-P2.59 or Δ Kiss1R-P2.58 receptor trafficking. (A) Immunofluorescence analysis of the number of FA points labeled with an antibody directed against paxillin (red) in HEK293 cells expressing Kiss1R^{eGFP}-P2.59 or Δ Kiss1R^{eGFP}-P2.58 (green) in the absence or the presence of KP-10 administered for 5 to 60 min. Merge images allowed visualization of receptors and paxillin in the plasma and cytosolic compartments (yellow). Nuclei (blue) were counterstained with DAPI. Scale bars indicate 40 μ m. White squares on the pictures illustrates the specific cell area enlarged on the right panel (zoom). Scale bars indicate 15 μ m. (B and C) Quantification of FA points per cell (B) and distribution of FA areas (C) in HEK293 cells expressing Kiss1R^{eGFP}-P2.59 or Δ Kiss1R^{eGFP}-P2.58 in the absence or the presence of KP-10 (10^{-9} M) administered for 5 to 60 min. Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-test; *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. (B) FA areas are measured using a successive image treatments, and the proportion of FA comprised between 0 to 0.1 μ m² (white), 0.1 to 0.2 μ m² (light grey), 0.2 to 1 μ m² (dark grey) and higher than 1 μ m² (black) were quantified for each time treatment. (D) Percentages of cells presenting a receptor membrane labeling (white), membrane and intracellular labelings (grey) or exclusively intracellular labeling (black) were quantified. (E) The interaction between receptor and β -Arrestin 2 was investigated on HEK293 cells transfected with plasmid encoding eYFP-tagged Kiss1R-P2.59, Δ Kiss1R-P2.59A or Δ Kiss1R-P2.58 receptor in combination with cDNA encoding β -Arrestin 2^{Rluc8}. No significant BRET signal was detected between eYFP-tagged Kiss1R-P2.59, Δ Kiss1R-P2.59A or Δ Kiss1R-P2.58 receptors and β -Arrestin 2^{Rluc8} in the absence or the presence of KP-10 (10^{-7} M). Data are mean \pm SEM from 3 independent experiments.

Figure 8: Effects of UT and Kiss1R wild-type and mutant receptors on the lamellipodia formation. (A) Images of representative cells transfected with cDNAs encoding UT^{eGFP}-P2.58 (*left images*) or Δ UT^{eGFP}-P2.59 (*right images*) in the absence (*upper images*) or the presence (*lower images*) of UII (15 min, 10^{-9} M). Nuclei (blue) were counterstained with DAPI. Scale bare correspond to 20 μ m. (B) Percentage of cells expressing UT^{eGFP}-P2.58 (*upper*) or Δ UT^{eGFP}-P2.59 (*lower*) presenting membrane labeling (grey bars), no lamellipodium (●), one lamellipodium (■) or more (▲), after exposure to UII (10^{-9} M) for 5 to 60 min. (C) Images of representative cells expressing Kiss1R^{eGFP}-P2.59 (*left images*) or Δ Kiss1R^{eGFP}-P2.58 (*right images*), in the absence (*upper images*) or the presence (*lower images*) of KP-10 (15 min, 10^{-9} M). Nuclei (blue) were counterstained with DAPI. Scale bars correspond to 20 μ m. (D) Percentage of cells expressing Kiss1R^{eGFP}-P2.59 (*upper*) or

Δ Kiss1R^{eGFP}-P2.58 (*lower*) presenting membrane labeling (grey bars), no lamellipodium (●), one lamellipodium (■) or more (▲), after exposure to KP-10 (10^{-9} M) for 5 to 60 min.

Supplementary information

Supplementary methods

Calcium measurement

For G_q coupling study, HEK293 cells (2 millions) were transfected with 3 μ g plasmid encoding UT^{Myc}-P2.58 using Cell line nucleofector kit V as previously described. Transfected cells were then seeded in poly-L-ornithine-coated 96-well plates at a density of 50,000 cells/wells and incubated for 48h at 37°C with 5% CO₂. After incubation with 2 μ M Fluo4-AM dye containing 20 % pluronic acid (1 h), cells were preincubated in the absence or presence of the G_q inhibitor UBO QIC (10^{-6} M, 30 min) and the effect of graded concentrations of UII in the absence or the presence of the G_q inhibitor UBO QIC (10^{-6} M) on [Ca²⁺]_c was measured with the FlexStation III on PRIMACEN Platform. For experiments using siRNA control and siRNA directed against RhoGEFp63 (Dharmacon, GE Healthcare Europe), HEK293 cells (2 millions) were transfected with 200 pM siRNA using Cell line nucleofector kit V. Then, 48 hours later, cells (2.5 millions) were transfected by nucleofection with 3 μ g plasmid encoding Kiss1R^{Myc}-P2.59 or UT^{Myc}-P2.58 and 200 pM siRNA. The following day, after incubation with Fluo4-AM dye, the effect of graded concentrations of KP-10 or UII on [Ca²⁺]_c was measured with the FlexStation III on PRIMACEN Platform.

Migration assays

HEK293 cells were transfected with 4 μ g empty pCMV-Myc or plasmid encoding c-Myc-tagged wild-type and mutant receptors using FuGene HD as previously described. Twenty four hours after transfection, cells were seeded at a density of 100,000 cells/125 μ L/filter on the upper chamber of the Transwell. The gradient was generated by filling the lower chamber with the appropriate ligand. Cells were preincubated with PTX (6 h, 2×10^{-6} M) and PTX was added to both upper and lower chambers.

SDS-PAGE and western blot

Cells lysates were prepared in ice-cold RIPA Buffer (25 mM Tris HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) supplemented with protease and phosphatase inhibitor cocktails. Lysates were mixed with Laemmli buffer 5X (4:1, vol:vol) and loaded onto 10% SDS-PAGE gel. After separation, proteins were transferred onto a

polyvinylidene difluoride membrane (Immobilon-P, Millipore). Membrane were blocked with 5% non-fat milk, incubated overnight at 4°C with the primary antibodies (anti-phospho-ERK1/2, Santa Cruz Biotechnology, sc-7383; anti-ERK1/2, Santa Cruz Biotechnology, sc-94) and then incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies against mouse IgG (Santa Cruz Biotechnology, sc-2005) or against rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology, sc-2004) at room temperature for 1 hour. Immunoreactive bands were visualized with the enhanced chemiluminescence western blotting substrate (GE Healthcare).

Legends to supplementary figures

Figure S1. Kiss1r or UT Receptor Gq coupling and intracellular calcium increase. (A) Effect of G_q inhibitor UBO QIC (10⁻⁶ M) on UII-induced calcium mobilization on HEK293 cells expressing UT^{Myc}-P2.58. Data are expressed as percentages of the maximal response induced by UT-P2.58 without inhibitor and correspond to one representative experiment. (B) Effects of siRNA control (*light grey*) or siRNA directed against RhoGEFp63 (*dark grey*) on calcium mobilization relayed by Kiss1R^{Myc}-P2.59 (*left*) or UT^{Myc}-P2.58 (*right*). Data are expressed as percentages of the maximal response induced by Kiss1R-P2.59 (*left*) or UT-P2.58 (*right*) in the absence of siRNA and correspond to one representative experiment.

Figure S2. Effect of the G_{i/o} coupling in wild-type and mutant Kiss1R and UT receptor-induced migration. HEK293 cells were transiently transfected with plasmid encoding pCMV-Myc (Mock), Kiss1R^{Myc}-P2.59, ΔKiss1R^{Myc}-P2.59A or ΔKiss1R^{Myc}-P2.58 (A) or UT^{Myc}-P2.58, ΔUT^{Myc}-P2.58A or ΔUT^{Myc}-P2.59 (B). Twenty four hours after transfection, cells were pre-treated with PTX (6h, 2×10⁻⁶ M), loaded in the upper chamber of the transwell in the presence or the absence of PTX (2×10⁻⁶ M), and treated in the absence or the presence of KP-10 (A) or UII (10⁻⁹ M, 24 h; B). Histograms are quantification of the migrating cells expressed as the percentage as compared with control. Each bar corresponds to mean ± SEM obtained from one (A) or 3 (B) experiments in triplicate. One-way analysis of variance, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-test; **P<0.01.

Figure S3. Wild-type and mutant CXCR4-mediated adhesion and CXCR4-P2.58 receptor trafficking. (A) Immunofluorescence analysis of the number of FA points labeled with an antibody directed against paxillin (*red*) in HEK293 cells expressing CXCR4^{eGFP}-P2.58 or ΔCXCR4^{eGFP}-P2.59 (*green*), in the absence or presence of SDF-1α (10⁻⁹ M; 30 min). Merge images allowed visualization of receptors and paxillin in the plasma and cytosolic compartments (yellow). Nuclei (blue) were counterstained with DAPI. Scale bars indicate 20 μm. (B) Scatter plots represent the quantification of focal adhesion points per cell area in control condition in HEK293 cells expressing CXCR4^{eGFP}-P2.58 or ΔCXCR4^{eGFP}-P2.59 in the absence or presence of UII (10⁻⁹ M, 15 and 30 min). Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-test; ns, not significant; **P<0.01; ***P<0.001. (C) Immunofluorescence analysis of the number of FA points labeled with an antibody directed against paxillin (*red*) in HEK293 cells expressing CXCR4^{eGFP}-P2.58 (*green*) in the absence or presence of SDF-1α administered for 5 to 60 min. Merge images allowed visualization of receptors and paxillin in the plasma and cytosolic compartments (yellow). Nuclei (blue) were counterstained with DAPI. Scale bars

indicate 40 μm . White squares on the pictures illustrate the specific cell area enlarged on the right panel (zoom). Scale bars indicate 15 μm . (D and E) Quantification of FA points per cell (D) and distribution of FA areas (E) in HEK293 cells expressing CXCR4^{eGFP}-P2.58 in the absence or presence of SDF-1 α (10^{-9} M) administered for 5 to 60 min. FA areas are measured using a successive image treatments, and the proportion of FA comprised between 0 to 0.1 μm^2 (white), 0.1 to 0.2 μm^2 (light grey), 0.2 to 1 μm^2 (dark grey) and higher than 1 μm^2 (black) were quantified for each time treatment. (F) Percentages of cells presenting a receptor membrane labeling (white), membrane and intracellular labelings (grey) were quantified. (G) The interaction between receptor and β -Arrestin 2 was investigated on HEK293 cells expressing eYFP-tagged CXCR4-P2.58, Δ CXCR4-P2.58A or Δ CXCR4-P2.59 receptor in combination with DNA encoding β -Arrestin 2^{Rluc8}. BRET signal between eYFP-tagged receptors and β -Arrestin 2^{Rluc8} was monitored in the presence of increasing concentrations of UII. Data are mean \pm SEM from 3 independent experiments.

Figure S4. CXCR4-P2.58-induced lamellipodia formation. (A) Images of representative cells transfected with cDNAs encoding CXCR4^{eGFP}-P2.58 in the absence or the presence of SDF-1 α (15 min, 10^{-9} M). Nuclei (blue) were counterstained with DAPI. Scale bars correspond to 20 μm . (B) Percentage of cells expressing CXCR4^{eGFP}-P2.58 presenting membrane labeling (grey bars), no lamellipodium (●), one lamellipodium (■) or more (▲), after exposure to SDF-1 α (10^{-9} M) for 5 to 60 min.

Figure S5. Wild-type and mutant Kiss1R and UT-induced stimulation of ERK1/2. (A) Determination of both total and phosphorylated ERK1/2 on HEK293 cells expressing Kiss1R^{Myc}-P2.59 (*upper panel*) or Δ Kiss1R^{Myc}-P2.58 (*lower panel*) in the absence or the presence of KP-10 (10^{-9} M) from 5 to 120 min. Western blots were performed using specific antibody against total or phospho (P-ERK1/2, Thr202/Tyr204) ERK1/2. Quantifications were performed with ImageLab[®] software. Histograms represent ratio P-ERK1/2 /total ERK1/2 of one representative experiment. (B) Determination of both total and phosphorylated ERK1/2 on HEK293 cells expressing UT^{Myc}-P2.58 (*upper panel*) or Δ UT^{Myc}-P2.59 (*lower panel*) in the absence or the presence of UII (10^{-9} M) from 5 to 120 min. Western blots were performed using specific antibody against total or P-ERK1/2. Quantifications were performed with ImageLab[®] software. Histograms represent ratio P-ERK1/2/total ERK1/2 of one representative experiment.

Discussion-Conclusion

1. Différentes voies de couplages et sélectivité fonctionnelle du récepteur UT :

implication dans la mise au point de ligands d'intérêt thérapeutique

Dans la première partie de mon travail de thèse et en raison des travaux précédemment obtenus par l'équipe qui montraient notamment que l'UII et l'URP exercent des fonctions similaires mais aussi distinctes sur les astrocytes (Jarry *et al.*, 2010), nous avons étudié, en **collaboration étroite avec le Dr Laurent Prézeau (IGF, Montpellier, France) et le Pr Richard Leduc (Université de Sherbrooke, Québec, Canada)**, le profil de signalisation du récepteur UT. Plus précisément, nous avons cherché à valider le rôle des deux ligands endogènes de l'UT, UII et URP, et de quatre agonistes ou antagonistes peptidiques synthétiques (UII₄₋₁₁, [Orn⁵]URP, [Orn⁸]UII et urantide), sur un modèle de cellules HEK293 exprimant le récepteur UT humain recombinant. Trois profils principaux de couplage ont été obtenus, et montrent la manière dont les ligands régulent les activités biologiques cellulaires, comme la migration, l'adhésion et la survie cellulaire.

Nous avons dans un premier temps caractérisé la capacité de l'UII et de l'URP à induire un couplage du récepteur UT à six différentes voies de signalisation (G_q , G_{i1} , G_{oA} , G_{i3} et β -Arrestines 1 et 2, en excluant G_s) et à entraîner, secondairement, la phosphorylation de ERK1/2 ou NF- κ B, voire l'internalisation du récepteur. Ces résultats sont cohérents avec les études suggérant un couplage indirect du récepteur UT aux protéines $G_{q/11}$ (Sauzeau *et al.*, 2001; Tzanidis *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2015), $G_{i/o}$ (Castel *et al.*, 2006; Jarry *et al.*, 2010; Lecointre *et al.*, 2015) et G_{i3} (Lecointre *et al.*, 2015), ainsi que l'activation des voies de signalisation incluant la PKC, les MAPK p38 et ERK1/2, les tyrosine kinases et les protéines RhoA/ROCK (Rossowski *et al.*, 2002; Lecointre *et al.*, 2015), ou encore la translocation nucléaire, *via* l'activité de GRK5, de NF- κ B (Park *et al.*, 2016). De plus, le recrutement des β -Arrestines 1 et 2 observé dans notre étude corrobore les travaux précédents menés par le groupe du Pr Leduc, qui suggéraient que l'endocytose du récepteur UT (Proulx *et al.*, 2005) est dépendante de la β -Arrestine 2 et de la phosphorylation possible d'un cluster de sérines dans le domaine C-terminal de l'UT de Rat. En outre, deux phases d'activation de ERK1/2 ont été détectées suite à la stimulation du récepteur UT par l'UII mais aussi par l'URP. Celles-ci peuvent être relayées par l'intermédiaire d'un couplage aux protéines $G_{i/o}$ et G_q et du recrutement des β -Arrestines, bien que d'autres voies puissent être impliquées, telles que la transactivation de l'EGFR, comme il a été démontré pour le récepteur de V_2 de la

vasopressine (Zhang *et al.*, 2016), AT_{1A} de l'angiotensine (Kim *et al.*, 2009) ou encore 5-HT_{2B} de la sérotonine (Li *et al.*, 2008).

En comparant l'ensemble des données obtenues avec les ligands endogènes ou analogues synthétiques testés, des schémas de signalisation peuvent être organisés en trois groupes (Figure 27): le groupe 1 est représenté par les agonistes dit « entiers » UII, URP et UII₄₋₁₁, le groupe 2 par l'[Orn⁸]UII et l'[Orn⁵]URP et le groupe 3 par l'urantide. Ainsi, on peut souligner ici que l'UII et l'URP, présentent exactement les mêmes profils de couplage. Pourtant, malgré la large distribution de l'UII et de l'URP dans le système cardiovasculaire, rénal et endocrinien, leurs distributions tissulaires ainsi que leur production ne se superposent pas, suggérant que ces ligands exercent des actions distinctes. De plus, il a été montré que les ligands endogènes UII et URP exercent à la fois des activités biologiques comparables certes, mais aussi propres à chacun, notamment sur la prolifération des astrocytes de Rat (Jarry *et al.*, 2010), l'accumulation de ${}_c[Ca^{2+}]$ (Desrues *et al.*, 2012), ou la production de peptide natriurétique auriculaire (Ross *et al.*, 2010). Dans notre étude, l'absence de différence dans les voies de signalisation, la migration cellulaire, l'adhésion et l'apoptose suite à l'activation du récepteur UT par l'UII, l'URP et l'UII₄₋₁₁ peut éventuellement s'expliquer par le fait que nous regardons des événements directement reliés au récepteur UT. Ces cinétiques d'observation contrastent avec les études qui s'attachent aux effets cellulaires ou physiologiques du système urotensinergique, requérant une coordination dans le temps, et/ou entre différents types cellulaires, et/ou impliquant des densités probablement plus faibles de récepteur dans les cellules natives. En effet, le modèle de cellules HEK293 recombinantes pour le récepteur UT ne reflète pas des conditions natives, en partie à cause de la forte surexpression du récepteur après transfection, ce qui entraînerait par exemple des différences dans la liaison du ligand. En effet, le temps de liaison des molécules pourrait être d'une importance cruciale, puisque l'UII, et non l'URP (Jarry *et al.*, 2010), est considéré comme un agoniste quasiment irréversible (Castel *et al.*, 2006). Ce temps de résidence serait lié aux différences de séquence et de structure entre les deux peptides, la partie N-terminale plus longue chez l'UII, pourrait en effet allonger le temps de liaison au récepteur. En outre, une étude de RMN révèle que l'UII et l'URP se fixent *via* leur partie cyclique de la même manière au récepteur UT, impliquant une interaction avec les mêmes résidus des DTM3 et DTM7 et des boucles extracellulaires e₂ et e₃ (Brancaccio *et al.*, 2015). Cependant, seule la partie N-terminale de l'UII adopte une interaction large avec la boucle e₂ de l'UT, *via* des liaisons hydrogènes entre les résidus Gly¹ de l'UII et Lys¹⁹⁶ de l'UT et entre Asp⁴ de l'UII et Arg¹⁹³ de l'UT. Cette étude révèle également que la substitution du résidu Gly⁴ de l'UII par une Ala augmente le

ratio de dissociation ligand/récepteur (Brancaccio *et al.*, 2015). Ainsi, la liaison de l'UII et de l'URP pourrait induire des changements de conformation du récepteur UT responsables de l'activation de voies de signalisation pleiotropes, mais c'est le temps de résidence accru des ligands qui pourrait altérer la réponse du récepteur en *i)* induisant une action à long terme et différents processus de désensibilisation/internalisation, ou *ii)* surmontant les processus de remodelage tissulaire, conduisant à des réponses cellulaires ou physiologiques différentes (Guo *et al.*, 2012). Ce concept peut également être appliqué aux ligands présentant un biais de signalisation, dont le temps de résidence pourrait avoir un impact sur la sélection de la signalisation vers les β -Arrestines.

De manière intéressante, les peptides du groupe 1 présentent une efficacité de recrutement des β -arrestines 5 à 10 fois supérieure à celle observée pour le couplage aux protéines G (Figure 27). Au contraire, les peptides du groupe 2 ne recrutent pas les β -arrestines alors qu'ils entraînent un couplage du récepteur UT à toutes les protéines G, suggérant que ces peptides présentent un biais de signalisation dirigé spécifiquement vers ces protéines G. Cela explique éventuellement certains effets de l'[Orn⁸]UII, qui présente une activité antagoniste dans des modèles cellulaires de rongeurs, comme les anneaux d'aorte de Rat (Camarda *et al.*, 2002; Guerrini *et al.*, 2005; Vergura *et al.*, 2004), tout en conservant une activité agoniste sur la mobilisation calcique (Vergura *et al.*, 2004). Il en est de même pour l'[Orn⁵]URP, qui montre des activités agoniste ou antagoniste selon les modèles cellulaires étudiés (Chatenet *et al.*, 2004; Desrues *et al.*, 2012). Chacune des valeurs de pEC₅₀ déterminées pour le couplage aux protéines G des peptides du groupe 2, sont environ d'un log supérieur à celles observées pour les peptides du groupe 1, ce qui peut être relié à leur plus basse affinité pour le récepteur et/ou à leur plus basse efficacité de couplage aux protéines G.

En ce qui concerne le groupe 3, les effets de l'urantide apparaissent encore plus complexes. En effet, l'urantide se comporte principalement comme un agoniste partiel, puisque son efficacité de couplage est plus basse dans toutes les voies de signalisation, par rapport aux groupes 1 et 2 (Figure 27). L'urantide a pour la première fois été synthétisé pour ses capacités antagonistes présumées notamment dans les réponses calciques (Camarda *et al.*, 2006) comme mis en évidence ici sur le recrutement des β -arrestines. Cependant, son activité d'agoniste partiel pour chacune des protéines G signifie qu'il peut se comporter à la fois comme agoniste ou antagoniste, contrairement à l'activité purement antagoniste précédemment démontrée (Song *et al.*, 2006). De plus, alors que les autres peptides présentent des valeurs de pEC₅₀ pour G_o similaires, voire meilleures, que celles observées pour G_i ou G_q, l'urantide montre une valeur de pEC₅₀ pour G_i (et dans une moindre mesure, pour G_q) presque

10 fois supérieure à celle déterminée pour G_o . Ces résultats indiquent que l'urantide présente un biais de signalisation, au moins par rapport à G_i et G_q contre G_o et les β -Arrestines. La majorité des ligands biaisés décrits dans la littérature distingue la signalisation dépendante des protéines G de celle dépendante des β -Arrestines (Luttrell, 2014). Nos résultats démontrent que le récepteur UT représente un exemple de récepteur pour lequel les ligands peuvent favoriser un couplage à certaines protéines G par rapport à d'autres (Figure 27).

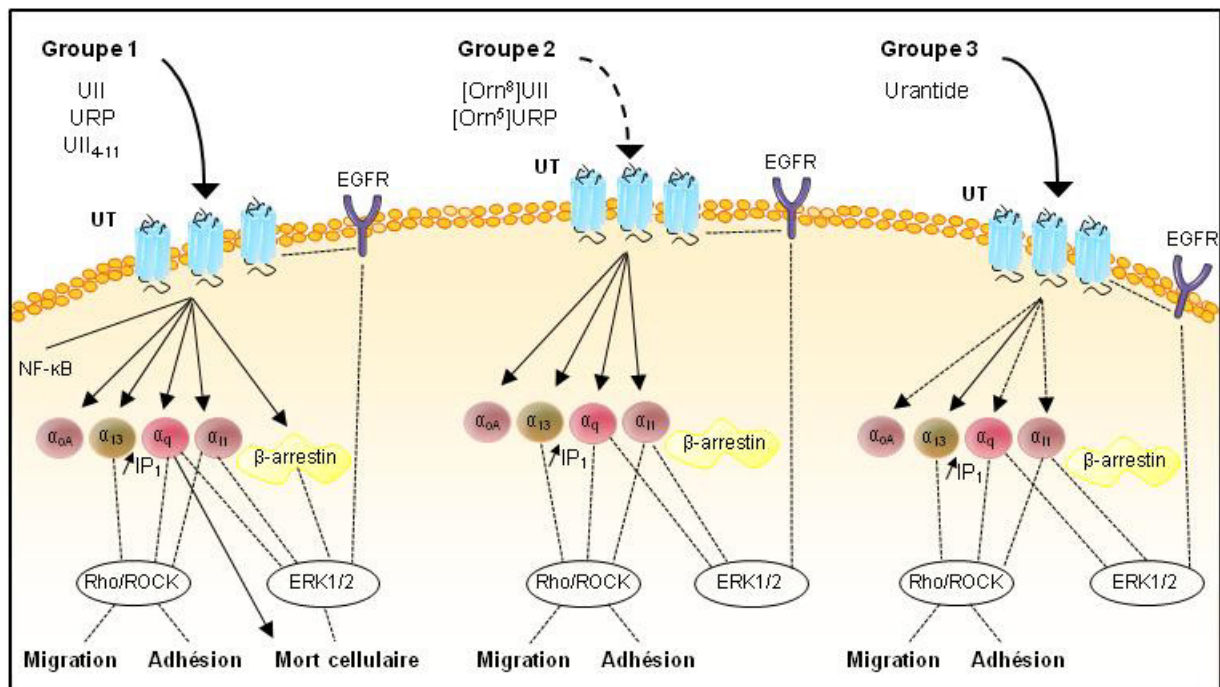


Figure 27. Représentation schématique des profils de signalisation des ligands urotensinergiques et de leurs effets cellulaires. Les voies de signalisation des différents groupes (1, 2 et 3) de ligands urotensinergiques sont représentées. La flèche pleine symbolise un recrutement des partenaires protéiques ; une flèche pointillée un recrutement partiel ; un trait plein représente la mise en évidence directe d'éléments de signalisation ; un trait pointillé représente les relations hypothétiques entre les voies de signalisation et les effets cellulaires.

Nous n'avons pas détecté de profil de signalisation particulier entre l'UII, l'URP et l'UII₄₋₁₁, suggérant que les séquences plus courtes de l'URP et de l'UII₄₋₁₁ par rapport à l'UII n'affectent pas leur capacité de liaison ou leur capacité à induire un couplage. Contrairement au peptide UII₅₋₁₁, qui présente une efficacité 200 à 1000 fois inférieure, nous montrons que l'UII₄₋₁₁ possède non seulement la séquence minimale requise pour une activité biologique mais qu'elle est également suffisante pour un agonisme total. Les profils de signalisation engagés par l'[Orn⁸]UII et l'[Orn⁵]URP révèlent qu'en plus de son importance dans la reconnaissance et l'activation du récepteur (Leprince *et al.*, 2008), le résidu Lys est déterminant pour la signalisation de l'UT dépendante des β -Arrestines, pour la deuxième phase de phosphorylation de ERK1/2, ainsi que pour l'internalisation du récepteur. Les trois substitutions dans la séquence de l'urantide lui confèrent une forte affinité au récepteur ainsi

qu'une activité biaisée au regard du couplage à G_i vs. G_o . Nous émettons donc l'hypothèse que le biais de signalisation des β -Arrestines et des protéines G soit supporté par la substitution de la Lys⁸ par l'Orn⁸ et que l'affinité soit renforcée par le remplacement de Cys³ par Pen³. En effet, cette substitution sur le peptide UII₄₋₁₁ (ligand P5U) lui confère une activité de super-agoniste. En conséquence, nous pensons que cette Lys⁸, qui interagit au moins partiellement avec les DTM3 et 7, joue un rôle central dans le recrutement des β -Arrestines et est déterminante dans le biais de signalisation du récepteur UT. Cette hypothèse est supportée par des études récentes de RMN qui montrent que le biais de signalisation du récepteur β_2 -AD vis-à-vis des β -Arrestines implique essentiellement le DTM7 (Liu *et al.*, 2012b). De plus, une étude utilisant la résonance plasmonique de surface a montré que l'urantide, qui ne recrute que très partiellement les β -arrestines, ne pouvait interagir qu'avec la boucle e_2 de l'UT, alors que l'UII et l'URP interagissent avec e_2 ainsi que e_3 connectée au DTM7 (Boivin *et al.*, 2006). Ces observations ouvrent donc la voie à de nouvelles stratégies dans la conception rationnelle de ligands biaisés à visée thérapeutique ciblant le récepteur UT.

