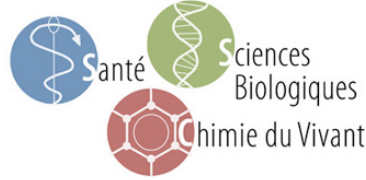




ECOLE DOCTORALE SSBCV



**Année 2017-2018 - Demande d'allocation doctorale
ED Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant (SSBCV) n°549**

1. Informations administratives :

Nom de l'encadrant responsable de la thèse : Pascale CREPIEUX
Unité : UMR PRC 7247 - INRA Centre Val de Loire
Equipe (*si unité multi-équipes*): Biologie et Bioinformatique des Systèmes de Signalisation
Filière de rattachement : D
Email de l'encadrant : Pascale.Crepieux@inra.fr
Co-encadrant éventuel (NB : limité à 1 seul co-encadrant(e)) : Gilles BRUNEAU

2. Titre de la thèse :

Modulation de la dynamique conformationnelle du récepteur de la FSH à l'aide d'intrabodies et conséquences fonctionnelles

3. Résumé :

Contexte- Les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) sont des récepteurs membranaires impliqués dans toutes les fonctions physiologiques. Notre équipe étudie tout particulièrement le fonctionnement du récepteur de l'hormone folliculo-stimulante FSH (RFSH), un GPCR impliqué dans le contrôle de la reproduction, et cible thérapeutique privilégiée en assistance médicale à la procréation. Les données les plus récentes sur le mode d'activation des GPCR indiquent que l'interaction aux protéines transductrices G et β -arrestines stabilise l'une des multiples conformations induites par leur ligand. Il est possible de figer l'une ou l'autre de ces conformations activées à l'aide d'anticorps intracellulaires (intrabodies ou Ibs). C'est ainsi que l'utilisation d'Ibs a été déterminante pour élucider leur structure tridimensionnelle active (Rasmussen *et al.*, 2011, *Nature*, **469**, 175). Dans ce contexte, le projet de thèse que nous proposons consistera à isoler des Ibs dirigés contre le RFSH, et à caractériser leur impact fonctionnel sur le réseau de signalisation du RFSH et sa régulation.

Avancées scientifiques attendues- 1/ En immobilisant certaines conformations du RFSH activé, il devrait être possible de moduler les propriétés dynamiques du réseau de signalisation qu'il induit. Par exemple, le masquage de certains sites de phosphorylation du RFSH devrait affecter la dynamique d'activation des MAP kinases ERK, comme nos travaux antérieurs le suggèrent (Heitzler, *et al.*, 2012, *Mol. Syst. Biol.*, **8**, 590). 2/ Des Ibs fusionnés à GFP devraient permettre de déterminer le trafic intracellulaire du RFSH en temps réel.

Résumé du programme de recherche-

- sur la base des abondantes données de la littérature, création d'un mutant du RFSH constitutivement actif

-sélection des Ibs à partir d'une banque de V_{HH} (ou nanobodies, fragments d'anticorps simple chaîne) issue d'un lama immunisé par des membranes de cellules exprimant le RFSH humain. Confirmation de la liaison par ELISA

- analyse fonctionnelle par expression transitoire en cellules HEK293 : effet de l'Ibs sur les principales voies de signalisation du RFSH (AMPC, recrutement des β -arrestines, activation des MAP kinases ERK, de la p70S6K, etc), par BRET et HTRF

- effet des Ibs sur la désensibilisation et l'internalisation du RFSH. Suivi du RFSH internalisé à l'aide d'un Ib-GFP, par imagerie.

- mesure de l'affinité par interférométrie, peptide mapping et docking *in silico* (Bourquard *et al.*, 2014, *Sci. Rep.*, **5**, 10760) pour l'identification précise des épitopes.

- contrôle précis du niveau d'expression des Ibs en cellule HEK293 à l'aide d'un plasmide d'expression inductible (pMDC-Dual), afin de caractériser la dynamique temporelle d'activation des voies classiques de signalisation FSH. Un modèle dynamique sera élaboré par les modélisateurs de l'équipe BIOS pour confronter les hypothèses de modulation du signal par les Ibs aux données d'activation des voies de signalisation en temps réel dont nous disposons. Ce modèle sera également mis à l'épreuve dans des cellules de Sertoli en culture primaire.

Faisabilité- Nous disposons déjà de la banque de phage et de tous les équipements requis. Le projet sera financé grâce au projet GPCRAb2 (programme ARD Biomédicaments de la Région Centre).

