

Université de Montréal

**Rôle du GPR91 dans la réponse à l'hypoxie-ischémie et
l'importance de sa localisation intracellulaire**

par

David Hamel

Département de Pharmacologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor (Ph.D.)
en Pharmacologie

Août 2013

© David Hamel, 2013

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

**Rôle du GPR91 dans la réponse à l'hypoxie-ischémie et
l'importance de sa localisation intracellulaire**

présentée par:

David Hamel

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Jean-François Gauchat
Président-rapporteur

Dr Sylvain Chemtob
Directeur de recherche

Dr Jean-Philippe Gratton
Membre du jury

Dre Danielle Jacques
Examinatrice externe

Dr Angelo Calderone
Représentant du doyen

Résumé

L'adaptation à l'environnement est essentielle à la survie cellulaire et des organismes en général. La capacité d'adaptation aux variations en oxygène repose sur des mécanismes de détection de l'hypoxie et une capacité à répondre en amorçant un programme d'angiogenèse. Bien que la contribution du facteur induit par l'hypoxie (HIF) est bien définie dans l'induction d'une telle réponse, d'autres mécanismes sont susceptibles d'être impliqués. Dans cette optique, les études démontrant l'influence du métabolisme énergétique sur le développement vasculaire sont de plus en plus nombreuses. L'un de ces composés, le succinate, a récemment été démontré comme étant le ligand du GPR91, un récepteur couplé aux protéines G. Parmi les différents rôles attribués à ce récepteur, notre laboratoire s'intéressa aux rôles du GPR91 dans la revascularisation observée suite à des situations d'hypoxie dont ceux affectant la rétine. Il existe cependant d'autres conditions pour lesquelles une revascularisation serait bénéfique notamment suite à un stress hypoxique-ischémique cérébral. Nos travaux ont pour objectifs de mieux comprendre le rôle et le fonctionnement de ce récepteur durant le développement et dans le cadre de pathologies affectant la formation de vaisseaux sanguins.

Dans un premier temps, nous avons déterminé le rôle du GPR91 dans la guérison suite à un stress hypoxique-ischémique cérébral chez le nouveau-né. Nous montrons que ce récepteur est exprimé dans le cerveau et en utilisant des souris n'exprimant pas le GPR91, nous démontrons que dans un modèle d'hypoxie-ischémie cérébrale néonatal l'angiogenèse prenant place au cours de la phase de guérison dépend largement du récepteur. L'injection intracérébrale de succinate induit également l'expression de nombreux facteurs proangiogéniques et les résultats suggèrent que le GPR91 contrôle la production de ces facteurs. De plus, l'injection de ce métabolite avant le modèle d'hypoxie-ischémie réduit substantiellement la taille de l'infarctus. *In vitro*, des essais de transcription génique démontrent qu'à la fois les neurones et les astrocytes répondent au succinate en induisant l'expression de facteurs bénéfiques à la revascularisation.

En considérant le rôle physiologique important du GPR91, une seconde étude a été entreprise afin de comprendre les déterminants moléculaires régissant son activité. Bien que la localisation subcellulaire des RCPG ait traditionnellement été considérée comme étant la membrane plasmique, un nombre de publications indique la présence de ces récepteurs à l'intérieur de la cellule. En effet, tel qu'observé par microscopie confocale, le récepteur colocalise avec plusieurs marqueurs du réticulum endoplasmique, que celui-ci soit exprimé de façon endogène ou transfecté transitoirement. De plus, l'activation des gènes par stimulation avec le succinate est fortement affectée en présence d'inhibiteur du transport d'acides organiques. Nous montrons que le profil de facteurs angiogéniques est influencé selon la localisation ce qui affecte directement l'organisation du réseau tubulaire *ex vivo*. Finalement, nous avons identifié une région conservée du GPR91 qui agit de signal de rétention. De plus, nous avons découvert l'effet de l'hypoxie sur la localisation.

Ces travaux confirment le rôle de régulateur maître de l'angiogenèse du GPR91 lors d'accumulation de succinate en condition hypoxique et démontrent pour la première fois l'existence, et l'importance, d'un récepteur intracellulaire activé par un intermédiaire du métabolisme. Ces données pavent donc la voie à une nouvelle avenue de traitement ciblant GPR91 dans des pathologies hypoxiques ischémiques cérébrales et soulèvent l'importance de tenir compte de la localisation subcellulaire de la cible dans le processus de découverte du médicament.

Mots-clés : récepteurs couplés aux protéines G, métabolisme énergétique, succinate, GPR91, angiogenèse, facteurs de croissance, ischémie-hypoxie cérébrale, cycle de Krebs, récepteurs intracellulaires

Abstract

The ability to adapt to the changing environment is essential for the survival of cells and organisms in general. The capacity to adjust to variations in oxygen content not only relies on the ability to sense hypoxia but also depends the time required to induce an angiogenic process. Notwithstanding the important contribution of the hypoxia inducible factor (HIF) in this response, other mechanisms are likely to be involved. Studies that have demonstrated the influence of metabolic compounds on vascular development are increasingly abundant. One of those compounds, succinate, has recently been indentified as the ligand of GPR91, a G-protein-coupled receptor. Amongst the roles of this receptor, our group has been interested in determining its contribution in revascularisation observed following hypoxic events in the retina. Other pathological conditions could benefit from the contribution of GPR91 including cerebral hypoxia-ischemia. Our objective is to better understand the role of this receptor during development and in pathological conditions affecting blood vessel formation.

We first, determined the role of GPR91 in revascularisation following cerebral hypoxia-ischemia in the newborn. We show the expression of the receptor in the cerebral cortex. Using mice devoid of GPR91, we demonstrate that angiogenesis normally taking place during the recovery phase is largely dependent upon GPR91. Intracerebral injection of succinate induces the expression of several proangiogenic growth factors by activating GPR91. Furthermore, injection of succinate before cerebral H-I model substantially reduces the infarct size. In vitro, gene transcription shows that neurons and astrocytes respond to succinate and produce factors beneficial to revascularisation.

Considering the important physiological role of GPR91, a second study was initiated to better determine the molecular determinants controlling the receptor's activity. The plasma membrane has classically been considered the typical GPCR's location of action but several new publications indicate the presence of such receptors within the cell. We observe, by confocal microscopy, the colocalisation of GPR91 (endogenous or transfected) with several marker of the endoplasmic reticulum. In addition, the gene induction observed when

stimulated with succinate is severely affected in presence of the compound probenecid, an organic anion transporter inhibitor. We also demonstrate that the profile of genes expressed is largely dependent on the localisation of the receptor and consequently affects the organization of the tubular network *ex vivo*. Finally, we have identified a conserved region of GPR91 that acts as a retention signal. Lastly, we have uncovered the consequence of hypoxia affecting the post-translational modification of GPR91 and its change in location from the ER to the plasma membrane.

This work confirms the role of GPR91 as a master regulator of angiogenesis in situations where succinate accumulates and demonstrated for the first time the existence, and importance, of an intracellular receptor activated by a metabolic intermediate. These results pave the way for future treatment targeting GPR91 in cerebral hypoxic ischemic pathologies and demonstrate the importance of taking into account the subcellular localisation in the drug discovery process.

Keywords : G-protein-coupled receptor, metabolism, succinate, GPR91, angiogenesis, growth factors, cerebral ischemia-hypoxia, Krebs cycle, intracellular receptors.

Table des matières

Résumé	i
Abstract	iii
Table des matières	v
Liste des tableaux	vii
Liste des figures	viii
Liste des sigles et abréviations	ix
Remerciements	xii
Avant-propos	xiii
Introduction	1
A) Angiogenèse et réponse à l'hypoxie	1
Détection de l'hypoxie	3
Implication du métabolisme énergétique	6
Angiogenèse: facteurs de croissance	8
a) <i>VEGF</i>	8
b) <i>ANG1/2</i>	11
c) <i>Cytokines inflammatoires</i>	11
Le système vasculaire du système nerveux central	16
B) Ischémie-Hypoxie cérébrale	19
Chez les nouveau-nés	19
a) <i>Traitements actuels</i>	20
b) <i>Voies d'avenirs</i>	22
C) Rôle des RCPG dans la réponse à l'hypoxie	25
RCPG : Généralités	25
La signalisation des RCPG	28
a) <i>Protéines G hétérotrimériques</i>	28

<i>b) Arrestines</i>	28
Les RCPG spécifiques aux composés issus du métabolisme cellulaire.....	29
<i>a) L'adénosine et les récepteurs purinergiques</i>	29
<i>b) GPR91 et GPR99: récepteurs d'intermédiaires du cycle de Krebs</i>	31
<i>c) Autres récepteurs d'intermédiaires du métabolisme</i>	33
D) Une cellule dans une cellule	35
RCPG intracellulaire.....	35
Export et rétention au RE.....	42
<i>a) Signaux d'export à la membrane</i>	42
Région C-terminale.....	43
Région N-terminale.....	44
<i>b) Signaux de rétention au RE</i>	44
Modifications post-traductionnelles des RCPG.....	48
La N-glycosylation.....	49
<i>a) Impact de l'hypoxie sur la glycosylation</i>	53
Transport du succinate.....	54
Hypothèses	56
Résultats	58
A) Article 1	59
B) Article 2	89
Discussion	127
<i>GPR91: un récepteur au réticulum endoplasmique</i>	127
<i>Importance de la N-glycosylation pour la rétention</i>	130
<i>Hypoxie, glycosylation et localisation?</i>	131
<i>Effets biologiques d'un mutant</i>	132
<i>Un mécanisme de régulation de l'activité du GPR91</i>	132
<i>Rôle dans l'angiogenèse cérébrale</i>	133
<i>Une cible valable pour le développement de médicament?</i>	136
<i>Perspectives</i>	137

Liste des tableaux

Tableau I: Liste des gènes ciblés par HIF-1.....	5
Tableau II: Agents pharmacologiques ciblant VEGF-A.....	14
Tableau III: Liste des récepteurs couplés aux protéines G localisés dans la région nucléaire.	38

Liste des figures

Figure 1: L'angiogenèse.....	2
Figure 2: Oxygène et HIF.....	4
Figure 3: Métabolisme énergétique et hypoxie.....	9
Figure 4: Les isoformes de VEGF.....	12
Figure 5: La signalisation du récepteur VEGFR-2.....	13
Figure 6: Angiopoétines et leur rôle dans l'angiogenèse.....	15
Figure 7: Circulation sanguine cérébrale.....	17
Figure 8: Microvasculature du système nerveux central.....	18
Figure 9: L'ischémie-hypoxie cérébrale.....	21
Figure 10: Classification des récepteurs couplés aux protéines G.....	26
Figure 11: Structure des récepteurs couplés aux protéines G.....	27
Figure 12: Signalisation des récepteurs couplés aux protéines G.....	30
Figure 13: Rôles connus du GPR91.....	32
Figure 14: Évidences supportant l'hypothèse des récepteurs intracellulaires.....	37
Figure 15: Exemple de récepteurs présentant une localisation intracellulaire.....	40
Figure 16: Transport antérograde et rétrograde au réticulum endoplasmique.....	47
Figure 17: Modifications post-traductionnelles des récepteurs couplés aux protéines G.....	50
Figure 18: Structure des N-Glycan ajoutés au cours du processus de N-glycosylation.....	51
Figure 19: Impact de l'hypoxie sur la glycosylation.....	55
Figure 20: Hypothèse.....	57
Figure 21: Mention d'une localisation intracellulaire du GPR91.....	129
Figure 22: Conclusion.....	139

Liste des sigles et abréviations

ADN: Acide désoxyribonucléique
ADP: Adénosine diphosphate
AMPc: 3,5-adénosine monophosphate cyclique
ARN: Acide ribonucléique
Ang: Angiopoïétine
ATP: Adénosine triphosphate
AT1: Récepteur de type 1 de l'angiotensine
bFGF: Facteur basique de croissance des fibroblastes
CB: Récepteur des cannabinoïdes
CFTR: Régulateur de la conductance transmembranaire de la fibrose kystique
COPII: «*Coat protein complex II*»
CP: Paralysie cérébrale
CTP: Cytidine triphosphate
CXCR-2: Récepteur de type 2 des chémokines CXC
DXE: peptide acide aspartique - non-spécifié - acide glutamique
ERGIC-53: Marqueur 53 du compartiment intermédiaire ER-Golgi
EPO: Érythropoïétine
EP: Récepteur de la prostaglandine E₂
ERK: Kinase régulée par signal extracellulaire
Erv 41/46 : «*ER-derived vesicles protein ERV41/46*»
FGF: Facteur de croissance des fibroblastes
FP: Récepteur de la prostaglandine F_{2α}
GDP: Guanosine diphosphate
GFAP: Protéine acide fibrillaire gliale
GFP: Protéine verte fluorescente
GRK: Kinase des récepteurs couplés aux protéines G
GPR91: Récepteur couplés aux protéines G 91
GTP: Guanosine triphosphate
HEK: Cellules de rein embryonnaire humain
HIF: Facteurs induits par l'hypoxie
HRE: Élément de réponse du HIF
HUVEC: Cellules endothéliales dérivées de la veine ombilicale humaine
IL-1: Interleukine-1
IL-6: Interleukine-6
IL-8: Interleukine-8
IP3: Inositol triphosphate
JNK: Jun N-terminal Kinase
Kir 2.1 : «*Inward-rectifier potassium ion channel 2.1*»
LPA: Acide lysophosphatidique
LPS: Lipopolysaccharide
MAPK: Protéines kinases activées par des mitogènes
MCAO: Occlusion de l'artère cérébrale moyenne

MMP: Métalloprotéinase matricielle
MoDC: Cellules dendritique dérivées de monocytes
NF- κ B: Facteur nucléaire κ B
NMDA: Acide N-méthyl-D-aspartique
NO: Oxyde nitrique
OAT: Transporteur d'anions organiques
OST: Oligosaccharyl transférase
p24: Protéine 24
PGE₂: Prostaglandine E₂
PGC-1 α : Coactivateur du PPAR- γ
PHD: Prolyle-4-hydroxylase
PI-3K: Phosphoinositide 3-kinase
PKA: Protéine kinase A
RCPG: Récepteurs couplés aux protéines G
RE: Réticulum endoplasmique
RT-PCR: Réaction de polymérase en chaîne en temps réel
Sec23/24: Protéines Sec23 et Sec24
TGF- β : Facteur de croissance de transformation β
Tie-2: Récepteur tyrosine kinase Tie
TLR: Récepteur Toll-like
TSP-1: Thrombospondine-1
UDP: Uridine diphosphate
UDP-GlcNAc: Uridine diphosphate *N*-acetylglucosamine
UGGT: UDP-glucose: glycoprotéine glucosyltransférase
UTP: Uridine triphosphate
VEGF: Facteur de croissance vasculaire endothélial
VEGFR: Récepteur du VEGF
VHL: Von Hippel-Lindau
VSVG: Glycoprotéine du virus de la stomatite vésiculaire

Forward! That is the battle cry.

- F. Underwood

*Never give in. Never give in. Never, never, never,
never—in nothing, great or small, large or petty—never
give in, except to convictions of honour and good sense.*

- W. Churchill

*À mes parents, Aurora et Yves, et mon frère
Alexandre, pour leur support inconditionnel*

*À Mélanie,
pour avoir partagé cette traversée avec moi*

Remerciements

Quelle aventure! Une aventure parchemée d'obstacles et de succès, de questions et (parfois) de réponses. Guidé par l'envie de comprendre, de savoir. Cette route, j'ai eu l'unique opportunité de la partager avec de nombreuses personnes que j'ai maintenant l'occasion de remercier.

Avant tout, Sylvain Chemtob, mon directeur de recherche, sans qui rien n'aurait été possible. Merci de m'avoir accueilli dans votre équipe, de m'avoir supporté, fait confiance et pour votre passion incroyable.

Tous les membres du laboratoire, passé et présent, pour ces nombreuses discussions autour de la paillasse ou de la table à manger. Votre agréable compagnie rendit ces années plus qu'agréable. Je tiens également à souligner le personnel du département de Pharmacologie de l'Université de Montréal ainsi que les membres du comité d'évaluation pour leur contribution.

Mes parents, famille et amis pour leur intérêt et leurs encouragements.

Finalement, un énorme merci à Mélanie pour m'avoir supporté et avoir cru en moi. Merci d'avoir accepté de partager ce parcours avec moi. Merci pour ta vision et pour les nombreuses discussions. Merci de mettre tant de joie dans ma vie.

Avant-propos

L'efficacité de la réponse est une indication de la chance de survie. En ce sens, la capacité d'adaptation d'un organisme est centrale à sa survie individuelle et, dans une perspective évolutive, la survie de l'espèce.

L'un des prérequis de l'adaptation est la capacité de déterminer la situation environnementale dans laquelle un organisme, un tissu ou une cellule se trouve. Pour ce faire, un système élaboré de ligands et de récepteurs pouvant induire des changements cellulaires permet la production de facteurs qui, une fois secrétés, induiront les changements nécessaires. Ce système de communication entre la cellule et son environnement a d'abord été décrit par Paul Ehrlich puis par John Newport Langley; les pères de la pharmacologie.

La présente thèse porte sur l'un de ces mécanismes d'adaptation. En étudiant spécifiquement le rôle et le fonctionnement d'un récepteur couplé aux protéines G, nous démontrons un mécanisme de régulation autocrine liant le métabolisme énergétique à l'angiogenèse. L'importance de la régulation de l'apport vasculaire à un tissu est centrale à la survie cellulaire. L'adaptation aux conditions changeantes de l'oxygénation tissulaire requiert divers systèmes de détection et d'ajustement du système vasculaire, essentiellement via la production de facteurs proangiogéniques. Nous verrons aussi que d'autres facteurs de croissance favorisant la guérison sont produits et sous le contrôle de ce système.

Nous verrons également que la localisation, à l'échelle cellulaire, de ce récepteur constitue un paramètre essentiel dans l'efficacité de la réponse. De plus, nous verrons que la régulation de l'activité du récepteur est elle-même dépendante du contexte métabolique.

Introduction

A) Angiogenèse et réponse à l'hypoxie

Le développement vasculaire est dépendant de l'activité métabolique d'un tissu. John Hunter, anatomiste et chirurgien écossais, fut le premier à rapporter des observations en ce sens et du même coup établit le champ de l'angiogenèse vers la fin du 18^e siècle. Il nota que différents organes présentent des degrés variés de vascularisation, ou densité vasculaire, selon l'état développemental dans lequel ils se trouvent (Hunter, 1840). Ainsi, les processus qui sont étudiés dans un contexte pathologique peuvent également s'appliquer en situation de développement normal de l'organisme. Dans les deux cas il s'agit de conditions où l'apport en oxygène et nutriment est insuffisant pour combler les besoins métaboliques.

Le système cardiovasculaire est d'ailleurs le premier système à se développer chez l'embryon; les cellules endothéliales provenant du mésoderme (Risau, 1997). S'il s'agit d'un développement par vasculogenèse, tel que chez l'embryon, les cellules endothéliales proviennent des angioblastes, eux-mêmes dérivés des cellules souches mésodermes, et s'organisent selon la présence de facteurs de croissance. L'angiogenèse quant à elle repose sur l'expansion, par prolifération des cellules endothéliales, d'un réseau vasculaire existant (Figure 1). Ce second mode de développement vasculaire peut être par "*sprouting*" ou "*intussusceptive*". L'angiogenèse par "*sprouting*" permet d'établir un apport vasculaire dans une région ou un tissu qui est en hypoxie. L'angiogenèse "*intussusceptive*" consiste en une réorganisation de la structure d'un réseau vasculaire déjà établi (Figure 1) (Adair et al., 2010).

A

© National Portrait Gallery

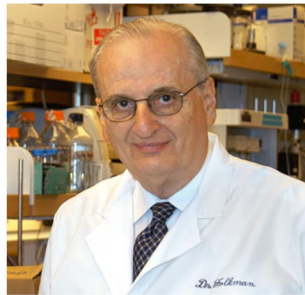
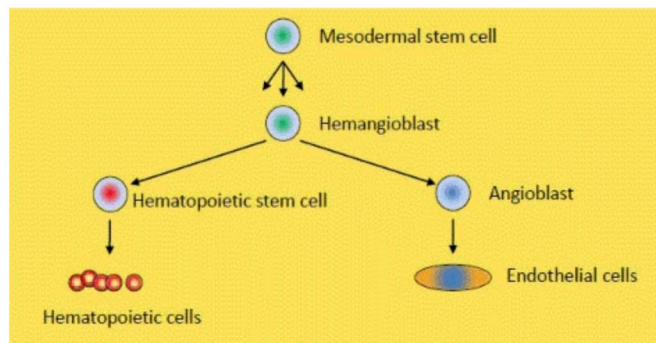
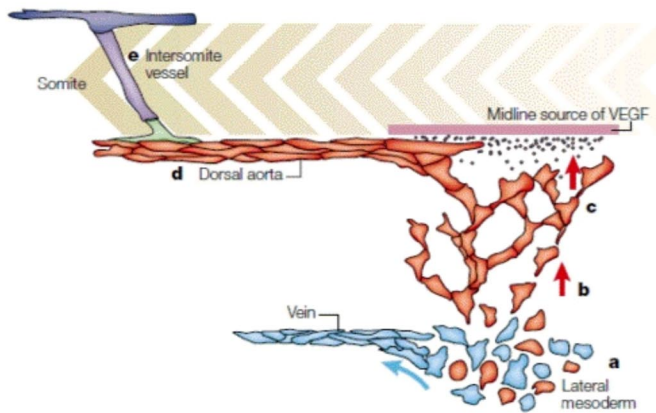
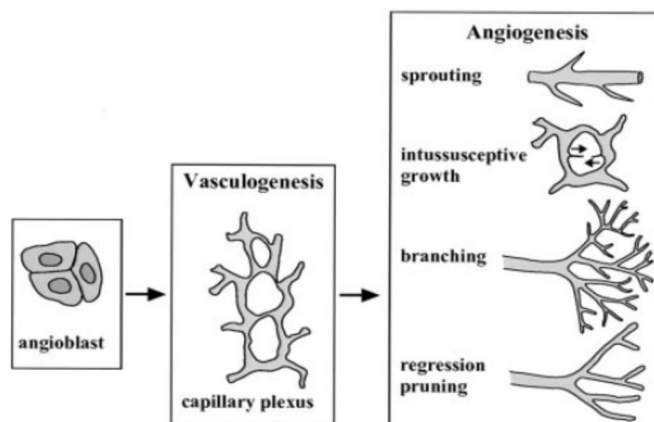
B**C****D****E**

Figure 1. L'angiogenèse. A) John Hunter, chirurgien et anatomiste écossais du 18^e siècle et premier à avoir observé une vascularisation plus importante dans les tissus métaboliquement plus actif. (Tiré de National Portrait Gallery, London; John Hunter by artist John Jackson) B) Judah Folkman, père de l'angiogénèse moderne, proposa l'utilisation de bloqueur de l'angiogénèse afin de combattre la progression des tumeurs. (Tiré de : www.childrenshospital.org) C) Schéma démontrant le processus de différenciation des cellules souches mésodermes menant aux cellules hématopoiétiques et aux cellules endothéliales (Tiré de Adair et Montani, Angiogenesis; figure 1.1) D) Schéma démontrant le processus de vasculogénèse chez les embryons des vertébrés. Les angioblastes destinés à former l'artère dorsale migrent du mésoderme latéral à la ligne médiane (source du VEGF-A) (a-c). Les angioblastes artériels coalescent et forment l'aorte dorsale (d). (Tiré de Hogan et al., (2002). E) Les types de croissance vasculaire; vasculogénèse et angiogénèse (Adapté de Carmeliet et Collen (2000).