Les profils de transduction générés par les différents peptides dictent l'intégration de leur signalisation à des événements cellulaires, comme observé pour la migration, l'adhésion et la survie cellulaire. Les ligands testés induisent la migration et l'adhésion cellulaire avec des intensités similaires, suggérant qu'ils partagent des voies de transductions requises pour ces effets. Ces données sont en accord avec les études montrant que les voies de signalisation Rho/ROCK mobilisées dans la migration cellulaire relayée par le récepteur UT, sont dépendantes des couplages aux protéines $G_{i/o}$, G_{13} et G_q (Segain *et al.*, 2007; Lecointre *et al.*, 2015). Seuls les peptides du groupe 1 UII, URP et UII₄₋₁₁ inhibent la croissance des cellules HEK293 exprimant l'UT en réduisant la prolifération ou la survie cellulaire, et/ou en favorisant l'apoptose, comme le suggère l'augmentation du marquage annexine V. Il convient de noter que les effets mitogéniques du système urotensinergique dépendent de l'activation de ERK1/2 subséquente à l'activation de l'UT (Ziltener *et al.*, 2002).

Nous pouvons émettre l'hypothèse que le recrutement des β -Arrestines et leur signalisation jouent un rôle dans ces effets différentiels, à travers leur implication dans la régulation des MAPK, conduisant à l'apoptose ou la mort cellulaire. Cependant, l'inhibition concomitante ou indépendante de l'expression des β -Arrestines 1 et 2 ne prévient pas la mort cellulaire induite par l'UII, l'URP et l'UII₄₋₁₁. Mais la démonstration de l'implication du couplage G_q dans ce phénomène ouvre un nouveau niveau de complexité du biais de signalisation du récepteur UT. Il peut être proposé que la seconde phase d'activation de ERK1/2 résulte de différentes voies. La première impliquerait l'internalisation du récepteur UT, les β -Arrestines

étant complètement recrutées par l'UII, l'URP et l'UII₄₋₁₁ et partiellement par l'urantide. La seconde emprunterait une cascade de signalisation encore non-identifiée, éventuellement relayée par une protéine dont l'activité serait dépendante de G_q pleinement activée par l'UII, l'URP et l'UII₄₋₁₁ et partiellement par l'urantide, et qui mènerait à la mort cellulaire. En accord avec cette hypothèse, il a été montré que *i*) l'activation du récepteur de la GnRH conduit au couplage G_q et à une diminution de la prolifération cellulaire (White *et al.*, 2008) *ii*) le récepteur de la somatostatine 2 induit l'activation de ERK *via* la sous-unité G α_{14} de la famille G_q (Sánchez-Fernández *et al.*, 2013), et enfin *iii*) le récepteur A3 de l'adénosine induit l'apoptose des cellules de tumeur de vessie *via* un couplage G_q conduisant à la surexpression du facteur proapoptotique AIF (*apoptosis-inducing factor*) (Kanno *et al.*, 2012).

Nos travaux viennent donc conforter les études relevant un lien entre les mécanismes moléculaires sous-tendant le biais de signalisation aux évènements intracellulaires. Un agonisme biaisé ne se traduit pas exclusivement par un biais de signalisation entre les protéines G et les β -Arrestines mais peut aussi se traduire par une sélectivité pour certaines protéines G. Ces observations supportent la découverte récente de ligands biaisés capables d'engager les β -arrestines dans des conformations spécifiques, permettant ainsi la commutation phénotypique de la migration vers la prolifération cellulaire (Zimmerman *et al.*, 2012), des mécanismes cellulaires importants en conditions physiopathologiques.

2. Le récepteur UT, de la famille SO, présente une signature structurelle propre aux récepteurs chimiokines de la famille CHEM

La migration chimiotactique est un évènement cellulaire majeur impliqué dans de nombreux processus physiopathologiques, *i.e.* le développement embryonnaire et cérébrale, les réponses inflammatoires ou encore l'invasion du tissu sain par les cellules tumorales ou les métastases. Un grand nombre de RCPGs ont une capacité à détecter une variété de petits peptides ou de chimiokines pour contrôler la migration chimiotactique. L'un des objectifs actuels est de comprendre comment les RCPGs peuvent détecter des gradients de ligands moléculaires pour coupler les protéines G $\alpha\beta\gamma$ et réguler de façon spatio-temporelle, les évènements conduisant au chimiotactisme. Nous avons abordé, dans la deuxième partie de mon travail de thèse, la question du rôle des récepteurs chimio-attractants sous un aspect évolutif. En effet, en collaboration avec le Dr Marie Chabbert (Université d'Angers, France) et le Dr Isabelle Milazzo (COBRA, Université Rouen Normandie, France), nous avons émis l'hypothèse selon laquelle une délétion ancestrale au sein du DTM2 de la famille des récepteurs du groupe G₀, qui inclut les récepteurs du cluster PEP (Kiss1R) qui comprennent

en majorité une P2.59, conduit vraisemblablement au repositionnement P2.58 dans les récepteurs du groupe G1, formé des clusters SO (UT), CHEM (CXCR4) et PUR. Des analyses détaillées des distorsions hélicoïdales et des structures cristallographiques des RCPGs contenant une P2.58, confirment une structure en coude du DTM2, alors que les positions P2.59, P2.60 ou l'absence de proline entraînent un renflement du DTM2. Nous avons donc cherché à fournir de nouvelles connaissances sur les récepteurs chimiotactiques qui pour la plus part possèdent une P2.58, et une meilleure compréhension de leur mécanisme d'activation. Nous avons alors généré des mutants des récepteurs prototypiques Kiss1R (P2.59), UT (P2.58) et CXCR4 (P2.58) pour lesquels nous avons soit *i*) remplacé la Pro du DTM2 en Ala ou *ii*) repositionné la Pro en 2.58 ou 2.59 par insertion/délétion d'un acide aminé en amont. L'expression des récepteurs mutants et sauvages nous a permis d'étudier l'effet de la structure du DTM2 sur le trafic à la membrane, les capacités de liaison et de couplage des récepteurs ainsi que leur implication dans les processus de migration et d'adhésion cellulaire.

2.1. Signalisation spécifique des récepteurs chimiotactiques UT-P2.58 et CXCR4-P2.58 par rapport au récepteur peptidique Kiss1R-P2.59

Nous avons démontré, dans un modèle de cellules HEK293, que l'activation de l'UT-P2.58 et de CXCR4-P2.58 par leur ligand respectif entraîne bien le couplage aux protéines G et à leurs effecteurs. Pour le système UII/UT-P2.58, nous observons un adressage normal à la membrane, l'activation de la voie $G_q/IP_1/Ca^{2+}$, le couplage aux protéines de type G_{i1} , G_{oA} et potentiellement G_{13} , ainsi que le recrutement de la β -arrestine 2. Nous notons aussi des événements intracellulaires consécutifs à l'activation/recrutement de ces différentes protéines, telles que deux phases d'activation de ERK1/2, et deux phases d'endocytose/translocation du récepteur. Ces résultats sont en accord avec nos études précédentes, *i.e.* un couplage direct du récepteur UT-P2.58 aux protéines G_q , G_{i1} , G_{oA} et G_{13} , le recrutement des β -Arrestines 1 et 2, et l'activation de ERK1/2 en deux phases (Brulé *et al.*, 2014), et des travaux antérieurs qui suggèrent une signalisation indirecte du récepteur UT-P2.58 aux protéines $G_{q/11}$ et $G_{i/o}$ (Tzanidis *et al.*, 2003; Jarry *et al.*, 2010), la PKC, les MAPK p38 et ERK1/2 et la voie Rho/ROCK (Rossowski *et al.*, 2002; Grieco *et al.*, 2011; Lecointre *et al.*, 2015). En ce qui concerne le système SDF-1 α /CXCR4, bien qu'aucune activation de la voie $G_q/IP_1/Ca^{2+}$ ne soit observée, on peut constater l'activation des mêmes voies de signalisation que celles du récepteur UT-P2.58, concernant le couplage aux protéines G_{i1} et G_{oA} , le recrutement de la β -Arrestine 2 et un contrôle cyclique de l'expression membranaire du récepteur. De ces

observations nous pouvons émettre l'hypothèse de voies de couplage et d'effets cellulaires conservés entre l'UT-P2.58 et CXCR4-P2.58, dans un modèle de cellules HEK293 recombinantes. Certaines études ont déjà montré que les effets de CXCR4 peuvent être relayés par $G\alpha_i$, $G\beta\gamma$, la β -Arrestine 2 (Busillo et Benovic, 2007) ou encore les GRK, qui en phosphorylant des résidus spécifiques de la queue C-terminale de CXCR4, provoquent le recrutement des β -Arrestines (Busillo *et al.*, 2010), conduisant au découplage des protéines G et à l'internalisation et/ou au recyclage du récepteur (Pozzobon *et al.*, 2016). Cependant, nos études portant sur la signalisation de CXCR4-P2.58 soulignent des propriétés distinctes de celles du récepteur UT-P2.58, notamment la perte d'activation de la voie $G_q/IP_1/Ca^{2+}$. Ce dernier point de notre étude est en contradiction avec des observations montrant que le complexe $G\beta\gamma$ peut stimuler la PLC- β , l'hydrolyse des PIP2 en IP3, conduisant indirectement à la possible mobilisation calcique (Mellado *et al.*, 2001; Rubin, 2009). Cependant, il reste beaucoup à découvrir quant à la contribution des hétérotrimères $G\alpha\beta\gamma$ dans les réponses au SDF-1 α spécifiques aux modèles cellulaires étudiés. Dans cette étude, nous n'avons pas détecté de couplage G_q ou de mobilisation calcique, ce que nous pouvons expliquer par deux hypothèses *i.e.* *i*) un processus d'activation séquentiel des protéines G_q et G_i , comme il a été montré pour le récepteur β_2 -AD pour lequel un premier couplage à G_s et l'activation subséquente de la voie AMPc/PKA conduit à la phosphorylation du récepteur et à *switch* de couplage favorable à G_i (Daaka *et al.*, 1997), et/ou *ii*) une hétérodimérisation de CXCR4 avec des récepteurs bloquant son couplage à G_q et la mobilisation calcique, comme il a été démontré pour les hétérodimères CXCR4/CXCR7 (Levoye *et al.*, 2009) et CXCR4/CCR5 (Contento *et al.*, 2008). Ainsi, même si le couplage de CXCR4 aux protéines $G_{i/o}$ et à la β -Arrestine 2 est compatible avec les mécanismes bien étayés dans la littérature (Pozzobon *et al.*, 2016), nous avons choisi le système UII/UT comme prototype des voies de signalisation relayées par les récepteurs P2.58 dans les mécanismes de chimiotactisme.

Nous avons fait aussi l'option de travailler sur le récepteur Kiss1R-P2.59 pour la comparaison avec UT et CXCR4. Notre travail démontre clairement que le récepteur Kiss1R-P2.59 couple la protéine G_q , stimule le métabolisme PIPs, permet une mobilisation calcique ainsi que l'activation de ERK1/2, mais ne provoque pas le recrutement de G_{i1} , G_{oA} ou encore de la β -Arrestine 2. Ces observations, pour majeure partie, corroborent ce qui a été déjà décrit dans la littérature, *i.e.* l'activation de la voie $G_q/PLC/Ca^{2+}/PKC$ et de la MAPK ERK1/2 (Cvetković *et al.*, 2013; Castano *et al.*, 2009). Ici, notre difficulté à mettre en évidence un recrutement de la β -Arrestine 2 et la liaison du KP-10 au récepteur Kiss1R-P2.59 par notre stratégie de HTRF peut éventuellement s'expliquer par une association constitutive du

récepteur à la GRK2 et aux β -Arrestines 1 et 2 conduisant ainsi à un *turn-over* constitutif de Kiss1R-P2.59 (Pampillo *et al.*, 2009). De plus, des études récentes ont proposé que suite à son internalisation, ce dernier soit rapidement recyclé à la membrane, alors qu'une faible proportion de ce récepteur s'engage dans la voie de la dégradation (Bianco *et al.*, 2011). Ainsi, le récepteur Kiss1R-P2.59 pourrait être recyclé de manière dynamique en fournissant une quantité constante de liaison et de signalisation sous l'activation par le KP-10. Collectivement, nos données établissent aussi bien des similitudes que des différences quant aux voies de signalisation engagées par les récepteurs P2.58 et P2.59, et renforcent le nœud majeur que représente la signalisation par $G_{i/o}$ et les β -Arrestines des récepteurs P2.58, en l'absence ici de données sur le recrutement des protéines G_{12} et G_{13} . En revanche, la question sur le rôle comparatif de ces différents récepteurs sur la migration cellulaire et le chimiotactisme reste non élucidée.

2.2. Caractéristiques communes des récepteurs chimiotactiques UT-P2.58 et CXCR4-P2.58 permettant de favoriser la migration directionnelle

Les RCPG chimiotactiques, tels que les récepteurs CXCR4, formyl-Met-Leu-Phe (fMLP), C5a, AT-1 ou encore leucotriène B₄, induisent une migration cellulaire directionnelle et forment une catégorie de récepteurs tous couplés à G_i . Dans cette étude, nous avons confirmé le rôle pléiotrope de l'UT-P2.58 que nous avons montré associé à la migration, l'adhésion et la survie cellulaires (Brulé *et al.*, 2014; Grieco *et al.*, 2011). En particulier, une étude à laquelle j'ai participé menée au sein de l'équipe, a mis en évidence qu'un gradient de concentration d'UII induit la migration chimiotactique de cellules issues de gliomes humain *via* l'activation de la voie G_{13} /Rho/ROCK d'une part, et de la voie $G_{i/o}$ /PI3K d'autre part (Lecointre *et al.*, 2015). Ces données correspondent aux multiples couplages décrits pour le récepteur chimiotactique professionnel CXCR4, avec notamment l'activation des voies G_{13} /ROCK et $G_{i/o}$ /PI3K (Rubin, 2009; Tan *et al.*, 2006). En revanche, le rôle de Kiss1R-P2.59 est presque systématiquement décrit comme suppresseur de métastases dans le mélanome, le cancer du sein ou encore dans le carcinome ovarien (Lee *et al.*, 1996; Lee et Welch, 1997; Jiang *et al.*, 2005). Plus précisément, l'activation de Kiss1R-P2.59 par les KPs conduit à une inhibition de la migration et de l'invasion cellulaire (Navenot *et al.*, 2009b; Li *et al.*, 2012). Dans notre étude, nous avons ainsi testé la capacité des ligands des récepteurs UT-P2.58, CXCR4-P2.58 et Kiss1R-P2.59 à induire la migration chimiotactique ou la motilité cellulaire.

Les expériences menées en chambres de Boyden modifiées montrent clairement que l'UII et le SDF-1 α stimulent la migration chimiotactique, tandis que le KP-10 relaye

vraisemblablement la motilité, même administré en concentration homogène. Nous montrons pour la première fois la différence entre les récepteurs P2.58, qui semblent sensibles à une faible concentration de ligand et capables de réguler la migration chimiotactique de cellules polarisées *via* des mécanismes d'adhésion à la matrice, et les récepteurs P2.59, qui engendrent la motilité cellulaire même en concentration homogène de ligand.

Cet aspect clé pourrait constituer un début de réponse au questionnement vis-à-vis de la capacité des récepteurs, généralement présents de manière homogène à la surface des cellules, à générer la polarisation d'une cellule et son déplacement dans une direction précise. Cela implique que les molécules engagées dans la réorganisation du cytosquelette doivent être temporairement régulées et spatialement contrôlées. Parmi ces protéines, celles qui constituent les adhésions naissantes et les points focaux d'adhésion matures ont récemment été décrites comme jouant un rôle majeur dans la régulation de la migration chimiotactique (Case *et al.*, 2015). Comme attendu, nous avons observé une augmentation du nombre de cellules exprimant les récepteurs UT-P2.58 ou CXCR4-P2.58 en adhésion à une matrice de fibronectine, suite au traitement. Dans le cas de l'UT-P2.58, l'application d'UUI conduit à la phosphorylation de la paxilline, à l'augmentation du nombre de points focaux d'adhésion (FA), à l'activation de la β -intégrine 1 et à une tendance à stimuler la FAK. Au contraire, bien que la stimulation du récepteur Kiss1R-P2.59 induise également une augmentation du nombre de FA, les cellules présentent une adhérence après stimulation par le KP-10 mais aucun facteur impliqué dans la maturation des FA ne semble activé, suggérant ainsi que les FA formés ne permettent que la motilité aléatoire.

Les expériences préliminaires suggèrent que la migration directionnelle relayée par le récepteur UT-P2.58 requière un couplage, direct ou non, à la protéine G_{13} , et non G_q , tandis que la motilité contrôlée par le récepteur Kiss1R-P2.59 semble totalement dépendante de G_q . Cette dernière observation est confortée par des résultats plus anciens qui montraient que les récepteurs P2.58 PAR-2 et AT_1 , présentant un couplage à la protéine G_q , ont la capacité d'induire la migration chimiotactique par un couplage indépendant de G_q (DeFea, 2007). En effet, le chimiotactisme relayé par ces deux récepteurs s'est avéré être dépendant des β -Arrestines (Hunton *et al.*, 2005, Ge *et al.*, 2004). Dans la présente étude, la capacité de l'UT-P2.58 et de CXCR4-P2.58 à recruter la β -Arrestine 2 a été démontrée. De plus, nous avons mis en évidence le caractère cyclique des mécanismes d'endocytose et recyclage de ces récepteurs, avec une disparition rapide des récepteurs à la surface cellulaire, suivie par un retour transitoire à la membrane plasmique et d'une nouvelle phase d'endocytose, sous activation continue par le ligand à faible concentration. Ce constat peut être mis en relation

avec des études montrant que la désensibilisation et le recyclage des récepteurs chimiotactiques sont essentiels au maintien de la polarisation cellulaire, et que dans ce mécanisme, les β -Arrestines peuvent servir de plateformes pour des protéines impliquées dans la réorganisation du cytosquelette (Caterina *et al.*, 1995; Xiao *et al.*, 1997). Dans notre étude, quelques minutes après l'activation de l'UT-P2.58, une diminution de la quantité de récepteurs détectés à la membrane plasmique ainsi qu'une diminution du nombre de points d'adhésion mais une augmentation de leur taille, sont observés. Un traitement de 15 min entraîne un recyclage des récepteurs à la membrane et un nombre accru des FA ainsi que d'une proportion plus importante d'adhésions naissantes.

Bien que ces résultats méritent d'être confirmés, nous pensons que la deuxième phase d'activation de ERK1/2, précédemment observée (Brulé *et al.*, 2014) et confirmée ici, peut être liée au cycle d'adhésion/dé-adhésion permettant la migration chimiotactique. En accord avec cette hypothèse, il a été montré que la migration cellulaire était coordonnée par une succession d'étapes d'adhésion et de détachement, et qu'un équilibre entre ces deux phases était nécessaire à un mouvement cellulaire optimal (Hautaniemi *et al.*, 2005). Ainsi, le récepteur Kiss1R-P2.59 est capable d'augmenter le nombre de FA, sans pour autant présenter de cycle d'expression à la membrane, et sans régulation cyclique de la taille des FA et de l'activation de ERK1/2. L'absence de régulation spatio-temporelle permettrait au récepteur Kiss1R de promouvoir la motilité et non la migration chimiotactique. De plus, les cellules exprimant le récepteur Kiss1R-P2.59 et traitées au KP-10, présentent majoritairement plus d'un lamellipode, suggérant une plus grande aptitude à migrer de manière aléatoire.

Si l'on compare l'ensemble des données sur les récepteurs P2.58 et P2.59, il ressort qu'un dynamisme impliquant *i*) la désensibilisation/re-sensibilisation des récepteurs, *ii*) l'augmentation de la taille des FA et la formation d'adhésions naissantes, et *iii*) la sélection du nombre de lamellipodes, sont fortement liés à la définition du chimiotactisme. En accord avec ce concept, des études récentes indiquent que *i*) la β -Arrestine 2 facilite, potentiellement par le biais d'un complexe $G\beta\gamma$, le recyclage du récepteur δ -opioïde après liaison d'un agoniste faiblement internalisant (Audet *et al.*, 2012; Pradhan *et al.*, 2016), *ii*) le cycle des FAs au front de migration des cellules implique l'inhibition de processus autophagiques bloquant la dégradation probable des protéines impliquées dans les FA (Kenific *et al.*, 2016, Coly *et al.* 2016) et *iii*) la phosphorylation de la m-calpaïne par ERK1/2, favorise sa liaison au PIP_2 et ainsi sa localisation l'arrière de la cellule en migration, ce qui joue un rôle central dans la dégradation des FAs et la migration directionnelle (Leloup *et al.*, 2010; Shao *et al.*, 2006).

Ainsi, nous proposons que l'activation d'un RCPG P2.58 par un agoniste faiblement désensibilisant conduit à l'activation des protéines G_i et potentiellement G_{13} , menant ainsi à une diminution de l'activité de la voie AMPc/PKA, à la resensibilisation du récepteur/ β -Arrestin 2 à la membrane et à une phosphorylation de ERK1/2 et à la dégradation des FAs.

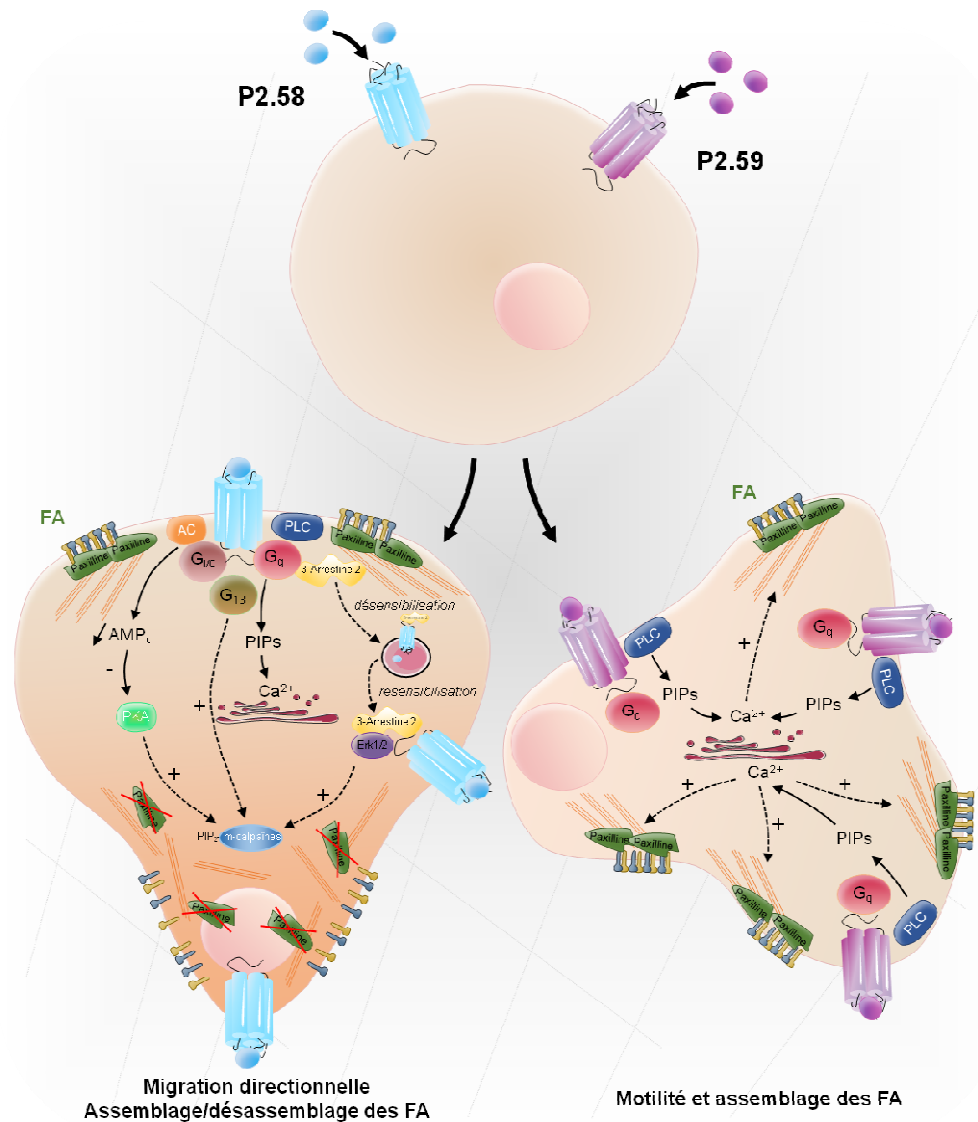


Figure 28. Schéma hypothétique récapitulant les profils de signalisation et les aspects dynamiques de la migration chimiotactique relayée par les RCPG P2.58. *Haut*, détection cellulaire d'un gradient et/ou d'une concentration homogène de ligand par les RCPGs de type P2.58 (UT) et P2.59 (Kiss1R) et activation des voies de signalisation qui permettraient la migration aléatoire ou motilité (droite) ou la migration directionnelle chimiotactique (gauche). *Bas*, gauche, le récepteur P2.58 peut lier avec une haute affinité l'agoniste en concentration non désensibilisante, coupler les voies G_i /AC/AMPc/PKA pour entraîner une inhibition de l'activité de la PKA, la voie G_{13} , et G_q /PIP₂/Ca²⁺ ainsi que hypothétiquement la β -arrestin 2. Cette première phase pourrait conduire à l'activation de la formation des FAs. La phase de désensibilisation et resensibilisation (retour à la membrane) suivie de l'activation de ERK1/2, et de la m-calpaïne (associée à PIP2) à l'arrière de la cellule, seraient reponsable de la dégration localisée des FAs, et de la sélection d'un seul lamellipode pour la migration directionnelle. *Droite*, le récepteur P2.59 peut lier l'agoniste en concentration non désensibilisante, coupler les voies G_q /PLC/PIP₂/Ca²⁺ pour entraîner l'activation de la formation des FAs, en favorisant potentiellement la dynamique constitutive des adhésions cellulaires. L'absence de phase de resensibilisation à la membrane plasmique et de seconde phase d'activation de ERK1/2, ne permettrait pas un contrôle efficace de la dégration localisée des FA, maintenant plusieurs lamellipodes par cellule, ce qui conduit à la motilité cellulaire.

Une faible liaison des β -arrestines pourrait ainsi mener à un recyclage du récepteur à la membrane plutôt qu'à une dégradation, et à une deuxième phase d'activation de ERK1/2. L'inhibition de l'activité de la PKA, concomitante à la phosphorylation de ERK1/2 à la membrane conduirait à l'activation de la m-calpaïne à l'arrière de la cellule, pour favoriser le désassemblage des points focaux d'adhésion et la polarisation cellulaire (Figure 28). Bien entendu, d'autres mécanismes, tels que l'activité de FAK, seraient à prendre en considération (Webb *et al.*, 2004). La motilité aléatoire stimulée par Kiss1R-P2.59, qui peut-être reliée aux changements morphologiques décrits dans la littérature (Navenot *et al.*, 2009b), dépend de la voie de signalisation initiée par G_q et favorise l'adhésion et la migration (Figure 28). Nous proposons que la contraction et la migration cellulaire dépendrait, dans ce cas, de l'activation de la voie RhoA/Rac (Chikumi *et al.*, 2002; Katoh *et al.*, 1998; Vogt *et al.*, 2003). En favorisant l'activité de Rac ainsi que certains effecteurs en aval, tels que WAVE (*WASP-family verprolin-homologous protein*), les récepteurs P2.59 tels que Kiss1R-P2.59 pourraient « pousser » ces phénomènes dynamiques.