Résultats attendus- Ce projet permettra de préciser les relations entre une conformation active du RFSH et son activité ou sa régulation. Il devrait donner lieu à 3 publications : 1/ Identification et caractérisation fonctionnelle des Ibs anti-RFSH, 2/ Trafic intracellulaire du RFSH en lignée et en cellule de Sertoli en temps réel, 3/ Conséquences de l'expression inductible d'un Ib sur la cinétique d'activation des principales voies de signalisation FSH, incluant un modèle dynamique.

De plus, seul le domaine extracellulaire de liaison à l'hormone et la région charnière du RFSH sont cristallisés, en complexe avec la FSH (Jiang *et al.*, 2013, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **109**, 12491). Des Ibs devraient stabiliser certains changements conformationnels du RFSH à des fins d'analyse structurale (en collaboration avec X. Jiang). A plus long terme, il pourrait être possible d'introduire un Ib d'intérêt dans la cellule de Sertoli à l'aide d'un peptide pénétrant, dans la perspective d'applications futures chez l'animal (ex : augmentation du rendement spermatique, retard de l'âge de la puberté).

4. Résumé en anglais :

Control of the conformational dynamics of the follicle-stimulating hormone receptor with intrabodies and functional consequences

Background- G protein-coupled receptors (GPCRs) are membrane receptors involved in most physiological functions. Our studies focus on the follicle-stimulating hormone receptor (FSHR), a GPCR involved in reproduction, and is a prominent therapeutic target in medically-assisted procreation. Recent advance on GPCR action indicate that their interaction with transducers such as G proteins and β -arrestins stabilize one out of multiple conformations upon ligand binding. It is possible to immobilize one or the other of these activated conformations with intracellular antibodies (intrabodies or Ibs). Accordingly, Ibs have been instrumental in deciphering the 3D structure of several active GPCRs (Rasmussen *et al.*, 2011, *Nature*, **469**, 175). In this context, the thesis project that we propose will be dedicated to the isolation of anti-FSHR Ibs, and to the characterization of their functional impact on FSHR regulation and induced signaling network.

Expected scientific advance- 1/ By freezing some conformations of the activated FSHR, it should be possible to modulate the dynamic properties of the signaling network this receptor induces. For example, masking some of the phosphorylation sites of the FSHR is

expected to affect the activation dynamics of the ERK MAP kinases, as our previous results suggest (Heitzler, Durand *et al.*, 2012, *Mol. Syst. Biol.*, **8**, 590). 2/ Ibs fused to GFP should permit to track the FSHR intracellular traffic in real time.

Research program-

- based on an abundant literature on the subject, a constitutively active FSHR will be created

-selection of Ibs from a library of V_{HH} (nanobodies, fragments of single-chain antibodies) derived from a lama immunized by membranes of cells expressing the human FSHR. Binding will be confirmed by ELISA.

- functional analysis following transient expression of the Ibs in HEK293 cells: effect of Ibs on the main RFSH signaling pathways (cAMP, β -arrestin recruitment, ERK MAP kinases activation, p70S6K activation, etc), by BRET and HTRF

- effect of Ibs on FSHR desensitization and internalization. Imaging of the intracellular trafficking of internalized FSHR with an Ib-GFP.

- affinity measurement by interferometry, peptide mapping and *in silico* docking (Bourquard *et al.*, 2014, *Sci. Rep.*, **5**, 10760) for a precise epitope determination.

- precise control of the Ib expression level in HEK293 cells with an inducible expression plasmid (pMDC-Dual), to characterize the temporal dynamic of activation of the main RFSH signaling pathways. A dynamic mathematical model will be elaborated by the computer scientists of our group to compare hypotheses of signaling modulation generated by the Ibs to the real-time signaling data that we have obtained. This model will also be challenged in primary Sertoli cells.

Feasibility- We already have the phage library and all the equipments required to achieve this project. This project will be financially supported by the GPCRAb2 project (program ARD Biomédicaments of Région Centre).

Expected results- This project will contribute to determine the relationships between FSHR active conformations and its signaling and regulation. It should produce 3 publications: 1/ Identification and functional characterization of anti-RFSH Ibs, 2/ FSHR intracellular trafficking in real-time, in HEK293 cells and in primary Sertoli cells, 3/ Consequences of Ib inducible expression on the kinetics of the main RFSH signaling pathways, including a dynamic model.

In addition, only the extra-cellular domain and the hinge region of the FSHR coupled to FSH have been cristallized so far (Jiang *et al.*, 2013, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **109**, 12491). Ibs should stabilize some conformations of the activated FSHR amenable for structural analyses by X-ray cristallography (in collaboration with X Jiang). Finally, it should become possible to transduce interesting Ibs into Sertoli cells with penetrating peptides, for *in vivo* applications in animal (increase in sperm yield, onset of puberty delay, etc).