Les travaux menés par Judah Folkman au cours des années 1970 menant à l'hypothèse que l'usage des thérapies anti-angiogéniques serait utile dans le traitement des cancers marquèrent le début de l'ère moderne de la recherche sur l'angiogénèse (Folkman, 1971). On dénombre maintenant un nombre impressionnant de publications dans ce champ de recherche, mais également une quantité croissante d'outils thérapeutiques lui étant reliés.

Nous verrons d'abord les mécanismes de détection d'un environnement hypoxique, suivi des signaux issus du métabolisme produits par les cellules en hypoxie permettant de mettre sur pied une réponse. Finalement, les facteurs qui participent à la régénération du tissu.

Détection de l'hypoxie

L'oxygène, à l'inverse d'une majorité d'intermédiaires métaboliques, ne peut être entreposé dans une cellule. Impliqué dans nombre de réactions biologiques, mais particulièrement dans la phosphorylation oxydative, celui-ci devient rapidement un élément limitant du métabolisme en situation de carence en oxygène (Figure 2) (Ke et al., 2006). Dans ce cas, l'inhibition des prolyl-4-hydroxylases (PHD), une famille d'enzyme responsable de l'hydroxylation des résidus proline qui permet la reconnaissance et l'ubiquitination des protéines ciblées par le Von Hippel-Lindau (VHL), par l'oxygène est levée et permet l'accumulation du facteur de transcription HIF (hypoxia-inducible factor) et la transcription de plusieurs facteurs de croissance essentiels au développement vasculaire et au processus de réparation tissulaire ainsi que nombre d'enzymes du métabolisme énergétique (Tableau 1) (pour un schéma détaillant le mécanisme de dégradation de HIF voir Figure 2) (Ke et al., 2006). En sa qualité de facteur de transcription, HIF lie les régions promotrices contenant un élément de réponse du HIF (HRE; *HIF response element*) et facilite le recrutement de coactivateurs aux promoteurs des gènes cibles.

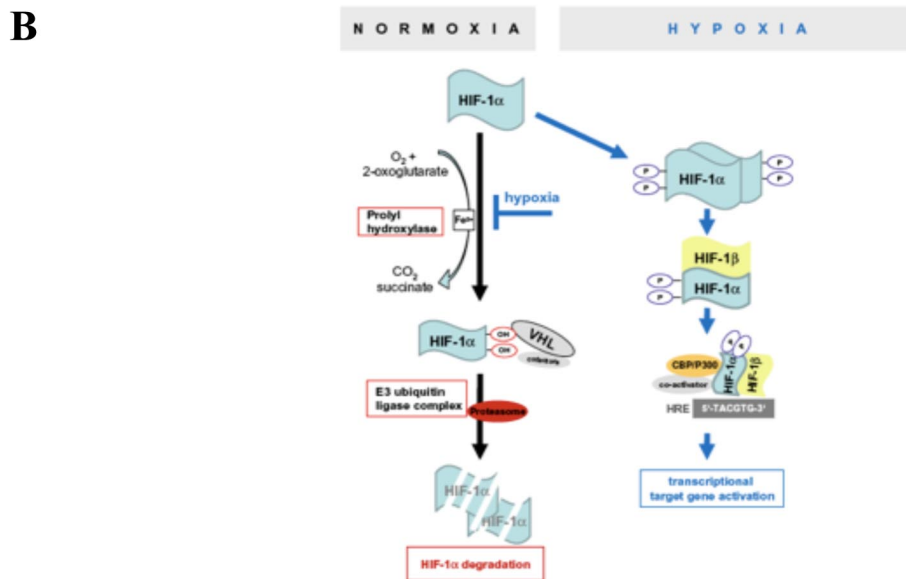
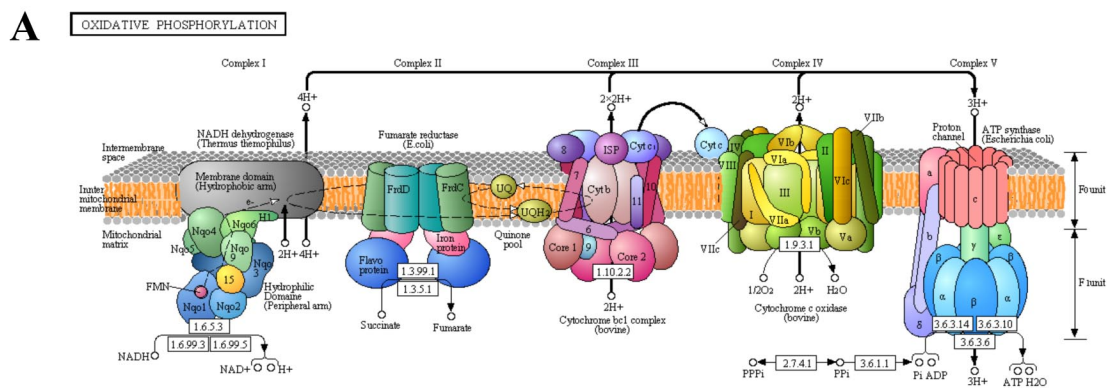


Figure 2. Oxygène et HIF. A) Schéma détaillé des réactions de la phosphorylation oxydative. L'oxygène est essentiel au fonctionnement de la chaîne de transport d'électrons. Il sert d'accepteur d'électrons et permet le transport des protons H⁺ dans l'espace intermembranaire mitochondrial. (Tiré de KEGG pathway; Kanehisa et al., Nuc. acid research, (2004)) B) Schéma démontrant le processus de stabilisation de HIF. En situation de normoxie, l'hydroxylation de résidues proline, par les prolyl-hydroxylases, de HIF-1 α favorise son interaction avec VHL et son ubiquitination. Ceci entraîne HIF-1 α vers la dégradation protéosomale. En situation d'hypoxie, l'inhibition des prolyl-hydroxylases permet l'accumulation et la dimérisation de HIF, l'interaction avec les régions promotrices pertinentes (les éléments de réponses du HIF; HRE) et l'activation des gènes ciblés. (VHL; von Hippel-Lindau, HIF; hypoxia-inducible factor). (Tiré de Trollmann et al., Brain and Dev., 2009)

Tableau I : Liste des gènes ciblés par HIF-1

Fonction	Gène (abréviation)
Érythropoïèse / métabolisme du fer	Érythropoïétine (EPO) Transferrine (Tf) Récepteur de la transferrine (Tfr) Céruleoplasmine
Angiogénèse	Facteur de croissance vasculaire endothéliale (VEGF) VEGF dérivé de glande endocrine (EG-VEGF) Leptine (LEP) Facteur de croissance de transformation (TGF- β 3)
Tonus vasculaire	Synthase d'oxide nitrique (NOS2) Hème oxygénase 1 Endothéline 1 (ET1) Adrénoméduline (ADM) Récepteur adrénergique α -1B
Métabolisme de la matrice	Métalloprotéinases de la matrice (MMPs) Récepteurs et inhibiteurs de l'activateur du plasminogène (PAIs) Prolyse hydroxylase du collagène
Métabolisme du glucose	Adénylate kinase 3 Aldolase-A,C (ALDA,C) Anhydrase carbonique-9 Énolase-1 (ENO1) Transporteur du glucose-1,3 (GLU1,3) Glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase (GAPDH) Hexokinase 1,2 (HK1,2) Lactate déshydrogénase-A (LDHA) Pyruvate Kinase M (PKM) Phosphofructokinase L (PFKL) Phosphoglycérate kinase 1 (PGK1) 6-phosphofructo-2-kinase/glucose-2.6bisphosphate-3 (PFKFB3)
Prolifération cellulaire / survie	Facteur de croissance «insuline-like» 2 (IGF2) Facteur de croissance transformant - α (TGF- α) Adrénoméduline (ADM)
Apoptose	«Nip3-like» protéine X (NIX)

Adapté de Ke et al., Mol Pharmacol, 2006

Il va s'en dire que HIF a, jusqu'à présent, été le plus étudié des mécanismes de détection de l'hypoxie, mais ce champ d'études s'intéresse maintenant à déterminer de nouveaux «détecteurs» de l'hypoxie. Dans cette perspective, les effets qu'a une diminution de la concentration d'oxygène sur les processus métaboliques sont en vogue.

Implication du métabolisme énergétique

Un nombre croissant de publications ont démontré que le métabolisme exerce lui-même une certaine influence sur le développement vasculaire, et ce à différents niveaux. Ces travaux supportent la notion que les senseurs du métabolisme sont centraux à l'adaptation d'un apport sanguin insuffisant causé par une ischémie.

À titre d'exemple, le cofacteur transcriptionnel PGC-1 α , un coactivateur du récepteur nucléaire PPAR- γ , induit l'expression du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF: *vascular endothelial growth factor*), indépendamment du HIF, dans un modèle d'ischémie des membres postérieurs (*hind-limb ischemia*). Pour ce faire, PGC-1 α lie le "*estrogen related receptor alpha*" (ERR- α), un récepteur nucléaire pouvant agir de cofacteur transcriptionnel, et participe à la liaison aux sites consensus 5'-GGTCA ou 5'-TGACCT contenus dans le promoteur du VEGF afin d'induire son expression. Ainsi le PGC-1 α agit comme un senseur du stress oxydatif secondaire à l'ischémie et participe à la revascularisation du tissu (Arany et al., 2008).

Le fait que la concentration de nombreux intermédiaires du métabolisme soit affectée en condition d'insuffisance en oxygène est connu depuis les années 1980. En effet, dans le système nerveux central, deux études ont démontré d'importantes variations dans la concentration tissulaire du cerveau suite à différentes périodes d'hypoxie (Figure 3) (Folbergrová et al., 1974; Hoyer et al., 1986). Hoyer et al. démontrèrent une augmentation importante de fructose-di-phosphate, de lactate et de succinate après 15 minutes d'hypoxie

cérébrale complète chez le rat adulte (Hoyer et al., 1986). Folbergrova et al. (1974), observa une élévation significative de succinate après 5 minutes d'ischémie (Folbergrová et al., 1974). La compréhension du fonctionnement des voies métaboliques permet d'apprécier l'impact d'une déficience en oxygène sur les réactions enzymatiques métabolique (Figure 3). Produits du cycle de Krebs, les intermédiaires énergétiques, tels que le succinate et l'alpha-cétoglutarate, permettent la conversion du glucose en ATP. Ce faisant, le cycle consomme de l'oxygène et génère du CO₂. La partie du cycle consommant le plus d'oxygène est certes la conversion du succinate en fumarate par le complexe II de la chaîne oxydative; l'oxygène servant d'accepteur final d'électron.

Leurs caractères proangiogéniques a également été étudié *in vitro* et *in vivo*. Ces études ont montré une augmentation de la formation de tubes lors de stimulation de cellules endothéliales humaines (HUVEC) avec le lactate, le pyruvate, le malate ou l'adénosine (Burns et al., 2003). Les résultats de Lee et al. montrent l'effet proangiogénique du pyruvate sur des membranes choriallantoïque d'embryon de poulet ainsi que sur la prolifération cellulaire et la formation de tube (Lee et al., 2001). Les travaux de Neuman quant à eux ont démontré les propriétés prolifératives du pyruvate, de l'alpha-kétoglutarate et de l'oxalacetate tel que testé sur des cellules de carcinome de Walker (Neuman et al., 1958). Également, dans un modèle animal d'occlusion de l'artère cérébrale moyenne (MCAO), Wang et al. ont confirmé les effets bénéfiques du pyruvate. Cette propriété, qui confère une protection cérébrale, repose sur l'effet anti-inflammatoire causé par une réduction de l'activité Nf-kB et une diminution de l'expression de MMP-9 (Wang et al., 2009).

De façon analogue, l'effet protecteur du lactate a également été étudié. Longtemps considérés comme un déchet métabolique, les travaux de Schurr et al. démontrèrent que ce métabolite pouvait être utilisé par les neurones comme source d'énergie (Schurr et al., 1988). Se basant sur ces données, Berthet et al. ont démontré que l'injection de lactate, même une heure après l'ischémie cérébrale, réduisait significativement l'impact négatif sur les fonctions neurologiques (Berthet et al., 2009). Les auteurs n'ont pas démontré de mécanisme, mais suggèrent que cette protection repose sur l'augmentation en substrat que constitue l'ajout exogène de lactate. Même en présence d'oxygène, le lactate a été démontré comme induisant

l'expression du VEGF par les macrophages suggérant qu'il s'agit là d'un indicateur puissant d'un manque d'oxygène (Constant et al., 2000). De plus, l'ajout de lactate exogène à une plaie accroît la production de TGF- β , VEGF et d'IL-1 ainsi que la déposition de collagène (Trabold et al., 2003). En somme, s'il contribue à la guérison et, dans certaines études, à la production de facteurs bénéfiques, le récepteur par lequel il agit demeure inconnu.

Le mode d'action conférant les effets bénéfiques de ces composés n'a, jusqu'à maintenant, été que très peu étudié. Selon les travaux de différents groupes, incluant le nôtre, la production de facteurs de croissance proangiogéniques constitue un élément central de ce mode d'action. L'objectif général consiste maintenant à identifier la composante réceptorielle via laquelle ils agissent.

Angiogenèse: facteurs de croissance

L'identification d'une déficience dans l'apport en oxygène ne constitue que la première phase du processus d'angiogenèse qui doit être suivie par la sécrétion de molécules capables d'induire les changements nécessaires aux réseaux vasculaires. Voyons maintenant quelques-uns de ces facteurs de croissance pertinents dans le cadre de nos travaux.

a) VEGF

Identifié en 1989 par le groupe de Napoleone Ferrara au département de biologie moléculaire de l'entreprise Genentech, le VEGF est l'un des marqueurs principaux qu'un processus angiogénique est en cours (Leung et al., 1989). Le génome des mammifères contient le code génétique permettant de produire cinq protéines de la famille VEGF; VEGF-A, PlGF, VEGF-B, VEGF-C et VEGF-D (Shibuya, 2013). VEGF-A, généralement simplifié à VEGF, est essentiel à la formation de vaisseaux sanguins au cours de l'embryogenèse.

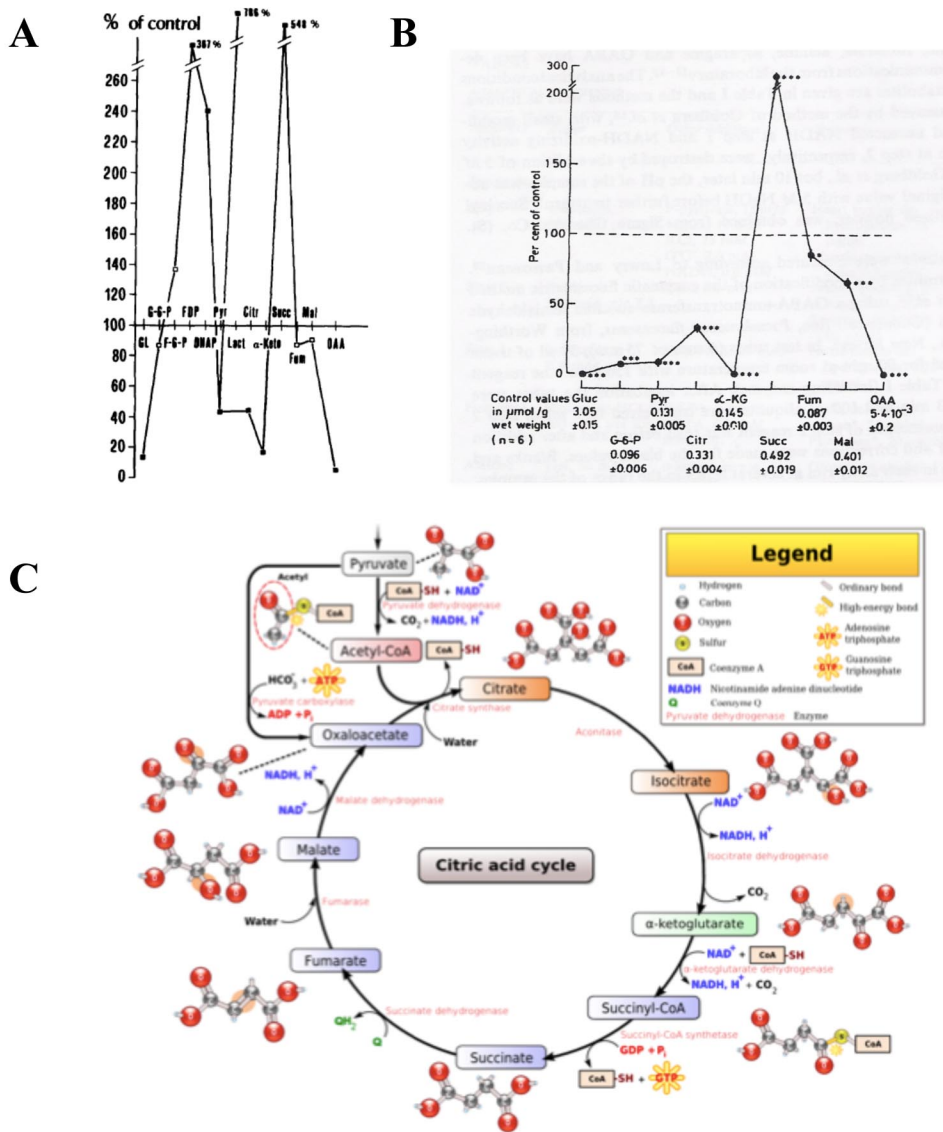


Figure 3. Métabolisme énergétique et hypoxie. A) Démonstration de l'effet de l'ischémie cérébrale complète sur la concentration des intermédiaires du cycle de Krebs. Hoyer et al., observèrent une forte augmentation de fructose-diphosphate, de lactate et de succinate immédiatement après 15 minutes d'ischémie complète. (Tiré de Hoyer et al., Neurobiol Aging, 1986) B) De façon similaire, Folbergrova et al. démontrèrent une forte augmentation de la concentration de succinate suite à 5 minutes d'hypoxie complète suivie de 15 minutes de recirculation chez l'adulte. (Tiré de Folbergrova et al., Brain Res, 1974). C) Le succinate est un produit du cycle de Krebs. Il est produit par le retrait du Coenzyme-A du Succinyl-CoA par la succinyl-CoA synthétase (Tiré de Wikipedia, fichier "Citric acid cycle with aconitate 2.svg" .)

Les souris VEGF-A ^{-/-} et ^{+/-} présente d'ailleurs un phénotype létale (Carmeliet et al., 1996; Ferrara et al., 1996). En plus de la diversité de séquences codantes, un épissage alternatif permet de produire différents variants. Par exemple, VEGF-A se présente dans les formes VEGF121, VEGF121b, VEGF145, VEGF165, VEGF165b, VEGF189, VEGF206 (Figure 4). Chaque isoforme, caractérisé par une longueur variée en acides aminés, a des propriétés de liaison aux récepteurs tyrosine kinase qui lui sont propre ainsi qu'une capacité de diffusion dans la matrice extracellulaire qui diffèrent. Cette variabilité de diffusion est due à la présence, ou l'absence, d'un domaine de liaison à l'héparine (exons 6 et 7). Ce domaine est responsable de l'interaction entre le VEGF et la matrice extracellulaire. Le variant 121 étant dépourvu de ces domaines diffuse librement. À l'inverse, les variants 189 et 206 contiennent ces domaines et présentent une mobilité réduite (Bacic et al., 1995; Neufeld et al., 1999). L'importance de ces différents variants est tel que les souris n'exprimant que l'isoforme VEGF120 décèdent dans les premières semaines de vie (Pritchard-Jones et al., 2007). Les isoformes VEGFxxx_b quant à eux ont une affinité plus faible pour le récepteur et compétitionnent avec VEGF-A ce qui affecte négativement l'angiogenèse (Figure 4) (Pritchard-Jones et al., 2007).

L'effet proangiogénique de VEGF-A dépend de la liaison au récepteur VEGFR-1 et VEGFR-2; des récepteurs tyrosines kinases principalement exprimés par les cellules endothéliales. L'activation de ces récepteurs induit un signal de migration cellulaire et de prolifération permettant la formation de nouveaux capillaires sanguins. À titre d'exemple, la liaison du VEGF à VEGFR-2 induit sa dimérisation et auto-phosphorylation et induit l'activation de nombreuses protéines dans la cellule endothéliale dont la phospholipase C- γ , PI-3K, Ras GTPase-activating protein (Guo et al., 1995) et les protéines de la famille Src (Eliceiri et al., 1999) (Figure 5).