2.3. Impact de la mutation ou du repositionnement de la proline du DTM2 dans l'activation des récepteurs P2.58 et P2.59

Sur la base de ce schéma, il nous est apparu important de comprendre les différences subtiles entre la détection d'un gradient relatif à une migration directionnelle (chimiotactisme) et l'accélération des mouvements d'une manière aléatoire (motilité). Ainsi, notre but était de comprendre comment un récepteur P2.58 est capable de détecter une variation de concentration de ligands et/ou suivre un cycle de sensibilisation/désensibilisation, tous deux indispensables à la migration chimiotactique. Pour cela, nous avons généré des mutants pour lesquels la Pro du DTM2 a été remplacée par une Ala ou repositionnée en P2.59 (UT et CXCR4) ou en P2.58 (Kiss1R). L'ensemble des mutants générés semble correctement acheminé à la membrane plasmique, ce qui nous a permis d'effectuer des expériences de liaison et de fonctionnalité. Ces premiers éléments suggèrent que la proline du DTM2 des récepteurs PEP, SO et CHEM ne joue pas un rôle majeur dans l'adressage à la membrane plasmique. Il est intéressant de noter que le repositionnement de la proline en P2.59 pour des récepteur P2.58 a un effet sur les voies de signalisation du récepteur tout en maintenant une liaison du ligand. En accord avec ces données, il a été montré que la mutation de la proline du motif TxP en alanine diminue l'affinité du ligand pour le récepteur CCR5 et abolit sa signalisation (Arias *et al.*, 2003), alors que la même mutation sur le récepteur AT_1 n'affecte pas la liaison du ligand mais diminue significativement sa signalisation (Reis *et al.*, 2007).

Ces résultats sont assez proches des observons sur nos mutants Δ UT-P2.58A/P2.59 et Δ CXCR4-P2.58A/P2.59, qui perdent totalement les couplages aux protéines G_{i1} et G_{oA} et vraisemblablement à la protéine G_q , bien que l'on puisse toujours observer, pour les mutants du récepteur UT, une production d' IP_1 et une motilité dépendante de G_q . La mutation ou le repositionnement de la proline effectué pour obtenir les mutants Δ Kiss1R-P2.59A et Δ Kiss1R-P2.58 conduit à une diminution drastique du couplage à la protéine G_q impliqué dans la motilité cellulaire, alors qu'une légère accumulation d' IP_1 est toujours observée. L'ensemble de ces résultats nous permet de dire que la proline en position P2.58 et P2.59 intervient dans l'activation des récepteurs et leur signalisation. De plus, la proline en position 2.58 semble déterminante pour un couplage aux protéines $G_{i/o}$ alors que la 2.59 semble spécifique au recrutement de G_q . Nous avons également déterminé pour la première fois que le recrutement des β -Arrestines est inhibé pour les récepteurs mutants Δ P2.59, qui se comportent ainsi de la même manière que le récepteur Kiss1R-P2.59 sauvage. Ce dernier point reste à préciser, car il a été démontré que certains récepteurs P2.59 du groupe G0, comme le récepteur β_2 -AD, peuvent recruter les β -Arrestines (Ren *et al.*, 2005).

Les aspects évolutifs entre le récepteur Kiss1R comme prototype des récepteurs P2.59 (PEP) et de l'UT (SO) ou du CXCR4 (CHEM) comme prototype des récepteurs P2.58, confèrent au récepteur UT une position centrale, puisqu'il semble avoir conservé le couplage G_q des récepteurs ancestraux tel que le récepteur Kiss1R, et acquis le couplage aux protéines $G_{i/o}$ et probablement G_{13} , spécifiques du chimiotactisme. C'est ainsi, probablement, la raison pour laquelle le récepteur mutant Δ UT-P2.59 reproduit au moins en partie le comportement de Kiss1R-P2.59. Ces propriétés communes entre Δ UT-P2.59 et Kiss1R-P2.59 reposent sur une motilité cellulaire relayée par un couplage G_q , la perte d'adhérence à une matrice et le recyclage cyclique du récepteur à la membrane plasmique, deux éléments cruciaux pour le désassemblage des points d'adhésion et la sélection des lamellipodes. À l'inverse, nous obtenons des résultats moins probants avec le mutant Δ Kiss1R-P2.58 qui ne semble pas avoir acquis de couplage aux protéines $G_{i/o}$ et avoir perdu le couplage G_q (bien qu'une accumulation d' IP_1 reste observable). Néanmoins, ce récepteur montre une tendance à réguler les propriétés d'adhésion des cellules et à produire un nombre réduit de lamellipodes, ce que l'on pourrait relier à l'activation de ERK1/2 dépendante des protéines G. Cette hypothèse est étayée par une étude qui montre l'éventuelle implication d'un découplage des récepteurs dans la formation/sélection des lamellipodes (Liu *et al.*, 2012a). À ce stade, nous pensons qu'il est crucial de d'étudier la cinétique d'un potentiel couplage à la β -Arrestine 2 au cours de l'activation du récepteur Δ Kiss1R-P2.58, car des études ont montré que des leucocytes

n'exprimant pas la β -Arrestine 2 perdent leur capacité chimiotactique relayée par l'activation des récepteurs AT₁ et PAR2 (Ge *et al.*, 2004; Hunton *et al.*, 2005).

En résumé, nous pouvons proposer, de manière simplifiée et hypothétique, que le positionnement de la proline en P2.58 dans les récepteurs de classe Rhodopsine permet *i*) un couplage privilégié à la β -Arrestine 2 et *ii*) la possibilité d'un recyclage à la membrane, entraînant ainsi la re-sensibilisation des récepteurs. Ces complexes pourraient séquestrer ERK1/2 à la membrane plasmique avec d'autres effecteurs (DeFea, 2007), ce qui semble déterminant dans les processus d'adhésion/dé-adhésion et de chimiotactisme. Quant à elle, l'acquisition d'un couplage aux protéines G_{i/o} semble plus complexe et nécessite probablement des mutations corrélées par exemple au sein d'autres DTM.

2.4. Changements conformationnels menant à l'acquisition de la re-sensibilisation des récepteurs P2.58 et l'interaction à la β -Arrestine 2?

En l'absence de toute modélisation moléculaire des récepteurs mutants Δ Kiss1R-P2.58, Δ UT-P2.59 et Δ CXCR4-P2.59, nous ne pouvons qu'émettre des hypothèses quant aux effets du repositionnement de la proline du DTM2 sur la structure des récepteurs des groupes G₀ et G₁. Les études de modélisation et de cristallographie portant sur les RCPG ont permis de mettre en évidence que les profils atypiques de la proline dans le DTM2 (P2.59, P2.59 ou P2.60), ou même l'absence de proline, conduisent à une distorsion de l'hélice α caractérisée soit par un renflement (P2.59) soit par un coude (P2.58) (Cherezov *et al.*, 2007; Fenalti *et al.*, 2014; Rasmussen *et al.*, 2007; Warne *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2010). Les distorsions hélicoïdales jouent un rôle majeur dans la conformation globale des RCPG. En fait, la plupart des RCPGs possède un renflement α dans les DTM2 et DTM5 (Cartailler et Luecke, 2004; Rey *et al.*, 2010), qui semble cependant également présent dans d'autres DTM (van der Kant et Vriend, 2014). Ces distorsions sont supposées être des caractéristiques importantes des RCPGs, et par conséquent, l'absence de ce type de renflement pourrait être directement liée à un processus particulier d'activation. Dans notre étude, la modélisation de la position de la proline au sein du DTM2 a confirmé une structure renflée pour le récepteur Kiss1R-P2.59 sauvage et les mutants Δ UT-P2.59 et Δ CXCR4-P2.59, et une structure en coude pour les récepteurs sauvages UT-P2.58 et CXCR4-P2.58 et le récepteur mutant Δ Kiss1R-P2.58, suggérant qu'une perte d'un couplage spécifique à la β -Arrestine 2 (mais aussi aux protéines G_{i/o}) pourrait être attribuée à une structure en coude du DTM2.

En fin de compte, les propriétés de liaison des ligands aux récepteurs P2.58 pourraient relayer les événements de signalisation et les effets cellulaires spécifiques, ce qui se rapproche

d'un comportement biaisé. L'analyse des structures cristallographiques des RCPGs dans des états actifs ou inactifs propose des mécanismes d'activation communs aux RCPGs de la classe Rhodopsine, et met l'accent sur le coeur hydrophobe des RCPGs (Tehan et al., 2014) ou encore sur le rôle pivot du DTM3 (Dalton et al., 2015). Cependant, il a été démontré que l'activation des protéines G ou des β -Arrestines résulte de différents changements de conformation des récepteurs qui semblent conservés pour les récepteurs P2.59 et P2.58. Il est proposé que le couplage aux protéines G induit en effet un changement conformationnel aux niveaux des chaînes latérales d'acides aminés impliquées dans des liaisons inter-DTM, conduisant au redressement du DTM3, à la cassure du DTM6 et à l'ouverture de la poche cytoplasmique de liaison aux protéines G (Tautermann, 2014). La liaison aux β -Arrestines implique quant à elle les DTM1, 2 et 7 reliés entre eux par un réseau de molécules d'eau et l'ion Na^+ . La comparaison de structures cristallographiques du récepteur muscarinique M2 (groupe G0) et du récepteur δ -opioïdérique (cluster SO, groupe G1) montre qu'un réseau de molécules d'eau formé entre le motif NPxxY du DTM7, le motif WxP du DTM6 et le résidu N2.50 du DTM2, est très conservé (Gutiérrez-de-Terán *et al.*, 2013). Il a été montré pour le récepteur $\text{A}_{2\text{A}}$ -AD (groupe G0) que le Na^+ pouvait agir comme un modulateur allostérique négatif (Göblyös et Ijzerman, 2011; Magnani *et al.*, 2008; Parker *et al.*, 2008). Ainsi, les mécanismes qui différencient les récepteurs P2.58 des récepteurs P2.59 dans leur éventuelle propension à présenter un couplage particulier aux β -Arrestines pourrait résulter dans des variations subtiles des liaisons hydrogènes engageant le Na^+ , notamment entre les résidus N2.50 (DTM2) et S3.39 (DTM3). Dans le récepteur δ -opioïdérique, le Na^+ est en interaction avec le résidu N3.35 dont la mutation induit une activité constitutive du récepteur vers la β -Arrestine 2 (Fenalti *et al.*, 2014). Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que le résidu polaire en position 3.35, conservé au sein des récepteurs P2.58 opioïdérique, PAR1, CXCR4 mais aussi urotensinergique, constitue un caractère spécifique permettant une grande sensibilité à la liaison du ligand et au couplage des β -Arrestines responsables d'évènement intracellulaires spécifiques.

En conclusion, notre travail a permis générer des pistes de réflexion quant au rôle spécifique de mutations évolutives telle qu'une délétion dans le DTM2 de RCPGs de la classe Rhodopsine, en étudiant les récepteurs P2.58 (UT ou CXCR4) et un récepteur peptidique Kiss1R ancestral. Nous proposons que la structure en coude du DTM2 des RCPGs de la famille SO, CHEM et potentiellement PUR présentant une P2.58, favorise l'acquisition de compétences spécifiques résidant dans une sensibilité élevée au ligand et au couplage β -

Arrestine 2, responsables de la régulation spatio-temporelle des FAs, permettant la migration cellulaire chimiotactique.

Perspectives

1. Du biais de signalisation du récepteur UT...

Dans la première partie de cette étude, nous avons démontré le caractère pléiotrope du système urotensinergique dans un modèle de cellules HEK293 recombinantes pour le récepteur UT humain. Nous avons également détaillé les profils de signalisation des ligands endogènes de l'UT (UII et URP) ainsi que différents analogues peptidiques synthétiques. Nous avons mis en évidence l'existence d'un biais de signalisation de certains de ces ligands vers les protéines G, et même en faveur de certaines protéines G, et souligné la complexité de leur signalisation dans un modèle *in vitro*. Cependant, certaines questions restent maintenant à être abordées :

- ◆ Quels sont précisément les voies de signalisation relayées par l'UII, l'URP et l'UII₄₋₁₁ conduisant à la diminution de la survie/prolifération et impliquées dans l'induction de l'apoptose dans le modèle de cellules HEK293 recombinantes ?
- ◆ Comment peut-on exploiter le biais de signalisation du récepteur UT dans un modèle *in vivo* physiopathologique ?

Il a été montré que certains RCPGs classiquement couplés à G_q, tels que le récepteur de la GnRH ou encore des prostaglandines, entraînent des événements apoptotiques dans de nombreux modèles cellulaires *via* l'activation de c-Jun (JNK), corrélée à l'inhibition de la phosphorylation de AKT et l'activation de la PKC (Ben-Ami *et al.*, 2011). Ainsi, afin d'étayer les voies de signalisation relayées par G_q et conduisant à la mort cellulaire, nous envisageons de rechercher l'effet de l'UII, l'URP, l'UII₄₋₁₁ sur l'activation de la PKC, des voies PI3K/AKT et JNK, par Western blot et potentiellement grâce à l'utilisation de kits basés sur la technologie HTRF disponibles chez Cisbio®, permettant d'appréhender plus finement les aspects cinétiques. Des inhibiteurs pharmacologiques de la PKC (ruboxistaurin) et de JNK (SP600125) permettront d'évaluer leur rôle dans les effets anti-prolifératifs/pro-apoptotiques de l'UII, l'URP et l'UII₄₋₁₁. Nous pourrions dans le même temps rechercher plus finement les voies de signalisation sur l'induction de la deuxième phase d'activation de ERK1/2 observée pour les agonistes endogènes de l'UT et l'UII₄₋₁₁.

Dans notre étude, il apparaît que l'urantide entraîne un biais de signalisation de l'UT complexe et particulièrement intéressant. Il a été montré au sein de l'équipe, que l'urantide, dans un modèle de choc septique chez la souris, permettait la survie de la grande majorité des animaux traités, la régulation de nombreux marqueurs de l'inflammation et un effet anti-apoptotique sur le tissu rénal (en préparation). De plus, Dans un modèle d'hémorragie sous-

arachnoïdienne, l'injection d'urantide dans le liquide céphalo-rachidien, semble prévenir le phénomène de vasospasme cérébral relayé par le récepteur UT (soumis). Enfin, l'injection intratumorale d'urantide, retarde la croissance de cellules gliomales xénotransplantées chez la souris Nude, et conduit à une inhibition de l'angiogenèse intratumorale (soumis). L'ensemble de ces données suggère que l'urantide présente un intérêt thérapeutique majeur et indique qu'il est essentiel de caractériser *in vivo* le rôle des voies de signalisation, et notamment des voies biaisées dans la pathologie. Ainsi, en collaboration avec le Pr Leduc de l'Université de Sherbrook, nous allons élaborer de nouveaux ligands sur la base structurale de l'urantide, avec des modifications de l'extrémité N-terminale et/ou *via* l'introduction de cycle rigide artificiellement créés pour mimer celui présent dans la séquence de l'UII. En jouant sur ces éléments structuraux, et notamment en mutant la position 5 de l'urantide (Orn), nous espérons modifier les capacités de liaison de l'urantide afin d'en augmenter l'affinité et/ou l'efficacité et le temps de liaison au récepteur UT. Dans un premier temps, en collaboration avec le Dr. L. Prézeau, nous comptons évaluer les voies de signalisation de l'UT recrutées par ces différents ligands dans un modèle de cellules HEK293, puis dans des lignées natives telles que des cellules endothéliales ou tumorales humaines, grâce aux techniques de BRET et HTRF précédemment utilisées, ou de inhibiteurs pharmacologiques/siRNA ciblant ces voies de signalisation. Les effets cellulaires de ces ligands seront aussi évalués par des expériences de migration, d'adhésion, de prolifération et de mesure d'apoptose. À terme, nous évaluerons les effets de ces nouveaux peptides synthétiques sur les modèles cellulaires endothéliaux ou tumoraux en conditions pathologiques (hypoxie et/ou inflammation) et enfin, pour certains, dans les modèles pré-cliniques pathologiques *in vivo*. Ainsi, nous espérons découvrir de nouveaux ligands d'intérêt thérapeutique, capables de bloquer la voie de signalisation délétère dans la pathologie, mais de maintenir les voies de signalisation nécessaires au fonctionnement normal du récepteur.

2. ...vers la compréhension du mécanisme d'activation des récepteurs P2.58

La deuxième partie de mon travail de thèse a permis de suggérer que la position spécifique de la proline du DTM2 des récepteurs SO, CHEM et PUR est responsable d'une structure en coude et d'un mécanisme d'activation particulier conduisant au chimiotactisme. Ce travail n'est pas finalisé et un certain nombre d'études restent encore à être menées pour confirmation. Ainsi, les questions suivantes restent posées :

- ◆ Quels sont les voies de signalisation engagées par les récepteurs présentant une proline en position 2.58 ou 2.59 relayant les effets pro-migratoires et pro-adhésifs de Kiss1R, de l'UT et de CXCR4?
- ◆ Comment pourraient-être impliquées les β -Arrestines dans les processus cycliques de désensibilisation/recyclage à la membrane des récepteurs P2.58?
- ◆ Quels sont les rôles du processus autophagique dans la fine régulation des points focaux d'adhésion au cours de la migration chimiotactique?
- ◆ D'un point de vue évolutif, la proline en position 2.58 est-elle reliée à d'autres mutations au sein des DTM des récepteurs UT et CXCR4? Le mimétisme de ces mutations corrélées sur ces récepteurs permettrait-il de mieux démontrer le rôle de la proline dans la fonction chimiotactique des récepteurs?
- ◆ Si tel est le cas, quels seraient les effets de l'expression et de l'activation de ces récepteurs dans un modèle d'étude *in vivo* ?

Nos objectifs seront donc de finaliser notre étude. Il faudrait notamment déterminer la capacité de liaison de l'UII aux récepteurs UT-P2.58, Δ UT-P2.58A et Δ UT-P2.59 à l'aide de récepteurs-Snap-Tag, d'UII fluorescent rouge (UII-red) et de la technique d'HTRF. Nous devons également confirmer la liaison du KP-10 au récepteur Kiss1R-P2.59 à l'aide d'un ligand radioactif [I^{125}]-KP-10, puisqu'aucune liaison du KP-10 fluorescent rouge sur le récepteur Kiss1R-P2.59ST n'a pu être démontrée. Nous envisageons d'effectuer des expériences de compétition entre les ligands froid et chaud (fluorescents ou radioactifs) sur l'ensemble des récepteurs sauvages et mutants à l'aide de différents ligands (UII et URP, KP-10 et KP-54). Une fois les capacités de liaison des ligands aux récepteurs déterminées, nous confirmerons l'implication des voies de signalisation associées à la protéine G_q dans la motilité relayée par les récepteurs Kiss1R-P2.59 et Δ UT-P2.59 à l'aide de l'inhibiteur de G_q UBO-QIC, de siRNA ciblant G_q , d'inhibiteur de Rac et éventuellement d'un siRNA dirigé RhoGEFp63, puisqu'il a été montré que cette dernière est impliquée dans la migration induite par la stimulation du GPR116 relayée par G_q (Tang *et al.*, 2013) et dans la polymérisation des fibres d'actine régulée par RhoA, indispensable à la migration (van Unen *et al.*, 2015). Nous confirmerons ensuite l'implication des voies de signalisation de la protéine $G_{\alpha 13}$ dans la migration chimiotactiques relayée par le récepteur UT-P2.58 grâce à l'utilisation d'un siRNA spécifique ainsi que d'inhibiteurs de Rho (toxine dérivée de la transférase C3) et de ROCK (Y27632), puisque l'ensemble de ces protéines est impliqué dans la migration relayée par UT (Lecointre *et al.*, 2015) et CXCR4 (Tan *et al.*, 2006). Nous espérons ainsi mettre en évidence que la position de la proline en position 2.58 favorise la migration chimiotactique par la voie

G₁₃/Rho/ROCK, tandis que la proline en position 2.59 favorise une motilité cellulaire non directionnelle par une signalisation dépendante de G_q et éventuellement RhoGEFp63. Nous pourrions également évaluer l'impact de l'application de PTX et d'un inhibiteur de la PI3K (LY294002) afin de mettre en évidence la voie G_{i/o}/PI3K dans la migration induite par l'ensemble des récepteurs sauvages et mutants étudiés.

Nous nous attacherons ensuite à déterminer l'implication de l'ensemble de ces voies de transduction dans la formation des FAs par marquages comparatifs de la paxilline, vinculine, taline et α -actinine qui permettront de mesurer la maturation, dans le temps, des FAs, après activation des différents récepteurs grâce à la technique d'immunofluorescence et par l'utilisation de siRNA et inhibiteurs susmentionnés. Il nous semble également indispensable d'approfondir les études de recrutement des β -Arrestines par les récepteurs, et ce d'un point de vue dynamique par des techniques time-lapse d'imagerie confocale (*Spinning disk*). Nous devons aussi étendre nos analyses BRET et d'imagerie à la β -Arrestine 1, qui pourrait jouer un rôle important la désensibilisation/resensibilisation des RCPGs de type P2.58.

Nous nous attacherons également à relier les différentes phases d'activation de ERK1/2 au couplage des protéines G et au recrutement des β -arrestines. Nous espérons ainsi confirmer notre hypothèse selon laquelle *i*) la première phase de phosphorylation de ERK1/2 est dépendante des protéines G et pourrait être stimulée par les récepteurs P2.59 et P2.58 et *ii*) la deuxième phase d'activation de ERK1/2 est dépendante des β -arrestines et donc des récepteurs P2.58, dans notre modèle d'étude. Pour cela, nous pourrions utiliser les siRNA et inhibiteurs mentionnés dans le paragraphe précédant, ainsi que des siRNA ciblant la β -Arrestine 1 et 2, et évaluer l'activation de ERK1/2 relayée par les différents récepteurs P2.58 et P2.59 sauvages et mutants, par la technique classique de Western blot ou encore, de manière plus originale et sensible, par l'utilisation d'un kit reposant sur le FRET proposé par CisBio®.

Afin de démontrer l'implication des β -Arrestines dans la régulation fine et spatio-temporelle des processus de recyclage des récepteurs et de désassemblage des FAs, nous envisageons d'effectuer des expériences d'imagerie sur cellules vivantes par la technique de microscopie de fluorescence par réflexion totale interne (TIRF). Cette technique très résolutive permet en effet de visualiser des évènements se situant à proximité de la membrane plasmique. Grâce à celle-ci, nous pourrions visualiser l'interaction des récepteurs fusionnés à eGFP et des β -Arrestines fusionnées à des protéines fluorescentes rouges (mCherry, pmKate, mTomato), après nous être assuré que l'encombrement stérique que représentent les protéines fluorescentes n'interfère pas dans l'interaction des deux protéines d'intérêt. Nous pourrions

également utiliser cette méthode afin de détecter de manière dynamique la régulation des FAs, grâce à l'utilisation de protéines des complexes d'adhésion fusionnées à des protéines fluorescentes. Cette technique représenterait un atout majeur dans la compréhension des mécanismes dynamiques sous-tendus par la migration chimiotactique.

Les données récentes et originales de notre équipe sur l'implication du processus autophagique dans les mécanismes d'assemblage/désassemblage des FAs (Kenific *et al.*, 2016) et de migration chimiotactique relayés par les RCPGs (Coly *et al.*, 2016), nous permettent d'envisager le rôle des calpaïnes. En particulier, l'effet de l'inhibition de l'expression des calpaïnes sur la stimulation des FAs relayée par les différents récepteurs, ainsi que la dynamique d'assemblage et désassemblage seront évalués. Pour cela, nous pourrions de nouveau utiliser la microscopie TIRF, en utilisant par exemple la paxilline fusionnée à eGFP pour visualiser les points d'adhésion, et une LC3 fusionnée à mCherry pour visualiser des autophagosomes. Etant donné que l'inhibition de l'autophagie permettant éventuellement le maintien des FA à l'avant de la cellule, semble dépendante des couplages $G_{i/o}$ (résultats non publiés de l'équipe, Coly et Morin), nous chercherons un mécanisme spécifique qui lie les récepteurs P2.58, l'autophagie et la régulation spatio-temporelle des points d'adhésion.

Comme évoqué dans l'introduction (*cf.* Chapitre 1§ 2.2.2), les résidus sérine et thréonine en position $i-2/3$ et $i+2/3$ (i étant la position de la proline) sont très importants dans la courbure et la distorsion d'une hélice α induite par une proline (Deupi *et al.*, 2004; Weber *et al.*, 2012), et seraient impliqués dans les mécanismes d'activation de certains récepteurs couplés aux protéines G. On peut notamment citer l'influence du résidu thréonine du motif TxP présent au sein du DTM2 du récepteur CCR5 (Govaerts *et al.*, 2001a). En fait, dans la classe Rhodopsine avec P2.58, 81% des récepteurs présente cette proline dans un motif S/TxP, contre 1% dans un motif PxT. À l'inverse, parmi les récepteurs P2.59, la proline se trouve dans un motif S/TxP dans seulement 18% des cas, contre 26% dans motif PxT/S (Deupi *et al.*, 2004). Si l'on s'intéresse à ces motifs au sein des clusters PEP, SO, CHEM et PUR, 42% des récepteurs du cluster SO qui présentent une proline en position 2.58, ont un motif S/TxP. Ce pourcentage monte à 66% dans le cluster PUR et 80% dans le cluster CHEM. À l'inverse, ce pourcentage est de seulement 5% pour les récepteurs du cluster PEP présentant une proline en position 2.59. Dans les récepteurs PEP, cette proline est incluse dans un motif PxT dans 30% des cas (alignement des séquences peptidiques du DTM2 de chacun des récepteurs des clusters PEP, SO, CHEM et PUR grâce à la base de donnée *G protein coupled receptors data base*). Dans notre étude, nous avons volontairement conservé les motifs S/TxP et PxT

présents dans le DTM2 des récepteurs étudiés (*i.e.* SxP pour UT, TxP pour CXCR4 et PxT pour Kiss1R) afin de nous concentrer spécifiquement sur le rôle de la position de la proline au sein du DTM2 dans les processus de migration chimiotactique. Ainsi, nous envisageons de générer les mutants Δ Kiss1R-T2.56P2.58, Δ UT-P2.59T2.61 et Δ CXCR4-P2.59T2.61 et d'évaluer leur capacité à recruter de nouvelles voies de couplage et à relayer potentiellement une motilité et/ou migration chimiotactique.