Plusieurs agents pharmacologiques ciblant le VEGF et ses récepteurs sont actuellement sur le marché (Tableau II). Leurs applications principales touchent l'oncologie, mais également les pathologies rétinienne impliquant l'angiogenèse (Neufeld et al., 1999). Ces agents anti-angiogéniques se heurtent toutefois à une augmentation du taux de résistance,

particulièrement en oncologie et c'est pourquoi la combinaison de ces drogues avec d'autres composés est actuellement à l'étude (Lambrechts et al., 2013).

b) ANGI/2

Suite à l'identification du système VEGF-VEGFR, le système des Angiopoïétines (Ang) et des récepteurs Tie a été démontré comme essentiel au processus de développement vasculaire (Dumont et al., 1992; Partanen et al., 1992; Iwama et al., 1993; Maisonpierre et al., 1993; Sato et al., 1993). La famille des angiopoïétines inclut les Ang-1 à 4 ainsi que sept protéines "*Angiopoietines-like*". Les angiopoïétines 1 et 2 lient le récepteur tyrosines kinases TIE2 («*Tyr Kinase with Ig and EGF homology domains*»); Ang1 à titre d'agoniste et Ang2 en tant qu'antagoniste (Figure 6). Le ratio Ang1/Ang2 détermine l'état dans lequel les cellules endothéliales se trouvent; soit un état quiescent ou activé. L'état activé correspond au relâchement des jonctions cellulaires et permet de répondre aux autres signaux proangiogéniques, notamment du VEGF, présent dans l'environnement et ainsi adapter aux besoins de l'organe en permettant un remodelage vasculaire. En résumé, le processus d'angiogenèse requiert la déstabilisation de la structure vasculaire rendue possible par une réduction du ratio Ang1/Ang2 (Fagiani et al., 2013).

c) Cytokines inflammatoires

La contribution du système immunitaire dans l'angiogenèse est reconnue à différents niveaux. La sécrétion des cytokines influence la prolifération, la survie et l'apoptose ainsi que la migration et l'activation des cellules endothéliales (Naldini et al., 2005). Parmi la diversité de cytokines existantes, la famille des Interleukines est l'une des plus étudiées et pour laquelle nombres d'études ont démontré une implication dans l'angiogenèse. IL-1 fait partie de cette famille et son rôle dans l'angiogenèse a été démontré comme étant essentiel. *In vitro*, IL-1b stimule la prolifération des cellules endothéliales (Dinarello, 1996; Dinarello, 1998) alors qu'IL-1 α induit la synthèse de VEGF par les cellules mononucléaires (Voronov et al., 2003).

A

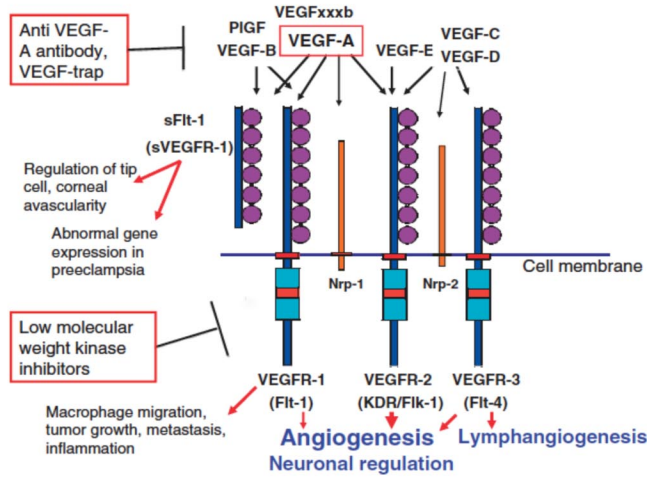
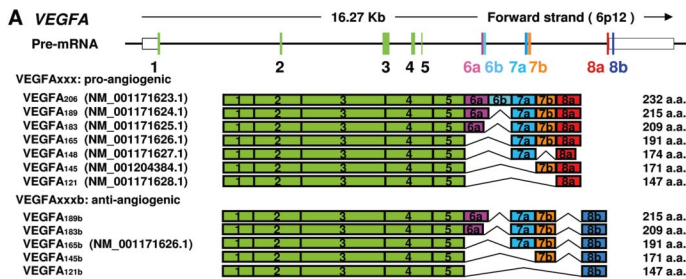


Figure 4. Les isoformes de VEGF. A) VEGF et ses récepteurs sont impliqués dans l'angiogénèse, la lymphangiogénèse et la régulation de certaines fonctions neuronales. Les interactions entre les ligands et les différents récepteurs sont ici présentés. Le site d'action de certains antagonistes est également indiqué. (Tiré de Shibuya, J Biochem, 2013) B) VEGF-A présente plusieurs variants, produit d'un d'épissage alternatif, chacun diffusant à sa propre vitesse. (Tiré de Miura et al., Carcinogenesis, 2012)

B



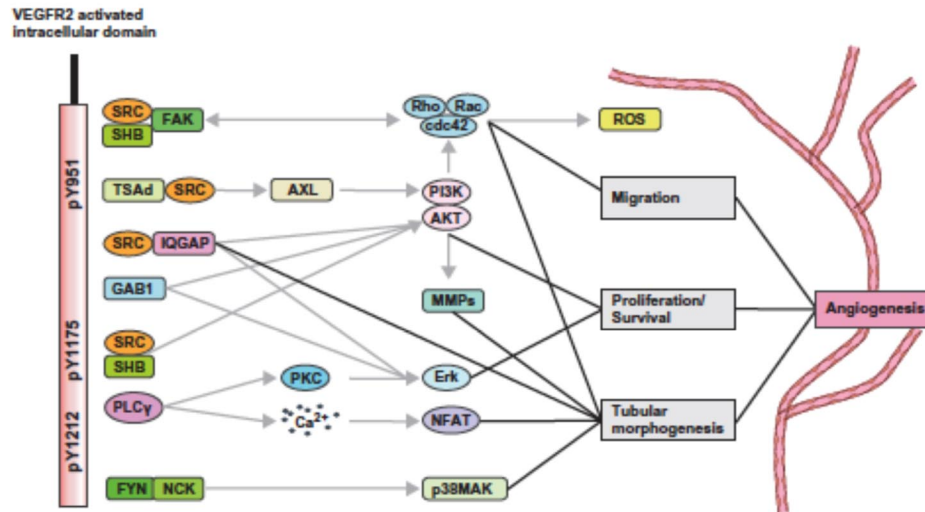


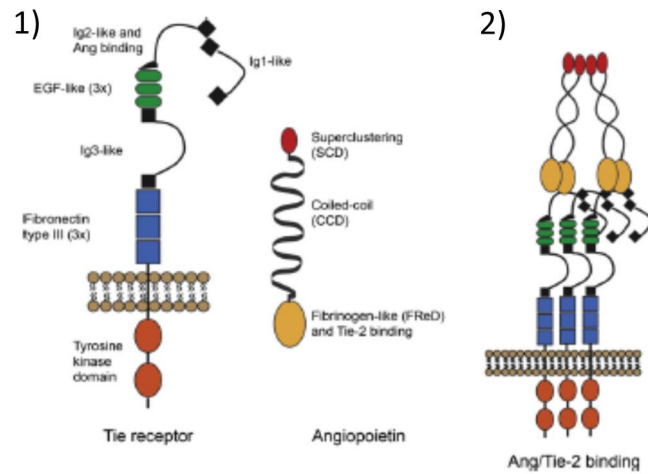
Figure 5. La signalisation du récepteur VEGFR-2. Schéma démontrant les principales voies de signalisation sous le contrôle de VEGFR2. La phosphorylation de différentes tyrosines induit l'activation de voies variées toutes impliquées dans l'angiogénèse. (Ferrara N et al., Nature Medicine, 2003)

Tableau II : Agents pharmacologiques ciblant le VEGF-A

Composé	Mode d'action	Applications
Bevacizumab; ranibizumab	Anticorps neutralisant le VEGF-A: Pleine longueur (bevacizumab) ou Fragment F(ab)2 (ranibizumab)	Approuvé et à l'étude pour plusieurs types de cancer, approuvé pour la dégénérescence maculaire
Aflibercept	Piège à VEGF («Trap»)	Approuvé pour la dégénérescence maculaire, actuellement à l'étude pour différents cancers
Ramucirumab	Anticorps neutralisant le récepteur VEGFR2	Actuellement à l'étude pour différents cancers et pour la dégénérescence maculaire
Sunitinib	Inhibiteur du VEGFR2; effet large sur plusieurs tyrosine kinases	Approuvé pour le carcinome rénal, tumeur stromal gastrointestinal, cancer du pancréas
Sorafenib	Inhibiteur du VEGFR2; effet large sur plusieurs tyrosine kinases	Approuvé pour le cancer rénal et le cancer hépatocellulaire
Pazopanib	Inhibiteur du VEGFR2; effet large sur plusieurs tyrosine kinases	Approuvé pour le cancer rénal et le sarcome des tissus mous.

Pour plus de détail voir: <http://www.cancer.gov/cancertopics/druginfo/>
(Adapté de Claesson-Welsh et al., J Intern Med, 2013)

A



B

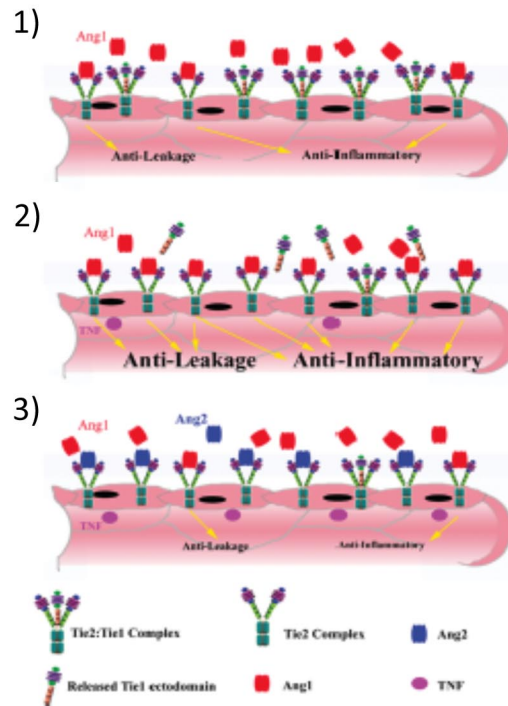


Figure 6. Angiopoïtines et leur rôle dans l'angiogenèse. A. Schéma présentant la structure du récepteur Tie et de l'angiopoïtine (1) et d'une représentation de l'interaction de ceux-ci en organisation multimérique. (Adapté de Fagiani E et al., Cancer Letters, 2013). B. Rôle du système Ang-Tie sur le contrôle de la vasculature. En condition de base Ang 1 favorise le maintien de l'état quiescent (1). En situation de stress, la production de facteurs activateurs induit le clivage du récepteur Tie1 permettant une plus grande interaction entre Ang1 et Tie2 et un renforcement de l'état quiescent (2). Si Ang2 est également présent dans l'environnement cellulaire, il antagonise l'effet de Ang1 et permet un remodelage de l'endothélium (3). (Adapté de Singh H et al, Biochemm Soc trans, 2011)

En plus de lui-même induire l'expression de VEGF, IL-6 participerait à l'angiogenèse en favorisant la prolifération et la migration de cellules endothéliales cérébrales et des cellules de muscles lisses (Wang et al., 2003; Nilsson et al., 2005; Yao et al., 2006). Finalement, IL-6 favoriserait la prolifération de cellules progénitrices endothéliales *in vitro* (Fan et al., 2008).

L'orchestration des molécules angiogéniques permet la mise en place d'un réseau vasculaire assurant le fonctionnement de l'organisme. Le système nerveux représente un tel organe où un apport insuffisant se fait vite sentir.

Le système vasculaire du système nerveux central

L'approvisionnement cérébral en oxygénation et nutriments est rendu possible par l'apport sanguin de quatre artères ascendantes; deux artères carotides et deux artères vertébrales (Figure 7). Les artères carotides se divisent en artères carotides interne et externe. La première assurant la circulation intracrânienne et l'irrigation des artères antérieures et cérébrales moyennes alors que la seconde irrigue le domaine extracrânien (Figure 7). Avant de pénétrer le tissu cérébral, les carotides internes et le système vasculaire vertébral anastomosent et forment le cercle de Willis. Cette structure assure un apport vasculaire minimal lorsque l'une des artères est obstruée ou lésée (JE et al., 2008).

Alors que la macrovasculature assure l'apport sanguin à l'organe, c'est la microvasculature qui assure une distribution fine aux cellules du système nerveux (Figure 8). C'est cette microvasculature qui peut être influencée et sur laquelle nos études se concentrent. Dans un contexte pathologique, un blocage de la circulation artérielle affectera la microvasculature. Dans de tels cas, on parlera d'ischémie-hypoxie.

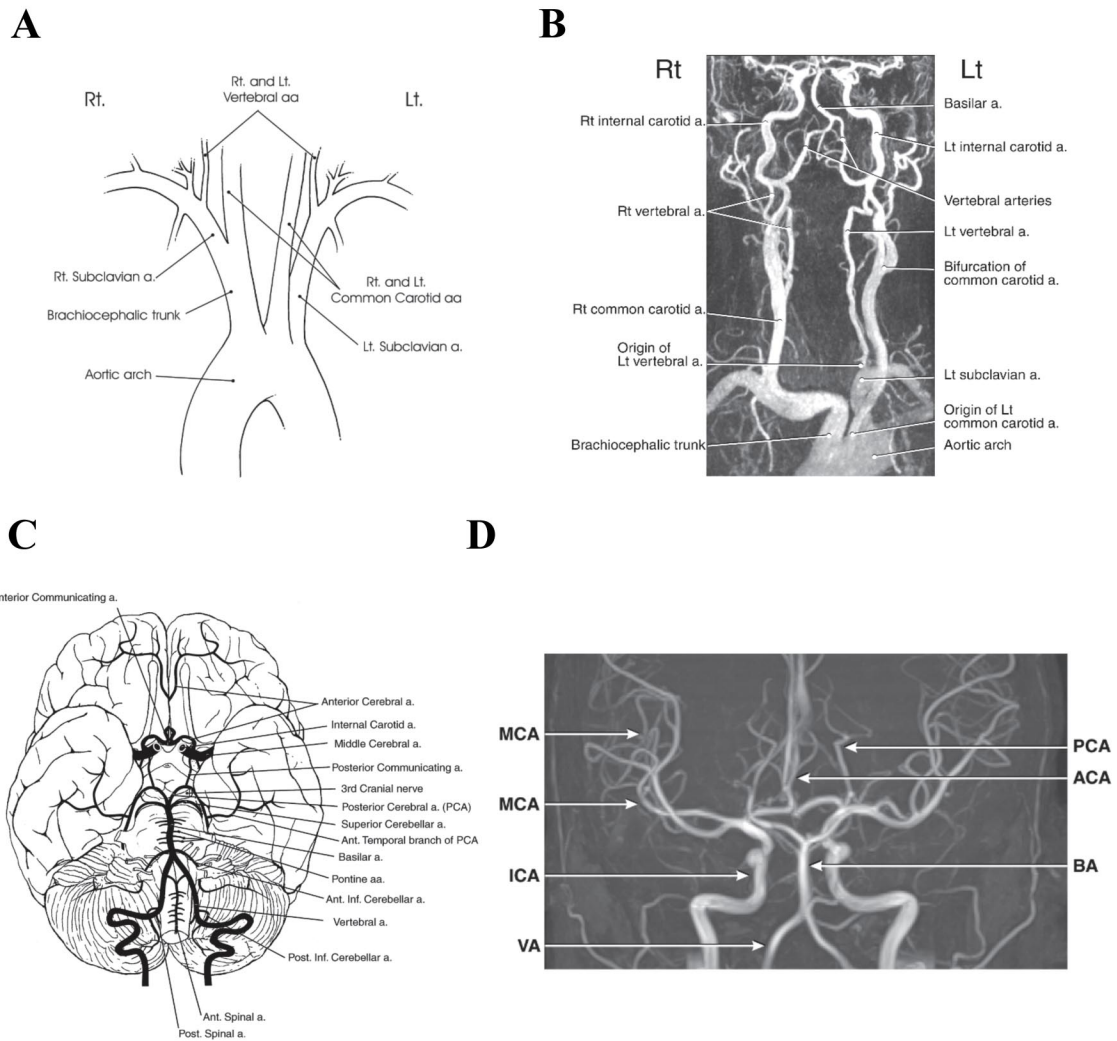


Figure 7. Circulation sanguine cérébrale. A. Schéma présentant les artères carotides et vertébrales à la sortie de l'aorte. B. Angiographie par résonance magnétique de la même région chez un individu. C. Schéma démontrant la relation entre le système circulatoire des carotides et de l'irrigation du cerveau. Le cercle de Willis, qui permet une circulation entre la circulation carotide et les artères postérieures est également visible. D. Région similaire présentée par angiographie. Abréviations: ACA: «anterior cerebral artery»; BA: «basilar artery»; ICA: «internal carotid artery»; MCA: «middle cerebral artery»; PCA: «posterior cerebral artery»; PCoA: «posterior communicating artery»; SCA: «superior cerebellar artery»; VA: «vertebral artery» (Tiré de Mendoza J et al., Clinical Neuroanatomy: A Neurobehavioral Approach, 2008)

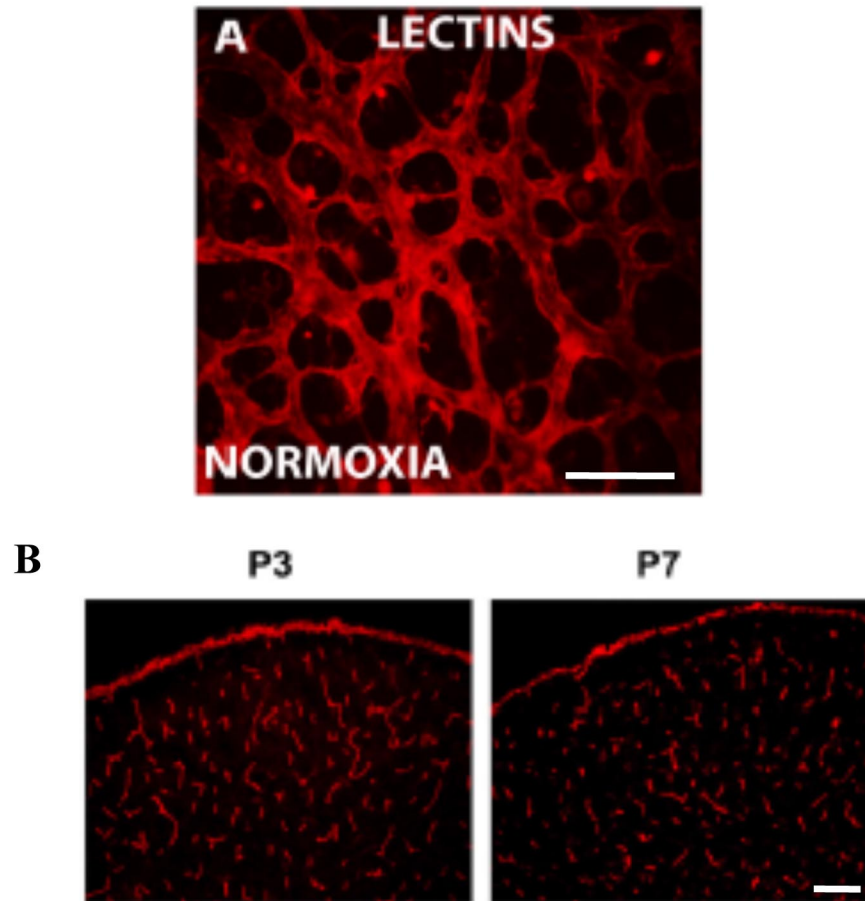


Figure 8. Microvasculature du système nerveux central. A. Image microscopique du réseau vasculaire rétinien normal chez la souris marqué à la Lectine (lectine conjuguée au fluorophore FITC) (rétines mise à plat). On note la ramification de la microvasculature (échelle = 50 μ m) (Tiré de Rivera et al, ATVB, 2013) B. Dans le cortex cérébral, un fin réseau vasculaire est également observé (cryosections de cerveau). La densité de ce réseau vasculaire est susceptible de changer dans le temps. Dans ce cas entre 3 et 7 jours de vie (P3 et P7) (échelle = 100 μ m) (Tiré de Honoré et al., ATVB,2013)

B) Ischémie-Hypoxie cérébrale

Plusieurs conditions pathologiques impliquent, à divers degrés, une condition d'hypoxie cérébrale. Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) chez l'adulte sont certes les plus communément observés, mais l'avancée des connaissances démontre que certaines maladies neurodégénératives impliqueraient également une déficience en oxygène ou, à tout le moins, présenteraient une composante d'hypoxie comme c'est notamment le cas pour la maladie d'Alzheimer (Desai et al., 2009; Hunter et al., 2012).

Le cerveau des jeunes enfants, on l'oublie souvent, est également susceptible d'être exposé à des épisodes d'ischémie-hypoxie causant de sévères désordres du développement. L'impact de dommages causés de façon précoce affecte de façon profonde le développement cérébral. C'est chez ces patients que la mise sur pied d'approches thérapeutiques aura le plus de retombées.

Chez les nouveau-nés

Raju et al. ont compilé que près d'une naissance sur 2300 à 5000 présente des dommages cérébraux potentiellement causés par une période d'ischémie-hypoxie (Nelson et al., 2004; Raju et al., 2007). En considérant que plus de 95% de ces enfants survivront jusqu'à l'âge adulte, les coûts, tant économiques que sociaux, associés aux problèmes neurologiques sont considérables. Les estimations de Perkins et al. suggèrent qu'au moment de la décharge les coûts d'hospitalisation à eux seuls s'élèvent à près de 21000\$ US (Perkins et al., 2009). Cette étude soulève également une variation du coût d'hospitalisation selon la nature de l'accident vasculaire cérébral. Les coûts associés aux traitements à long terme n'étant pas inclus dans cette étude, les auteurs rappellent que ceux-ci devront être supportés pour la vie entière des individus atteints ce qui accroît substantiellement les coûts totaux.

L'un de ces types d'accidents vasculaires, l'ischémie artérielle («*ischemic perinatal stroke*»: IPS) serait la cause de près de 30% des cas de paralysie cérébrale (CP: «*cerebral palsy*»)(Raju, 2008); une condition débilitante et requérant une aide continue. En plus de la CP, l'hypoxie-ischémie cérébrale est la cause primaire des encéphalopathies hypoxiques ischémiques et des leukomalacies périventriculaires (Ferriero, 2004). (Figure 9) Ces conditions sont généralement observées chez les prématurés ou les nouveau-nés et, quoique les mécanismes en jeu ne sont pas clairement définis, il existe quelques possibilités de traitements.

a) Traitements actuels

Ces traitements actuellement disponibles sont essentiellement de nature supportives. L'utilisation du magnésium, des bloqueurs des canaux calciques ainsi que les antagonistes du récepteur du NMDA, durant la phase aiguë, visent à réduire les dommages causés par l'hypoxie-ischémie. L'accent est donc centré sur la neuroprotection, la prévention de l'hyperthermie et de l'hypoglycémie ainsi que la normalisation de la perfusion et des paramètres de ventilation (Cnossen et al., 2009). Chez ces patients, diverses approches visant à réduire la mort neuronale dans le but de maintenir une fonction cérébrale sont favorisées. À long terme, la réhabilitation incluant la thérapie par le mouvement semble également produire des résultats prometteurs (Kirton et al., 2007).

L'hypothermie, bien que son mode d'action précis demeure vague, constitue l'une des approches de plus en plus populaires (Adelson et al., 2013). Une réduction de la température cérébrale de quelques degrés suffit pour observer des résultats significatifs (Groenendaal et al., 2009; Thoresen, 2011). Dans les modèles animaux, elle diminue la relâche de glutamate (Thoresen et al., 1995), normalise la synthèse protéique (Bergstedt et al., 1993) et réduit le stress oxydatif (Lei et al., 1994).

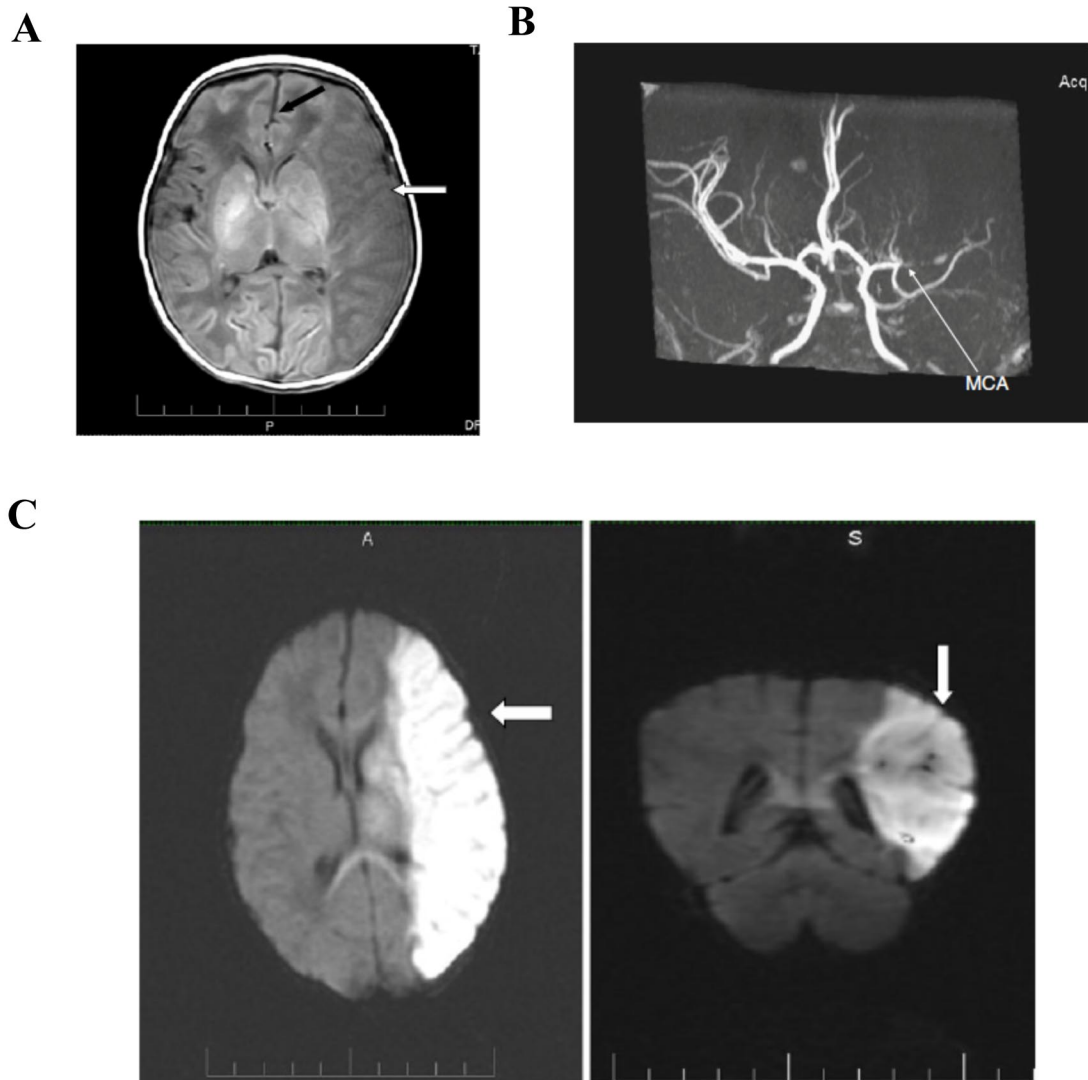


Figure 9. L'ischémie-hypoxie cérébrale. A. Image de résonance magnétique chez un jeune individu. On observe un déplacement de la ligne médiane (flèche noire) ainsi qu'une dégradation du patron des sillons du cortex (flèche blanche). B. Angiographie montrant une perte de signal dans la région de l'artère cérébrale moyenne (MCA; «*middle cerebral artery*») (Flèche blanche). C. Image par résonance magnétique montrant une diffusion dans la région irriguée par l'artère moyenne. (Tiré de Sehgal et al., Eur J Pediatr, 2012)

L'absence de diversité dans les traitements pharmacologiques est en partie justifiée par une mauvaise compréhension de la pathologie, de ses sources et des différents facteurs favorisant sa genèse. De plus, l'amélioration des technologies d'imageries médicales rend maintenant possible la détermination rapide des caractéristiques de l'ischémie dans chaque cas (Raju et al., 2007; Kirton et al., 2009).

b) Voies d'avenirs

Notre laboratoire a suggéré, et démontré en utilisant des modèles animaux, que de nombreux médiateurs générés au cours de l'insulte agissent de façon délétère sur la microvasculature cérébrale.

1. La mort des cellules endothéliales induite par le 8-Iso-Prostaglandin F₂ α (Brault et al., 2003).
2. La dégénération microvasculaire induite par le stress oxydatif (Sirinyan et al., 2006) via la génération d'acide trans-arachidonique et l'activation subséquente du GPR40 (Honore et al., 2013).
3. La dégénération microvasculaire induite par la génération de LPA (Brault et al., 2007).
4. L'effet négatif de l'inflammation causée par l'IL-1 β tel que démontré lors de l'utilisation bénéfique d'un antagoniste peptidique (Quiniou et al., 2008).

Jusqu'à présent ces évidences expérimentales identifient des facteurs responsables des dommages au système vasculaire cérébral lors du stress hypoxique ischémique. L'identification de ces facteurs permettrait, en théorie, d'établir de nouveaux traitements capables d'atténuer les effets négatifs de la phase aiguë.

Une seconde approche, plus récente et gagnant en popularité, consiste à élucider les mécanismes de guérison normale de l'organisme afin de les exploiter et d'améliorer la

restauration des zones endommagées. Nous présentons ici trois approches d'intérêts en lien avec notre hypothèse. D'abord, l'injection de cellules souches chez la souris, puis l'utilisation de l'érythropoïétine (EPO) dans un essai clinique et, enfin, l'utilisation d'un agoniste dérivé des cannabinoïdes.

Pabon et Borlongan se sont penchés sur l'avancée des traitements des hypoxies-ischémies cérébrales à base de cellules souches (Pabon et al., 2013). Leur revue de la littérature sur ce sujet suggère que, bien que la sécurité à court terme ait été démontrée, les effets à long terme sont toujours inconnus. Les données concernant l'efficacité sont toujours en attente, mais les connaissances actuelles suggèrent que les effets neurotrophiques, anti-inflammatoires et antioxydants favoriseront la récupération du tissu cérébral. Les auteurs sont d'avis que la thérapie cellulaire combinée à l'hypothermie permettra, à la fois, de réduire l'impact de la phase aiguë (dégénération) et d'accroître la récupération.

Dans le cadre du PENUT Trial («*Preterm Erythropoietin Neuroprotection Trial*»; NCT01378273) débutant en 2013, un regroupement de centres dirigé par Dr. Juul de l'Université de Washington testeront l'efficacité de l'injection intraveineuse puis sous-cutanée d'EPO, un facteur de croissance hématopoïétique de la super famille des cytokines impliqué dans l'érythropoïèse, mais également dans l'angiogenèse (Kertesz et al., 2004; Lombardero et al., 2011; Hernandez et al., 2012; Wang et al., 2012). Les critères d'inclusions sont l'âge gestationnel (de 24 à 27 semaines) et l'âge depuis la naissance (maximum de 24 heures). L'objectif est de déterminer si les effets neuroprotecteurs de l'EPO réduisent la mort ou la déficience neurodéveloppementale à 24-26 mois. L'essai a aussi pour objectif de définir s'il existe des risques à l'utilisation de l'EPO chez les petits prématurés, déterminer la concentration circulante de médiateurs inflammatoires et de biomarqueurs de dommage cérébraux. Cette étude vise également à comparer par imagerie par résonance magnétique la structure cérébrale des différents groupes sujets.

Enfin, Fernandez-Lopez et al., se sont intéressés au rôle bénéfique que peuvent jouer les récepteurs cannabinoïdes (CB1 et CB2) (Fernandez-Lopez et al., 2010). Ces récepteurs, principalement connus pour leur rôle dans les fonctions neuronales, ont récemment été

montrés comme favorisant la remyélination et la prolifération d'oligodendrocytes et de neuroblastes. Ces travaux démontrent que l'utilisation d'un agoniste pharmacologique de ces récepteurs est susceptible de favoriser la récupération après l'insulte.

Ces trois exemples tirés de la littérature récente démontrent que les approches visant à favoriser la réparation du tissu neurale, via la stimulation de récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) ou de facteurs de croissance aux effets diversifiés, suite à une insulte hypoxique ischémique est une voie d'intérêt et pour laquelle nous réalisons que nous ne pouvons nous limiter aux cibles classiques en lien avec le développement vasculaire. Largement étudiés dans le cadre du développement du médicament, les récepteurs couplés aux protéines G constituent un aspect particulièrement intéressant et susceptible de générer d'importantes retombées dans le champ des ischémies cérébrales.

C) Rôle des RCPG dans la réponse à l'hypoxie

RCPG : Généralités

L'importance des récepteurs couplés aux protéines G n'est plus à prouver. Leurs rôles dans une diversité de systèmes physiologiques et de conditions pathologiques ont été démontrés à de nombreuses reprises. La diversité d'agents pharmacologiques les ciblant, environ 36% des drogues sur le marché cible des RCPG humains (Tang et al., 2012), est une autre preuve de leur importance biologique. Ces récepteurs sont généralement classifiés en six classes selon leurs homologies de séquences et leurs similarités fonctionnelles (Figure 10) (Foord et al., 2005). Une classification plus récente, basée sur une analyse phylogénétique, propose de regrouper ces récepteurs en cinq familles sous l'acronyme GRAFS (pour glutamate, rhodopsine, adhésion, *frizzled/taste2* et sécrétine) (Fredriksson et al., 2003).

L'étude de ces récepteurs n'a véritablement été entreprise que suite à l'isolation du récepteur β 2-adrénergique par le groupe du Dr. Lefkowitz (Caron et al., 1976). L'identification de l'ADNc a permis de proposer l'existence d'approximativement 750-800 RCPG dans le génome humain. De ce nombre environ 350 correspondraient à des RCPG non olfactifs (Fredriksson et al., 2003; Vassilatis et al., 2003) dont on estime qu'environ 140 sont toujours orphelins (Levoye et al., 2006; Tang et al., 2012).

Les RCPG partagent une organisation membranaire (topologie) similaire (Figure 11). Une région aminée (N-terminale) extracellulaire ainsi qu'une région carboxyl (C-terminale) intracellulaire liée par sept passages transmembranaires constitués d'hélice α . Cette connaissance de la structure de ces récepteurs a longtemps été basée sur les données cristallographiques de la rhodopsine (Palczewski et al., 2000).

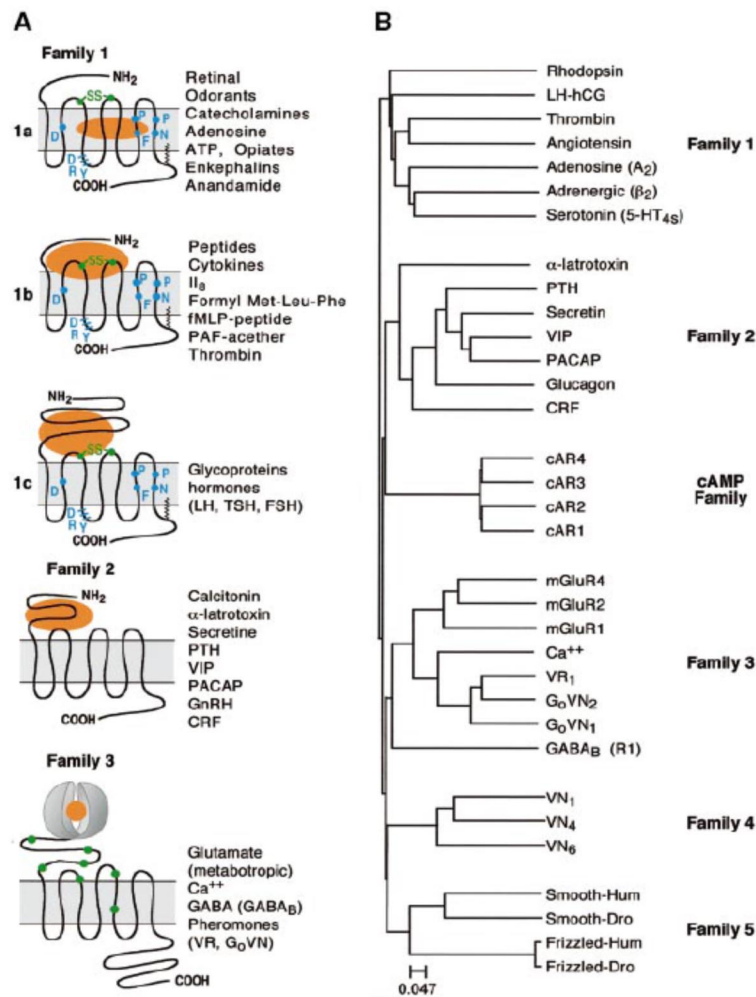


Figure 10. Classification des récepteurs couplés aux protéines G. A. L'une des classifications reconnaît 5 familles de récepteur. La famille 1 comprend les récepteurs de molécules odorantes, les petits ligands (1a), les peptides (1b), les glycoprotéines comme les hormones (1c). La famille 2 inclut les récepteurs des ligands à haut poids moléculaire. La famille 3 compte les récepteurs sensible au calcium et au glutamate. B. La famille 4 est constituée des récepteurs activés par les phéromones. La famille 5 comprend les récepteurs de type «frizzled» et «smoothened». (Tiré de Bockaert et al., EMBO J, 1999).

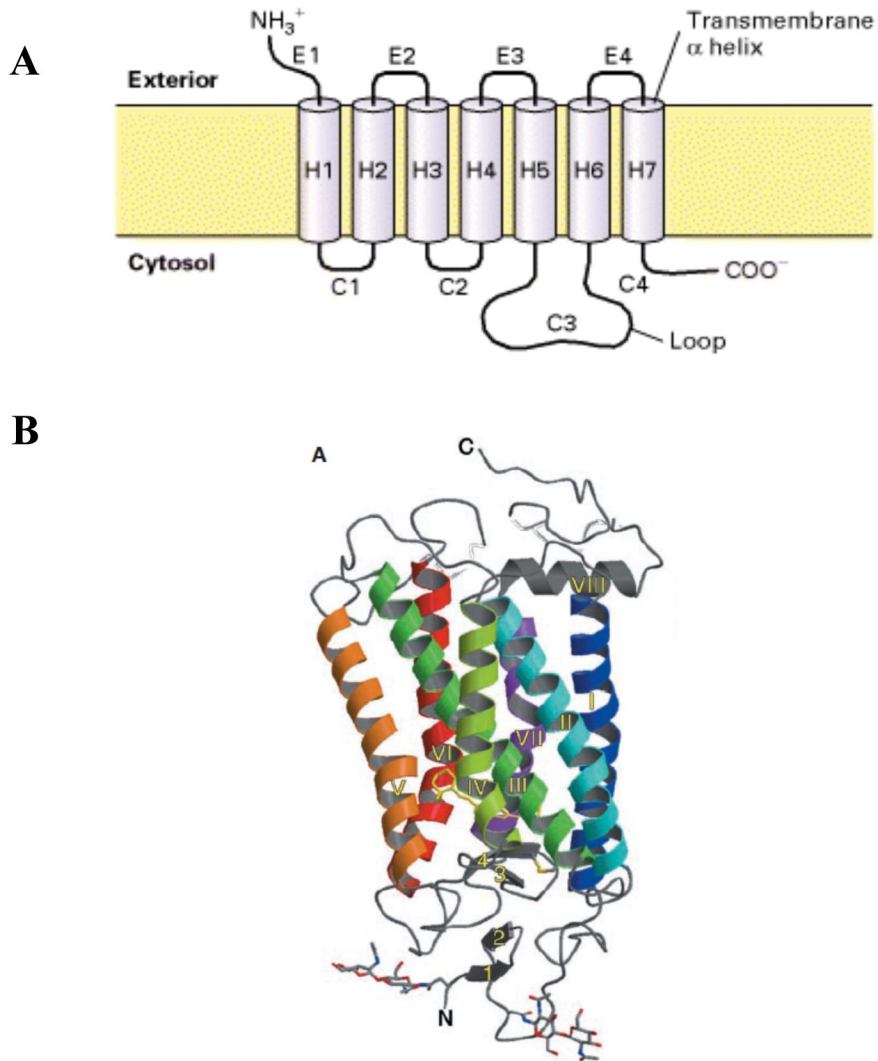


Figure 11. Structure des récepteurs couplés aux protéines G. A. Schéma démontrant l'organisation membranaire des sept passages transmembranaires des RCPG. La longueur des domaines extramembranaires varie selon le récepteur. La longueur des régions C-terminale et N-terminale varient également selon les familles de récepteurs (Tiré de Lodish et al, Molecular Cell Biology 4th edition, 2000). B. Première structure cristallographique d'un membre de la famille des RCPG, récepteur de la rhodopsine A. Cette vue reflète mieux l'organisation en forme de cylindre des helices-alpha transmembranaires (Tiré de Palczewski et al., Science, 2000).

Récemment le développement des méthodes cristallographiques a permis d'obtenir la structure de trois autres RCPG, soit le récepteur β 2-adrénérique (Cherezov et al., 2007; Rasmussen et al., 2007), β 1-adrénérique (Warne et al., 2008) et le récepteur A2A de l'adénosine (Jaakola et al., 2008).

La signalisation des RCPG

La signalisation propre à chacun des RCPG varie selon la structure du récepteur et les partenaires avec lesquelles cette structure lui permet d'interagir. Elle dépend également du changement de conformation induit par l'interaction avec un ligand, qu'il soit orthostérique ou allostérique (Figure 12).

L'étude des RCPG permet de démontrer que ces récepteurs signalent notamment via les protéines G et les arrestines.

a) Protéines G hétérotrimériques

Composé de trois sous-unités ($G\alpha$ et $\beta\gamma$) l'activation du récepteur induit l'échange du GDP lié à la protéine G par un GTP la rendant active. Ce GTP induit un changement conformationnel résultant en la dissociation des sous-unités α et $\beta\gamma$ l'activation d'effecteur. L'hydrolyse du GTP par la $G\alpha$ inactive la sous-unité et permet la réassociation des sous-unités (Figure 12).

b) Arrestines

Initialement considéré comme des composantes importantes de la désensibilisation et de l'internalisation des RCPG leurs rôles dans l'échafaudage de complexes signalétiques se

révélèrent également importants. Formant une famille de quatre membres seuls les arrestines 2 et 3, aussi appelés β -arrestine 1 et 2, sont exprimés de façon ubiquitaire; les arrestines 1 et 4 étant limités au système visuel. Ce rôle dans la transmission du signal de RCPG a notamment été observé dans le recrutement et l'activation de c-SRC (Luttrell et al., 1999; DeFea et al., 2000), MAPK et JNK (DeWire et al., 2007) (Figure 12).

L'étude de la signalisation des RCPG est un domaine de recherche en lui-même et cette brève description ne met qu'en place les éléments permettant de faire le lien entre les composés du métabolisme énergétique et les mécanismes par lesquelles ils sont en mesure d'influencer les fonctions physiologiques.

Les RCPG spécifiques aux composés issus du métabolisme cellulaire

Tel que mentionné antérieurement, l'hypoxie cause un profond désordre métabolique causant l'augmentation ou la réduction d'intermédiaires ayant également le rôle de ligands. Dans cette section, nous verrons qu'il existe des récepteurs spécifiques aux intermédiaires du métabolisme.

a) L'adénosine et les récepteurs purinergiques

Déjà en 1929 Drury et Szent-Györgyi démontrèrent que l'ATP et l'adénosine extracellulaire avaient de puissants effets vasodilatateurs sur les vaisseaux coronaires (Drury et al., 1929). Plus tard, il fut proposé que l'ATP relâchée par les cellules endothéliales durant l'hypoxie induit la production d'oxyde nitrique et une vasodilatation (Burnstock, 2004). En 1979 Burnstock démontra l'existence des récepteurs P1 et P2 respectivement pour l'adénosine et ATP/ADP. Au cours des années suivantes, de nombreux récepteurs purinergiques ayant chacun leurs propriétés, mais pouvant être principalement classifiés comme étant des RCPG ou des récepteurs canaux, ont été identifiés (Burnstock, 2006).