Dans le même ordre, l'évolution du cluster SO par rapport au cluster PEP a impliqué, en plus de la délétion ancestrale d'un codon dans le DTM2, d'autres mutations corrélées, telle que la mutation au niveau du résidu 3.37. Chez les chordés et les vertébrés, un résidu tyrosine est effectivement très conservé à cette position au sein des récepteurs des clusters SO, CHEM et PUR (Pelé *et al.*, 2011). Cependant, il s'avère que le récepteur UT, contrairement au CXCR4, possède une histidine (H, résidu basique) et non une tyrosine (Y, résidu polaire) en position 3.37. Il a également été montré que le résidu polaire 3.35 du récepteur β_2 -AD est impliqué dans un réseau d'interaction inter-DTM impliquant le Na^+ , et conservé dans de nombreux récepteurs (il s'agit d'une thréonine pour le récepteur UT et d'une asparagine pour le récepteur CXCR4). Nous pourrions, conjointement au repositionnement de la proline du DTM2 chez nos mutants, générer la mutation des résidus polaires 3.37 et/ou 3.35 en résidus apolaires (leucine, valine ou alanine) et vérifier les capacités de liaison, de couplage et de migration/adhésion. Nous pourrions ainsi vérifier des rapprochements en terme de couplage du récepteur UT, vers les couplages du récepteur CXCR4, *e.g.* la perte sélective du couplage Gq.

À l'issue de ces études, et si nous trouvons des mutations qui induisent des changements sélectifs dans les voies de signalisation et les effets cellulaires des différents récepteurs, nous souhaiterions évaluer l'effet de l'expression et de l'activation de ces derniers dans un modèle de cellules murines pré-tumorales NIH3T3, que nous pourrions xénotransplanter chez la souris Nude. En utilisant des récepteurs fusionnés à l'eGFP, il serait possible d'étudier les caractères pro-invasifs et/ou pro-métastatiques de chacun des récepteurs.

Références bibliographiques

-A-

- Adebiyi, A. (2014) RGS2 regulates urotensin II-induced intracellular Ca²⁺ elevation and contraction in glomerular mesangial cells. *J Cell Physiol* 229,502–511.
- Ahlquist, R.P. (1948). A study of the adrenotropic receptors. *Am. J. Physiol.* 153, 586–600.
- Aiuti, A., Webb, I.J., Bleul, C., Springer, T., and Gutierrez-Ramos, J.C. (1997). The Chemokine SDF-1 Is a Chemoattractant for Human CD34+ Hematopoietic Progenitor Cells and Provides a New Mechanism to Explain the Mobilization of CD34+ Progenitors to Peripheral Blood. *J. Exp. Med.* 185, 111.
- Albertin, G., Casale, V., Ziolkowska A., Spinazzi, R., Malendowicz, LK., Rossi, GP., Nussdorfer, GG. (2006) Urotensin-II and UII-receptor expression and function in the rat adrenal cortex. *International journal of molecular medicine* 17,1111–1115.
- Ames, R.S., Sarau, H.M., Chambers, J.K., Willette, R.N., Aiyar, N.V., Romanic, A.M., Loudon, C.S., Foley, J.J., Sauermech, C.F., Coatney, R.W., et al. (1999). Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. *Nature* 401, 282–286.
- Andersson, H., D'Antona, A.M., Kendall, D.A., Von Heijne, G., and Chin, C.-N. (2003). Membrane assembly of the cannabinoid receptor 1: impact of a long N-terminal tail. *Mol. Pharmacol.* 64, 570–577.
- Andreev, J., Galisteo, M.L., Kranenburg, O., Logan, S.K., Chiu, E.S., Okigaki, M., Cary, L.A., Moolenaar, W.H., and Schlessinger, J. (2001). Src and Pyk2 mediate G-protein-coupled receptor activation of epidermal growth factor receptor (EGFR) but are not required for coupling to the mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling cascade. *J. Biol. Chem.* 276, 20130–20135.
- Arai, H., Nakao, K., Takaya, K., Hosoda, K., Ogawa, Y., Nakanishi, S., and Imura, H. (1993). The human endothelin-B receptor gene. Structural organization and chromosomal assignment. *J. Biol. Chem.* 268, 3463–3470.
- Arias, D.A., Navenot, J.-M., Zhang, W., Broach, J., and Peiper, S.C. (2003). Constitutive Activation of CCR5 and CCR2 Induced by Conformational Changes in the Conserved TXP Motif in Transmembrane Helix 2. *J. Biol. Chem.* 278, 36513–36521.
- Artemenko, Y., Lampert, T.J., and Devreotes, P.N. (2014). Moving towards a paradigm: common mechanisms of chemotactic signaling in Dictyostelium and mammalian leukocytes. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 71, 3711–3747.
- Attwood, T.K., and Findlay, J.B.C. (1994). Fingerprinting G-protein-coupled receptors. *Protein Eng.* 7, 195–203.

Audet, N., Charfi, I., Mnie-Filali, O., Amraei, M., Chabot-Doré, A.-J., Millicamps, M., Stone, L.S., and Pineyro, G. (2012). Differential association of receptor-G $\beta\gamma$ complexes with β -arrestin2 determines recycling bias and potential for tolerance of δ opioid receptor agonists. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 4827–4840.

Azzi, M., Charest, P.G., Angers, S., Rousseau, G., Kohout, T., Bouvier, M., and Piñeyro, G. (2003). β -Arrestin-mediated activation of MAPK by inverse agonists reveals distinct active conformations for G protein-coupled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 11406–11411.

-B-

Balat, A., Karakok M, Yilmaz K, Kibar Y (2007) Urotensin-II immunoreactivity in children with chronic glomerulonephritis. *Renal failure* 29:573–578.

Balkwill, F. (2004). Cancer and the chemokine network. *Nat. Rev. Cancer* 4, 540–550.

Ballesteros, J.A., and Weinstein, H. (1995). Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors. In *Methods in Neurosciences*, S.C. Sealfon, ed. (Academic Press), pp. 366–428.

Ballesteros, J., Kitanovic, S., Guarnieri, F., Davies, P., Fromme, B.J., Konvicka, K., Chi, L., Millar, R.P., Davidson, J.S., Weinstein, H., et al. (1998). Functional microdomains in G-protein-coupled receptors. The conserved arginine-cage motif in the gonadotropin-releasing hormone receptor. *J. Biol. Chem.* 273, 10445–10453.

Ballesteros, J.A., Shi, L., and Javitch, J.A. (2001). Structural Mimicry in G Protein-Coupled Receptors: Implications of the High-Resolution Structure of Rhodopsin for Structure-Function Analysis of Rhodopsin-Like Receptors. *Mol. Pharmacol.* 60, 1–19.

Ban, Y., Watanabe, T., Suguro, T., Matsuyama, T.A., Iso, Y., Sakai, T., Sato, R., Idei, T., Nakano, Y., Ota, H., Miyazaki, A., Kato, N., Hirano, T., Ban, Y., Kobayashi, Y. (2009) Increased plasma urotensin-II and carotid atherosclerosis are associated with vascular dementia. *J. Atheroscler. Thromb* 16,179–187.

Bansal, G., Druey, K.M., and Xie, Z. (2007). R4 RGS proteins: regulation of G-protein signaling and beyond. *Pharmacol. Ther.* 116, 473–495.

Baryshnikova, O.K., and Sykes, B.D. (2006). Backbone dynamics of SDF-1 α determined by NMR: interpretation in the presence of monomer-dimer equilibrium. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 15, 2568–2578.

Bastepe, M., Gunes, Y., Perez-Villamil, B., Hunzelman, J., Weinstein, L.S., and Jüppner, H. (2002). Receptor-Mediated Adenylyl Cyclase Activation Through XL α s, the Extra-

- Large Variant of the Stimulatory G Protein α -Subunit. *Mol. Endocrinol.* 16, 1912–1919.
- Begley, L.A., Kasina, S., Shah, R.B., and Macoska, J.A. (2015). Signaling mechanisms coupled to CXCL12/CXCR4-mediated cellular proliferation are PTEN-dependent. *Am. J. Clin. Exp. Urol.* 3, 91–99.
- Behm, D.J., Aiyar, N.V., Olzinski, A.R., McAtee, J.J., Hilfiker, M.A., Dodson, J.W., Dowdell, S.E., Wang, G.Z., Goodman, K.B., Sehon, C.A., Harpel, M.R., Willette, R.N., Neeb, M.J., Leach, C.A., Douglas, S.A. (2010) GSK1562590, a slowly dissociating urotensin-II receptor antagonist, exhibits prolonged pharmacodynamic activity ex vivo. *Br. J Pharmacol* 161,207–228.
- Behm, D.J., Doe, C.P., Johns, D.G., Maniscalco, K., Stankus, G.P., Wibberley, A., Willette, R.N., Douglas, S.A. (2004) Urotensin-II: a novel systemic hypertensive factor in the cat. *Naunyn Schmiedebergs Arch of Pharmacol* 369,274-280.
- Behm, D.J., Herold, C.L., Camarda, V., Aiyar, N.V., Douglas, S.A. (2004) Differential agonistic and antagonistic effects of the urotensin-II ligand SB-710411 at rodent and primate UT receptors. *Eur J Pharmacol* 492,113–116.
- Behm, D.J., Herold, C.L., Ohlstein, E.H., Knight, S.D., Dhanak D, Douglas SA (2002) Pharmacological characterization of SB-710411 (Cpa-c[D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Cpa-amide), a novel peptidic urotensin-II receptor antagonist. *Br. J Pharmacol* 137,449–458.
- Behm, D.J., Stankus, G., Doe, C.P., Willette, R.N., Sarau, H.M., Foley, J.J., Schmidt, D.B., Nuthulaganti, P., Fornwald, J.A., Ames, R.S., Lambert, D.G., Calo, G., Camarda, V., Aiyar, N.V., Douglas, S.A. (2006) The peptidic urotensin-II receptor ligand GSK248451 possesses less intrinsic activity than the low-efficacy partial agonists SB-710411 and urantide in native mammalian tissues and recombinant cell systems. *Br. J Pharmacol* 148,173–190.
- Ben-Ami, I., Yao, Z., Naor, Z., and Seger, R. (2011). Gq protein-induced apoptosis is mediated by AKT kinase inhibition that leads to protein kinase C-induced c-Jun N-terminal kinase activation. *J. Biol. Chem.* 286, 31022–31031.
- Benovic, J.L., Staniszewski, C., Mayor, F., Caron, M.G., and Lefkowitz, R.J. (1988). beta-Adrenergic receptor kinase. Activity of partial agonists for stimulation of adenylate cyclase correlates with ability to promote receptor phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 263, 3893–3897.
- Bern, H.A., Lederis, K. (1969) A reference preparation for the study of active substances in the caudal neurosecretory system of teleosts. *J. Endoc.* 45,Suppl:xi–xii.
- Bian, D., Mahanivong, C., Yu, J., Frisch, S.M., Pan, Z.K., Ye, R.D., and Huang, S. (2006). The G12/13-RhoA signaling pathway contributes to efficient lysophosphatidic acid-stimulated cell migration. *Oncogene* 25, 2234–2244.

- Bianco, S.D.C., Vandepas, L., Correa-Medina, M., Gereben, B., Mukherjee, A., Kuohung, W., Carroll, R., Teles, M.G., Latronico, A.C., and Kaiser, U.B. (2011). KISS1R intracellular trafficking and degradation: effect of the Arg386Pro disease-associated mutation. *Endocrinology* 152, 1616–1626.
- Bockaert, J., and Pin, J.P. (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* 18, 1723–1729.
- Boerrigter, G., Soergel, D.G., Violin, J.D., Lark, M.W., and Burnett, J.C. (2012). TRV120027, a Novel β -Arrestin Biased Ligand at the Angiotensin II Type I Receptor, Unloads the Heart and Maintains Renal Function When Added to Furosemide in Experimental Heart Failure. *Circ. Heart Fail.* 5, 627–634.
- Bohn, L.M., Lefkowitz, R.J., Gainetdinov, R.R., Peppel, K., Caron, M.G., and Lin, F.-T. (1999). Enhanced Morphine Analgesia in Mice Lacking β -Arrestin 2. *Science* 286, 2495–2498.
- Boivin, S., Guilhaudis, L., Milazzo, I., Oulyadi, H., Davoust, D., and Fournier, A. (2006). Characterization of urotensin-II receptor structural domains involved in the recognition of U-II, URP, and urantide. *Biochemistry (Mosc.)* 45, 5993–6002.
- Boudot, A., Kerdivel, G., Habauzit, D., Eeckhoutte, J., Dily, F.L., Flouriot, G., Samson, M., and Pakdel, F. (2011). Differential Estrogen-Regulation of CXCL12 Chemokine Receptors, CXCR4 and CXCR7, Contributes to the Growth Effect of Estrogens in Breast Cancer Cells. *PLoS ONE* 6.
- Bousette, N., Patel, L., Douglas, S.A., Ohlstein, E.H., Giaid, A. (2004) Increased expression of urotensin II and its cognate receptor GPR14 in atherosclerotic lesions of the human aorta. *Atherosclerosis* 176,117-123.
- Brancaccio, D., Merlino, F., Limatola, A., Yousif, A.M., Gomez-Monterrey, I., Campiglia, P., Novellino, E., Grieco, P., and Carotenuto, A. (2015). An investigation into the origin of the biased agonism associated with the urotensin II receptor activation. *J. Pept. Sci.* 21, 392–399.
- Bratton, M.R., Antoon, J.W., Duong, B.N., Frigo, D.E., Tilghman, S., Collins-Burow, B.M., Elliott, S., Tang, Y., Melnik, L.I., Lai, L., et al. (2012). Gao potentiates estrogen receptor α activity via the ERK signaling pathway. *J. Endocrinol.* 214, 45–54.
- Brkovic, A., Hattenberger, A., Kostenis, E., Klabunde, T., Flohr, S., Kurz, M., Bourgault, S., Fournier, A. (2003) Functional and binding characterizations of urotensin II-related peptides in human and rat urotensin II-receptor assay. *J Pharmacol Exp Ther* 306,1200–1209.
- Brulé, C., Perzo, N., Joubert, J.-E., Sainsily, X., Leduc, R., Castel, H., and Prézeau, L. (2014). Biased signaling regulates the pleiotropic effects of the urotensin II receptor to modulate its cellular behaviors. *FASEB J.* 28, 5148–5162.

- Buhl, A.M., Johnson, N.L., Dhanasekaran, N., and Johnson, G.L. (1995). G α 12 and G α 13 Stimulate Rho-dependent Stress Fiber Formation and Focal Adhesion Assembly. *J. Biol. Chem.* 270, 24631–24634.
- Bunzow, J.R., Tol, H.H.M.V., Grandy, D.K., Albert, P., Salon, J., Christie, M., Machida, C.A., Neve, K.A., and Civelli, O. (1988). Cloning and expression of a rat D2 dopamine receptor cDNA. *Nature* 336, 783–787.
- Busillo, J.M., and Benovic, J.L. (2007). Regulation of CXCR4 signaling. *Biochim. Biophys. Acta* 1768, 952–963.
- Busillo, J.M., Armando, S., Sengupta, R., Meucci, O., Bouvier, M., and Benovic, J.L. (2010). Site-specific phosphorylation of CXCR4 is dynamically regulated by multiple kinases and results in differential modulation of CXCR4 signaling. *J. Biol. Chem.* 285, 7805–7817.

-C-

- Cabana, J., Holleran, B., Leduc, R., Escher, E., Guillemette, G., and Lavigne, P. (2015). Identification of Distinct Conformations of the Angiotensin-II Type 1 Receptor Associated with the Gq/11 Protein Pathway and the β -Arrestin Pathway Using Molecular Dynamics Simulations. *J. Biol. Chem.* 290, 15835–15854.
- Calebiro, D., Nikolaev, V.O., Gagliani, M.C., de Filippis, T., Dees, C., Tacchetti, C., Persani, L., and Lohse, M.J. (2009). Persistent cAMP-signals triggered by internalized G-protein-coupled receptors. *PLoS Biol.* 7, e1000172.
- Camarda, V., Guerrini, R., Kostenis, E., Rizzi, A., Calò, G., Hattenberger, A., Zucchini, M., Salvadori, S., and Regoli, D. (2002). A new ligand for the urotensin II receptor. *Br. J. Pharmacol.* 137, 311–314.
- Camarda, V., Song, W., Marzola, E., Spagnol, M., Guerrini, R., Salvadori, S., Regoli, D., Thompson, J.P., Rowbotham, D.J., Behm, D.J., Douglas, S.A., Calò, G., Lambert, D.G. (2004) Urantide mimics urotensin-II induced calcium release in cells expressing recombinant UT receptors. *Eur J Pharmacol* 498,83–86.
- Camarda, V., Spagnol, M., Song, W., Vergura, R., Roth, A.L., Thompson, J.P., Rowbotham, D.J., Guerrini, R., Marzola, E., Salvadori, S., et al. (2006). In vitro and in vivo pharmacological characterization of the novel UT receptor ligand [Pen⁵,DTrp⁷,Dab⁸]urotensin II(4-11) (UFP-803). *Br. J. Pharmacol.* 147, 92–100.
- Carotenuto, A., Grieco, P., Campiglia, P., Novellino, E., Rovero, P. (2004) Unraveling the active conformation of urotensin II. *J Med Chem* 47,1652–1661.
- Cartailler, J.-P., and Luecke, H. (2004). Structural and Functional Characterization of π Bulges and Other Short Intrahelical Deformations. *Structure* 12, 133–144.

- Case, L.B., Baird, M.A., Shtengel, G., Campbell, S.L., Hess, H.F., Davidson, M.W., and Waterman, C.M. (2015). Molecular mechanism of vinculin activation and nanoscale spatial organization in focal adhesions. *Nat. Cell Biol.* 17, 880–892.
- Castel, H., Diallo, M., Chatenet, D., Leprince, J., Desrues, L., Schouft, M.-T., Fontaine, M., Dubessy, C., Lihmann, I., Scalbert, E., et al. (2006). Biochemical and functional characterization of high-affinity urotensin II receptors in rat cortical astrocytes. *J. Neurochem.* 99, 582–595.
- Caterina, M.J., Devreotes, P.N., Borleis, J., and Hereld, D. (1995). Agonist-induced loss of ligand binding is correlated with phosphorylation of cAR1, a G protein-coupled chemoattractant receptor from Dictyostelium. *J. Biol. Chem.* 270, 8667–8672.
- Chakrabarti, P., and Chakrabarti, S. (1998). C—H...O hydrogen bond involving proline residues in α -helices I. *J. Mol. Biol.* 284, 867–873.
- Changeux, J.-P., and Edelstein, S. (2011). Conformational selection or induced fit? 50 years of debate resolved. *F1000 Biol. Rep.* 3.
- Chartrel, N., Conlon, J.M., Collin, F., Braun, B., Waugh, D., Vallarino, M., Lahrichi, S.L., Rivier, J.E., Vaudry, H. (1996) Urotensin II in the central nervous system of the frog *Rana ridibunda*: immunohistochemical localization and biochemical characterization. *J Comp Neurol* 364,324–339.
- Chatenet, D., Folch, B., Feytens, D., Letourneau, M., Tourwe, D., Doucet, N., Fournier, A. (2013) Development and pharmacological characterization of conformationally constrained urotensin II-related peptide agonists. *J Med Chem* 56,9612–9622.
- Chatenet, D., Dubessy, C., Leprince, J., Boularan, C., Carlier, L., Ségalas-Milazzo, I., Guilhaudis, L., Oulyadi, H., Davoust, D., Scalbert, E., et al. (2004). Structure-activity relationships and structural conformation of a novel urotensin II-related peptide. *Peptides* 25, 1819–1830.
- Chatenet, D., Nguyen, T.-T.M., Létourneau, M., and Fournier, A. (2012). Update on the urotensinergic system: new trends in receptor localization, activation, and drug design. *Front. Endocrinol.* 3, 174.
- Chen, J., DeVivo, M., Dingus, J., Harry, A., Li, J., Sui, J., Carty, D.J., Blank, J.L., Exton, J.H., and Stoffel, R.H. (1995). A region of adenylyl cyclase 2 critical for regulation by G protein beta gamma subunits. *Science* 268, 1166–1169.
- Chen, Y., Zhao, M., Liu, X., Yao, W., Yang, J., Zhang, Z., Tang, C. (2001) Urotensin II receptor in the rat airway smooth muscle and its effect on the rat airway smooth muscle cells proliferation. *Chin Med Sci J* 16,231–235.
- Chen, L., Liu, J.C., Loh, S.H., Chen, C.H., Hong, C.Y., Chen, J.J., Cheng, T.H. (2008) Involvement of reactive oxygen species in urotensin II-induced proliferation of cardiac fibroblasts. *Eur J Pharmacol* 593,24–29.
- Chen, X., Fang, J., Wang, S., Liu, H., Du, X., Chen, J., Li, X., Yang, Y., Zhang, B., Zhang,

- W. (2014) A new mosaic pattern in glioma vascularization: exogenous endothelial progenitor cells integrating into the vessels containing tumor-derived endothelial cells. *Oncotarget* 5,1955–1968.
- Chen, Z., Xu, J., Ye, Y., Li, Y., Gong, H., Zhang, G., Wu, J., Jia, J., Liu, M., Chen, Y., Yang, C., Tang, Y., Zhu, Y., Ge, J., Zou, Y. (2014) Urotensin II inhibited the proliferation of cardiac side population cells in mice during pressure overload by JNK-LRP6 signalling. *J Cel Mol Med* 18,852–862.
- Cherezov, V., Rosenbaum, D.M., Hanson, M.A., Rasmussen, S.G.F., Thian, F.S., Kobilka, T.S., Choi, H.-J., Kuhn, P., Weis, W.I., Kobilka, B.K., et al. (2007). High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* 318, 1258–1265.
- Chikumi, H., Vázquez-Prado, J., Servitja, J.-M., Miyazaki, H., and Gutkind, J.S. (2002). Potent Activation of RhoA by Gαq and Gq-coupled Receptors. *J. Biol. Chem.* 277, 27130–27134.
- Choe, H.-W., Kim, Y.J., Park, J.H., Morizumi, T., Pai, E.F., Krauß, N., Hofmann, K.P., Scheerer, P., and Ernst, O.P. (2011). Crystal structure of metarhodopsin II. *Nature* 471, 651–655.
- Civelli, O., Saito, Y., Wang, Z., Nothacker, H.-P., and Reinscheid, R.K. (2006). Orphan GPCRs and their ligands. *Pharmacol. Ther.* 110, 525–532.
- Clark, M.J., Harrison, C., Zhong, H., Neubig, R.R., and Traynor, J.R. (2003). Endogenous RGS protein action modulates mu-opioid signaling through Galphao. Effects on adenylyl cyclase, extracellular signal-regulated kinases, and intracellular calcium pathways. *J. Biol. Chem.* 278, 9418–9425.
- Clark, S.D., Nothacker, H.P., Wang, Z., Saito, Y., Leslie, F.M., Civelli, O. (2001) The urotensin II receptor is expressed in the cholinergic mesopontine tegmentum of the rat. *Brain Res* 923,120–127.
- Clements, M.K., McDonald, T.P., Wang, R., Xie, G., O’Dowd, B.F., George, S.R., Austin, C.P., and Liu, Q. (2001). FMRFamide-Related Neuropeptides Are Agonists of the Orphan G-Protein-Coupled Receptor GPR54. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284, 1189–1193.
- Clozel, M., Binkert, C., Birker-Robaczewska, M., Boukhadra, C., Ding, S.S., Fischli, W., Hess, P., Mathys, B., Morrison, K., Muller, C., Muller C, Nayler O, Qiu C, Rey M, Scherz MW, Velker J, Weller T, Xi JF, Ziltener P (2004) Pharmacology of the urotensin-II receptor antagonist palosuran (ACT-058362; 1-[2-(4-benzyl-4-hydroxy-piperidin-1-yl)-ethyl]-3-(2-methyl-quinolin-4-yl)-urea sulfate salt): first demonstration of a pathophysiological role of the urotensin System. *J. Pharm. Exp. Ther* 311,204–212.
- Cojoc, M., Peitzsch, C., Trautmann, F., Polishchuk, L., Telegeev, G.D., and Dubrovskaya, A. (2013). Emerging targets in cancer management: role of the CXCL12/CXCR4 axis. *OncoTargets Ther.* 6, 1347.

- Coly, P.-M., Perzo, N., Le Joncour, V., Lecointre, C., Schouft, M.-T., Desrues, L., Tonon, M.-C., Wurtz, O., Gandolfo, P., Castel, H., et al. (2016). Chemotactic G protein-coupled receptors control cell migration by repressing autophagosome biogenesis. *Autophagy* 12, 1–19.
- Conlon, J.M., O'Harte, F., Smith, D.D., Tonon, M.C., Vaudry, H. (1992) Isolation and primary structure of urotensin II from the brain of a tetrapod, the frog *Rana ridibunda*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 188,578–583.
- Conner, M., Hawtin, S.R., Simms, J., Wootten, D., Lawson, Z., Conner, A.C., Parslow, R.A., and Wheatley, M. (2007). Systematic analysis of the entire second extracellular loop of the V(1a) vasopressin receptor: key residues, conserved throughout a G-protein-coupled receptor family, identified. *J. Biol. Chem.* 282, 17405–17412.
- Contento, R.L., Molon, B., Boularan, C., Pozzan, T., Manes, S., Marullo, S., and Viola, A. (2008). CXCR4-CCR5: a couple modulating T cell functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 10101–10106.
- Cordes, F.S., Bright, J.N., and Sansom, M.S.P. (2002). Proline-induced Distortions of Transmembrane Helices. *J. Mol. Biol.* 323, 951–960.
- Coso, O.A., Teramoto, H., Simonds, W.F., and Gutkind, J.S. (1996). Signaling from G protein-coupled receptors to c-Jun kinase involves beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins acting on a Ras and Rac1-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 271, 3963–3966.
- Costa-Neto, C.M., Parreiras-E-Silva, L.T., and Bouvier, M. (2016). A Pluridimensional View of Biased Agonism. *Mol. Pharmacol.* 90, 587–595.
- Coulouarn Y, Lihmann I, Jegou S, Anouar Y, Tostivint H, Beauvillain JC, Conlon JM, Bern HA, Vaudry H (1998) Cloning of the cDNA encoding the urotensin II precursor in frog and human reveals intense expression of the urotensin II gene in motoneurons of the spinal cord. *PNAS* 95,15803–15808.
- Cowley E, Thompson JP, Sharpe P, Waugh J, Ali N, Lambert DG (2005) Effects of pre-eclampsia on maternal plasma, cerebrospinal fluid, and umbilical cord urotensin II concentrations: a pilot study. *Br J Anaesth* 95,495–499.
- Crasto, C.J. (2010). Hydrophobicity profiles in G protein-coupled receptor transmembrane helical domains. *J. Recept. Ligand Channel Res.* 2010, 123–133.
- Crump, M.P., Gong, J.-H., Loetscher, P., Rajarathnam, K., Amara, A., Arenzana-Seisdedos, F., Virelizier, J.-L., Baggiolini, M., Sykes, B.D., and Clark-Lewis, I. (1997). Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *EMBO J.* 16, 6996–7007.
- Currie, K.P.M. (2010). G protein modulation of CaV2 voltage-gated calcium channels. *Channels Austin Tex* 4, 497–509.

Cvetković, D., Dragan, M., Leith, S.J., Mir, Z.M., Leong, H.S., Pampillo, M., Lewis, J.D., Babwah, A.V., and Bhattacharya, M. (2013). KISS1R Induces Invasiveness of Estrogen Receptor-Negative Human Mammary Epithelial and Breast Cancer Cells. *Endocrinology* 154, 1999–2014.