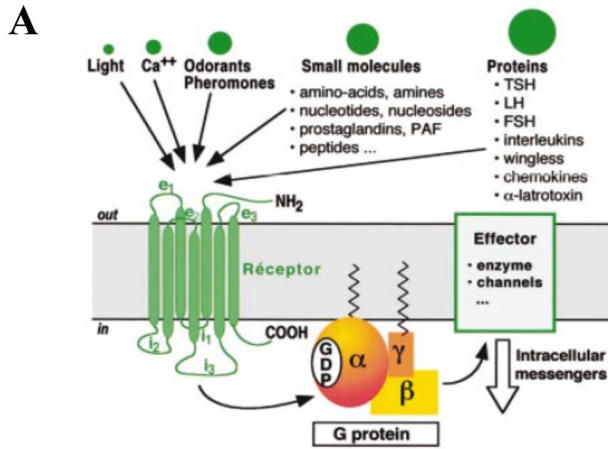
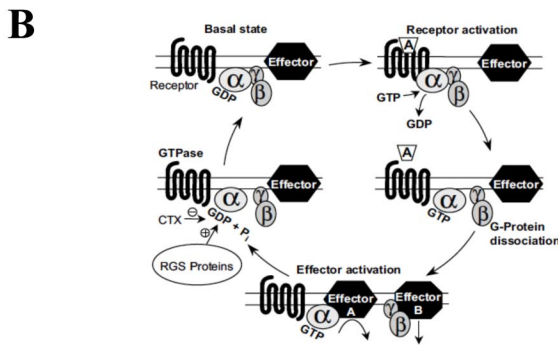


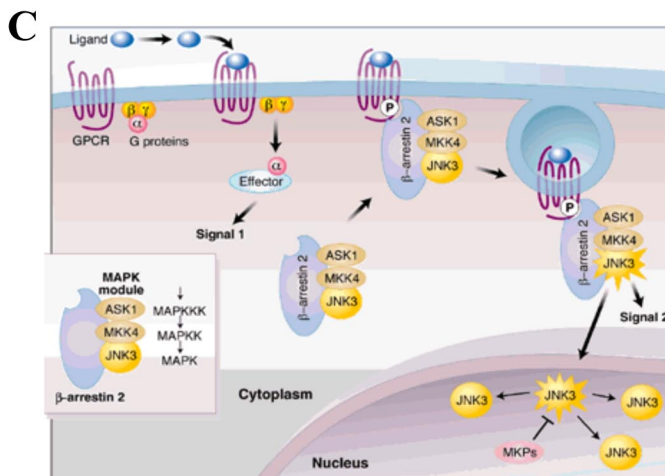
Figure 12. Signalisation des récepteurs couplés aux protéines G. A. Schéma démontrant la diversité de signalisation des RCPG, la variété de ligands et le couplage aux protéines G.

(Tiré de Bockaert et al., EMBO, 1999).



B. Schéma présentant le cycle des protéines G. La liaison d'un ligand au récepteur induit l'échange du GDP pour un GTP. Cet échange permet la dissociation du récepteur et des protéines G α et $\beta\gamma$.

La sous-unité α hydrolyse le GTP et active son effecteur. (Tiré de Offermanns et al., Prog Biophy Mol Bio, 2003).



C. Schéma démontrant le rôle des β -arrestines dans la signalisation indépendante des protéines G. Les β -arrestines peuvent servir d'échaffaudage et permettre le recrutement de nombreuses kinases. (Tiré de Pouyssegur J., Science, 2000).

Bern quant à lui proposa que l'adénosine est produite dans le tissu cardiaque lors d'ischémie-hypoxie et participe au contrôle du tonus vasculaire, assurant un apport constant en oxygène et nutriments (Feigl, 2004). Certains démontrèrent également que l'adénosine pouvait maintenir l'apport en oxygène en induisant l'expression de facteurs proangiogénique (Cronstein, 2004; Adair, 2005). Ces données démontrent que l'adénosine stimule la relâche d'IL-8, de bFGF et de VEGF via le récepteur A₂B alors qu'elle réduirait l'expression du facteur anti-angiogénique TSP-1 via A₂A (Feoktistov et al., 2002; Desai et al., 2005). L'interleukine 8 (IL-8), outre son rôle dans la migration cellulaire, participe également à l'angiogenèse en stimulant la prolifération endothéliale (Polet et al., 2013).

b) GPR91 et GPR99: récepteurs d'intermédiaires du cycle de Krebs

Ayant pour objectif de déterminer de nouvelles cibles thérapeutiques, de nombreux groupes s'attaquent à l'identification des ligands de récepteurs orphelins. Dans ce cas, l'identification de séquences codantes, permettant de prédire une séquence peptidique et la présence d'un récepteur, constitue une étape préliminaire essentielle. L'existence de GPR91 a d'abord été prévue par l'analyse bio-informatique de telles séquences génomiques disponibles tel qu'effectué par Wittenberg et al (Wittenberger et al., 2001). Il fallut toutefois attendre He et al. (2004) pour démontrer la spécificité de GPR91 pour le succinate et l'activation spécifique de certaines voies de signalisation (Ca²⁺, cAMP et IP₃) en présence de ce ligand. Ces mêmes travaux démontrèrent également que le GPR99, un récepteur présentant une forte analogie avec le GPR91, est activé par l'alpha-cétoglutarate. D'un point de vue physiologique, cet article démontre également, outre une forte expression du messenger ARN dans les tissus fortement vascularisés (Figure 13 A), que le succinate influence la pression artérielle. Ceci suggère, pour la première fois, que certains intermédiaires du cycle de Krebs pourraient avoir un rôle physiologique autre que dans la production d'énergie (Figure 13).

Cette idée a été reprise plus en profondeur dans les travaux de Toma (Toma et al., 2008). Les auteurs postulent l'existence d'un lien entre les intermédiaires du métabolisme et l'hypertension artérielle. Ce faisant, ils lient une augmentation du glucose sanguin en contexte

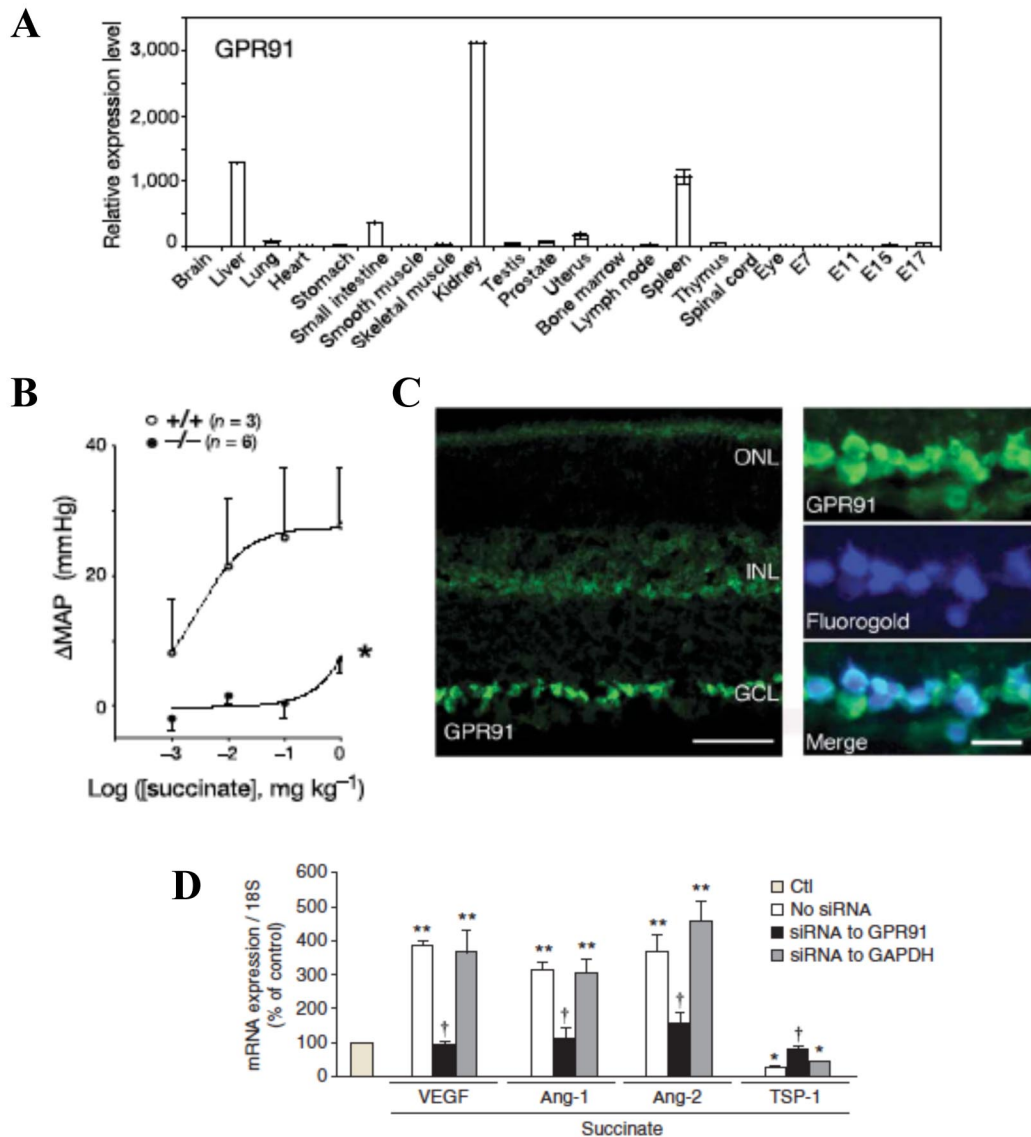


Figure 13. Rôles connus du GPR91. A. Graphique démontrant l'expression de l'ARNm du GPR91 dans différents tissus (Tiré de He et al., Nature, 2004). B. Augmentation de la pression artérielle suite à l'injection de succinate est dépendante du GPR91 puisqu'aucune augmentation n'est observée dans les souris GPR91^{-/-}. (Tiré de He et al., Nature, 2004). C. Dans la rétine interne, GPR91 (vert) est exprimé majoritairement par les cellules ganglionnaires (GCL; «ganglion cell layer») (marquage des cellules ganglionnaires au Fluorogold; bleu) (Tiré de Sapieha et al, Nature Med., 2008). D. Dans cette même étude, l'injection de succinate de façon intraoculaire induit l'expression de plusieurs gènes pro-angiogéniques. (VEGF: «vascular endothelial growth factor»; Ang-1/2: «angiopoetin 1/2»; TSP-1: «Thrombospondine-1») (Tiré de Sapieha et al, Nature Med., 2008)

de diabète à l'augmentation de la pression artérielle. Cette hausse de la pression artérielle repose sur l'augmentation de la relâche de rénine causée par la suractivation du GPR91 dans les cellules endothéliales glomérulaires. Les auteurs démontrent que le succinate induit la production d'oxyde nitrique (NO) et de prostaglandine E2 (PGE₂) en plus d'induire une relâche calcique dans les cellules de l'endothélium (Toma et al., 2008). Vargas et al., démontrèrent un phénomène similaire soit la production de PGE₂ et la relâche de rénine suite à la stimulation de cellules de la *macula densa* où le GPR91 est exprimé (Vargas et al., 2009).

Dans un autre contexte, Rubic et al. (Rubic et al., 2008) démontrèrent que le GPR91 exprimé par les cellules dendritiques agit comme un senseur de danger immunologique. Ils observèrent que les cellules dendritiques dérivées des monocytes (iMoDC) sont celles qui, parmi les cellules du système immunitaire, expriment le plus le GPR91. Dans ces cellules, la stimulation par le succinate induit l'expression de IL-1 β en synergie avec les récepteurs Toll-like (TLR) activés par le lipopolysaccharide (LPS). Dans un test de migration cellulaire, les cellules U937 migrent de manière dose-dépendante.

Dans un 3^e contexte, Sapiaha et al. (Sapiaha et al., 2008) ont démontré qu'en période d'hypoxie rétinienne, l'accumulation de succinate entraîne l'activation du GPR91 et permet le rétablissement d'un apport vasculaire suffisant à la rétine interne. Cette étude rapporte que l'expression du GPR91, spécifiquement par les cellules ganglionnaires de la rétine, assure la production et la sécrétion de facteurs proangiogéniques tels que le VEGF et les angiopoïétines 1 et 2. Dans ce cadre, l'atténuation de l'expression du récepteur dans un modèle de rétinopathie induite par l'oxygène réduit la néovascularisation pathologique normalement observée (voir Sapiaha et al, 2008, figure 6).

c) Autres récepteurs d'intermédiaires du métabolisme

Plus récemment, les récepteurs GPR81, GPR109A et GPR109B ont été identifiés comme étant les récepteurs du lactate, du 3-hydroxy-butyrat et de l'acide 3-hydroxy-octanoïque, ces deux derniers étant des corps cétoniques issus de la bêta-oxydation. D'une

part, le rôle du GPR81 et du lactate dans le contrôle de la lipolyse a été rapporté de façon convaincante (Liu et al., 2009). Cependant, Shurr et al. suggérèrent que le lactate peut servir à la production d'ATP (Schurr et al., 1988). L'effet bénéfique du lactate lors d'hypoxie cérébrale a été étudié par Berthet et al. Ces résultats démontrent que l'injection intra cérébral de lactate réduit la taille de la lésion causée par une obstruction de l'artère cérébrale moyenne. Une réduction de la mort cellulaire est également observée. L'existence que ces effets soient médié par un récepteur spécifique demeure possible mais n'a, jusqu'à maintenant, pas été le sujet de recherche concluante (Berthet et al., 2009).

S'ils soulèvent la question de l'existence de récepteurs spécifiques pour chacun, les fonctions des métabolites en dehors du contexte de la production énergétique soulèvent une seconde question concernant la localisation de ces récepteurs.

D) Une cellule dans une cellule

Au fil des découvertes sur la signalisation des RCPGs l'intérêt porté à leur localisation prit une certaine importance. Alors que le dogme classique supporta longtemps une localisation à la membrane plasmique de ces récepteurs, un nombre croissant d'évidences appuie l'existence de complexes signalétiques fonctionnels à l'intérieur de la cellule (Bkaily et al., 2012). En ce sens, la référence à l'expression "une cellule dans la cellule" qui réfère à la capacité du noyau de répondre aux changements cellulaires prend son sens (Bkaily et al., 2012). Précisons cependant que nous discutons des récepteurs présents, à l'état basal, à l'intérieur de la cellule. Une nuance importante, car certains récepteurs, même une fois internalisés, continuent d'induire une signalisation (Calebiro et al., 2010). C'est donc spécifiquement sur l'activité des récepteurs résidents d'un domaine intracellulaire, plus spécifiquement du réticulum endoplasmique, que nous nous pencherons.

RCPG intracellulaire

Déjà en 1971 Robertson et Khairallah avaient postulé l'existence d'effets nucléaires de l'angiotensine II suite à l'injection intracardiaque de celle-ci (Robertson et al., 1971). Alors même que l'existence d'un récepteur pour ce peptide n'était qu'une hypothèse, ils écrivent : « *The selective cellular localization of angiotensin II suggest that this vasoactive agent or some of its metabolic fragments may have specific effects on nuclear function* » (Robertson et al., 1971). Le récepteur de l'angiotensine a effectivement été identifié et localisé au noyau (Lu et al., 1998; Marrache et al., 2002; Lee et al., 2004). Plus près de nous, le postulat de l'existence de RCPG spécifique pour les dérivés lipidiques localisés à l'intérieur de la cellule naquit suite à l'identification, à la membrane nucléaire (MN) et au réticulum endoplasmique (RE) de plusieurs composantes enzymatiques essentielles à la synthèse d'intermédiaires lipidiques précurseur à la formation (Morita et al., 1995) ou impliqué dans le transport des prostaglandines (Kanai et al., 1995; Bhattacharya et al., 1998). Ces découvertes menèrent à la

démonstration de récepteurs nucléaires EP (EP3 et EP4) et LPAR-1 fonctionnels capables d'induire la relâche de calcium et l'expression génique (Bhattacharya et al., 1998; Bhattacharya et al., 1999; Gobeil et al., 2003) (Figure 14).

Depuis, plusieurs autres récepteurs de cette famille ont été observés à l'intérieur de la cellule, et ce dans différents organes et type cellulaire (Tableau III). À cela s'ajoute la détermination de la présence dans la région périnucléaire des nombreuses protéines impliquées dans la transmission du signal et la production de seconds messagés tels que les protéines G (Zhang et al., 2001; Gobeil et al., 2002; Boivin et al., 2005), l'adénylate cyclase (Dupre et al., 2006; Dupre et al., 2007), les phospholipases (Schievella et al., 1995; Kim et al., 1996; Freyberg et al., 2001), les «*G-protein Receptors Kinases*» GRKs (Yi et al., 2002; Johnson et al., 2004; Yi et al., 2005) et la «*Protein Kinase A*» PKA (Sastri et al., 2005). Ces découvertes ne confirment pas en elle-même l'existence de récepteurs fonctionnels dans la région périnucléaire, mais permettent de supposer la présence d'une machinerie complète et fonctionnelle qui permettra au récepteur d'activer un patron de signalisation spécifique et d'induire les changements cellulaires requis à partir de la région périnucléaire. Elle soulève également la question de la pertinence de la localisation de ces protéines qui ne seraient autrement pas requises.

Si la majorité des études concernant les RCPGs intracellulaires ont mis l'emphase sur les récepteurs à la membrane nucléaire, certaines ont démontré leurs présences au RE et même la possibilité d'activité à partir de cette organelle.

Parmi ces travaux, rappelons d'abord ceux portant sur le récepteur AR-a_{2C} ayant démontré que la majeure portion de ce récepteur, endogène (Rosin et al., 1996; Richman et al., 1998; Brum et al., 2006) ou transfecté (Brum et al., 2006; Angelotti et al., 2010), est retenu dans le réticulum endoplasmique. Hurt et al démontrèrent toutefois que cette localisation varie selon le type cellulaire suggérant la participation de partenaires d'interactions cellule-spécifique (Hurt et al., 2000). En effet, une différence majeure dans la localisation du récepteur est observable selon qu'il s'agisse de cellules NRK, AtT20 ou PC12 (Figure 15). Cette étude démontre également une activité adénylate cyclase comparable

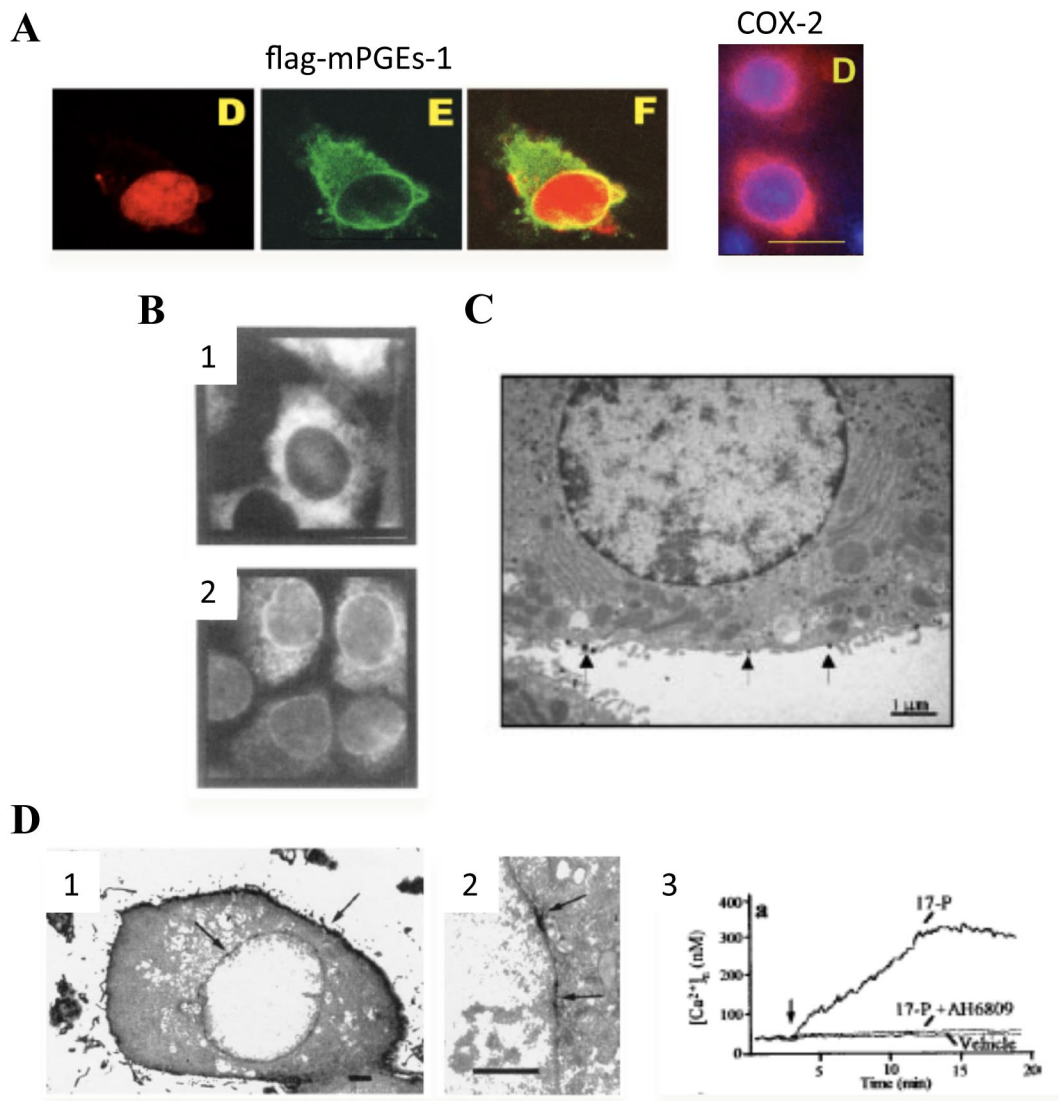


Figure 14. Évidences supportant l'hypothèse des récepteurs intracellulaires. A. Localisation dans la région périnucléaire de mPGES-1 et de COX-2, deux enzymes impliquées dans la production de prostaglandine. (Tiré de Vazquez-Tello et al., *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2004) B. De façon similaire, localisation perinucléaire des PGH synthase 1 et 2 exprimés de façon endogène dans les fibroblastes 3T3. (Adapté de Morita et al., *JBC*, 1995). C. Localisation par microscopie électronique du récepteur de l'acide lysophosphatique (LPA₁R) sur des cryosections de foie. (Tiré de Gobeil et al., *JBC*, 2003) D. Localisation périnucléaire du récepteur EP1 dans les cellules endothéliales de porc (1). Agrandissement de la région membranaire est visible en (2). Réponse calcique suite à la stimulation de noyaux cellulaires isolés de cellules myométriales (Agoniste EP1 : 17-P : 17-phenyltrior PGE₂, AH6809 et antagoniste EP1: AH6809) (Adapté de Bhattacharya et al., *PNAS*, 1998)

Tableau III : Liste des récepteurs couplés aux protéines G localisés dans la région nucléaire