Cvicko, V., Iii, W.A.G., and Abrol, R. (2016). Structure-Based Sequence Alignment of the Transmembrane Domains of All Human GPCRs: Phylogenetic, Structural and Functional Implications. *PLOS Comput Biol* 12, e1004805.

-D-

Daaka, Y., Luttrell, L.M., and Lefkowitz, R.J. (1997). Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* 390, 88–91.

Dai, H.Y., Guo, X.G., Ge, Z.M., Li, Z.H., Yu, X.J., Tang, M.X., Zhang, Y. (2008) Elevated expression of urotensin II and its receptor in diabetic cardiomyopathy. *J. Diabetes Complicat.* 22, 137–143.

Dalton, J.A., Lans, I., and Giraldo, J. (2015). Quantifying conformational changes in GPCRs: glimpse of a common functional mechanism. *BMC Bioinformatics* 16.

Daub, H., Weiss, F.U., Wallasch, C., and Ullrich, A. (1996). Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature* 379, 557–560.

Décaillot, F.M., Befort, K., Filliol, D., Yue, S., Walker, P., and Kieffer, B.L. (2003). Opioid receptor random mutagenesis reveals a mechanism for G protein-coupled receptor activation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 10, 629–636.

DeFea, K.A. (2007). Stop that cell! Beta-arrestin-dependent chemotaxis: a tale of localized actin assembly and receptor desensitization. *Annu. Rev. Physiol.* 69, 535–560.

Degtyarev, M.Y., Spiegel, A.M., and Jones, T.L. (1994). Palmitoylation of a G protein alpha i subunit requires membrane localization not myristoylation. *J. Biol. Chem.* 269, 30898–30903.

Desrues, L., Lefebvre, T., Lecointre, C., Schouft, M.-T., Leprince, J., Compère, V., Morin, F., Proust, F., Gandolfo, P., Tonon, M.-C., et al. (2012). Down-Regulation of GABA(A) Receptor via Promiscuity with the Vasoactive Peptide Urotensin II Receptor. Potential Involvement in Astrocyte Plasticity. *PloS One* 7, e36319.

Deupi, X., and Kobilka, B.K. (2010). Energy Landscapes as a Tool to Integrate GPCR Structure, Dynamics, and Function. *Physiology* 25, 293–303.

- Deupi, X., Olivella, M., Govaerts, C., Ballesteros, J.A., Campillo, M., and Pardo, L. (2004). Ser and Thr residues modulate the conformation of pro-kinked transmembrane alpha-helices. *Biophys. J.* *86*, 105–115.
- Devillé, J., Rey, J., and Chabbert, M. (2009). An indel in transmembrane helix 2 helps to trace the molecular evolution of class A G-protein-coupled receptors. *J. Mol. Evol.* *68*, 475–489.
- Diallo, M., Jarry, M., Desrues, L., Castel, H., Chatenet, D., Leprince, J., Vaudry, H., Tonon, M.C., Gandolfo, P. (2008) [Orn5]URP acts as a pure antagonist of urotensinergic receptors in rat cortical astrocytes. *Peptides* *29*, 813–819.
- Diebold, I., Petry, A., Burger, M., Hess, J., Gorlach, A. (2011) NOX4 mediates activation of FoxO3a and matrix metalloproteinase-2 expression by urotensin-II. *Mol. Biol. Cell.* *22*, 4424–4434.
- Diel, S., Klass, K., Wittig, B., and Kleuss, C. (2006). Gbetagamma activation site in adenylyl cyclase type II. Adenylyl cyclase type III is inhibited by Gbetagamma. *J. Biol. Chem.* *281*, 288–294.
- Dietrich, G., Gaibelet, G., Capeyrou, R., Butour, J.L., Pontet, F., and Emorine, L.J. (1998). Implication of the first and third extracellular loops of the mu-opioid receptor in the formation of the ligand binding site: a study using chimeric mu-opioid/angiotensin receptors. *J. Neurochem.* *70*, 2106–2111.
- Dixon, R.A.F., Kobilka, B.K., Strader, D.J., Benovic, J.L., Dohlman, H.G., Frielle, T., Bolanowski, M.A., Bennett, C.D., Rands, E., Diehl, R.E., et al. (1986). Cloning of the gene and cDNA for mammalian β -adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature* *321*, 75–79.
- Djordjevic, T., BelAiba, R.S., Bonello, S., Pfeilschifter, J., Hess, J., Gorlach, A. (2005) Human urotensin II is a novel activator of NADPH oxidase in human pulmonary artery smooth muscle cells. *Arterios. Scler. Thromb. Vasc. Biol.* *25*, 519–525.
- Doan, N.D., Nguyen, T.T., Letourneau, M., Turcotte, K., Fournier, A., Chatenet, D. (2012) Biochemical and pharmacological characterization of nuclear urotensin-II binding sites in rat heart. *Br. J. Pharmacol.* *166*, 243–257.
- Douglas, S.A., Tayara, L., Ohlstein, E.H., Halawa, N., Giaid, A. (2002) Congestive heart failure and expression of myocardial urotensin II. *Lancet* *359*, 1990–1997.
- Douglas SA, Naselsky D, Ao Z, Disa J, Herold CL, Lynch F, Aiyar NV (2004) Identification and pharmacological characterization of native, functional human urotensin-II receptors in rhabdomyosarcoma cell lines. *Br. J. Pharmacol.* *142*, 921–932.
- Douglas, S.A., Behm, D.J., Aiyar, N.V., Naselsky, D., Disa, J., Brooks, D.P., Ohlstein, E.H., Gleason, J.G., Sarau, H.M., Foley, J.J., Buckley, P.T., Schmidt, D.B., Wixted, W.E., Widdowson, K., Riley, G., Jin, J., Gallagher, T.F., Schmidt, S.J., Ridgers, L., Christmann, L.T., Keenan, R.M., Knight, S.D., Dhanak, D. (2005) Nonpeptidic urotensin-II receptor antagonists I: *in vitro* pharmacological characterization of SB-

706375. *Br. J. Pharmacol.* *145*, 620–635.
- Douglas, S.A., Dhanak, D., Johns, D.G. (2004) From 'gills to pills': urotensin-II as a regulator of mammalian cardiorenal function. *Trends Pharmacol. Sci.* *25*, 76–85.
- Dorn, G.W. (2009). GRK mythology: G-protein receptor kinases in cardiovascular disease. *J. Mol. Med.* *87*, 455–463.
- Drury, L.J., Ziarek, J.J., Gravel, S., Veldkamp, C.T., Takekoshi, T., Hwang, S.T., Heveker, N., Volkman, B.F., and Dwinell, M.B. (2011). Monomeric and dimeric CXCL12 inhibit metastasis through distinct CXCR4 interactions and signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 17655–17660.
- Dschietzig, T., Bartsch, C., Pregla, R., Zurbrugg, H.R., Armbruster, F.P., Richter, C., Laule, M., Romeyke, E., Neubert, C., Voelter, W., Baumann, G., Stangl, K. (2002) Plasma levels and cardiovascular gene expression of urotensin-II in human heart failure. *Regul. Pept.* *110*, 33–38.
- Dubessy, C., Cartier, D., Lectez, B., Bucharles, C., Chartrel, N., Montero-Hadjadje, M., Bizet, P., Chatenet, D., Tostivint, H., Scalbert, E., Leprince, J., Vaudry, H., Jegou, S., Lihmann, I. (2008) Characterization of urotensin II, distribution of urotensin II, urotensin II-related peptide and UT receptor mRNAs in mouse: evidence of urotensin II at the neuromuscular junction. *J. Neurochem.* *107*, 361–374.
- Dun, S.L., Brailoiu, G.C., Yang, J., Chang, J.K., Dun, N.J. (2001) Urotensin II-immunoreactivity in the brainstem and spinal cord of the rat. *Neurosci. Lett.* *305*, 9–12.
- Dunham, J.H., Meyer, R.C., Garcia, E.L., and Hall, R.A. (2009). GPR37 surface expression enhancement via N-terminal truncation or protein-protein interactions. *Biochemistry (Mosc.)* *48*, 10286–10297.

-E-

- Egginger, J.G., Parmentier, C., Garrel, G., Cohen-Tannoudji, J., Camus, A., Calas, A., Hardin-Pouzet, H., Grange-Messent, V. (2011) Direct evidence for the co-expression of URP and GnRH in a sub-population of rat hypothalamic neurones: anatomical and functional correlation. *PLoS one* *6*, e26611.
- El-Shewy, H.M., Abdel-Samie, S.A., Al Qalam, A.M., Lee, M.-H., Kitatani, K., Anelli, V., Jaffa, A.A., Obeid, L.M., and Luttrell, L.M. (2011). Phospholipase C and protein kinase C- β 2 mediate insulin-like growth factor II-dependent sphingosine kinase 1 activation. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *25*, 2144–2156.

- Elshourbagy, N.A., Douglas, S.A., Shabon, U., Harrison, S., Duddy, G., Sechler, J.L., Ao, Z., Maleeff, B.E., Naselsky, D., Disa, J., Aiyar, N.V. (2002) Molecular and pharmacological characterization of genes encoding urotensin-II peptides and their cognate G-protein-coupled receptors from the mouse and monkey. *Br J Pharmacol*, 136, 9-22.
- d'Emmanuele di Villa Bianca, R., Cirino, G., Mitidieri, E., Coletta, C., Grassia, G., Roviezzo, F., Grieco, P., Novellino, E., Imbimbo, C., Mirone, V., Sorrentino, R. (2010) Urotensin II: a novel target in human corpus cavernosum. *J. Sex. Med.* 7, 1778–1786.
- Ernst, O.P., Bieri, C., Vogel, H., and Hofmann, K.P. (2000). Intrinsic biophysical monitors of transducin activation: Fluorescence, UV-visible spectroscopy, light scattering, and evanescent field techniques. B.-M. in *Enzymology*, ed. (Academic Press), pp. 471–489.
- Esposito, G., Perrino, C., Cannavo, A., Schiattarella, G.G., Borgia, F., Sannino, A., Pironti, G., Gargiulo, G., Di Serafino, L., Franzone, A., et al. (2011). EGFR trans-activation by urotensin II receptor is mediated by β -arrestin recruitment and confers cardioprotection in pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Basic Res. Cardiol.* 106, 577–589.

-F-

- Federico A, Zappavigna S, Romano M, Grieco P, Luce A, Marra M, Gravina AG, Stiuso P, D'Armiento FP, Vitale G, Tuccillo C, Novellino E, Loguercio C, Caraglia M (2014) Urotensin-II receptor is over-expressed in colon cancer cell lines and in colon carcinoma in humans. *European journal of clinical investigation* 44:285-294.
- Fenalti, G., Giguere, P.M., Katritch, V., Huang, X.-P., Thompson, A.A., Cherezov, V., Roth, B.L., and Stevens, R.C. (2014). Molecular control of δ -opioid receptor signalling. *Nature* 506, 191–196.
- Feng, Y., Broder, C.C., Kennedy, P.E., and Berger, E.A. (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272, 872–877.
- Fisher, A., Heldman, E., Gurwitz, D., Haring, R., Barak, D., Meshulam, H., Marciano, D., Brandeis, R., Pittel, Z., Segal, M., et al. (1993). Selective Signaling via Unique M1 Muscarinic Agonists. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 695, 300–303.
- Flohr S, Kurz M, Kostenis E, Brkovich A, Fournier A, Klabunde T (2002) Identification of nonpeptidic urotensin II receptor antagonists by virtual screening based on a pharmacophore model derived from structure-activity relationships and nuclear magnetic resonance studies on urotensin II. *Journal of medicinal chemistry* 45:1799-1805.

- Foister S, Taylor LL, Feng JJ, Chen WL, Lin A, Cheng FC, Smith AB 3rd, Hirschmann R (2006) Design and synthesis of potent cystine-free cyclic hexapeptide agonists at the human urotensin receptor. *Organic letters* 8:1799-1802.
- Fokkelman, M., Balçioğlu, H.E., Klip, J.E., Yan, K., Verbeek, F.J., Danen, E.H.J., and Water, B. van de (2016). Cellular adhesion screen identifies critical modulators of focal adhesion dynamics, cellular traction forces and cell migration behaviour. *Sci. Rep.* 6.
- Fontes-Sousa AP, Bras-Silva C, Pires AL, Monteiro-Sousa D, Leite-Moreira AF (2007) Urotensin II acutely increases myocardial length and distensibility: potential implications for diastolic function and ventricular remodeling. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 376:107-115.
- Franco, M., Chardin, P., Chabre, M., and Paris, S. (1996). Myristoylation-facilitated binding of the G protein ARF1GDP to membrane phospholipids is required for its activation by a soluble nucleotide exchange factor. *J. Biol. Chem.* 271, 1573–1578.
- Franco, R., Martínez-Pinilla, E., Lanciego, J.L., and Navarro, G. (2016). Basic Pharmacological and Structural Evidence for Class A G-Protein-Coupled Receptor Heteromerization. *Front. Pharmacol.* 7, 76.
- Franco R, Zappavigna S, Gigantino V, Luce A, Cantile M, Cerrone M, Facchini G, Perdonà S, Pignata S, Di Lorenzo G, Chieffi S, Vitale G, De Sio M, Sgambato A, Botti G, Yousif AM, Novellino E, Grieco P, Caraglia M (2014) Urotensin II receptor determines prognosis of bladder cancer regulating cell motility/invasion. *Journal of experimental & clinical cancer research* 33:48.
- Fredriksson, R., and Schiöth, H.B. (2005). The repertoire of G-protein-coupled receptors in fully sequenced genomes. *Mol. Pharmacol.* 67, 1414–1425.
- Fredriksson, R., Lagerström, M.C., Lundin, L.-G., and Schiöth, H.B. (2003). The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol. Pharmacol.* 63, 1256–1272.
- G-
- Galés, C., Rebois, R.V., Hogue, M., Trieu, P., Breit, A., Hébert, T.E., and Bouvier, M. (2005). Real-time monitoring of receptor and G-protein interactions in living cells. *Nat. Methods* 2, 177–184.
- Gao, S., Oh, Y.B., Park, B.M., Park, W.H., Kim, S.H. (2012) Urotensin II protects ischemic reperfusion injury of hearts through ROS and antioxidant pathway. *Peptides* 36,199–205.
- Gao, S., Oh, Y.B., Shah, A., Park, W.H., Chung, M.J., Lee, Y.H., Kim, S.H. (2010) Urotensin

- II receptor antagonist attenuates monocrotaline-induced cardiac hypertrophy in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299,H1782–1789.
- Gartlon, J., Parker, F., Harrison, D.C., Douglas, S.A., Ashmeade, T.E., Riley, G.J., Hughes, Z.A., Taylor, S.G., Munton, R.P., Hagan, J.J., Hunter, J.A., Jones, D.N. (2001) Central effects of urotensin-II following ICV administration in rats. *Psychopharmacology* 155,426–433.
- Ge, L., Shenoy, S.K., Lefkowitz, R.J., and DeFea, K. (2004). Constitutive protease-activated receptor-2-mediated migration of MDA MB-231 breast cancer cells requires both beta-arrestin-1 and -2. *J. Biol. Chem.* 279, 55419–55424.
- Gesty-Palmer, D., Yuan, L., Martin, B., Wood, W.H., Lee, M.-H., Janech, M.G., Tsoi, L.C., Zheng, W.J., Luttrell, L.M., and Maudsley, S. (2013). β -arrestin-selective G protein-coupled receptor agonists engender unique biological efficacy in vivo. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 27, 296–314.
- Gilman, A.G. (1987). G Proteins: Transducers of Receptor-Generated Signals. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 615–649.
- Giuliani, L., Lenzini, L., Antonello, M., Aldighieri, E., Belloni, A.S., Fassina, A., Gomez-Sanchez, C., Rossi, G.P. (2009) Expression and functional role of urotensin-II and its receptor in the adrenal cortex and medulla: novel insights for the pathophysiology of primary aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab* 94,684–690.
- Göblyös, A., and Ijzerman, A.P. (2011). Allosteric modulation of adenosine receptors. *Biochim. Biophys. Acta* 1808, 1309–1318.
- Gohla, A., Harhammer, R., and Schultz, G. (1998). The G-protein G13 but Not G12 Mediates Signaling from Lysophosphatidic Acid Receptor via Epidermal Growth Factor Receptor to Rho. *J. Biol. Chem.* 273, 4653–4659.
- Golzar, F., Javanmard, S.H., Bahrambeigi, V., and Rafiee, L. (2015). The effect of Kisspeptin-10 on mesenchymal stem cells migration in vitro and in vivo. *Adv. Biomed. Res.* 4, 20.
- Gong, H., Wang, Y.X., Zhu, Y.Z., Wang, W.W., Wang, M.J., Yao, T., Zhu, Y.C. (2004) Cellular distribution of GPR14 and the positive inotropic role of urotensin II in the myocardium in adult rat. *J Applied Physiology* 97,2228–2235.
- González, A., Perez-Acle, T., Pardo, L., and Deupi, X. (2011). Molecular basis of ligand dissociation in β -adrenergic receptors. *PloS One* 6, e23815.
- Govaerts, C., Blanpain, C., Deupi, X., Ballet, S., Ballesteros, J.A., Wodak, S.J., Vassart, G., Pardo, L., and Parmentier, M. (2001a). The TXP motif in the second transmembrane helix of CCR5. A structural determinant of chemokine-induced activation. *J. Biol. Chem.* 276, 13217–13225.
- Gonzalez, G.C., Martinez-Padron, M., Lederis, K., Lukowiak, K. (1992) Distribution and coexistence of urotensin I and urotensin II peptides in the cerebral ganglia of *Aplysia*

- californica. *Peptides* 13,695-703.
- Govaerts, C., Lefort, A., Costagliola, S., Wodak, S.J., Ballesteros, J.A., Sande, J.V., Pardo, L., and Vassart, G. (2001b). A Conserved Asn in Transmembrane Helix 7 Is an On/Off Switch in the Activation of the Thyrotropin Receptor. *J. Biol. Chem.* 276, 22991–22999.
- Gray, T.M., and Matthews, B.W. (1984). Intrahelical hydrogen bonding of serine, threonine and cysteine residues within alpha-helices and its relevance to membrane-bound proteins. *J. Mol. Biol.* 175, 75–81.
- Grieco, P., Carotenuto, A., Campiglia, P., Zampelli, E., Patacchini, R., Maggi, C.A., Novellino, E., Rovero, P. (2002) A new, potent urotensin II receptor peptide agonist containing a Pen residue at the disulfide bridge. *J Med. Chem* 45,4391-4394.
- Grieco, P., Franco, R., Bozzuto, G., Toccaceli, L., Sgambato, A., Marra, M., Zappavigna, S., Migaldi, M., Rossi, G., Striano, S., et al. (2011). Urotensin II receptor predicts the clinical outcome of prostate cancer patients and is involved in the regulation of motility of prostate adenocarcinoma cells. *J. Cell. Biochem.* 112, 341–353.
- Groer, C.E., Tidgewell, K., Moyer, R.A., Harding, W.W., Rothman, R.B., Prisinzano, T.E., and Bohn, L.M. (2007). An Opioid Agonist that Does Not Induce μ -Opioid Receptor—Arrestin Interactions or Receptor Internalization. *Mol. Pharmacol.* 71, 549–557.
- Gruson D, Ginion A, Decroly N, Lause P, Vanoverschelde JL, Ketelslegers JM, Bertrand L, Thissen JP (2010) Urotensin II induction of adult cardiomyocytes hypertrophy involves the Akt/GSK-3beta signaling pathway. *Peptides* 31:1326-1333.
- Gsponer, J., and Babu, M.M. (2009). The rules of disorder or why disorder rules. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 99, 94–103.
- Guerrini, R., Camarda, V., Marzola, E., Arduin, M., Calo, G., Spagnol, M., Rizzi, A., Salvadori, S., and Regoli, D. (2005). Structure-activity relationship study on human urotensin II. *J. Pept. Sci. Off. Publ. Eur. Pept. Soc.* 11, 85–90.
- Guo, D., Mulder-Krieger, T., IJzerman, A.P., and Heitman, L.H. (2012). Functional efficacy of adenosine A₂A receptor agonists is positively correlated to their receptor residence time. *Br. J. Pharmacol.* 166, 1846–1859.
- Guo, J., Yu, X., Gu, J., Lin, Z., Zhao, G., Xu, F., Lu, C., and Ge, D. (2016). Regulation of CXCR4/AKT-signaling-induced cell invasion and tumor metastasis by RhoA, Rac-1, and Cdc42 in human esophageal cancer. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* 37, 6371–6378.
- Guo, R., Chai, L., Chen, L., Chen, W., Ge, L., Li, X., Li, H., Li, S., and Cao, C. (2015). Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) accelerated skin wound healing by promoting the migration and proliferation of epidermal stem cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 51, 578–585.

- Gurwitz, D., Haring, R., Heldman, E., Fraser, C.M., Manor, D., and Fisher, A. (1994). Discrete activation of transduction pathways associated with acetylcholine m1 receptor by several muscarinic ligands. *Eur. J. Pharmacol. Mol. Pharmacol.* 267, 21–31.
- Gutiérrez-de-Terán, H., Massink, A., Rodríguez, D., Liu, W., Han, G.W., Joseph, J.S., Katritch, I., Heitman, L.H., Xia, L., Ijzerman, A.P., et al. (2013). The role of a sodium ion binding site in the allosteric modulation of the A(2A) adenosine G protein-coupled receptor. *Struct. Lond. Engl.* 1993 21, 2175–2185.
- Gutiérrez-Pascual, E., Leprince, J., Martínez-Fuentes, A.J., Ségalas-Milazzo, I., Pineda, R., Roa, J., Duran-Prado, M., Guilhaudis, L., Desperrois, E., Lebreton, A., et al. (2009). In Vivo and in Vitro Structure-Activity Relationships and Structural Conformation of Kisspeptin-10-Related Peptides. *Mol. Pharmacol.* 76, 58–67.

-H-

- Hague, C., Chen, Z., Pupo, A.S., Schulte, N.A., Toews, M.L., and Minneman, K.P. (2004). The N Terminus of the Human α 1D-Adrenergic Receptor Prevents Cell Surface Expression. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 309, 388–397.
- Hautaniemi, S., Kharait, S., Iwabu, A., Wells, A., and Lauffenburger, D.A. (2005). Modeling of signal-response cascades using decision tree analysis. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 21, 2027–2035.
- Heringlake, M., Kox, T., Uzun, O., Will, B., Bahlmann, L., Klaus, S., Eleftheriadis, S., Armbruster, F.P., Franz, N., Kraatz, E. (2004) The relationship between urotensin II plasma immunoreactivity and left ventricular filling pressures in coronary artery disease. *Reg. Pep.* 121,129–136.
- Heveker, N., Montes, M., Germeroth, L., Amara, A., Trautmann, A., Alizon, M., and Schneider-Mergener, J. (1998). Dissociation of the signalling and antiviral properties of SDF-1-derived small peptides. *Curr. Biol. CB* 8, 369–376.
- Hille, B. (1992). G protein-coupled mechanisms and nervous signaling. *Neuron* 9, 187–195.
- Hirose, T., Takahashi, K., Mori, N., Nakayama, T., Kikuya, M., Ohkubo, T., Kohzuki, M., Totsune, K., Imai, Y. (2009) Increased expression of urotensin II, urotensin II-related peptide and urotensin II receptor mRNAs in the cardiovascular organs of hypertensive rats: comparison with endothelin-1. *Peptides* 30,1124–1129.
- Holleran, B.J., Domazet, I., Beaulieu, M.-E., Yan, L.P., Guillemette, G., Lavigne, P., Escher, E., and Leduc, R. (2009). Identification of transmembrane domain 6 & 7 residues that contribute to the binding pocket of the urotensin II receptor. *Biochem. Pharmacol.* 77, 1374–1382.

- Hollinger, S., and Hepler, J.R. (2002). Cellular regulation of RGS proteins: modulators and integrators of G protein signaling. *Pharmacol. Rev.* *54*, 527–559.
- Holloway, A.C., Qian, H., Pipolo, L., Ziogas, J., Miura, S., Karnik, S., Southwell, B.R., Lew, M.J., and Thomas, W.G. (2002). Side-Chain Substitutions within Angiotensin II Reveal Different Requirements for Signaling, Internalization, and Phosphorylation of Type 1A Angiotensin Receptors. *Mol. Pharmacol.* *61*, 768–777.
- Hu, J., Wang, Y., Zhang, X., Lloyd, J.R., Li, J.H., Karpiak, J., Costanzi, S., and Wess, J. (2010). Structural basis of G protein-coupled receptor–G protein interactions. *Nat. Chem. Biol.* *6*, 541–548.
- Huang, X., Shen, J., Cui, M., Shen, L., Luo, X., Ling, K., Pei, G., Jiang, H., and Chen, K. (2003). Molecular Dynamics Simulations on SDF-1 α : Binding with CXCR4 Receptor. *Biophys. J.* *84*, 171–184.
- Huma, T., Wang, Z., Rizak, J., Ahmad, F., Shahab, M., Ma, Y., Yang, S., and Hu, X. (2013). Kisspeptin-10 modulates the proliferation and differentiation of the rhesus monkey derived stem cell line: R366.4. *ScientificWorldJournal* *2013*, 135470.
- Hunton, D.L., Barnes, W.G., Kim, J., Ren, X.-R., Violin, J.D., Reiter, E., Milligan, G., Patel, D.D., and Lefkowitz, R.J. (2005). Beta-arrestin 2-dependent angiotensin II type 1A receptor-mediated pathway of chemotaxis. *Mol. Pharmacol.* *67*, 1229–1236.
- Hurowitz, E.H., Melnyk, J.M., Chen, Y.J., Kouros-Mehr, H., Simon, M.I., and Shizuya, H. (2000). Genomic characterization of the human heterotrimeric G protein alpha, beta, and gamma subunit genes. *DNA Res. Int. J. Rapid Publ. Rep. Genes Genomes* *7*, 111–120.

-I-

- Iglewski M, Grant SR (2010) Urotensin II-induced signaling involved in proliferation of vascular smooth muscle cells. *Vascular health and risk management* *6*:723-734.
- Information, N.C. for B., Pike, U.S.N.L. of M. 8600 R., MD, B., and Usa, 20894 (1996). A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J. Exp. Med.* *184*, 1101.
- Itoh, Y., Cai, K., and Khorana, H.G. (2001). Mapping of contact sites in complex formation between light-activated rhodopsin and transducin by covalent crosslinking: Use of a chemically preactivated reagent. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *98*, 4883–4887.