RCPG	Type cellulaire / Tissu	Espèces	Fonction	Références
mAChR	Cornée, cellules endothéliales et épithéliales	Lapin	↑ activité de l'ADN et ARN Pol II	Lind GJ et al., 1993 Lind GJ et al., 1995 Cavanagh HD et al., 1989
APJ	Cervelet, hypothalamus, cellules du cervelet D283 Med transfectées	Humain	Inconnu	Lee DK et al., 2004
α-AR	Myocytes ventriculaires néonatal et adulte	Rat, murin	Activation de ERK, prolifération	Buu NT et al., 1993 Huang Y et al., 2007
β-AR	Myocytes ventriculaires néonatal et adulte	Rat, murin	↑ AMPc nucléaire, couplage à protéine G	Boivin B et al., 2006 Buu NT et al., 1993
AT ₁ R	Cellules endothéliales vasculaires, VSMC	Rat, hamster	↑ Ca ⁺⁺ nucléaire, activation de ERK et p38	Lee DK et al., 2004 Lu D et al., 1998 Robertson AI et al. 1971 Re RN et al., 1983 Re RN et al., 1984 Cook JL et al., 2006 Booz GW et al., 1992 Eggena P et al., 1993 Erdmann B et al., 1996 De Mello WC et al., 1998 Haller H et al., 1999 Bkaily G et al., 2003
AT ₂ R	VSMC, cellules endothéliales de l'endocarde	humain	↑ Ca ⁺⁺ nucléaire	Bkaily G et al., 1997 Jacques D et al., 2003 Jacques D et al., 2006
CysLT1	Tissus de colon, cancer colorectal, cellules Int 407, et CaCo-2	Humain	↑ Ca ⁺⁺ nucléaire, activation de ERK	Nielsen CK et al., 2005
CXCR4	Hépatome, cancer colorectal, cellule HT-29	Humain	Tumorigénèse?	Shibuta K et al., 2002 Spano JP et al., 2004 Gobeil F et al., 2006
EP receptors	Cerveau, myomètre, foie, cellules transfectées	Murin, humain	↑ Ca ⁺⁺ nucléaire, activation de ERK et PKB	Gobeil F et al., 2002 Bhattacharya M et al., 1998 Bhattacharya M et al., 1999
ETR	Foie, VSMC, myocytes ventriculaires adultes	Rat, humain	↑Ca ⁺⁺ nucléaire, ↑ phosphorylation	Boivin B et al., 2003 Hochoer B et al., 1992 Bkaily G et al., 2000 Jacques D et al., 2005
MT2	Cellules de choriocarcinome de placenta	Humain	Inconnu	Lanoix D et al., 2006

(Suite sur la page suivante)

(Adapté de Boivin et al., J of receptor and signal transduction research, 2008)

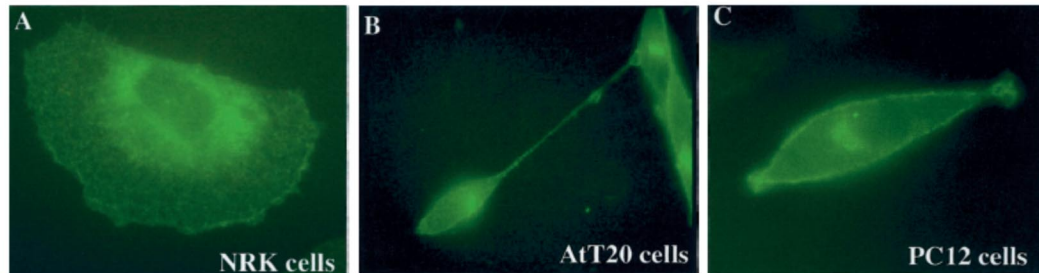
Tableau III : Liste des récepteurs couplés aux protéines G localisés dans la région nucléaire (suite)

RCPG	Type cellulaire / Tissu	Espèces	Fonction	Références
LPA ₁ R	Hépatocytes, cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux	Rat, porc	↑ Ca ⁺⁺ nucléaire, activation de ERK et PKB	Gobeil FJ et al., 2003
MC2R	Cellules adrénales Y6	Humain	Inconnu	Doufexis M et al., 2007
NK ₁ R	Cellules neurales du ganglion spinal	Rat	Inconnu	Boer PA et al., 2006
OPR1/2	Cellules neurohybrides NG108-15 (OPR1)	Humain, hamster	Couplage à protéine G, activation de PKC	Belcheva M et al., 1993 Ventura C et al., 1998
PAFR	Foie, cellules endothéliales microvasculaires cérébrales	Rat, porc	↑ DAG nucléaire, ↑ Ca ⁺⁺ nucléaire	Zhu T et al., 2006 Marrache AM et al., 2002 Miguel BG et al., 2001
VPAC	Cellules HT29	Humain	Inconnu	Omary MB et al., 1987
Y1R	Cellules de la glande pituitaire	Rat, humain	Inconnu	Chabot JG et al., 1988 Jacques D et al., 2003
GLRN-R	Cellules HEK293 transfectées	Humain	Inconnu	Leung PK et al., 2007
PTH ₁ R	Rein, foie, intestin, utérus, ovaire,	Rat, murin	Synthèse d'ADN, mitose	Watson PH et al., 2000 Watson PH et al., Bone, 2000 Faucheu C et al., 2002 Pickard BW et al., 2006
mGluR5	Cellules neuronales, cellules HEK293 transfectées	murin	↑ Ca ⁺⁺ nucléaire,	O'Malley KL et al., 2003
GnRHR	intestins	C. elegans	Inconnu	Vadakkadath MS et al, 2006
NPYR	cellules endothéliales de l'endocarde	humain	↑ Ca ⁺⁺ nucléaire	Jacques D et al., 2006

Abréviations: mAChR: récepteur muscarinique de l'acétylcholine, APJ: récepteur de l'apeline, α-AR: récepteur alpha adrénergique, β-AR: récepteur beta-adrénergique, AT₁R: récepteur de type1 de l'angiotensine II, AT₂R: récepteur de type2 de l'angiotensine II, CysLT₁: récepteur de type 1 du cystéinyle leukotriène, CXCR4: Récepteur 4 de la chimiokine CXC, EP receptor: récepteur de la prostaglandine E2, ETR: récepteur de l'endothéline, GLRN-R: récepteur de la ghréline, LPA₁R: récepteur de type 1 de l'acide lysophosphatidique, MC2R: récepteur de la mélanocortin-2, MT2: récepteur 2 de la mélatonine, NK₁R: récepteur 1 de la tachykinine, OPR1/2: récepteur 1/2 du peptide opioïde, PAFR: récepteur du facteur plaquettaire activé, PRLR: récepteur de la prolactine, VPAC: récepteur du peptide vasoactif intestinal, Y1R: récepteur du neuropeptide Y, PTH₁R: récepteur de l'hormone parathyroïde, mGluR5: récepteur 5 métabotropique du glutamate, GnRHR: récepteur de l'hormone de relâche de la gonadotropine, NPYR: récepteur du neuropeptide Y

(Adapté de Boivin et al., J of receptor and signal transduction research, 2008)

A



B

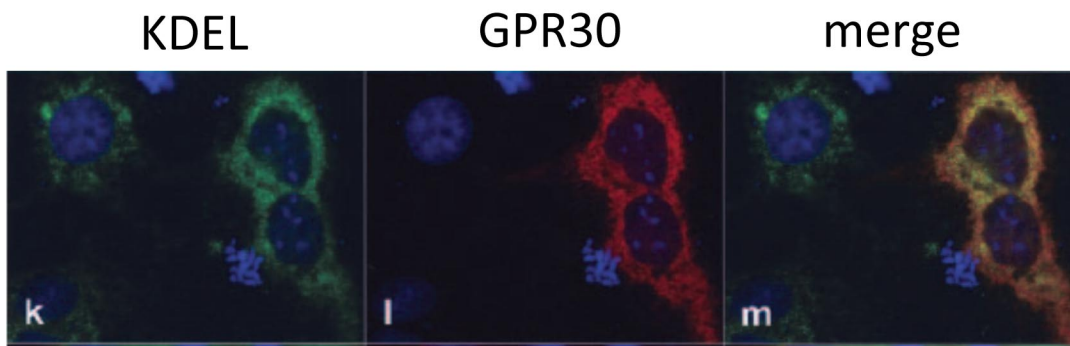


Figure 15. Exemples de récepteurs présentant une localisation intracellulaire. A. La localisation du récepteur adrénergique α_2c varie selon le type cellulaire dans lequel elle est étudiée. Une localisation périnucléaire nette dans les cellules NRK et, à l'inverse, à la membrane plasmique dans les PC12. (Tiré de Hurt et al., JBC, 2000). B. Le récepteur GPR30 co-localise avec le marqueur de réticulum endoplasmique KDEL dans les cellules COS-7 (Tiré de Otto et al., Endocrinology, 2008).

suggérant une fonctionnalité équivalente entre les récepteurs à la membrane plasmique et intracellulaire (Hurt et al., 2000).

Une seconde série de travaux, pour sur le récepteur du GABA, démontra que l'absence de la sous-unité GABA_{B2} empêche la sous-unité GABA_{B1} d'échapper du réticulum endoplasmique et d'atteindre la membrane plasmique (White et al., 1998; Margeta-Mitrovic et al., 2000). Dans ce cas, le motif de rétention RXR présent dans la portion C-terminale de la sous-unité B1 est masqué lors de l'assemblage du complexe hétérodimériques permettant la translocation du complexe et aux auteurs de qualifier l'hétérodimérisation de point de contrôle du trafic («*trafficking checkpoint*») (Jones et al., 1998; Ng et al., 1999). La sous-unité B1 ne peut migrer seule à la membrane. Il s'agissait là d'un mécanisme semblable à ce qui avait été déterminé pour le canal K⁺-dépendant de l'ATP, un canal à multiples passages transmembranaires (Zerangue et al., 1999).

De façon similaire, la mutation des sites de glycosylation Asn18 et Asn33 accélère l'export des récepteurs delta-Opioïde du RE à la membrane plasmique (Markkanen et al., 2008) suggérant que, dans le cas de ce récepteur, le motif de glycosylation influence la structure conformationnelle des récepteurs et, du même coup, l'interaction avec des partenaires permet la rétention au RE. Cette rétention plus longue du récepteur natif assurerait l'expression de récepteur mature et correctement replié.

À l'inverse des exemples précédent, le GPR30 représente probablement la preuve la plus pertinente d'un récepteur localisé de manière constitutionnelle au RE et, bien qu'une certaine controverse demeure en ce qui concerne la nature de son ligand, les évidences expérimentales suggèrent, dans l'ensemble, que le récepteur agisse de cette localisation. Ce récepteur est adéquatement localisé au réticulum endoplasmique par co-marquage avec le récepteur KDEL, un marqueur spécifique du réticulum endoplasmique (Revankar et al., 2005). Les travaux de Otto et al. confirment la spécificité de l'anticorps (en démontrant la colocalisation du récepteur couplé au GFP et du marquage à l'anticorps contre GPR30), mais soulèvent un doute quant à la spécificité du récepteur pour l'estrogène (Otto et al., 2008) (Figure 15).

Ces quelques exemples de récepteurs à sept passages transmembranaires étant observés au réticulum endoplasmique nous démontrent que la localisation de ceux-ci peut être influencée par de nombreux paramètres incluant les partenaires d'interactions et la présence de séquences de rétention au réticulum endoplasmique.

Export et rétention au RE

C'est principalement dans le cadre de travaux portant sur la synthèse et la maturation des RCPG que leurs mécanismes d'exportations et de rétention ont été étudiés. Règle générale, nous avons cherché à déterminer les séquences peptidiques agissantes, en induisant une structure tertiaire caractéristique, de signal de rétention au réticulum endoplasmique, mais il est également pertinent de voir quelques éléments déterminant la localisation de protéine membranaire à la membrane plasmique.

a) Signaux d'export à la membrane

Dans les protéines membranaires, autres que les RCPG, deux classes de signaux d'exports du RE ont été identifiées. Les motifs de type diacidique (DXE) ont été observés dans le domaine C-terminal de la protéine virale VSVG, le canal CFTR ainsi que le canal Kir2.1 (Nishimura et al., 1997; Nishimura et al., 1999; Wang et al., 2004). DXE permet notamment l'interaction avec COPII et des protéines accessoires dans certains cas (Nishimura et al., 2002). La seconde classe est constituée de motif dihydrophobe de type double phénylalanine (FF). Il est en outre requis pour le transport des protéines ERGIC-53, p24 ainsi que Erv41-Erv46 (Fiedler et al., 1996; Dominguez et al., 1998; Nufer et al., 2002; Otte et al., 2002; Nufer et al., 2003). Ce signal permet l'interaction avec Sec23/24 et, s'il est aboli, affecte l'export à la membrane (Dominguez et al., 1998).

Dans le cas des RCPG, les travaux ont également supporté l'importance de la région C-terminale à proximité de la membrane. Une série de séquences ont été identifiées par mutagenèse.

Région C-terminale

E(X)3LL

L'importance de ce motif a été démontrée dans la translocation vers la membrane plasmique via les puits de clathrine (Hunziker et al., 1994; Heilker et al., 1996). Certains ont démontré que ce motif est crucial à l'expression à la membrane plasmique du récepteur V2R (Schulein et al., 1998). Le récepteur mutant pour le glutamate ou la leucine (ou la combinaison des deux) est maintenu au RE.

F(X)3F(X)3F

Identifiée dans le récepteur de la dopamine de type 1 (D₁R), la mutation des phénylalanines entraîne un changement de distribution (rétention complète au RE). En contrepartie, une telle mutation entraîne une perte de capacité à induire la production d'AMPc (Bermak et al., 2001).

FN(X)2LL(X)3L

Ce motif a été identifié dans le domaine C-terminal du récepteur de la vasopressine (V1b/V3). Dans ce cas également, la mutation des résidus essentiels diminue la distribution à la membrane plasmique (Robert et al., 2005).

F(X)6LL

Cette séquence, observée dans les récepteurs α_{2B} -AR et AT₁R, est essentielle pour l'expression à la surface ainsi que la signalisation de ces récepteurs (Duvernay et al., 2004).

Région N-terminale

Le rôle de la région N-terminal dans l'export des RCPGs a également été étudié. Le domaine incluant les 12 premiers acides aminés du récepteur α_{2B} -AR est essentiel à la localisation à la membrane plasmique puisqu'une fois tronqué le récepteur est maintenu au RE (Dong et al., 2006). C'est également dans cette région que la glycosylation peut influencer la localisation, mais l'importance de cette composante, comme nous le verrons plus loin, varie largement selon les récepteurs.

b) Signaux de rétention au RE

KDEL

Identifiée par Munro et Pelham (Munro et al., 1987), la séquence peptidique Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL) permet la rétention au réticulum endoplasmique de protéines solubles destinées à être maintenues dans la lumière de celui-ci. Ces protéines, telles que les chaperones BiP (grp78), grp94 et la disulfide isomérase, contiennent cette séquence dans leur région C-terminal et permettent l'interaction avec le récepteur KDEL. Cette interaction induit la formation de vésicule COPI assurant le transport rétrograde et le retour de ces protéines résidentes du RE à cette organelle (Figure 16).

KKXX

En ce qui a trait aux protéines membranaires, la séquence de récupération Lys-Lys-X-X (KKXX) permet l'interaction entre la protéine et le complexe COPI sans dépendre d'un

récepteur (comme c'est le cas pour la séquence KDEL) (Jackson et al., 1990; Stornaiuolo et al., 2003).

RXR

À l'inverse, la séquence RXR constitue un signal fort de rétention au RE qui, seulement s'il est masqué, peut permettre la distribution à la membrane plasmique. Cette séquence est à la base des motifs de rétentions présents dans les récepteurs GABAB1 et V2R (Zerangue et al., 1999; Margeta-Mitrovic et al., 2000; Hermosilla et al., 2001; Zhou et al., 2002).

ALAAALAAAAA

Les séquences de rétentions ci-haut mentionnées sont situées dans la portion C-terminale (cytosolique) des protéines et récepteurs et constitue donc des signaux reconnus par la machinerie cellulaire présente dans le cytosol. À l'inverse, l'étude menée par Angelotti et publiée en 2010 dévoile la présence, dans le domaine N-terminal du récepteur adrénergique alpha2c (α_{2c} -AR), d'une nouvelle séquence de rétention au RE (Angelotti et al., 2010). Cette séquence peptidique ALAAALAAAAA constituerait la première démonstration d'une séquence de rétention sur la face luminale du RE pour un RCPG.

Il est important de noter que dans cette même étude, les auteurs démontrèrent que la mutation des sites de glycosylations dans les domaines extracellulaires réduit d'environ 5% la proportion de récepteurs intracellulaires au profit de la membrane plasmique. Une réduction qui, selon les auteurs, n'est pas déterminante dans le cas de ce récepteur.

Malgré ces travaux, l'objet précis de la rétention de l'isoforme 2C est inconnu. Filipeanu et al. suggèrent l'existence d'un défaut intrinsèque entraînant un mauvais repliement et des problèmes d'exportation (Angelotti et al., 2010). Hurt et al. quant à eux postulèrent qu'il ne s'agit là que d'un mécanisme de rétention distinct sans invoquer la théorie du mauvais repliement (Hurt et al., 2000; Filipeanu et al., 2011).

En conclusion, nous avons vu qu'il existe différents signaux de rétention au réticulum endoplasmique. Parmi ces travaux, retenons deux conclusions d'Angelotti et al. pertinentes à nos travaux: 1) un signal de rétention au RE peut être localisé sur la face luminale du RCPG et 2) il est possible que l'état de la glycosylation influence la distribution cellulaire d'un RCPG.

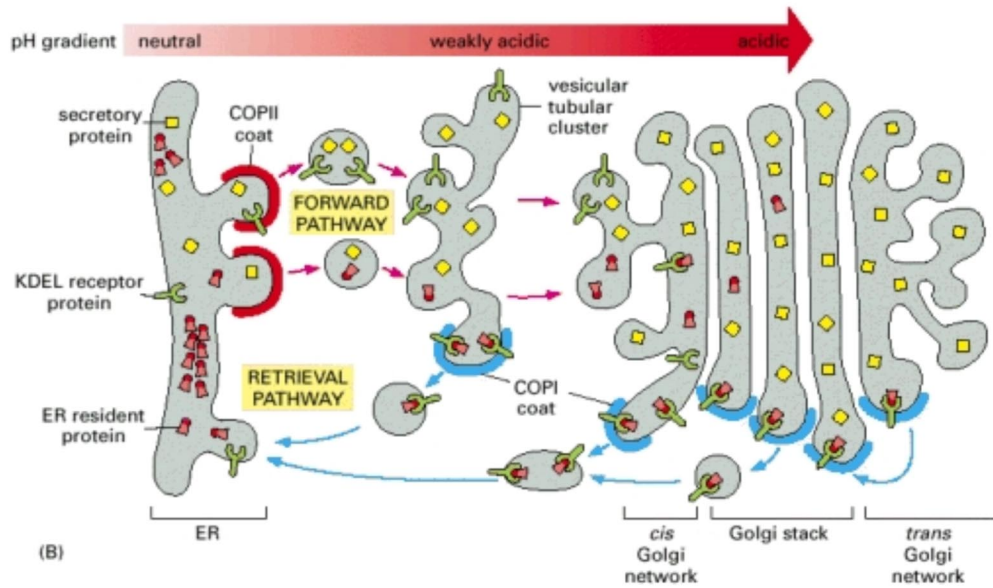


Figure 16. Transport antérograde et rétrograde au réticulum endoplasmique. Les protéines s'échappant du réticulum endoplasmique mais portant la séquence de rétention KDEL sont renvoyées vers le réticulum par une vésicule COPI (voie bleue). (Tiré de Albert B. et al., Molecular Biology of the Cell 4th edition, 2002)

Modifications post-traductionnelles des RCPG

Diverses modifications post-traductionnelles peuvent contribuer à modifier la structure des RCPG et ainsi influencer leur activité et leur localisation (Janovick et al., 2003; Pietila et al., 2005; Conn et al., 2006; Janovick et al., 2006) (Figure 17). La phosphorylation de ces récepteurs, notamment par les GRKs, influence l'interaction avec plusieurs protéines d'échafaudages et contribue au recrutement de protéines de signalisation permettant la transduction du signal et la désensibilisation (internalisation et dégradation/recyclage) des récepteurs.

L'ajout de chaîne lipidique, telle que la palmitoylation, via un lien covalent lié à une cystéine, a été observé au cours des années 1980 et, pour certains récepteurs, influence la conformation, la dimérisation des récepteurs (Zheng et al., 2012) et la localisation cellulaire (Karnik et al., 1993; Zhu et al., 1995; Fukushima et al., 2001; Percherancier et al., 2001).

L'ubiquitination est certes réputée pour contrôler la dégradation des protéines, une tâche qu'elle exécute également sur les RCPGs, mais participe aussi à réguler l'expression à la surface et l'activité de ces récepteurs. C'est d'ailleurs le cas du récepteur Frizzled dont l'expression à la membrane est fortement augmentée lorsqu'il est désubiquitiné. Cette réduction de l'état d'ubiquitination augmente l'activité de ce récepteur (Mukai et al., 2010). De façon similaire, l'état d'ubiquitination du récepteur de l'albinisme oculaire de type 1 (OA1) influence la localisation dans les endosomes en augmentant ainsi la quantité délivrée au tissu (Giordano et al., 2011).

Enfin, la glycosylation constitue l'une des modifications les plus ubiquitaires, non seulement pour la famille des RCPGs, mais pour nombre de protéines. Le rôle de la glycosylation comme signal actif de rétention des RCPG au RE n'a jamais, à notre avis, été étudié.

La N-glycosylation

Selon Apweiler et al., près de la moitié des protéines eucaryotes seraient des glycoprotéines et près de 90% de celles-ci seraient N-glycosylés (Apweiler et al., 1999). La glycosylation représente une étape cruciale de la maturation des protéines assurant un repliement adéquat, une stabilité et rigidité structurale, influençant la solubilité et participant à réguler la dégradation des protéines (Helenius et al., 2004). Ajouté en bloc sur les polypeptides en cours de synthèse par l'oligosaccharyl transférase, l'oligosaccharide de base, composé de trois glucoses, neuf mannoses et de deux N-acetyl-glucosamines (Glu3Man9GlcNac2), est progressivement élagué et mûré au cours de sa migration à travers l'appareil de Golgi. Ce processus de maturation génère trois types de glycans soit l'oligomannose (ou "mannose-rich"), le glycan de type complexe et l'hybride (Figure 18).

La synthèse des N-glycan débute sur la face cytosolique du réticulum endoplasmique par le transfert de GlcNac-P sur le dolichol phosphate, une étape critique pouvant être inhibé par l'inhibiteur tunicamycin, afin de générer le dolichol pyrophosphate N-acétylglucosamine (Dol-P-P-GlcNac) et se termine par l'ajout du N-Glycan, par l'oligosaccharyltransférase (OST), sur le polypeptide naissant dans la lumière du RE. L'ajout des molécules de sucres constituant le glycan de base s'effectue par une série d'enzyme de part et d'autre de la membrane du réticulum; une "flippase" transférant la molécule en cours de synthèse.

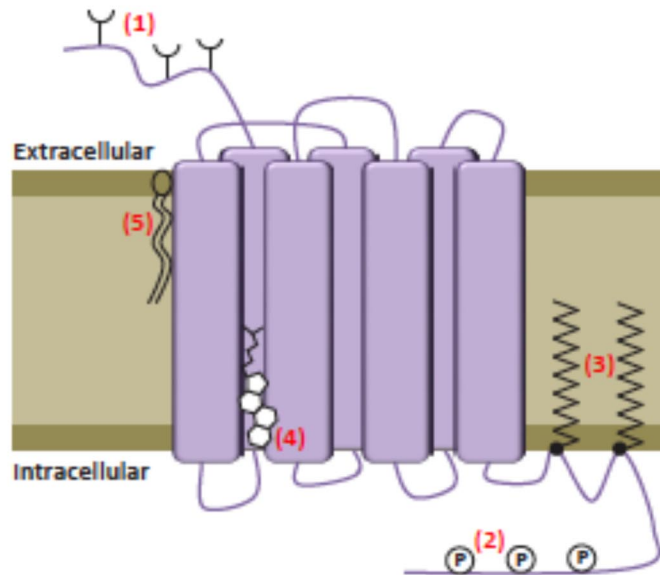


Figure 17. Modifications post-traductionnelles des récepteurs couplés aux protéines G. Plusieurs modifications post-traductionnelles influencent la structure et la fonction des RCPG. La glycosylation (1) est fréquemment retrouvée dans la portion N-terminal. La phosphorylation (2) réversible du domaine C-terminal influence l'interaction entre le récepteur et des partenaires de signalisation. La palmitoylation (3) influence la structure tertiaire des domaines intracellulaires. (4) Insertion de molécule de cholestérol influence l'activité du récepteur. (5) Certains lipides membranaires influencent l'activité des récepteurs. (Tiré de Goddard et al., BMC Biology, 2012)

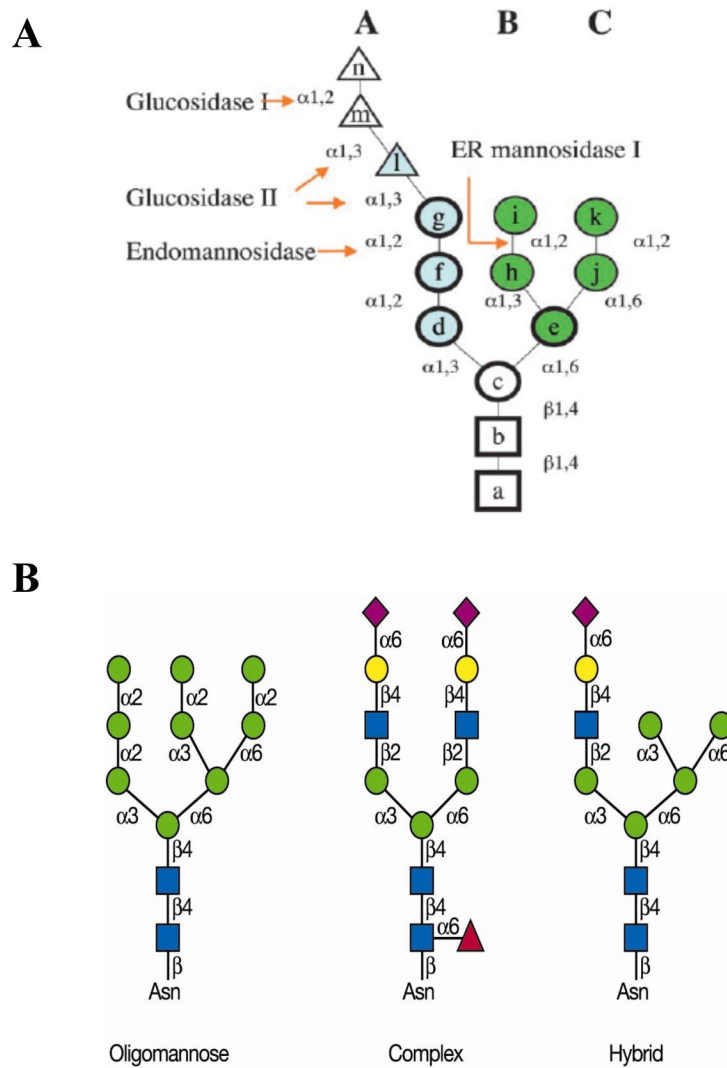


Figure 18. Structure des N-Glycan ajoutés au cours du processus de N-Glycosylation.
 A. L'oligosaccharide de base est composé de trois glucoses (triangles) neuf mannoses (cercles) et 2 N-acétylglucosamines (carrés). Les sites de digestion par les glucosidases et les mannosidases sont indiqués. (Tiré de Helenius A. et al., Annual review of biochemistry, 2004). B. Les différents types de glycans généralement retrouvés chez les eucaryotes; oligomannose (ou riche en mannose), complexe ou hybride. (Tiré de Varki et al., Essential of Glycobiology 2nd edition, 2009)

Afin de permettre l'interaction avec les chaperones du RE facilitant le repliement des protéines, une première étape de clivage est effectuée par les α -glucosidase I et II. Réduire l'efficacité de cette première étape de maturation par l'emploi d'inhibiteur de la glucosidase I (Castanospermine ou déoxynojirimycin) augmente la durée du transit en général dans le réticulum endoplasmique. Une vaste majorité de glycoprotéines sont, avant de quitter le réticulum endoplasmique, exposées à l' α -mannosidase I qui clive le mannose terminal en position α 1-2. Une fois dans l'appareil de Golgi plusieurs modifications sont apportées aux glycanes; une revue détaillée de la maturation des glycoprotéines peut être trouvée dans (Varki et al.).

Tel que mentionné précédemment le repliement des glycoprotéines dans le réticulum endoplasmique requiert l'interaction avec les chaperones de type «*lectine-like*» calnexine et calreticuline. Celles-ci participent à la rétention des protéines dans le réticulum endoplasmique jusqu'à l'obtention d'un repliement adéquat. Cet état de repliement adéquat est déterminé par la UDP-Glc glycoprotéine glucosyltransférase (UGGT) qui, lorsqu'elle reconnaît des domaines hydrophobes, reglucosyle l'oligosaccharide (préalablement clivé par l' α -glucosidase II). Cet ajout rétablit la structure du Glc1Man9GlcNAc2 et permet l'interaction avec les chaperones calnexin et calreticuline. Ce cycle de déglucosylation/glucosylation s'effectue jusqu'à l'obtention d'une protéine adéquatement repliée (Varki et al.).

Les RCPG sont également sujets à la glycosylation; cette modification constituant une étape essentielle de la maturation de cette classe de protéine. Pour certains récepteurs l'abolition des sites de glycosylation affecte la localisation, la liaison avec le ligand ou l'oligomérisation.

L'ensemble des études ayant étudiés les effets sur la localisation ont démontré l'importance de la N-glycosylation pour l'expression à la surface. C'est notamment le cas pour les récepteurs AT1 (Lanctot et al., 1999; Lanctot et al., 2005), rhodopsine (Reeves et al., 2002), FPR (Wenzel-Seifert et al., 2003), bradykinine B2 (Michineau et al., 2006) et CXCR-2 (Ludwig et al., 2000). De façon similaire, cloner le domaine N-terminal du récepteur EPO du

Spalax galili (sEPO), un rat-taupe vivant majoritairement dans un environnement souterrain, sur la séquence du récepteur murin (mEPO) induit un changement de distribution en faveur de la membrane plasmique. Cette différence serait causée par la structure extracellulaire permettant une maturation plus rapide de l'oligosaccharide et réduirait la durée du transit au réticulum endoplasmique (Ravid et al., 2007).

Tel que soulevé par Helenius et al., il a longtemps semblé étrange qu'en cours d'évolution les cellules aient maintenu un système de modification si peu efficace. Un processus dépendant de l'ajout d'oligosaccharides devant être clivés avant d'être reconstruit avec des sucres différents est nécessairement important; il n'aurait autrement pas été maintenu à travers l'évolution(Helenius et al., 2004).

a) Impact de l'hypoxie sur la glycosylation

Tel que mentionné précédemment, l'hypoxie, via une réduction de la disponibilité en oxygène, affecte de nombreuses voies métaboliques, mais un changement dans l'expression génique des enzymes impliquées dans ces voies a également un impact important. Le lien entre la glycosylation et les effets néfastes de l'hypoxie sur les voies métaboliques a été observé sur ces deux aspects. D'une part, l'accumulation de HIF-1 induit l'expression de nombreuses protéines impliquées dans le métabolisme du glucose. L'expression du transporteur GLUT1 et d'autres enzymes limitantes du métabolisme aérobie ou anaérobie est augmentée, modifiant, en théorie, les niveaux d'UDP-GlcNAc ce qui influencerait la structure des glycanes et le processus de glycosylation. Cet impact sur le substrat est incertain et peu documenté. Manzari et al. (Manzari et al., 2007). ont observé une augmentation de l'expression des enzymes impliquées dans la synthèse de l'UDP-GlcNAc suggérant que les niveaux de GlcNAc devraient croître proportionnellement en hypoxie. Cependant, des données non publiées de Shirato et al. suggèrent que l'expression accrue de ces enzymes n'est pas reflétée dans le groupe d'UDP-GlcNAc puisqu'une quantification par spectrométrie de masse démontra une réduction de près de 50% de ce composé en situation d'hypoxie (Shirato et al., 2011).

Dans un modèle animal d'hypoxie cérébrale, Hisanaga et al. ont démontré une forte diminution de la concentration en nucléotides (ATP, GTP, UTP et CTP)(Hisanaga et al., 1986) et, en considérant l'importance de l'UTP dans la production d'UDP-GlcNAc, il s'agit là d'un autre indice suggérant que l'hypoxie affecte les processus de glycosylation (Figure 19).

D'un point de vue évolutif, rappelons-nous de la structure du domaine N-terminal du récepteur de l'érythropoïétine du rat-taupo *Spalax galili*. L'hypothèse des auteurs quant à cette modification du nombre de sites de glycosylation repose sur le besoin d'une sensibilité accrue pour l'EPO. La pression de sélection causée par l'exposition à un environnement hypoxique aurait favorisé l'apparition d'un récepteur présentant une quantité supérieure de sites de glycosylation conférant à l'espèce les avantages d'une quantité accrue de récepteur à la membrane (Ravid et al., 2007).

Transport du succinate

Le succinate produit dans la mitochondrie peut, dans certaines conditions, s'échapper de cette organelle et atteindre le cytosol ou l'environnement extracellulaire. Différents groupes de transporteurs et d'échangeurs présentent la capacité de transporter le succinate à travers les membranes cellulaires(Emami Riedmaier et al., 2012) et les membranes mitochondriales(Terlouw et al., 2000). Citons les transporteurs d'anions organiques (OATs) et les échangeurs sodium-dicarboxylate. La membrane interne de la mitochondrie contient des transporteurs du type SLC2510, un transporteur de succinate et fumarate/malate, qui permettra à ce composé d'atteindre l'espace intermembranaire (Oswald et al., 2007). Le passage à travers la membrane externe est possible via de larges canaux peu spécifiques aux molécules de taille inférieure à 1,5 KDa. Les porines sont des exemples de tels canaux (Ariza et al., 2012). Finalement, le passage de la membrane plasmique sera probablement rendu possible par un, ou plusieurs, transporteurs exprimés spécifiquement dans le tissu d'intérêt (Markovich et al., 2004; Pajor, 2006; Ariza et al., 2012).

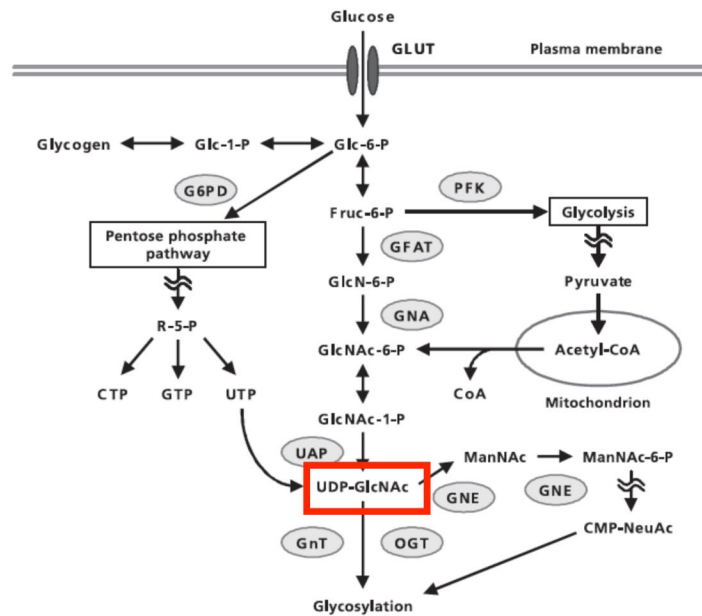


Figure 19. Impact de l'hypoxie sur la glycosylation. La synthèse de l'UDP-GlcNAc requiert l'apport de composés issus de trois différentes voies métaboliques; la voie des pentoses phosphates, la glycolyse et la voie des hexosamines. (Adapté de Shirato et al., J Clin Biochem Nutr, 2011).

Hypothèses

Nos hypothèses de travail sont de deux ordres.

En premier lieu, nous postulons que le GPR91 et le succinate ont un rôle bénéfique dans la récupération post hypoxie-ischémie. L'accumulation des intermédiaires du métabolisme en situation d'hypoxie ainsi que le rôle proangiogénique du GPR91 tel que déterminé dans la rétine nous porte à croire que ce phénomène pourrait être bénéfique en situation d'hypoxie-ischémie cérébrale chez le nouveau-né. Pour ce faire, nous démontrons 1) qu'il y a augmentation de concentration de succinate suite au modèle d'hypoxie-ischémie chez le nouveau-né (modèle de Rice-Vannucci), 2) que cette augmentation induit la production de facteurs de croissance participant à la phase de guérison, 3) que ce processus dépend de l'expression du GPR91 par les neurones et les astrocytes.

En second lieu, en tenant compte que le succinate est produit par la mitochondrie et que celles-ci gravitent à proximité de la région nucléaire nous estimons qu'une localisation intracellulaire favoriserait l'efficacité de la signalisation et de la réponse cellulaire. Afin de démontrer ce concept nous 1) procédons à la localisation intracellulaire par microscopie confocale et analyse biochimique, 2) procédons à des études d'expressions géniques sur cellules entières et fractions cellulaires, 3) identifions les caractéristiques moléculaires permettant à ce récepteur d'avoir une localisation atypique.

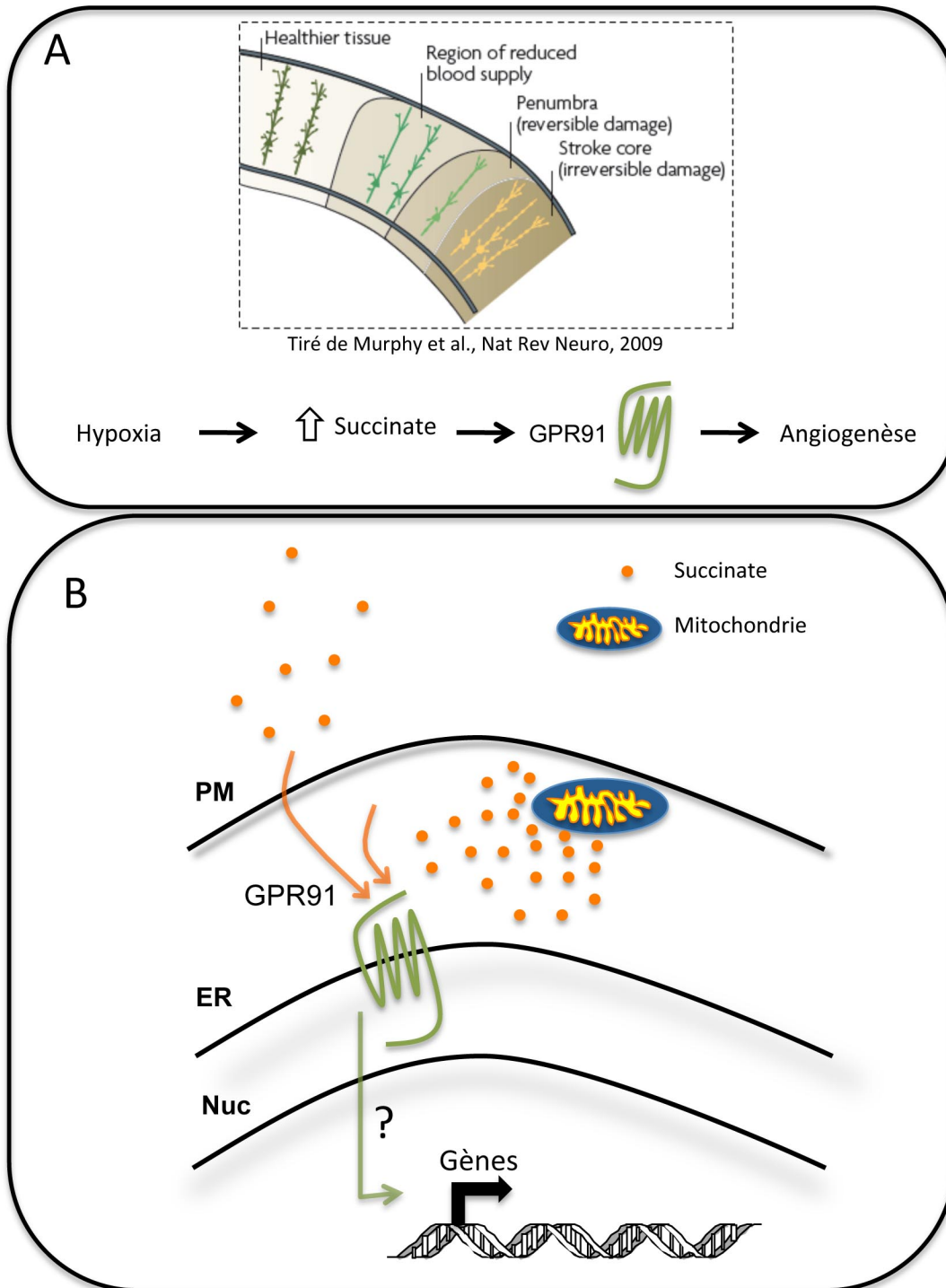


Figure 20. Hypothèse: A. Nous proposons un mécanisme d'adaptation à l'hypoxie basé sur l'accumulation de succinate et l'activation du GPR91. Cette activation entraînant la transcription de gènes pro-angiogéniques. B. En second lieu, nous proposons que la localisation intracellulaire contribue de façon importante à la signalisation via la GPR91.

Résultats

Cette thèse comporte deux articles. L'un portant sur l'implication physiologique du GPR91 et du succinate dans la période post-hypoxie cérébrale publié dans le journal *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. Le second, en préparation, porte sur l'importance de la localisation intracellulaire pour remplir son rôle physiologique.

A) Article 1

G-Protein-Coupled Receptor 91 and Succinate are Key Contributors in Neonatal Post-Cerebral Hypoxia-Ischemia Recovery

Hamel D, Sanchez M, Duhamel F, Roy O, Honoré JC, Noueihed B, Zhou T, Nadeau-Vallée M, Hou X, Lavoie JC, Mitchell G, Mamer OA, Chemtob S

Contributions des auteurs

David Hamel a contribué à l'établissement du projet, la formulation des hypothèses, le design expérimental, les expérimentations, l'analyse des données et la rédaction de l'article.

Mélanie Sanchez contribua à plusieurs expérimentations ainsi qu'à la rédaction de l'article.

François Duhamel, Olivier Roy, Jean-Claude Honoré et Xin Hou ont participé à quelques expérimentations animales.

Jean-Claude Lavoie et Grant Mitchell ont contribué à la formulation des hypothèses initiales.

Orval Mamer procéda à l'établissement de la méthode ainsi qu'à la quantification du succinate par spectrométrie de masse.

Sylvain Chemtob contribua à l'établissement et le financement du projet, la formulation des hypothèses, la rédaction de l'article.

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology



JOURNAL OF THE AMERICAN HEART ASSOCIATION

G-Protein–Coupled Receptor 91 and Succinate Are Key Contributors in Neonatal Postcerebral Hypoxia-Ischemia Recovery

David Hamel, Melanie Sanchez, François Duhamel, Olivier Roy, Jean-Claude Honoré, Baraa Noueihed, Tianwei Zhou, Mathieu Nadeau-Vallée, Xin Hou, Jean-Claude Lavoie, Grant Mitchell, Orval A. Mamer and Sylvain Chemtob

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2014;34:285-293; originally published online November 27, 2013;

doi: 10.1161/ATVBAHA.113.302131

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75231

Copyright © 2013 American Heart Association, Inc. All rights reserved.

Print ISSN: 1079-5642. Online ISSN: 1524-4636

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

<http://atvb.ahajournals.org/content/34/2/285>

Data Supplement (unedited) at:

<http://atvb.ahajournals.org/content/suppl/2013/11/27/ATVBAHA.113.302131.DC1.html>

Permissions: Requests for permissions to reproduce figures, tables, or portions of articles originally published in *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* can be obtained via RightsLink, a service of the Copyright Clearance Center, not the Editorial Office. Once the online version of the published article for which permission is being requested is located, click Request Permissions in the middle column of the Web page under Services. Further information about this process is available in the [Permissions and Rights Question and Answer](#) document.