-J-

- Jaffré, F., Friedman, A.E., Hu, Z., Mackman, N., and Blaxall, B.C. (2012). β -Adrenergic Receptor Stimulation Transactivates Protease-Activated Receptor 1 via Matrix Metalloproteinase 13 in Cardiac Cells Clinical Perspective. *Circulation* 125, 2993–3003.
- Janz, J.M., and Farrens, D.L. (2004). Rhodopsin Activation Exposes a Key Hydrophobic Binding Site for the Transducin α -Subunit C Terminus. *J. Biol. Chem.* 279, 29767–29773.
- Jarpe, M.B., Knall, C., Mitchell, F.M., Buhl, A.M., Duzic, E., and Johnson, G.L. (1998). [d-Arg1,d-Phe5,d-Trp7,9,Leu11]Substance P Acts as a Biased Agonist toward Neuropeptide and Chemokine Receptors. *J. Biol. Chem.* 273, 3097–3104.
- Jarry, M., Diallo, M., Lecointre, C., Desrues, L., Tokay, T., Chatenet, D., Leprince, J., Rossi, O., Vaudry, H., Tonon, M.-C., Prézeau, L., Castel, H., and Gandolfo, P. (2010). The vasoactive peptides urotensin II and urotensin II-related peptide regulate astrocyte activity through common and distinct mechanisms: involvement in cell proliferation. *Biochem. J.* 428, 113–124.
- Jastrzebska, B., Tsybovsky, Y., and Palczewski, K. (2010). Complexes between photoactivated rhodopsin and transducin: progress and questions. *Biochem. J.* 428, 1–10.
- Johns D.G., Ao Z., Naselsky D., Herold C.L., Maniscalco K., Sarov-Blat L., Steplewski K., Aiyar N., and Douglas S.A. (2004). Urotensin-II-mediated cardiomyocyte hypertrophy: effect of receptor antagonism and role of inflammatory mediators. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 370, 238–250.
- Jegou, S., Cartier, D., Dubessy, C., Gonzalez, B.J., Chatenet, D., Tostivint, H., Scalbert, E., Leprince, J., Vaudry, H., and Lihrmann, I. (2006). Localization of the urotensin II receptor in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 495, 21–36.
- Joyal, D., Huynh, T., Aiyar, N., Guida, B., Douglas, S., and Giaid, A. (2006). Urotensin-II levels in acute coronary syndromes. *Int. J. Cardiol.* 108, 31–35.
- Jiang, T., Zhang, S., Lin, B., Meng, L., and Gao, H. (2005). [Expression and clinical significance of KISS-1 and GPR54 mRNA in endometrial carcinoma]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 27, 229–231.

-K-

- Kahsai, A.W., Xiao, K., Rajagopal, S., Ahn, S., Shukla, A.K., Sun, J., Oas, T.G., and Lefkowitz, R.J. (2011). Multiple ligand-specific conformations of the β 2-adrenergic receptor. *Nat. Chem. Biol.* 7, 692–700.
- Kalamarz-Kubiak, H., Ashkenazi, I.M., Kleszczynska, A., and Rosenfeld, H. (2014). Urotensin II inhibits arginine vasotocin and stimulates isotocin release from nerve endings in the pituitary of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *J. Exp. Zool. A Ecol. Genet. Physiol.* 321, 467–471.
- Kalatskaya, I., Schüssler, S., Blaukat, A., Müller-Esterl, W., Jochum, M., Proud, D., and Faussner, A. (2004). Mutation of Tyrosine in the Conserved NPXXY Sequence Leads to Constitutive Phosphorylation and Internalization, but Not Signaling, of the Human B2 Bradykinin Receptor. *J. Biol. Chem.* 279, 31268–31276.
- Kang, Y., Zhou, X.E., Gao, X., He, Y., Liu, W., Ishchenko, A., Barty, A., White, T.A., Yefanov, O., Han, G.W., et al. (2015). Crystal structure of rhodopsin bound to arrestin by femtosecond X-ray laser. *Nature* 523, 561–567.
- Kanno, T., Gotoh, A., Fujita, Y., Nakano, T., and Nishizaki, T. (2012). A(3) adenosine receptor mediates apoptosis in 5637 human bladder cancer cells by G(q) protein/PKC-dependent AIF upregulation. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 30, 1159–1168.
- van der Kant, R., and Vriend, G. (2014). Alpha-Bulges in G Protein-Coupled Receptors. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 7841–7864.
- Kasina, S., Scherle, P.A., Hall, C.L., and Macoska, J.A. (2009). ADAM-mediated amphiregulin shedding and EGFR transactivation. *Cell Prolif.* 42, 799–812.
- Katoh, H., Aoki, J., Yamaguchi, Y., Kitano, Y., Ichikawa, A., and Negishi, M. (1998). Constitutively Active G α 12, G α 13, and G α q Induce Rho-dependent Neurite Retraction through Different Signaling Pathways. *J. Biol. Chem.* 273, 28700–28707.
- Katritch, V., Cherezov, V., and Stevens, R.C. (2012). Diversity and Modularity of G Protein-Coupled Receptor Structures. *Trends Pharmacol. Sci.* 33, 17–27.
- Kaupmann, K., Malitschek, B., Schuler, V., Heid, J., Froestl, W., Beck, P., Mosbacher, J., Bischoff, S., Kulik, A., Shigemoto, R., et al. (1998). GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature* 396, 683–687.
- Kenakin, T. (1995). Agonist-receptor efficacy II: agonist trafficking of receptor signals. *Trends Pharmacol. Sci.* 16, 232–238.
- Kim, D.S.-K., Li, D.Y., Park, P.C., Abrol, D.R., Goddard, P.W.A., and III (2010). Prediction of the 3D structure for the rat urotensin II receptor and comparison of the antagonist

- binding sites and binding selectivity between human and rat from atomistic simulations. *ChemMedChem* 5, 1594–1608.
- Kim, J., Ahn, S., Rajagopal, K., and Lefkowitz, R.J. (2009). Independent beta-arrestin2 and Gq/protein kinase C pathways for ERK stimulated by angiotensin type 1A receptors in vascular smooth muscle cells converge on transactivation of the epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* 284, 11953–11962.
- Kinney, W.A., Almond, Jr H.R., Qi, J., Smith, C.E., Santulli, R.J., de Garavilla L., Andrade-Gordon, P., Cho, D.S., Everson, A.M., Feinstein, M.A., Leung, P.A., and Maryanoff, B.E. (2002). Structure-function analysis of urotensin II and its use in the construction of a ligand-receptor working model. *Angew. Chem.* 41, 2940–2944.
- Kobilka, B.K., Dixon, R.A., Frielle, T., Dohlman, H.G., Bolanowski, M.A., Sigal, I.S., Yang-Feng, T.L., Francke, U., Caron, M.G., and Lefkowitz, R.J. (1987). cDNA for the human beta 2-adrenergic receptor: a protein with multiple membrane-spanning domains and encoded by a gene whose chromosomal location is shared with that of the receptor for platelet-derived growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84, 46–50.
- Koch, W.J., Hawes, B.E., Allen, L.F., and Lefkowitz, R.J. (1994). Direct evidence that G-coupled receptor stimulation of mitogen-activated protein kinase is mediated by G beta gamma activation of p21ras. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 12706–12710.
- Koelle, M.R., and Horvitz, H.R. (1996). EGL-10 Regulates G Protein Signaling in the *C. elegans* Nervous System and Shares a Conserved Domain with Many Mammalian Proteins. *Cell* 84, 115–125.
- Kojima, M., Haruno, R., Nakazato, M., Date, Y., Murakami, N., Hanada, R., Matsuo, H., and Kangawa, K. (2000). Purification and identification of neuromedin U as an endogenous ligand for an orphan receptor GPR66 (FM3). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276, 435–438.
- Kolakowski, L.F. (1994). GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels* 2, 1–7.
- Kosugi, S., and Mori, T. (1994). The third exoplasmic loop of the thyrotropin receptor is partially involved in signal transduction. *FEBS Lett.* 349, 89–92.
- Kotani, M., Detheux, M., Vandenberghe, A., Communi, D., Vanderwinden, J.M., Le Poul, E., Brézillon, S., Tyldesley, R., Suarez-Huerta, N., Vandeput, F., et al. (2001). The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J. Biol. Chem.* 276, 34631–34636.
- Krasel, C., Bünemann, M., Lorenz, K., and Lohse, M.J. (2005). Beta-arrestin binding to the beta2-adrenergic receptor requires both receptor phosphorylation and receptor activation. *J. Biol. Chem.* 280, 9528–9535.
- Kristof, A.S., You, Z., Han, Y.S., and Giaid, A. (2010). Protein expression of urotensin II, urotensin-related peptide and their receptor in the lungs of patients with lymphangioleiomyomatosis. *Peptides* 31, 1511–1516.

- Krumm, B.E., and Grisshammer, R. (2015). Peptide ligand recognition by G protein-coupled receptors. *Exp. Pharmacol. Drug Discov.* *16*, 48.
- Kufareva, I., Stephens, B.S., Holden, L.G., Qin, L., Zhao, C., Kawamura, T., Abagyan, R., and Handel, T.M. (2014). Stoichiometry and geometry of the CXC chemokine receptor 4 complex with CXC ligand 12: molecular modeling and experimental validation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 5363–5372.
- Kumar, A., Kremer, K.N., Dominguez, D., Tadi, M., and Hedin, K.E. (2011). Gα13 and Rho mediate endosomal trafficking of CXCR4 into Rab11+ vesicles upon SDF-1 stimulation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *186*, 951–958.

-L-

- Labarrere, P., Chatenet, D., Leprince, J., Marionneau, C., Loirand, G., Tonon, M.C., Dubessy, C., Scalbert, E., Pfeiffer, B., Renard, P., Calas, B., Pacaud, P., and Vaudry, H. (2003). Structure-activity relationships of human urotensin II and related analogues on rat aortic ring contraction. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* *18*, 77–88.
- Lachance, M., Ethier, N., Wolbring, G., Schnetkamp, P.P., and Hébert, T.E. (1999). Stable association of G proteins with beta 2AR is independent of the state of receptor activation. *Cell. Signal.* *11*, 523–533.
- Lagerström, M.C., and Schiöth, H.B. (2008). Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* *7*, 339–357.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* *409*, 860–921.
- Langham, R.G., Kelly, D.J., Gow, R.M., Zhang, Y., Dowling, J.K., Thomson, N.M., Gilbert, R.E. (2004). Increased expression of urotensin II and urotensin II receptor in human diabetic nephropathy. *Am. J. Kidney Dis.* *44*, 826–831.
- Langley, J.N. (1905). On the reaction of cells and of nerve-endings to certain poisons, chiefly as regards the reaction of striated muscle to nicotine and to curari. *J. Physiol.* *33*, 374–413.
- Laporte, S.A., Oakley, R.H., Zhang, J., Holt, J.A., Ferguson, S.S.G., Caron, M.G., and Barak, L.S. (1999). The β2-adrenergic receptor/βarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *96*, 3712–3717.
- Lapp, H., Boerrigter, G., Costello-Boerrigter, L.C., Jaekel, K., Scheffold, T., Krakau, I., Schramm, M., Guelker, H., Stasch, J.P. (2004). Elevated plasma human urotensin-II-like immunoreactivity in ischemic cardiomyopathy. *Int. J. Cardiol.* *94*, 93–97.

- Lean, A.D., Stadel, J.M., and Lefkowitz, R.J. (1980). A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* 255, 7108–7117.
- Lecointre, C., Desrues, L., Joubert, J.E., Perzo, N., Guichet, P.-O., Le Joncour, V., Brulé, C., Chabbert, M., Leduc, R., Prézeau, L., et al. (2015). Signaling switch of the urotensin II vasosactive peptide GPCR: prototypic chemotaxic mechanism in glioma. *Oncogene* 34, 5080–5094.
- Lee, J.-H., and Welch, D.R. (1997). Identification of highly expressed genes in metastasis-suppressed chromosome 6/human malignant melanoma hybrid cells using subtractive hybridization and differential display. *Int. J. Cancer* 71, 1035–1044.
- Lee, D.K., Nguyen, T., O'Neill, G.P., Cheng, R., Liu, Y., Howard, A.D., Coulombe, N., Tan, C.P., Tang-Nguyen, A.-T., George, S.R., et al. (1999). Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Lett.* 446, 103–107.
- Lee, J.H., Miele, M.E., Hicks, D.J., Phillips, K.K., Trent, J.M., Weissman, B.E., and Welch, D.R. (1996). KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J. Natl. Cancer Inst.* 88, 1731–1737.
- Lee, J.Y., Moon, J.S., Eu, Y.-J., Lee, C.W., Yang, S.-T., Lee, S.K., Jung, H.H., Kim, H.H., Rhim, H., Seong, J.Y., et al. (2009). Molecular interaction between kisspeptin decapeptide analogs and a lipid membrane. *Arch. Biochem. Biophys.* 485, 109–114.
- Lee, C.Y., Tsai, Y.T., Loh, S.H., Liu, J.C., Chen, T.H., Chao, H.H., Cheng, T.H., and Chen, J.J. (2014). Urotensin II induces interleukin 8 expression in human umbilical vein endothelial cells. *PLoS One* 9:e90278.
- Lehner, U., Velic, A., Schroter, R., Schlatter, E., and Sindic, A. (2007). Ligands and signaling of the G-protein-coupled receptor GPR14, expressed in human kidney cells. *Cell Physiol. Biochem.* 20:181–192.
- Leloup, L., Shao, H., Bae, Y.H., Deasy, B., Stolz, D., Roy, P., and Wells, A. (2010). m-Calpain activation is regulated by its membrane localization and by its binding to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* 285, 33549–33566.
- Leonard, A.D., Thompson, J.P., Hutchinson, E.L., Young, S.P., McDonald, J., Swanevelder, J., and Lambert, D.G. (2009) Urotensin II receptor expression in human right atrium and aorta: effects of ischaemic heart disease. *Br. J. Anaesth.* 102:477–484.
- Leprince, J., Chatenet, D., Dubessy, C., Fournier, A., Pfeiffer, B., Scalbert, E., Renard, P., Pacaud, P., Oulyadi, H., Ségalas-Milazzo, I., et al. (2008). Structure-activity relationships of urotensin II and URP. *Peptides* 29, 658–673.
- Leserer, M., Gschwind, A., and Ullrich, A. (2000). Epidermal growth factor receptor signal transactivation. *IUBMB Life* 49, 405–409.

- Levoye, A., Balabanian, K., Baleux, F., Bachelier, F., and Lagane, B. (2009). CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling. *Blood* 113, 6085–6093.
- Li, B., Zhang, S., Zhang, H., Nu, W., Cai, L., Hertz, L., and Peng, L. (2008). Fluoxetine-mediated 5-HT_{2B} receptor stimulation in astrocytes causes EGF receptor transactivation and ERK phosphorylation. *Psychopharmacology (Berl.)* 201, 443–458.
- Li, Q., Roa, A., Clarke, I.J., and Smith, J.T. (2012). Seasonal variation in the gonadotropin-releasing hormone response to kisspeptin in sheep: possible kisspeptin regulation of the kisspeptin receptor. *Neuroendocrinology* 96, 212–221.
- Libert, F., Vassart, G., and Parmentier, M. (1991). Current developments in G-protein-coupled receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.* 3, 218–223.
- Lin, F.T., Krueger, K.M., Kendall, H.E., Daaka, Y., Fredericks, Z.L., Pitcher, J.A., and Lefkowitz, R.J. (1997). Clathrin-mediated endocytosis of the beta-adrenergic receptor is regulated by phosphorylation/dephosphorylation of beta-arrestin1. *J. Biol. Chem.* 272, 31051–31057.
- Lin, Y., Tsuchihashi, T., Matsumura, K., Abe, I., and Iida, M. (2003a). Central cardiovascular action of urotensin II in conscious rats. *J. Hypertens.* 21:159–165.
- Lin, Y., Tsuchihashi, T., Matsumura, K., Fukuhara, M., Ohya, Y., Fujii, K., and Iida, M. (2003b). Central cardiovascular action of urotensin II in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension Res.* 26:839–845.
- Lin, H., Sassano, M.F., Roth, B.L., and Shoichet, B.K. (2013). A pharmacological organization of G protein-coupled receptors. *Nat. Methods* 10, 140–146.
- Ling, K., Wang, P., Zhao, J., Wu, Y.-L., Cheng, Z.-J., Wu, G.-X., Hu, W., Ma, L., and Pei, G. (1999). Five-transmembrane domains appear sufficient for a G protein-coupled receptor: Functional five-transmembrane domain chemokine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 7922–7927.
- Little, P.J., Neylon, C.B., Tkachuk, V.A., and Bobik, A. (1992). Endothelin-1 and endothelin-3 stimulate calcium mobilization by different mechanisms in vascular smooth muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 183, 694–700.
- Liu, Q., Pong, S.S., Zeng, Z., Zhang, Q., Howard, A.D., Williams, D.L. Jr, Davidoff, M., Wang, R., Austin, C.P., McDonald, T.P., Bai, C., George, S.R., Evans, J.F., and Caskey, C.T. (1999). Identification of urotensin II as the endogenous ligand for the orphan G-protein-coupled receptor GPR14. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266:174–178.
- Liu, J.C., Chen, C.H., Chen, J.J., and Cheng, T.H. (2009). Urotensin II induces rat cardiomyocyte hypertrophy via the transient oxidization of Src homology 2-containing tyrosine phosphatase and transactivation of epidermal growth factor receptor. *Mol. Pharmacol.* 76, 1186–1195.

- Liu, J., Zhao, Y., Sun, Y., He, B., Yang, C., Svitkina, T., Goldman, Y.E., and Guo, W. (2012a). Exo70 stimulates the Arp2/3 complex for lamellipodia formation and directional cell migration. *Curr. Biol.* CB 22, 1510–1515.
- Liu, J.J., Horst, R., Katritch, V., Stevens, R.C., and Wüthrich, K. (2012b). Biased signaling pathways in β 2-adrenergic receptor characterized by 19F-NMR. *Science* 335, 1106–1110.
- Liu, P., Long, P., Huang, Y., Sun, F., and Wang, Z. (2016). CXCL12/CXCR4 axis induces proliferation and invasion in human endometrial cancer. *Am. J. Transl. Res.* 8, 1719–1729.
- Liu, Q., Pong, S.S., Zeng, Z., Zhang, Q., Howard, A.D., Williams, D.L., Davidoff, M., Wang, R., Austin, C.P., McDonald, T.P., et al. (1999). Identification of urotensin II as the endogenous ligand for the orphan G-protein-coupled receptor GPR14. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266, 174–178.
- Loetscher, M., Geiser, T., O'Reilly, T., Zwahlen, R., Baggiolini, M., and Moser, B. (1994). Cloning of a human seven-transmembrane domain receptor, LESTR, that is highly expressed in leukocytes. *J. Biol. Chem.* 269, 232–237.
- Logothetis, D.E., Kurachi, Y., Galper, J., Neer, E.J., and Clapham, D.E. (1987). The β subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K⁺ channel in heart. *Nature* 325, 321–326.
- Lohse, M.J., Benovic, J.L., Codina, J., Caron, M.G., and Lefkowitz, R.J. (1990). beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science* 248, 1547–1550.
- Lohse, M.J., Andexinger, S., Pitcher, J., Trukawinski, S., Codina, J., Faure, J.P., Caron, M.G., and Lefkowitz, R.J. (1992). Receptor-specific desensitization with purified proteins. Kinase dependence and receptor specificity of beta-arrestin and arrestin in the beta 2-adrenergic receptor and rhodopsin systems. *J. Biol. Chem.* 267, 8558–8564.
- Luo, X., Popov, S., Bera, A.K., Wilkie, T.M., and Muallem, S. (2001). RGS Proteins Provide Biochemical Control of Agonist-Evoked [Ca²⁺]_i Oscillations. *Mol. Cell* 7, 651–660.
- Luttrell, L.M. (2014). Minireview: More than just a hammer: ligand “bias” and pharmaceutical discovery. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 28, 281–294.
- Lutz, S., Freichel-Blomquist, A., Yang, Y., Rümenapp, U., Jakobs, K.H., Schmidt, M., and Wieland, T. (2005). The Guanine Nucleotide Exchange Factor p63RhoGEF, a Specific Link between Gq/11-coupled Receptor Signaling and RhoA. *J. Biol. Chem.* 280, 11134–11139.

-M-

- Ma, Q., Jones, D., Borghesani, P.R., Segal, R.A., Nagasawa, T., Kishimoto, T., Bronson, R.T., and Springer, T.A. (1998). Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 9448.
- Maghazachi, A.A. (1997). Role of the Heterotrimeric G Proteins in Stromal-Derived Factor-1 α -Induced Natural Killer Cell Chemotaxis and Calcium Mobilization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236, 270–274.
- Magnani, F., Shibata, Y., Serrano-Vega, M.J., and Tate, C.G. (2008). Co-evolving stability and conformational homogeneity of the human adenosine A2a receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 10744–10749.
- Maguire, J.J., Kuc, R.E., Kleinz, M.J., and Davenport, A.P. (2008). Immunocytochemical localization of the urotensin-II receptor, UT, to rat and human tissues: relevance to function. *Peptides* 29, 735–742.
- Maguire, J.J., Kuc, R.E., Wiley, K.E., Kleinz, M.J., and Davenport AP (2004) Cellular distribution of immunoreactive urotensin-II in human tissues with evidence of increased expression in atherosclerosis and a greater constrictor response of small compared to large coronary arteries. *Peptides* 25, 1767–1774.
- Manglik, A., Kruse, A.C., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Mathiesen, J.M., Sunahara, R.K., Pardo, L., Weis, W.I., Kobilka, B.K., and Granier, S. (2012). Crystal structure of the μ -opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature* 485, 321–326.
- Marchese, A., Heiber, M., Nguyen, T., Heng, H.H.Q., Saldivia, V.R., Cheng, R., Murphy, P.M., Tsui, L.-C., Shi, X., Gregor, P., et al. (1995). Cloning and Chromosomal Mapping of Three Novel Genes, GPR9, GPR10, and GPR14, Encoding Receptors Related to Interleukin 8, Neuropeptide Y, and Somatostatin Receptors. *Genomics* 29, 335–344.
- Marco, J., Egidio, E.M., Hernandez, R., and Silvestre, R.A. (2008). Evidence for endogenous urotensin-II as an inhibitor of insulin secretion. Study in the perfused rat pancreas. *Peptides* 29, 852–858.
- Marinissen, M.J., Servitja, J.-M., Offermanns, S., Simon, M.I., and Gutkind, J.S. (2003). Thrombin Protease-activated Receptor-1 Signals through Gq- and G13-initiated MAPK Cascades Regulating c-Jun Expression to Induce Cell Transformation. *J. Biol. Chem.* 278, 46814–46825.
- Martínez-Fuentes, A.J., Molina, M., Vázquez-Martínez, R., Gahete, M.D., Jiménez-Reina, L., Moreno-Fernández, J., Benito-López, P., Quintero, A., de la Riva, A., Diéguez, C., et al. (2011). Expression of functional KISS1 and KISS1R system is altered in human pituitary adenomas: evidence for apoptotic action of kisspeptin-10. *Eur. J. Endocrinol.* 164, 355–362.
- Masui, T., Doi, R., Mori, T., Toyoda, E., Koizumi, M., Kami, K., Ito, D., Peiper, S.C., Broach, J.R., Oishi, S., et al. (2004). Metastin and its variant forms suppress migration of pancreatic cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315, 85–92.

- Matsushita, M., Shichiri, M., Imai, T., Iwashina, M., Tanaka, H., Takasu, N., Hirata, Y. (2001). Co-expression of urotensin II and its receptor (GPR14) in human cardiovascular and renal tissues. *J. Hypertens.* *19*, 2185–2190.
- Matsushita, M., Shichiri, M., Fukai, N., Ozawa, N., Yoshimoto, T., Takasu, N., and Hirata, Y. (2003). Urotensin II is an autocrine/paracrine growth factor for the porcine renal epithelial cell line, LLCPK1. *Endocrinology* *144*, 1825–1831.
- McDonald, P.H., Chow, C.W., Miller, W.E., Laporte, S.A., Field, M.E., Lin, F.T., Davis, R.J., and Lefkowitz, R.J. (2000). Beta-arrestin 2: a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3. *Science* *290*, 1574–1577.
- Meunier, J.-C., Mollereau, C., Toll, L., Suaudeau, C., Moisand, C., Alvinerie, P., Butour, J.-L., Guillemot, J.-C., Ferrara, P., Monsarrat, B., et al. (1995). Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature* *377*, 532–535.
- Miura, S., and Karnik, S.S. (2002). Constitutive Activation of Angiotensin II Type 1 Receptor Alters the Orientation of Transmembrane Helix-2. *J. Biol. Chem.* *277*, 24299–24305.
- Miura, S., Zhang, J., Boros, J., and Karnik, S.S. (2003). TM2-TM7 Interaction in Coupling Movement of Transmembrane Helices to Activation of the Angiotensin II Type-1 Receptor. *J. Biol. Chem.* *278*, 3720–3725.
- Mona, C.E., Besserer-Offroy, É., Cabana, J., Lefrançois, M., Boulais, P.E., Lefebvre, M.-R., Leduc, R., Lavigne, P., Heveker, N., Marsault, É., et al. (2016). Structure–Activity Relationship and Signaling of New Chimeric CXCR4 Agonists. *J. Med. Chem.* *59*, 7512–7524.
- Moore, C.A.C., Milano, S.K., and Benovic, J.L. (2007). Regulation of Receptor Trafficking by GRKs and Arrestins. *Annu. Rev. Physiol.* *69*, 451–482.
- Moreira, I.S. (2014). Structural features of the G-protein/GPCR interactions. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* *1840*, 16–33.
- Mori, M., Sugo, T., Abe, M., Shimomura, Y., Kurihara, M., Kitada, C., Kikuchi, K., Shintani, Y., Kurokawa, T., Onda, H., et al. (1999). Urotensin II is the endogenous ligand of a G-protein-coupled orphan receptor, SENR (GPR14). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *265*, 123–129.
- Mori, N., Hirose, T., Nakayama, T., Ito, O., Kanazawa, M., Imai, Y., Kohzuki, M., Takahashi, K., and Totsune, K. (2009). Increased expression of urotensin II-related peptide and its receptor in kidney with hypertension or renal failure. *Peptides* *30*, 400–408.
- Morimoto, R., Satoh, F., Murakami, O., Totsune, K., Arai, Y., Suzuki, T., Sasano, H., Ito, S., and Takahashi, K. (2008). Immunolocalization of urotensin II and its receptor in human adrenal tumors and attached non-neoplastic adrenal tissues. *Peptides* *29*, 873–880.
- Muir, A.I., Chamberlain, L., Elshourbagy, N.A., Michalovich, D., Moore, D.J., Calamari, A., Szekeres, P.G., Sarau, H.M., Chambers, J.K., Murdock, P., et al. (2001). AXOR12, a

- Novel Human G Protein-coupled Receptor, Activated by the Peptide KiSS-1. *J. Biol. Chem.* 276, 28969–28975.
- Mukherjee, C., Caron, M.G., Coverstone, M., and Lefkowitz, R.J. (1975). Identification of adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptors in frog erythrocytes with (minus)-[3-H] alprenolol. *J. Biol. Chem.* 250, 4869–4876.
- Mukherjee, S., Palczewski, K., Gurevich, V., Benovic, J.L., Banga, J.P., and Hunzicker-Dunn, M. (1999). A direct role for arrestins in desensitization of the luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor in porcine ovarian follicular membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 493–498.
- N-
- Nagasawa, T., Kikutani, H., and Kishimoto, T. (1994). Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 2305.
- Nakayama, T., Hirose, T., Totsune, K., Mori, N., Maruyama, Y., Maejima, T., Minagawa, K., Morimoto, R., Asayama, K., Kikuya, M., Ohkubo, T., Hashimoto, J., Kohzuki, M., Takahashi, K., and Imai, Y. (2008). Increased gene expression of urotensin II-related peptide in the hearts of rats with congestive heart failure. *Peptides* 29, 801–808.
- Nanoff, C., and Stiles, G.L. (1993). Solubilization and Characterization of the A2-Adenosine Receptor. *J. Recept. Res.* 13, 961–973.
- Nathans, J., and Hogness, D.S. (1983). Isolation, sequence analysis, and intron-exon arrangement of the gene encoding bovine rhodopsin. *Cell* 34, 807–814.
- Navenot, J.-M., Fujii, N., and Peiper, S.C. (2009a). KiSS1 Metastasis Suppressor Gene Product Induces Suppression of Tyrosine Kinase Receptor Signaling to Akt, Tumor Necrosis Factor Family Ligand Expression, and Apoptosis. *Mol. Pharmacol.* 75, 1074–1083.
- Navenot, J.-M., Fujii, N., and Peiper, S.C. (2009b). Activation of Rho and Rho-Associated Kinase by GPR54 and KiSS1 Metastasis Suppressor Gene Product Induces Changes of Cell Morphology and Contributes to Apoptosis. *Mol. Pharmacol.* 75, 1300–1306.
- Niida, A., Wang, Z., Tomita, K., Oishi, S., Tamamura, H., Otaka, A., Navenot, J.-M., Broach, J.R., Peiper, S.C., and Fujii, N. (2006). Design and synthesis of downsized metastatin (45–54) analogs with maintenance of high GPR54 agonistic activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16, 134–137.
- Ng, L.L., Loke, I., O'Brien, R.J., Squire, I.B., and Davies, J.E. (2002). Plasma urotensin in human systolic heart failure. *Circulation* 106, 2877–2880.

- Nguyen, T.T., Letourneau, M., Chatenet, D., and Fournier, A. (2012). Presence of urotensin-II receptors at the cell nucleus: specific tissue distribution and hypoxia-induced modulation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *44*, 639–647.
- Niu, J., Huang, Y., and Zhang, L. (2015). CXCR4 silencing inhibits invasion and migration of human laryngeal cancer Hep-2 cells. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* *8*, 6255–6261.
- Nobles, K.N., Guan, Z., Xiao, K., Oas, T.G., and Lefkowitz, R.J. (2007). The active conformation of beta-arrestin1: direct evidence for the phosphate sensor in the N-domain and conformational differences in the active states of beta-arrestins1 and -2. *J. Biol. Chem.* *282*, 21370–21381.
- Nobles, K.N., Xiao, K., Ahn, S., Shukla, A.K., Lam, C.M., Rajagopal, S., Strachan, R.T., Huang, T.-Y., Bressler, E.A., Hara, M.R., et al. (2011). Distinct phosphorylation sites on the $\beta(2)$ -adrenergic receptor establish a barcode that encodes differential functions of β -arrestin. *Sci. Signal.* *4*, ra51.
- Noel, J.P., Hamm, H.E., and Sigler, P.B. (1993). The 2.2 Å crystal structure of transducin- α complexed with GTP gamma S. *Nature* *366*, 654–663.
- Nordstrom, K.J.V., Sallman Almen, M., Edstam, M.M., Fredriksson, R., and Schioth, H.B. (2011). Independent HHsearch, Needleman-Wunsch-Based, and Motif Analyses Reveal the Overall Hierarchy for Most of the G Protein-Coupled Receptor Families. *Mol. Biol. Evol.* *28*, 2471–2480.
- Nothacker, H.-P., Wang, Z., McNeill, A.M., Saito, Y., Merten, S., O’Dowd, B., Duckles, S.P., and Civelli, O. (1999). Identification of the natural ligand of an orphan G-protein-coupled receptor involved in the regulation of vasoconstriction. *Nat. Cell Biol.* *1*, 383–385.
- Nygaard, R., Zou, Y., Dror, R.O., Mildorf, T.J., Arlow, D.H., Manglik, A., Pan, A.C., Liu, C.W., Fung, J.J., Bokoch, M.P., et al. (2013). The Dynamic Process of β 2-Adrenergic Receptor Activation. *Cell* *152*, 532–542.

-O-

- Oakley, R.H., Laporte, S.A., Holt, J.A., Barak, L.S., and Caron, M.G. (1999). Association of β -Arrestin with G Protein-coupled Receptors during Clathrin-mediated Endocytosis Dictates the Profile of Receptor Resensitization. *J. Biol. Chem.* *274*, 32248–32257.
- Oakley, R.H., Laporte, S.A., Holt, J.A., Caron, M.G., and Barak, L.S. (2000). Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J. Biol. Chem.* *275*, 17201–17210.

- Oakley, R.H., Laporte, S.A., Holt, J.A., Barak, L.S., and Caron, M.G. (2001). Molecular Determinants Underlying the Formation of Stable Intracellular G Protein-coupled Receptor- β -Arrestin Complexes after Receptor Endocytosis*. *J. Biol. Chem.* *276*, 19452–19460.
- Oberlin, E., Amara, A., Bachelier, F., Bessia, C., Virelizier, J.L., Arenzana-Seisdedos, F., Schwartz, O., Heard, J.M., Clark-Lewis, I., Legler, D.F., et al. (1996). The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* *382*, 833–835.
- Ohtaki, T., Shintani, Y., Honda, S., Matsumoto, H., Hori, A., Kanehashi, K., Terao, Y., Kumano, S., Takatsu, Y., Masuda, Y., et al. (2001). Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* *411*, 613–617.
- Olbrich, T., Ziegler, E., Türk, G., Schubert, A., Emons, G., and Gründker, C. (2010). Kisspeptin-10 inhibits bone-directed migration of GPR54-positive breast cancer cells: Evidence for a dose-window effect. *Gynecol. Oncol.* *119*, 571–578.
- Oldham, W.M., and Hamm, H.E. (2008). Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 60–71.
- Oldham, W.M., Van Eps, N., Preininger, A.M., Hubbell, W.L., and Hamm, H.E. (2006). Mechanism of the receptor-catalyzed activation of heterotrimeric G proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *13*, 772–777.
- Onan, D., Hannan, R.D., and Thomas, W.G. (2004). Urotensin II: the old kid in town. *Trends Endocrinol. Metab.* *TEM 15*, 175–182.
- Onat, A.M., Pehlivan, Y., Turkbeyler, I.H., Demir, T., Kaplan, D.S., Ceribasi, A.O., Orkmez, M., Tutar, E., Taysi, S., Sayarlioglu, M., and Kisacik, B. (2013). Urotensin inhibition with palosuran could be a promising alternative in pulmonary arterial hypertension. *Inflammation* *36*, 405–412.
- Onat, A.M., Turkbeyler, I.H., Pehlivan, Y., Demir, T., Kaplan, D.S., Taysi, S., Ceribasi, A.O., Tutar, E., and Kisacik, B. (2012). The efficiency of a urotensin II antagonist in an experimental lung fibrosis model. *Inflammation*, *35*, 1138–1143.
- Opgaard, O.S., Nothacker, H.-P., Ehlert, F.J., and Krause, D.N. (2000). Human urotensin II mediates vasoconstriction via an increase in inositol phosphates. *Eur. J. Pharmacol.* *406*, 265–271.

-P-

- Palczewski, K., Buczyłko, J., Kaplan, M.W., Polans, A.S., and Crabb, J.W. (1991). Mechanism of rhodopsin kinase activation. *J. Biol. Chem.* *266*, 12949–12955.
- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C.A., Motoshima, H., Fox, B.A., Trong, I.L., Teller, D.C., Okada, T., Stenkamp, R.E., et al. (2000). Crystal Structure of Rhodopsin: A G Protein-Coupled Receptor. *Science* *289*, 739–745.
- Pampillo, M., Camuso, N., Taylor, J.E., Szereszewski, J.M., Ahow, M.R., Zajac, M., Millar, R.P., Bhattacharya, M., and Babwah, A.V. (2009). Regulation of GPR54 Signaling by GRK2 and β -Arrestin. *Mol. Endocrinol.* *23*, 2060–2074.
- Parmentier, C., Hameury, E., Dubessy, C., Quan, F.B., Habert, D., Calas, A., Vaudry, H., Lihmann, I., and Tostivint, H. (2011). Occurrence of two distinct urotensin II-related peptides in zebrafish provides new insight into the evolutionary history of the urotensin II gene family. *Endocrinology* *152*, 2330–2341.
- Park, C.H., Lee, J.H., Lee, M.Y., Lee, J.H., Lee, B.H., and Oh, K.-S. (2016). A novel role of G protein-coupled receptor kinase 5 in urotensin II-stimulated cellular hypertrophy in H9c2UT cells. *Mol. Cell. Biochem.* *422*, 151–160.
- Park, J.H., Scheerer, P., Hofmann, K.P., Choe, H.-W., and Ernst, O.P. (2008). Crystal structure of the ligand-free G-protein-coupled receptor opsin. *Nature* *454*, 183–187.
- Parker, M.S., Wong, Y.Y., and Parker, S.L. (2008). An ion-responsive motif in the second transmembrane segment of rhodopsin-like receptors. *Amino Acids* *35*, 1–15.
- Patacchini, R., Santicioli, P., Giuliani, S., Grieco, P., Novellino, E., Rovero, P., and Maggi, C.A. (2003). Urantide: an ultrapotent urotensin II antagonist peptide in the rat aorta. *Br. J. Pharmacol.* *140*, 1155–1158.
- Pearson, D., Shively, J.E., Clark, B.R., Geschwind, I.I., Barkley, M., Nishioka, R.S., and Bern, H.A. (1980). Urotensin II: a somatostatin-like peptide in the caudal neurosecretory system of fishes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *77*, 5021–5024.
- Pehlivan, Y., Dokuyucu, R., Demir, T., Kaplan, D.S., Koc, I., Orkmez, M., Turkbeyler, I.H., Ceribasi, A.O., Tutar, E., Taysi, S., Kisacik, B., and Onat, A.M. (2014). Palosuran treatment effective as bosentan in the treatment model of pulmonary arterial hypertension. *Inflammation* *37*, 1280–1288.
- Pelé, J., Abdi, H., Moreau, M., Thybert, D., and Chabbert, M. (2011). Multidimensional Scaling Reveals the Main Evolutionary Pathways of Class A G-Protein-Coupled Receptors. *PLoS ONE* *6*, e19094.
- Pelletier, G., Lihmann, I., and Vaudry, H. (2002). Role of androgens in the regulation of urotensin II precursor mRNA expression in the rat brainstem and spinal cord. *Neuroscience* *115*, 525–532.
- Peng, S.-B., Zhang, X., Paul, D., Kays, L.M., Ye, M., Vaillancourt, P., Dowless, M., Stancato, L.F., Stewart, J., Uhlik, M.T., et al. (2016). Inhibition of CXCR4 by LY2624587, a

- Fully Humanized Anti-CXCR4 Antibody Induces Apoptosis of Hematologic Malignancies. *PloS One* *11*, e0150585.
- Perez-Aguilar, J.M., Shan, J., LeVine, M.V., Khelashvili, G., and Weinstein, H. (2014). A Functional Selectivity Mechanism at the Serotonin-2A GPCR Involves Ligand-Dependent Conformations of Intracellular Loop 2. *J. Am. Chem. Soc.* *136*, 16044–16054.
- Perkins, T.D., Bansal, S., and Barlow, D.J. (1990). Molecular modelling and design of analogues of the peptide hormone urotensin II. *Biochem. Soc. transactions* *18*, 918–919.
- Perlman, J.H., Wang, W., Nussenzveig, D.R., and Gershengorn, M.C. (1995). A Disulfide Bond between Conserved Extracellular Cysteines in the Thyrotropin-releasing Hormone Receptor Is Critical for Binding. *J. Biol. Chem.* *270*, 24682–24685.
- Peterson, F.C., Thorpe, J.A., Harder, A.G., Volkman, B.F., and Schwarze, S.R. (2006). Structural determinants involved in the regulation of CXCL14/BRAK expression by the 26 S proteasome. *J. Mol. Biol.* *363*, 813–822.
- Petrie, R.J., Doyle, A.D., and Yamada, K.M. (2009). Random versus directionally persistent cell migration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 538–549.
- Phillips, W.J., and Cerione, R.A. (1992). Rhodopsin/transducin interactions. I. Characterization of the binding of the transducin-beta gamma subunit complex to rhodopsin using fluorescence spectroscopy. *J. Biol. Chem.* *267*, 17032–17039.
- Pin, J.-P., Kniazeff, J., Goudet, C., Bessis, A.-S., Liu, J., Galvez, T., Acher, F., Rondard, P., and Prézeau, L. (2004). The activation mechanism of class-C G-protein coupled receptors. *Biol. Cell* *96*, 335–342.
- Pinilla, L., Aguilar, E., Dieguez, C., Millar, R.P., and Tena-Sempere, M. (2012). Kisspeptins and Reproduction: Physiological Roles and Regulatory Mechanisms. *Physiol. Rev.* *92*, 1235–1316.
- Pitcher, J.A., Inglese, J., Higgins, J.B., Arriza, J.L., Casey, P.J., Kim, C., Benovic, J.L., Kwatra, M.M., Caron, M.G., and Lefkowitz, R.J. (1992). Role of beta gamma subunits of G proteins in targeting the beta-adrenergic receptor kinase to membrane-bound receptors. *Science* *257*, 1264–1267.
- Pozzobon, T., Goldoni, G., Viola, A., and Molon, B. (2016). CXCR4 signaling in health and disease. *Immunol. Lett.* *177*, 6–15.
- Pradhan, A.A., Perroy, J., Walwyn, W.M., Smith, M.L., Vicente-Sanchez, A., Segura, L., Bana, A., Kieffer, B.L., and Evans, C.J. (2016). Agonist-Specific Recruitment of Arrestin Isoforms Differentially Modify Delta Opioid Receptor Function. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *36*, 3541–3551.
- Preininger, A.M., Van Eps, N., Yu, N.-J., Medkova, M., Hubbell, W.L., and Hamm, H.E. (2003). The myristoylated amino terminus of Galpha(i)(1) plays a critical role in the

- structure and function of Galpha(i)(1) subunits in solution. *Biochemistry (Mosc.)* 42, 7931–7941.
- Prenzel, N., Zwick, E., Daub, H., Leserer, M., Abraham, R., Wallasch, C., and Ullrich, A. (1999). EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature* 402, 884–888.
- Prioleau, C., Visiers, I., Ebersole, B.J., Weinstein, H., and Sealfon, S.C. (2002). Conserved Helix 7 Tyrosine Acts as a Multistate Conformational Switch in the 5HT_{2C} Receptor. Identification of a novel “locked-on” phenotype and double reversant mutations. *J. Biol. Chem.* 277, 36577–36584.
- Prosser, H.C., Forster, M.E., Richards, A.M., Pemberton, C.J. (2008). Urotensin II and urotensin II-related peptide (URP) in cardiac ischemia-reperfusion injury. *Peptides* 29, 770–777.
- Proulx, C.D., Simaan, M., Escher, E., Laporte, S.A., Guillemette, G., and Leduc, R. (2005). Involvement of a cytoplasmic-tail serine cluster in urotensin II receptor internalization. *Biochem. J.* 385, 115–123.
- Proulx, C.D., Holleran, B.J., Lavigne, P., Escher, E., Guillemette, G., and Leduc, R. (2008a). Biological properties and functional determinants of the urotensin II receptor. *Peptides* 29, 691–699.
- Proulx, C.D., Holleran, B.J., Boucard, A.A., Escher, E., Guillemette, G., and Leduc, R. (2008b). Mutational Analysis of the Conserved Asp2.50 and ERY Motif Reveals Signaling Bias of the Urotensin II Receptor. *Mol. Pharmacol.* 74, 552–561.

-Q-

- Qi, J., Du, J., Tang, X., Li, J., Wei, B., Tang, C. (2004) The upregulation of endothelial nitric oxide synthase and urotensin-II is associated with pulmonary hypertension and vascular diseases in rats produced by aortocaval shunting. *Heart and vessels.* 19, 81-88.
- Qi, J.S., Schulingkamp, R., Parry, T.J., Colburn, R., Stone, D., Haertlein, B., Minor, L.K., Andrade-Gordon, P., Damiano, B.P. (2007) Urotensin-II induces ear flushing in rats. *Br. J. Pharmacol.* 150, 415–423.
- Qiu, F., Li, Y., Fu, Q., Fan, Y.-Y., Zhu, C., Liu, Y.-H., and Mi, W.-D. (2016). Stromal Cell-Derived Factor 1 Increases Tetrodotoxin-Resistant Sodium Currents Nav1.8 and Nav1.9 in Rat Dorsal Root Ganglion Neurons via Different Mechanisms. *Neurochem. Res.* 41, 1587–1603.

Quoyer, J., Janz, J.M., Luo, J., Ren, Y., Armando, S., Lukashova, V., Benovic, J.L., Carlson, K.E., Hunt, S.W., and Bouvier, M. (2013). Pepducin targeting the C-X-C chemokine receptor type 4 acts as a biased agonist favoring activation of the inhibitory G protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, E5088-97.

-R-

Raehal, K.M., Walker, J.K.L., and Bohn, L.M. (2005). Morphine Side Effects in β -Arrestin 2 Knockout Mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 314, 1195–1201.

Rakowski, E., Hassan, G.S., Dhanak, D., Ohlstein, E.H., Douglas, S.A., Giaid, A. (2005) A role for urotensin II in restenosis following balloon angioplasty: use of a selective UT receptor blocker. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 39, 785–791.

Rask-Andersen, M., Almén, M.S., and Schiöth, H.B. (2011). Trends in the exploitation of novel drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* 10, 579–590.

Rasmussen, S.G., Jensen, A.D., Liapakis, G., Ghanouni, P., Javitch, J.A., and Gether, U. (1999). Mutation of a highly conserved aspartic acid in the beta2 adrenergic receptor: constitutive activation, structural instability, and conformational rearrangement of transmembrane segment 6. *Mol. Pharmacol.* 56, 175–184.

Rasmussen, S.G.F., Choi, H.-J., Rosenbaum, D.M., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Edwards, P.C., Burghammer, M., Ratnala, V.R.P., Sanishvili, R., Fischetti, R.F., et al. (2007). Crystal structure of the human β 2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 450, 383–387.

Rasmussen, S.G.F., DeVree, B.T., Zou, Y., Kruse, A.C., Chung, K.Y., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Chae, P.S., Pardon, E., Calinski, D., et al. (2011). Crystal structure of the β 2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* 477, 549–555.

Reis, R.I., Santos, E.L., Pesquero, J.B., Oliveira, L., Schanstra, J.P., Bascands, J.-L., Pecher, C., Paiva, A.C.M., and Costa-Neto, C.M. (2007). Participation of transmembrane proline 82 in angiotensin II AT1 receptor signal transduction. *Regul. Pept.* 140, 32–36.

Ren, X.-R., Reiter, E., Ahn, S., Kim, J., Chen, W., and Lefkowitz, R.J. (2005). Different G protein-coupled receptor kinases govern G protein and beta-arrestin-mediated signaling of V2 vasopressin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 1448–1453.

Rey, J., Deville, J., and Chabbert, M. (2010). Structural determinants stabilizing helical distortions related to proline. *J. Struct. Biol.* 171, 266–276.

Richards, A.M., Nicholls, M.G., Lainchbury, J.G., Fisher, S., Yandle, T.G. (2002) Plasma urotensin II in heart failure. *Lancet* 360, 545–546.

- Romanova, E.V., Sasaki, K., Alexeeva, V., Vilim, F.S., Jing, J., Richmond, T.A., Weiss, K.R., Sweedler, J.V. (2012) Urotensin II in invertebrates: from structure to function in *Aplysia californica*. *PLoS one* 7:e48764.
- Rosenbaum, D.M., Rasmussen, S.G.F., and Kobilka, B.K. (2009). The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* 459, 356–363.
- Rosenbaum, D.M., Zhang, C., Lyons, J., Holl, R., Aragao, D., Arlow, D.H., Rasmussen, S.G.F., Choi, H.-J., DeVree, B.T., Sunahara, R.K., et al. (2011). Structure and Function of an Irreversible Agonist- β 2 Adrenoceptor complex. *Nature* 469, 236–240.
- Roseweir, A.K., Katz, A.A., and Millar, R.P. (2012). Kisspeptin-10 inhibits cell migration in vitro via a receptor-GSK3 beta-FAK feedback loop in HTR8SVneo cells. *Placenta* 33, 408–415.
- Ross, E.M., and Wilkie, T.M. (2000). GTPase-Activating Proteins for Heterotrimeric G Proteins: Regulators of G Protein Signaling (RGS) and RGS-Like Proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 795–827.
- Ross, B., McKendry, K., and Giaid, A. (2010). Role of urotensin II in health and disease. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 298, R1156-1172.
- Rossowski, W.J., Cheng, B.-L., Taylor, J.E., Datta, R., and Coy, D.H. (2002). Human urotensin II-induced aorta ring contractions are mediated by protein kinase C, tyrosine kinases and Rho-kinase: inhibition by somatostatin receptor antagonists. *Eur. J. Pharmacol.* 438, 159–170.
- Roussos, E.T., Condeelis, J.S., and Patsialou, A. (2011). Chemotaxis in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 11, 573–587.
- Roy, A.A., Nunn, C., Ming, H., Zou, M.-X., Penninger, J., Kirshenbaum, L.A., Dixon, S.J., and Chidiac, P. (2006). Up-regulation of endogenous RGS2 mediates cross-desensitization between Gs and Gq signaling in osteoblasts. *J. Biol. Chem.* 281, 32684–32693.
- Rubin, J.B. (2009). Chemokine Signaling in Cancer: One Hump or Two? *Semin. Cancer Biol.* 19, 116.
- Russell, F.D., Molenaar, P., O'Brien, D.M. (2001) Cardiostimulant effects of urotensin-II in human heart in vitro. *Br. J. Pharmacol.* 132, 5–9.
- Russell, F.D., Meyers, D., Galbraith, A.J., Bett, N., Toth, I., Kearns, P., Molenaar, P. (2003) Elevated plasma levels of human urotensin-II immunoreactivity in congestive heart failure. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 285, H1576–1581.
- Russell, F.D., Molenaar, P. (2004) Investigation of signaling pathways that mediate the inotropic effect of urotensin-II in human heart. *Cardiovasc. Res.* 63, 673–681.

Ryu, E.K., Kim, T.G., Kwon, T.H., Jung, I.D., Ryu, D., Park, Y.-M., Kim, J., Ahn, K.H., and Ban, C. (2007). Crystal structure of recombinant human stromal cell-derived factor-1 α . *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 67, 1193–1197.

-S-

Sainsily, X., Cabana, J., Boulais, P.E., Holleran, B.J., Escher, E., Lavigne, P., and Leduc, R. (2013). Identification of transmembrane domain 3, 4 & 5 residues that contribute to the formation of the ligand-binding pocket of the urotensin-II receptor. *Biochem. Pharmacol.* 86, 1584–1593.

Sainsily, X., Cabana, J., Holleran, B.J., Escher, E., Lavigne, P., and Leduc, R. (2014). Identification of transmembrane domain 1 & 2 residues that contribute to the formation of the ligand-binding pocket of the urotensin-II receptor. *Biochem. Pharmacol.* 92, 280–288.

Sánchez-Fernández, G., Cabezudo, S., García-Hoz, C., Tobin, A.B., Mayor, F., and Ribas, C. (2013). ERK5 activation by Gq-coupled muscarinic receptors is independent of receptor internalization and β -arrestin recruitment. *PloS One* 8, e84174.

Saulière, A., Bellot, M., Paris, H., Denis, C., Finana, F., Hansen, J.T., Altié, M.-F., Seguelas, M.-H., Pathak, A., Hansen, J.L., et al. (2012). Deciphering biased-agonism complexity reveals a new active AT1 receptor entity. *Nat. Chem. Biol.* 8, 622–630.

Sauzeau, V., Le Mellionec, E., Bertoglio, J., Scalbert, E., Pacaud, P., and Loirand, G. (2001). Human urotensin II-induced contraction and arterial smooth muscle cell proliferation are mediated by RhoA and Rho-kinase. *Circ. Res.* 88, 1102–1104.

Savarese, T.M., Wang, C.D., and Fraser, C.M. (1992). Site-directed mutagenesis of the rat m1 muscarinic acetylcholine receptor. Role of conserved cysteines in receptor function. *J. Biol. Chem.* 267, 11439–11448.

Scheerer, P., Park, J.H., Hildebrand, P.W., Kim, Y.J., Krauss, N., Choe, H.-W., Hofmann, K.P., and Ernst, O.P. (2008). Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation. *Nature* 455, 497–502.

Schoots, O., Wilson, J.M., Ethier, N., Bigras, E., Hebert, T.E., and Van Tol, H.H. (1999). Co-expression of human Kir3 subunits can yield channels with different functional properties. *Cell. Signal.* 11, 871–883.

Segain, J.-P., Rolli-Derkinderen, M., Gervois, N., Raingeard de la Blétière, D., Loirand, G., and Pacaud, P. (2007). Urotensin II is a new chemotactic factor for UT receptor-expressing monocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 179, 901–909.

- Shan, J., Weinstein, H., and Mehler, E.L. (2010). Probing the Structural Determinants for the Function of Intracellular Loop 2 in Structurally Cognate G-Protein-Coupled Receptors. *Biochemistry (Mosc.)* 49, 10691–10701.
- Shao, H., Chou, J., Baty, C.J., Burke, N.A., Watkins, S.C., Stolz, D.B., and Wells, A. (2006). Spatial localization of m-calpain to the plasma membrane by phosphoinositide biphosphate binding during epidermal growth factor receptor-mediated activation. *Mol. Cell. Biol.* 26, 5481–5496.
- Shapiro, D.A., Kristiansen, K., Weiner, D.M., Kroeze, W.K., and Roth, B.L. (2002). Evidence for a Model of Agonist-induced Activation of 5-Hydroxytryptamine 2A Serotonin Receptors That Involves the Disruption of a Strong Ionic Interaction between Helices 3 and 6. *J. Biol. Chem.* 277, 11441–11449.
- Shenouda, A., Douglas, S.A., Ohlstein, E.H., Giaid, A. (2002) Localization of urotensin-II immunoreactivity in normal human kidneys and renal carcinoma. *J. Histochem. Cytochem.* 50, 885–889.
- Shi, L., Liapakis, G., Xu, R., Guarnieri, F., Ballesteros, J.A., and Javitch, J.A. (2002a). β 2 Adrenergic Receptor Activation modulation of the proline kink in transmembrane 6 by a rotamer toggle switch. *J. Biol. Chem.* 277, 40989–40996.
- Shi, L., Liapakis, G., Xu, R., Guarnieri, F., Ballesteros, J.A., and Javitch, J.A. (2002b). Beta2 adrenergic receptor activation. Modulation of the proline kink in transmembrane 6 by a rotamer toggle switch. *J. Biol. Chem.* 277, 40989–40996.
- Shimamura, T., Shiroishi, M., Weyand, S., Tsujimoto, H., Winter, G., Katritch, V., Abagyan, R., Cherezov, V., Liu, W., Han, G.W., et al. (2011). Structure of the human histamine H1 receptor complex with doxepin. *Nature* 475, 65–70.
- Shin, R., Welch, D.R., Mishra, V.K., Nash, K.T., Hurst, D.R., and Krishna, N.R. (2009). Nuclear magnetic resonance and circular dichroism study of metastin (Kisspeptin-54) structure in solution. *Clin. Exp. Metastasis* 26, 527–533.
- Shukla, A.K., Manglik, A., Kruse, A.C., Xiao, K., Reis, R.I., Tseng, W.-C., Staus, D.P., Hilger, D., Uysal, S., Huang, L.-Y., et al. (2013). Structure of active β -arrestin-1 bound to a G-protein-coupled receptor phosphopeptide. *Nature* 497, 137–141.
- Shukla, A.K., Westfield, G.H., Xiao, K., Reis, R.I., Huang, L.-Y., Tripathi-Shukla, P., Qian, J., Li, S., Blanc, A., Oleskie, A.N., et al. (2014). Visualization of arrestin recruitment by a G-protein-coupled receptor. *Nature* 512, 218–222.
- Sidharta, P.N., Wagner, F.D., Bohnemeier, H., Jungnik, A., Halabi, A., Krahenbuhl, S., Chadha-Boreham, H., Dingemans, J. (2006) Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the urotensin II receptor antagonist palosuran in macroalbuminuric, diabetic patients. *Clin. Pharmacol. Ther.* 80, 246–256.
- Silvestre, R.A., Egido, E.M., Hernandez, R., Leprince, J., Chatenet, D., Tollemer, H., Chartrel, N., Vaudry, H., Marco, J. (2004) Urotensin-II is present in pancreatic extracts and inhibits insulin release in the perfused rat pancreas. *Eur. J. Endocrinol.*

151:803-809.

- Simon, M.I., Strathmann, M.P., and Gautam, N. (1991). Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* 252, 802–808.
- Smith, H., Whittall, C., Weksler, B., and Middleton, J. (2012). Chemokines stimulate bidirectional migration of human mesenchymal stem cells across bone marrow endothelial cells. *Stem Cells Dev.* 21, 476–486.
- Song, W., McDonald, J., Camarda, V., Calo, G., Guerrini, R., Marzola, E., Thompson, J.P., Rowbotham, D.J., and Lambert, D.G. (2006). Cell and tissue responses of a range of Urotensin II analogs at cloned and native urotensin II receptors. Evidence for coupling promiscuity. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 373, 148–157.
- Sprang, S.R. (1997). G protein mechanisms: Insights from Structural Analysis. *Annu. Rev. Biochem.* 66, 639–678.
- Srivastava, A., Gupta, B., Gupta, C., and Shukla, A.K. (2015). Emerging Functional Divergence of β -Arrestin Isoforms in GPCR Function. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* 26, 628–642.
- Standfuss, J., Edwards, P.C., D'Antona, A., Fransen, M., Xie, G., Oprian, D.D., and Schertler, G.F.X. (2011). The structural basis of agonist-induced activation in constitutively active rhodopsin. *Nature* 471, 656–660.
- Stathaki, M., Armakolas, A., Dimakakos, A., Kaklamanis, L., Vlachos, I., Konstantoulakis, M.M., Zografos, G., and Koutsilieris, M. (2014). Kisspeptin effect on endothelial monocyte activating polypeptide II (EMAP-II)-associated lymphocyte cell death and metastases in colorectal cancer patients. *Mol. Med. Camb. Mass* 20, 80–92.
- Steen, A., Thiele, S., Guo, D., Hansen, L.S., Frimurer, T.M., and Rosenkilde, M.M. (2013). Biased and constitutive signaling in the CC-chemokine receptor CCR5 by manipulating the interface between transmembrane helices 6 and 7. *J. Biol. Chem.* 288, 12511–12521.
- Sue, Y.M., Chen, C.H., Hsu, Y.H., Hou, C.C., Cheng, C.Y., Chen, Y.C., Lin, S.L., Chen, T.W., Chen, T.H. (2009) Urotensin II induces transactivation of the epidermal growth factor receptor via transient oxidation of SHP-2 in the rat renal tubular cell line NRK-52E. *Growth factors* 27, 155–162.
- Sugo, T., Mori, M. (2008) Another ligand fishing for G protein-coupled receptor 14. Discovery of urotensin II-related peptide in the rat brain. *Peptides* 29, 809–812.
- Sugo, T., Murakami, Y., Shimomura, Y., Harada, M., Abe, M., Ishibashi, Y., Kitada, C., Miyajima, N., Suzuki, N., Mori, M., Fujino, M. (2003) Identification of urotensin II-related peptide as the urotensin II-immunoreactive molecule in the rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310, 860–868.

Sun, Y., Cheng, Z., Ma, L., and Pei, G. (2002). β -Arrestin2 Is Critically Involved in CXCR4-mediated Chemotaxis, and This Is Mediated by Its Enhancement of p38 MAPK Activation. *J. Biol. Chem.* 277, 49212–49219.

Szerezewski, J.M., Pampillo, M., Ahow, M.R., Offermanns, S., Bhattacharya, M., and Babwah, A.V. (2010). GPR54 Regulates ERK1/2 Activity and Hypothalamic Gene Expression in a $G\alpha q/11$ and β -Arrestin-Dependent Manner. *Plos One* 5, e12964.

-T-

Tal, M., Ammar, D.A., Karpuj, M., Krizhanovsky, V., Naim, M., and Thompson, D.A. (1995). A Novel Putative Neuropeptide Receptor Expressed in Neural Tissue, Including Sensory Epithelia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 209, 752–759.

Tan, K., Cho, S.-G., Luo, W., Yi, T., Wu, X., Siwko, S., Liu, M., and Yuan, W. (2014). KiSS1-induced GPR54 signaling inhibits breast cancer cell migration and epithelial-mesenchymal transition via protein kinase D1. *Curr. Mol. Med.* 14, 652–662.

Tan, Q., Zhu, Y., Li, J., Chen, Z., Han, G.W., Kufareva, I., Li, T., Ma, L., Fenalti, G., Li, J., et al. (2013). Structure of the CCR5 chemokine receptor-HIV entry inhibitor maraviroc complex. *Science* 341, 1387–1390.

Tan, W., Martin, D., and Gutkind, J.S. (2006). The $G\alpha_{13}$ -Rho Signaling Axis Is Required for SDF-1-induced Migration through CXCR4. *J. Biol. Chem.* 281, 39542–39549.

Tang, X., Wang, Y., Li, D., Luo, J., and Liu, M. (2012). Orphan G protein-coupled receptors (GPCRs): biological functions and potential drug targets. *Acta Pharmacol. Sin.* 33, 363–371.

Tang, X., Jin, R., Qu, G., Wang, X., Li, Z., Yuan, Z., Zhao, C., Siwko, S., Shi, T., Wang, P., et al. (2013). GPR116, an adhesion G-protein-coupled receptor, promotes breast cancer metastasis via the $G\alpha_q$ -p63RhoGEF-Rho GTPase pathway. *Cancer Res.* 73, 6206–6218.

Tashiro, K., Tada, H., Heilker, R., Shirozu, M., Nakano, T., and Honjo, T. (1993). Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. *Science* 261, 600–603.

Tautermann, C.S. (2014). GPCR structures in drug design, emerging opportunities with new structures. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24, 4073–4079.

Taylor, J.M., and Neubig, R.R. (1994). Peptides as probes for G protein signal transduction. *Cell. Signal.* 6, 841–849.

- Taylor, J.M., Jacob-Mosier, G.G., Lawton, R.G., Remmers, A.E., and Neubig, R.R. (1994). Binding of an alpha 2 adrenergic receptor third intracellular loop peptide to G beta and the amino terminus of G alpha. *J. Biol. Chem.* *269*, 27618–27624.
- Tehan, B.G., Bortolato, A., Blaney, F.E., Weir, M.P., and Mason, J.S. (2014). Unifying family A GPCR theories of activation. *Pharmacol. Ther.* *143*, 51–60.
- Tesmer, J.J., Berman, D.M., Gilman, A.G., and Sprang, S.R. (1997). Structure of RGS4 bound to AIF4--activated G(i alpha1): stabilization of the transition state for GTP hydrolysis. *Cell* *89*, 251–261.
- Thomas, M.N., Kalnins, A., Andrassy, M., Wagner, A., Klussmann, S., Rentsch, M., Habicht, A., Pratschke, S., Stangl, M., Bazhin, A.V., et al. (2015). SDF-1/CXCR4/CXCR7 is pivotal for vascular smooth muscle cell proliferation and chronic allograft vasculopathy. *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.* *28*, 1426–1435.
- Thompson, J.P., Watt, P., Sanghavi, S., Strupish, J.W., Lambert, D.G. (2003) A comparison of cerebrospinal fluid and plasma urotensin II concentrations in normotensive and hypertensive patients undergoing urological surgery during spinal anesthesia: a pilot study. *Anesth. Analg.* *97*, 1501–1503.
- Thomsen, A.R.B., Plouffe, B., Cahill, T.J., Shukla, A.K., Tarrasch, J.T., Dosey, A.M., Kahsai, A.W., Strachan, R.T., Pani, B., Mahoney, J.P., et al. (2016). GPCR-G Protein-β-Arrestin Super-Complex Mediates Sustained G Protein Signaling. *Cell* *166*, 907–919.
- Tostivint, H., Lihrmann, I., Vaudry, H. (2006) [Urotensin II and somatostatin: two old cousins get together again]. *Medecine sciences* *22*, 476–478.
- Totsune, K., Takahashi, K., Arihara, Z., Sone, M., Ito, S., Murakami, O. (2003) Increased plasma urotensin II levels in patients with diabetes mellitus. *Clin. Sci.* *104*, 1–5.
- Totsune, K., Takahashi, K., Arihara, Z., Sone, M., Murakami, O., Ito, S., Kikuya, M., Ohkubo, T., Hashimoto, J., Imai, Y. (2004) Elevated plasma levels of immunoreactive urotensin II and its increased urinary excretion in patients with Type 2 diabetes mellitus: association with progress of diabetic nephropathy. *Peptides* *25*, 1809–1814.
- Totsune, K., Takahashi, K., Arihara, Z., Sone, M., Satoh, F., Ito, S., Kimura, Y., Sasano, H., Murakami, O. (2001) Role of urotensin II in patients on dialysis. *Lancet* *358*, 810–811.
- Trebicka, J., Leifeld, L., Hennenberg, M., Biecker, E., Eckhardt, A., Fischer, N., Probsting, A.S., Clemens, C., Lammert, F., Sauerbruch, T., Heller, J. (2008) Hemodynamic effects of urotensin II and its specific receptor antagonist palosuran in cirrhotic rats. *Hepatology* *47*, 1264–1276.
- Tripathi, A., Davis, J.D., Staren, D.M., Volkman, B.F., and Majetschak, M. (2014). CXC chemokine receptor 4 signaling upon co-activation with stromal cell-derived factor-1α and ubiquitin. *Cytokine* *65*, 121–125.

- Trzaskowski, B., Latek, D., Yuan, S., Ghoshdastider, U., Debinski, A., and Filipek, S. (2012). Action of Molecular Switches in GPCRs - Theoretical and Experimental Studies. *Curr. Med. Chem.* *19*, 1090–1109.
- Tsai, C.S., Loh, S.H., Liu, J.C., Lin, J.W., Chen, Y.L., Chen, C.H., Cheng, T.H. (2009) Urotensin II-induced endothelin-1 expression and cell proliferation via epidermal growth factor receptor transactivation in rat aortic smooth muscle cells. *Atherosclerosis* *206*, 86–94.
- Tzanidis, A., Hannan, R.D., Thomas, W.G., Onan, D., Autelitano, D.J., See, F., Kelly, D.J., Gilbert, R.E., and Krum, H. (2003). Direct actions of urotensin II on the heart: implications for cardiac fibrosis and hypertrophy. *Circ. Res.* *93*, 246–253.

-U-

- Uchi, Y., Takeuchi, H., Matsuda, S., Saikawa, Y., Kawakubo, H., Wada, N., Takahashi, T., Nakamura, R., Fukuda, K., Omori, T., et al. (2016). CXCL12 expression promotes esophageal squamous cell carcinoma proliferation and worsens the prognosis. *BMC Cancer* *16*, 514.

-V-

- van Unen, J., Reinhard, N.R., Yin, T., Wu, Y.I., Postma, M., Gadella, T.W.J., and Goedhart, J. (2015). Plasma membrane restricted RhoGEF activity is sufficient for RhoA-mediated actin polymerization. *Sci. Rep.* *5*, 14693.
- Veldkamp, C.T., Peterson, F.C., Pelzek, A.J., and Volkman, B.F. (2005). The monomer-dimer equilibrium of stromal cell-derived factor-1 (CXCL 12) is altered by pH, phosphate, sulfate, and heparin. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* *14*, 1071–1081.
- Veldkamp, C.T., Seibert, C., Peterson, F.C., De la Cruz, N.B., Haugner, J.C., Basnet, H., Sakmar, T.P., and Volkman, B.F. (2008). Structural Basis of CXCR4 Sulfotyrosine Recognition by the Chemokine SDF-1/CXCL12. *Sci. Signal.* *1*, ra4-ra4.
- Venkatakrishnan, A.J., Deupi, X., Lebon, G., Tate, C.G., Schertler, G.F., and Babu, M.M. (2013). Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature* *494*, 185–194.
- Vergura, R., Camarda, V., Rizzi, A., Spagnol, M., Guerrini, R., Calo', G., Salvadori, S., and Regoli, D. (2004). Urotensin II stimulates plasma extravasation in mice via UT receptor activation. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* *370*, 347–352.

- Vila-Coro, A.J., Rodríguez-Frade, J.M., Ana, A.M.D., Moreno-Ortíz, M.C., Martínez-A, C., and Mellado, M. (1999). The chemokine SDF-1 α triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway. *FASEB J.* 13, 1699–1710.
- Viola, A., and Luster, A.D. (2008). Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 48, 171–197.
- Violin, J.D., and Lefkowitz, R.J. (2007). β -Arrestin-biased ligands at seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 28, 416–422.
- Violin, J.D., DeWire, S.M., Yamashita, D., Rominger, D.H., Nguyen, L., Schiller, K., Whalen, E.J., Gowen, M., and Lark, M.W. (2010). Selectively Engaging β -Arrestins at the Angiotensin II Type 1 Receptor Reduces Blood Pressure and Increases Cardiac Performance. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 335, 572–579.
- Visiers, I., Ballesteros, J.A., and Weinstein, H. (2002). Three-dimensional representations of G protein-coupled receptor structures and mechanisms. *Methods Enzymol.* 343, 329–371.
- Vogt, S., Grosse, R., Schultz, G., and Offermanns, S. (2003). Receptor-dependent RhoA activation in G12/G13-deficient cells genetic evidence for an involvement of Gq/G11. *J. Biol. Chem.* 278, 28743–28749.
- Voigt, P., Brock, C., Nürnberg, B., and Schaefer, M. (2005). Assigning Functional Domains within the p101 Regulatory Subunit of Phosphoinositide 3-Kinase γ . *J. Biol. Chem.* 280, 5121–5127.

-W-

- Wacker, J.L., Feller, D.B., Tang, X.-B., DeFino, M.C., Namkung, Y., Lyssand, J.S., Mhyre, A.J., Tan, X., Jensen, J.B., and Hague, C. (2008). Disease-causing Mutation in GPR54 Reveals the Importance of the Second Intracellular Loop for Class A G-protein-coupled Receptor Function. *J. Biol. Chem.* 283, 31068–31078.
- Wall, M.A., Coleman, D.E., Lee, E., Iñiguez-Lluhi, J.A., Posner, B.A., Gilman, A.G., and Sprang, S.R. (1995). The structure of the G protein heterotrimer $G\alpha_1\beta_1\gamma_2$. *Cell* 83, 1047–1058.
- Walsh, T.G., Harper, M.T., and Poole, A.W. (2015). SDF-1 α is a novel autocrine activator of platelets operating through its receptor CXCR4. *Cell. Signal.* 27, 37–46.
- Wang, T., Pentylala, S., Elliott, J.T., Dowal, L., Gupta, E., Rebecchi, M.J., and Scarlata, S. (1999). Selective interaction of the C2 domains of phospholipase C-beta1 and -beta2 with activated Galphaq subunits: an alternative function for C2-signaling modules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 7843–7846.

- Wang, H., Dong, K., Xue, X., Feng, P., Wang, X. (2011) Elevated expression of urotensin II and its receptor in diethylnitrosamine-mediated precancerous lesions in rat liver. *Peptides* 32, 382–387.
- Wang, H.X., Zeng, X.J., Liu, Y., Wang, J., Lu, L.Q., Hao, G., Zhang, L.K., Tang, C.S. (2009) Elevated expression of urotensin II and its receptor in skeletal muscle of diabetic mouse. *Regul. Pept.* 154:85–90.
- Warne, T., Serrano-Vega, M.J., Baker, J.G., Moukhametzianov, R., Edwards, P.C., Henderson, R., Leslie, A.G.W., Tate, C.G., and Schertler, G.F.X. (2008). Structure of a β 1-adrenergic G protein-coupled receptor. *Nature* 454, 486–491.
- Watanabe, T., Pakala, R., Katagiri, T., Benedict, C.R. (2001) Synergistic effect of urotensin II with serotonin on vascular smooth muscle cell proliferation. *J. Hypertens.* 19, 2191–2196.
- Webb, D.J., Donais, K., Whitmore, L.A., Thomas, S.M., Turner, C.E., Parsons, J.T., and Horwitz, A.F. (2004). FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat. Cell Biol.* 6, 154–161.
- Weber, M., Tome, L., Otzen, D., and Schneider, D. (2012). A Ser residue influences the structure and stability of a Pro-kinked transmembrane helix dimer. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1818, 2103–2107.
- Wei, H., Ahn, S., Shenoy, S.K., Karnik, S.S., Hunyady, L., Luttrell, L.M., and Lefkowitz, R.J. (2003). Independent beta-arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 10782–10787.
- Wei, L., Zhang, B., Cao, W., Xing, H., Yu, X., and Zhu, D. (2015). Inhibition of CXCL12/CXCR4 suppresses pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation and cell cycle progression via PI3K/Akt pathway under hypoxia. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 35, 329–339.
- Wescott, M.P., Kufareva, I., Paes, C., Goodman, J.R., Thaker, Y., Puffer, B.A., Berdugo, E., Rucker, J.B., Handel, T.M., and Doranz, B.J. (2016). Signal transmission through the CXC chemokine receptor 4 (CXCR4) transmembrane helices. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 9928–9933.
- Wettschureck, N., and Offermanns, S. (2005). Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol. Rev.* 85, 1159–1204.
- White, C.D., Coetsee, M., Morgan, K., Flanagan, C.A., Millar, R.P., and Lu, Z.-L. (2008). A crucial role for Galphaq/11, but not Galphai/o or Galphas, in gonadotropin-releasing hormone receptor-mediated cell growth inhibition. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 22, 2520–2530.
- Williams, R.S., and Lefkowitz, R.J. (1978). Alpha-adrenergic receptors in rat myocardium. Identification by binding of [3H]dihydroergocryptine. *Circ. Res.* 43, 721–727.

- Wittpoth, C., Scholich, K., Yigzaw, Y., Stringfield, T.M., and Patel, T.B. (1999). Regions on adenylyl cyclase that are necessary for inhibition of activity by beta gamma and G(ialpha) subunits of heterotrimeric G proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 9551–9556.
- Wolfe, B.L., and Trejo, J. (2007). Clathrin-Dependent Mechanisms of G Protein-coupled Receptor Endocytosis. *Traffic* *8*, 462–470.
- Wu, B., Chien, E.Y.T., Mol, C.D., Fenalti, G., Liu, W., Katritch, V., Abagyan, R., Brooun, A., Wells, P., Bi, F.C., et al. (2010). Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science* *330*, 1066–1071.

-X-

- Xiao, K., Shenoy, S.K., Nobles, K., and Lefkowitz, R.J. (2004). Activation-dependent conformational changes in {beta}-arrestin 2. *J. Biol. Chem.* *279*, 55744–55753.
- Xiao, Z., Zhang, N., Murphy, D.B., and Devreotes, P.N. (1997). Dynamic distribution of chemoattractant receptors in living cells during chemotaxis and persistent stimulation. *J. Cell Biol.* *139*, 365–374.
- Xu, H., Partilla, J.S., Wang, X., Rutherford, J.M., Tidgewell, K., Prisinzano, T.E., Bohn, L.M., and Rothman, R.B. (2007). A comparison of noninternalizing (herkinorin) and internalizing (DAMGO) μ -opioid agonists on cellular markers related to opioid tolerance and dependence. *Synapse* *61*, 166–175.
- Xu, S., Jiang, H., Wu, B., Yang, J., Chen, S. (2009) Urotensin II induces migration of endothelial progenitor cells via activation of the RhoA/Rho kinase pathway. *The Tohoku J. Exp. Med.* *219*, 283–288.
- Xu, S., Wen, H., Jiang, H. (2012) Urotensin II promotes the proliferation of endothelial progenitor cells through p38 and p44/42 MAPK activation. *Mol. Med. Rep.* *6*, 197–200.
- Xu, X., Zeng, W., Popov, S., Berman, D.M., Davignon, I., Yu, K., Yowe, D., Offermanns, S., Muallem, S., and Wilkie, T.M. (1999). RGS Proteins Determine Signaling Specificity of Gq-coupled Receptors. *J. Biol. Chem.* *274*, 3549–3556.

-Y-

- Yagi, H., Tan, W., Dillenburg-Pilla, P., Armando, S., Amornphimoltham, P., Simaan, M., Weigert, R., Molinolo, A.A., Bouvier, M., and Gutkind, J.S. (2011). A Synthetic

- Biology Approach Reveals a CXCR4-G13-Rho Signaling Axis Driving Transendothelial Migration of Metastatic Breast Cancer Cells. *Sci. Signal.* 4, ra60.
- Yamauchi, J., Nagao, M., Kaziro, Y., and Itoh, H. (1997). Activation of p38 Mitogen-activated Protein Kinase by Signaling through G Protein-coupled Receptors INVOLVEMENT OF G $\beta\gamma$ AND G $\alpha_q/11$ SUBUNITS. *J. Biol. Chem.* 272, 27771–27777.
- Yi, K., Yu, M., Wu, L., Tan, X. (2012) Effects of urotensin II on functional activity of late endothelial progenitor cells. *Peptides* 33, 87–91.
- Yohannan, S., Faham, S., Yang, D., Whitelegge, J.P., and Bowie, J.U. (2004). The evolution of transmembrane helix kinks and the structural diversity of G protein-coupled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 959–963.
- Yuan, W., Guo, Y.-Q., Li, X.-Y., Deng, M.-Z., Shen, Z.-H., Bo, C.-B., Dai, Y.-F., Huang, M.-Y., Yang, Z.-Y., Quan, Y.-S., et al. (2016). MicroRNA-126 inhibits colon cancer cell proliferation and invasion by targeting the chemokine (C-X-C motif) receptor 4 and Ras homolog gene family, member A, signaling pathway. *Oncotarget*.
- Yulis, C.R., Lederis, K. (1986) Extraurophyseal distribution of urotensin II immunoreactive neuronal perikarya and their processes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 7079–7083.

-Z-

- Zajac, M., Law, J., Cvetkovic, D.D., Pampillo, M., McColl, L., Pape, C., Di Guglielmo, G.M., Postovit, L.M., Babwah, A.V., and Bhattacharya, M. (2011). GPR54 (KISS1R) Transactivates EGFR to Promote Breast Cancer Cell Invasiveness. *PLoS ONE* 6, e21599.
- Zeng, Z.P., Liu, G.Q., Li, H.Z., Fan, X.R., Liu, D.M., Tong, A.L., Zheng, X., Liu, C. (2006) The effects of urotensin-II on proliferation of pheochromocytoma cells and mRNA expression of urotensin-II and its receptor in pheochromocytoma tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1073, 284–289.
- Zhang, F.L., and Casey, P.J. (1996). Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annu. Rev. Biochem.* 65, 241–269.
- Zhang, L., Wang, X., Cao, H., Chen, Y., Chen, X., Zhao, X., Xu, F., Wang, Y., Woo, A.Y.-H., and Zhu, W. (2016). Vasopressin V1A receptor mediates cell proliferation through GRK2-EGFR-ERK1/2 pathway in A7r5 cells. *Eur. J. Pharmacol.* 792, 15–25.
- Zhang, Y., Ying, J., Jiang, D., Chang, Z., Li, H., Zhang, G., Gong, S., Jiang, X., and Tao, J. (2015). Urotensin-II receptor stimulation of cardiac L-type Ca²⁺ channels requires the

- $\beta\gamma$ subunits of Gi/o-protein and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent protein kinase C $\beta 1$ isoform. *J. Biol. Chem.* *290*, 8644–8655.
- Zhang, Y.G., Li, J., Li, Y.G., Wei, R.H. (2008b) Urotensin II induces phenotypic differentiation, migration, and collagen synthesis of adventitial fibroblasts from rat aorta. *J. Hypertens.* *26*, 1119–1126.
- Zhang, W.X., Liang, Y.F., Wang, X.M., Nie, Y., Chong, L., Lin, L., Chen, C., Li, C.C (2012) Urotensin upregulates transforming growth factor-beta1 expression of asthma airway through ERK-dependent pathway. *-364*, 291–298.
- Zheng, H., Pearsall, E.A., Hurst, D.P., Zhang, Y., Chu, J., Zhou, Y., Reggio, P.H., Loh, H.H., and Law, P.-Y. (2012). Palmitoylation and membrane cholesterol stabilize μ -opioid receptor homodimerization and G protein coupling. *BMC Cell Biol.* *13*, 6.
- Zhou, H., and Tai, H.H. (2000). Expression and functional characterization of mutant human CXCR4 in insect cells: role of cysteinyl and negatively charged residues in ligand binding. *Arch. Biochem. Biophys.* *373*, 211–217.
- Zhou, H., Yang, J., Xin, T., Zhang, T., Hu, S., Zhou, S., Chen, G., and Chen, Y. (2015). Exendin-4 enhances the migration of adipose-derived stem cells to neonatal rat ventricular cardiomyocyte-derived conditioned medium via the phosphoinositide 3-kinase/Akt-stromal cell-derived factor-1 α /CXC chemokine receptor 4 pathway. *Mol. Med. Rep.* *11*, 4063–4072.
- Zhou, Y., Sondek, J., and Harden, T.K. (2008). Activation of human phospholipase C- $\epsilon 2$ by Gbetagamma. *Biochemistry (Mosc.)* *47*, 4410–4417.
- Ziarek, J.J., Getschman, A.E., Butler, S.J., Taleski, D., Stephens, B., Kufareva, I., Handel, T.M., Payne, R.J., and Volkman, B.F. (2013). Sulfopeptide probes of the CXCR4/CXCL12 interface reveal oligomer-specific contacts and chemokine allostery. *ACS Chem. Biol.* *8*, 1955–1963.
- Ziegler, E., Olbrich, T., Emons, G., and Gründker, C. (2013). Antiproliferative effects of kisspeptin-10 depend on artificial GPR54 (KISS1R) expression levels. *Oncol. Rep.* *29*, 549–554.
- Ziltener, P., Mueller, C., Haenig, B., Scherz, M.W., and Nayler, O. (2002). Urotensin II Mediates Erk1/2 Phosphorylation and Proliferation in Gpr14-Transfected Cell Lines. *J. Recept. Signal Transduct.* *22*, 155–168.
- Zimmerman, B., Beautrait, A., Aguila, B., Charles, R., Escher, E., Claing, A., Bouvier, M., and Laporte, S.A. (2012). Differential β -arrestin-dependent conformational signaling and cellular responses revealed by angiotensin analogs. *Sci. Signal.* *5*, ra33.
- Zou, Y.-R., Kottmann, A.H., Kuroda, M., Taniuchi, I., and Littman, D.R. (1998). Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* *393*, 595–599.