Reprints: Information about reprints can be found online at:

<http://www.lww.com/reprints>

Subscriptions: Information about subscribing to *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* is online at:

<http://atvb.ahajournals.org/subscriptions/>

G-Protein–Coupled Receptor 91 and Succinate Are Key Contributors in Neonatal Postcerebral Hypoxia-Ischemia Recovery

David Hamel, Melanie Sanchez, François Duhamel, Olivier Roy, Jean-Claude Honoré, Baraa Noueihed, Tianwei Zhou, Mathieu Nadeau-Vallée, Xin Hou, Jean-Claude Lavoie, Grant Mitchell, Orval A. Mamer, Sylvain Chemtob

Objective—Prompt post-hypoxia-ischemia (HI) revascularization has been suggested to improve outcome in adults and newborn subjects. Other than hypoxia-inducible factor, sensors of metabolic demand remain largely unknown. During HI, anaerobic respiration is arrested resulting in accumulation of carbohydrate metabolic intermediates. As such succinate readily increases, exerting its biological effects via a specific receptor, G-protein–coupled receptor (GPR) 91. We postulate that succinate/GPR91 enhances post-HI vascularization and reduces infarct size in a model of newborn HI brain injury.

Approach and Results—The Rice–Vannucci model of neonatal HI was used. Succinate was measured by mass spectrometry, and microvascular density was evaluated by quantification of lectin-stained cryosection. Gene expression was evaluated by real-time polymerase chain reaction. Succinate levels rapidly increased in the penumbral region of brain infarcts. GPR91 was foremost localized not only in neurons but also in astrocytes. Microvascular density increased at 96 hours after injury in wild-type animals; it was diminished in GPR91-null mice leading to an increased infarct size. Stimulation with succinate led to an increase in growth factors implicated in angiogenesis only in wild-type mice. To explain the mode of action of succinate/GPR91, we investigated the role of prostaglandin E₂–prostaglandin E receptor 4, previously proposed in neural angiogenesis. Succinate-induced vascular endothelial growth factor expression was abrogated by a cyclooxygenase inhibitor and a selective prostaglandin E receptor 4 antagonist. This antagonist also abolished succinate-induced neovascularization.

Conclusions—We uncover a dominant metabolic sensor responsible for post-HI neurovascular adaptation, notably succinate/GPR91, acting via prostaglandin E₂–prostaglandin E receptor 4 to govern expression of major angiogenic factors. We propose that pharmacological intervention targeting GPR91 could improve post-HI brain recovery. (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34:285–293.)

Key Words: animals, newborn ■ GPR91 protein, mouse ■ hypoxia-ischemia, brain ■ intracellular signaling peptides and proteins ■ succinic acid

Cerebral hypoxic-ischemic (HI) events have major consequences on neurological functions, leading to long-term sequelae¹ in adults and newborns. Perinatal complications associated with hemodynamic compromise, proinflammatory states, hypercapnia, and hyperoxia have all been associated with diffuse microvascular degeneration and brain injury.^{2,3} These insults substantially increase the risk of neonatal encephalopathies and life-long neurological disabilities, including cerebral palsy, mental retardation, and epilepsy.⁴

Several studies have emphasized the role of oxidants on the genesis of HI brain injuries.⁵ In recent years, increased interest in regenerative biology has motivated the importance of tackling the recovery phase after HI.^{6–8} This recovery process entails different facets, including neurogenesis, synaptic remodeling,

and of paramount importance—angiogenesis. Hence, this implies that the brain harbors innate reparative capabilities.^{9–11} In this context, prompt revascularization of stroke is associated with improved outcome.^{12–14} For instance in humans, elevated levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) are observed after stroke, and increased microvascular density correlates with a better outcome.^{15,16} In animal models, intracerebral injections of proangiogenic factors greatly enhance motor functions.¹⁷ Given the profound metabolic changes that occur in response to HI-associated cerebrovascular compromise, it would be surprising that these are not related to reinstate energy status possibly by governing expression of critical angiogenic factors. A better elucidation of mechanisms implicated in post-HI revascularization would enable to propose

Received on: June 27, 2013; final version accepted on: November 17, 2013.

From the Department of Pediatrics, Research Center—CHU Ste-Justine, Montréal, Quebec, Canada (D.H., O.R., J.C.H., T.Z., X.H., J.-C.L., G.A.M., S.C.); Departments of Pharmacology (D.H., F.D., S.C.) and Biomedical Sciences (O.R., M.N.-V.), Université de Montréal, Montréal, Quebec, Canada; and Department of Pharmacology and Therapeutics (M.S., B.N., S.C.), Goodman Cancer Research and Metabolomics Core Facility (O.A.M.), McGill University, Montréal, Quebec, Canada.

The online-only Data Supplement is available with this article at <http://atvb.ahajournals.org/lookup/suppl/doi:10.1161/ATVBAHA.113.302131/-/DC1>.

Correspondence to Sylvain Chemtob, MD, PhD, Research Center—CHU Ste-Justine, Departments of Pediatrics, Ophthalmology, and Pharmacology, Université de Montréal, 3175, Chemin Côte Ste-Catherine, Montréal, Quebec, Canada, H3T 1C5. E-mail sylvain.chemtob@umontreal.ca

© 2013 American Heart Association, Inc.

Arterioscler Thromb Vasc Biol is available at <http://atvb.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/ATVBAHA.113.302131

Nonstandard Abbreviations and Acronyms	
EP4	prostaglandin E receptor 4
GPR	G-protein–coupled receptor
HI	hypoxia-ischemia
VEGF	Vascular endothelial growth factor

timely approaches for neuroprotection^{18,19} by reestablishing appropriate vascular supply and hence metabolic balance.

Hypoxia leads to arrest in anaerobic respiration resulting in accumulation of carbohydrate metabolites involved in energy

formation. Many of these metabolic intermediates are Krebs cycle metabolites, notably succinate, which have been reported to exert vasorelaxant and angiogenic properties.^{20–22} Yet, their mode of action has generally remained inexplicable, until membrane-bound receptors that are specifically activated by these metabolites have been identified.²³ In this context, succinate has been shown to contribute to the developmental and possibly aberrant retinal neovascularization presumably through actions on G-protein–coupled receptor (GPR) 91 independent of hypoxia-inducible factor activation²⁴; accordingly, siRNA- and shRNA-GPR91 interfere with developmental angiogenesis and partly with abnormal preretinal neovascularization.

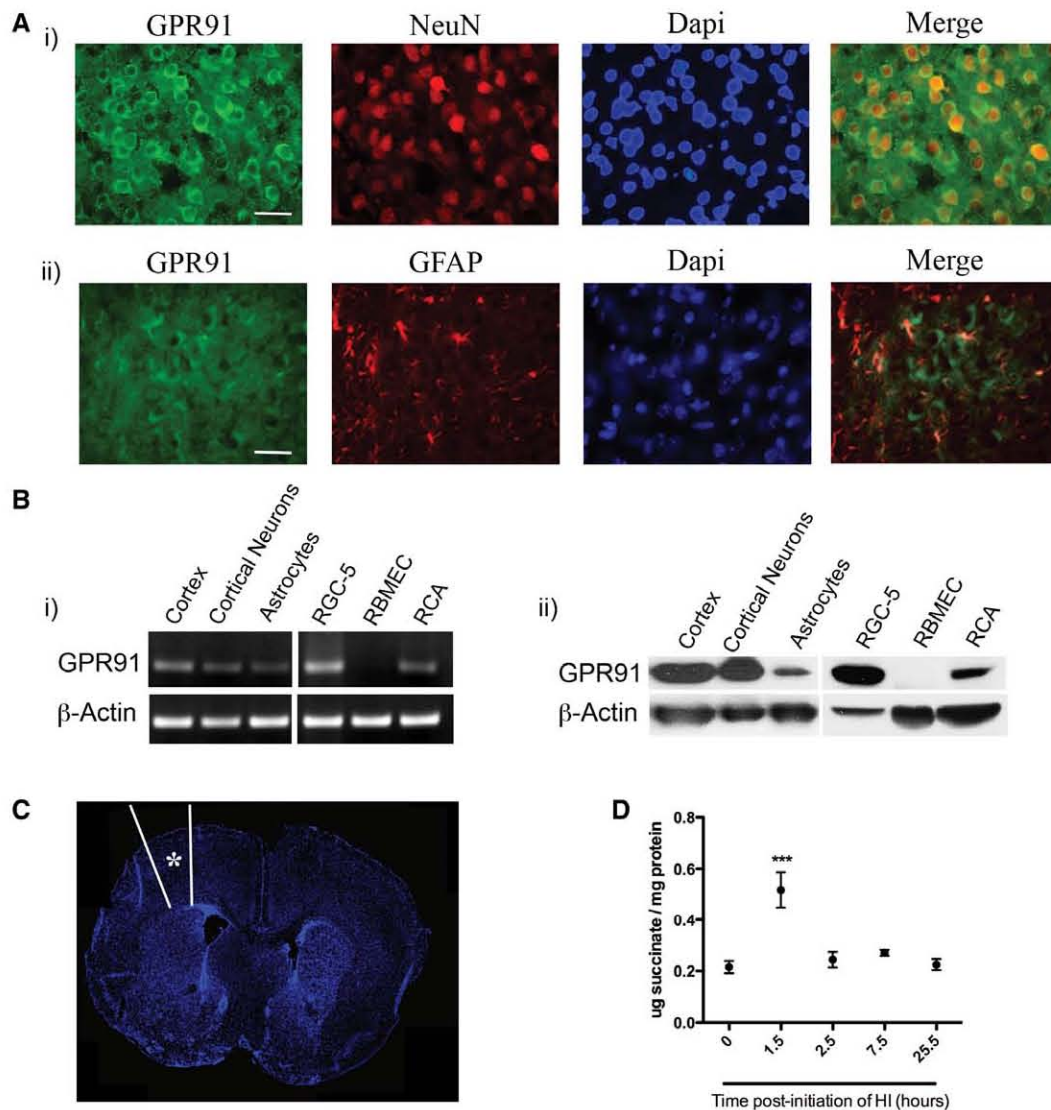


Figure 1. Succinate accumulates in the penumbral region after cerebral hypoxia-ischemia (HI) where G-protein–coupled receptor (GPR) 91 is expressed in neurons and astrocytes. **A**, GPR91 colocalizes with NeuN (i) and glial fibrillary acidic protein (GFAP) (ii) in the rat cerebral cortex. Rabbit anti-GPR91 was used to label GPR91, and mouse anti-NeuN—a neuronal marker—was used to mark neurons. Colocalization with astrocytes was determined with mouse anti-GFAP. 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) was used to stain nuclei (scale bar, 25 μ m). **B**, Semiquantitative polymerase chain reaction from cerebral cortex, cortical neurons, astrocytes, and cell lines retinal ganglion cells (RGC-5)-5, rat cerebral astrocytes (RCA), and rat brain microvascular endothelial cells (RBMEC) was used to evaluate GPR91 mRNA abundance. β -Actin was used as a loading control (i). Sample lysates from cerebral cortex, cortical neurons, astrocytes, and cell lines RGC-5, RCA, and RBMEC were subjected to SDS-PAGE and Western blotting with anti-GPR91 or anti- β -actin antibodies as indicated (ii). **C**, Rat cortical section stained with DAPI demonstrating the region (*) on which we focused throughout this study. **D**, Kinetic analysis of succinate concentration in animals subjected to HI shows a significant increase immediately after exposure to hypoxia and a return to baseline within 60 minutes ($n=3$; *** $P<0.001$).

Although an increase in hypoxia-inducible factor has been detected in brain after HI,²⁵ the post-HI brain revascularization seems to be independent of hypoxia-inducible factor.²⁶ Hence, mechanisms that orchestrate post-HI vascularization in the brain remain unknown. We postulate that succinate via GPR91 acts as a central sensor governing the release of (numerous) proangiogenic factors after neonatal HI brain insults and in turn diminishing infarct size. We hereby confirm this novel hypothesis and show that succinate-/GPR91-induced expression of major proangiogenic factors, notably VEGF, is regulated via a prostaglandin E₂ (PGE₂)/prostaglandin E receptor 4 (EP₄)-dependent mechanism.

Materials and Methods

Materials and Methods are available in the online-only Supplement.

Results

Succinate Accumulates in the Cerebral Cortex Expressing GPR91

The succinate receptor GPR91 was detected in the cerebral cortex of control animals primarily in neurons (colocalization with NeuN; Figure 1A). GPR91 mRNA and protein expression were confirmed with isolated cortical neurons, as well as with cultured retinal ganglion cell (RGC5) and rat cerebral astrocyte (RCA) neuronal cell lines (Figure 1B). A weaker expression of GPR91 was also found on primary isolated astrocytes and a rodent cortical astrocyte cell line

(Figure 1B); GPR91 was not detected on brain endothelial cells. In the cortical region corresponding to the penumbra (Figure 1C), we observed a 3-fold increase in succinate concentration 90 minutes after subjecting wild-type (Figure 1D) and GPR91-null (Figure I in the online-only Data Supplement) mouse pups to HI; this increase subsided to basal levels 1 hour later.

Succinate and GPR91 Augment Cortical Vascular Density and Preserve Brain Parenchyma After Perinatal HI Insult

We investigated the role of succinate/GPR91 in brain revascularization and post-HI preservation of brain parenchyma. HI injury induced a gradual decrease in microvascular density in (corresponding) cortical penumbral region detected at 24 hours, followed by an increase in vascular density at 96 hours post-HI (Figure 2Ai and 2Aii); evidently, vessels and parenchyma were fully destroyed in the infarct core (not shown). For the first 24 hours post-HI, microvascular density also decreased in GPR91-null mice, but vessel density remained low at 96 hours in these animals (Figure 2Ai and 2Aii). Accordingly, the volume of the infarct core and of the (metabolically compromised) penumbra was markedly (~3-fold) larger in GPR91-null mice when compared with wild-type animals, especially at 96 hours post-HI (Figure 2B). It should also be noted that vascular density was comparable in intact wild-type and GPR91-null animals between postnatal day (P) 7 and P11 (Figure II in the online-only Data Supplement).

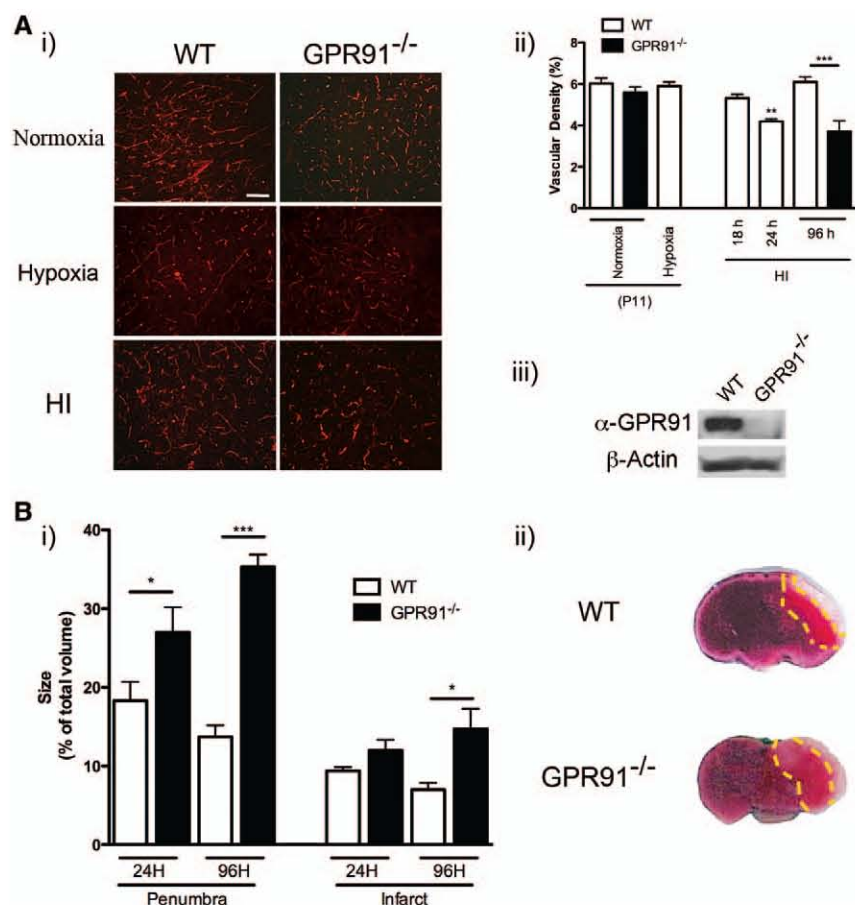


Figure 2. G-protein-coupled receptor (GPR) 91 regulates blood formation and infarct size after hypoxia-ischemia (HI). **A**, Representative photomicrograph of vascular density 96 hours after HI in mice (i; scale bar, 25 μm). GPR91^{-/-} vascular density inadequately recovered and remains 30% inferior to wild-type (WT) mice as measured on lectin-stained cryosections (n=6; ***P<0.001, **P<0.01). No difference in normal vascularization at postnatal day (P) 11 is observed between WT and GPR91^{-/-} mice. Hypoxia alone (no ligation) does not cause noticeable degeneration (ii). Western blot analysis demonstrating expression of GPR91 in WT mice and its absence in GPR91^{-/-} mice (iii). **B**, Damages evaluated by 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride at 24 and 96 hours post-HI shows the reduction in vascular supply is correlated with a change in infarct size, in GPR91^{-/-} mice, in the penumbra and core, respectively (n=5-7; *P<0.05, ***P<0.001; i). Representative infarct in mice. Yellow lines delineate infarct core (white) and penumbral (pink) regions (ii).

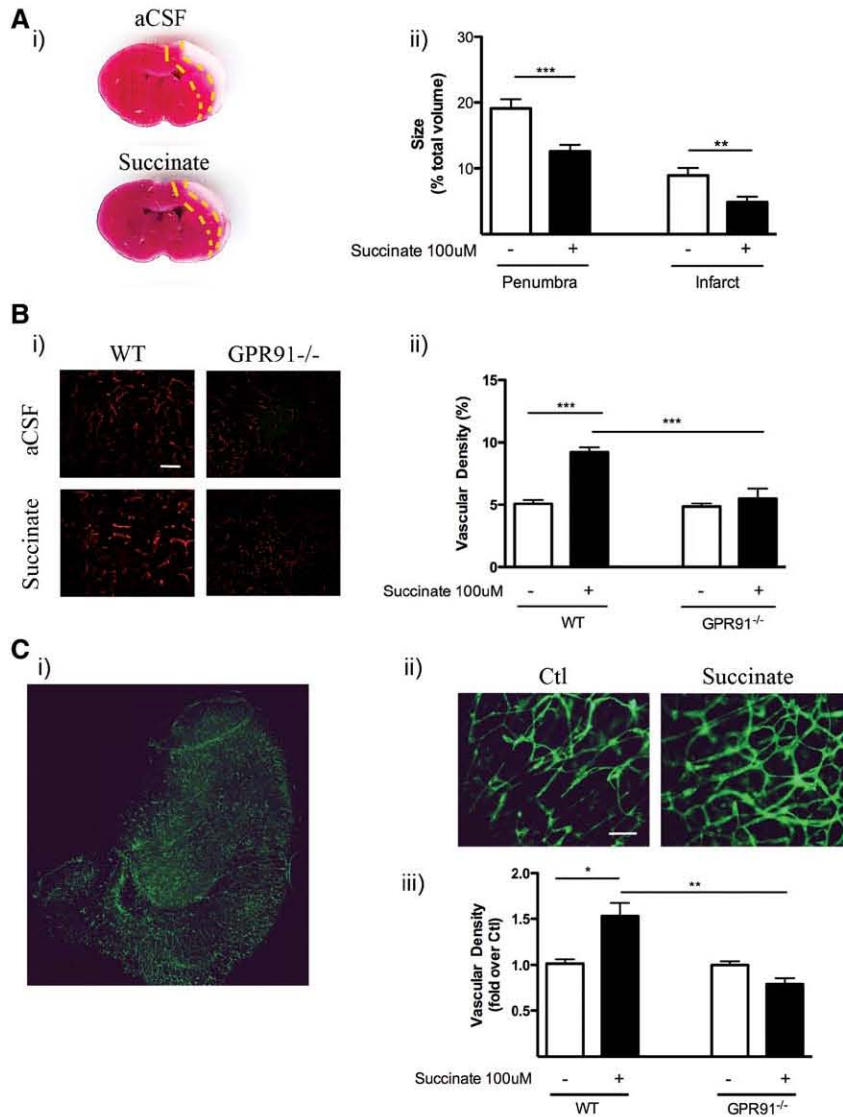


Figure 3. Stimulation of succinate increases vascular density and reduces the infarct size. **A**, Injection of succinate (final concentration 100 $\mu\text{mol/L}$) at postnatal day (P) 4 followed by hypoxia-ischemia (HI) model at P7 and 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride at P8 leads to a significant reduction in brain infarct (i). Reduction is observed in both the penumbra and the infarct (ii; $n=13-14$; $**P<0.01$, $***P<0.001$). **B**, Intracerebroventricular injection of succinate (final concentration estimated at 100 $\mu\text{mol/L}$) increases the vascular density in wild-type (WT) mice measured on lectin-stained cryosections. No effects are observed in GPR91^{-/-} mice ($n=3-6$; $***P<0.001$). **C**, Representation of cortical explants from a P1 rat pup prepared as a full section of cerebral cortex (i). Lectin stain of cortical explants shows a significant increase in vascular density 4 days after stimulation with 100 $\mu\text{mol/L}$ succinate ($n=6$; $*P<0.05$, $**P<0.01$; ii; scale bar, 50 μm). In the absence of GPR91, this angiogenic response is abrogated (iii; $n=3$; $*P<0.05$, $**P=0.017$). aCSF indicates artificial cerebrospinal fluid; Ctl, control; and GPR, G-protein-coupled receptor.

To substantiate the actions of GPR91 on brain angiogenesis, succinate (at concentrations equivalent to those detected in HI) was injected intracerebroventricularly before HI insult; succinate reduced penumbral and core infarct sizes by $\approx 50\%$ at 96 hours post-HI (Figure 3A). To ascertain cerebral angiogenic effects of succinate further, the latter was injected intracerebroventricularly at P7 in intact wild-type and GPR91-null mice; succinate nearly doubled microvascular density measured at P11 in wild-type animals but not in GPR91-null mice (Figure 3B). Likewise, treatment of cortical explants (Figure 3Ci) with succinate also led to an equivalent increase in microvascular density (Figure 3Cii); succinate was ineffective on cortical explants from GPR91-null mice (Figure 3Ciii).

GPR91 Controls the Expression of Numerous Angiogenic Factors

We evaluated the propensity of GPR91 to regulate the expression of key proangiogenic genes in the post-HI recovery process. Intracerebroventricular injection of succinate caused a time-dependent expression of the major

proangiogenic factor VEGF in brain of wild-type mice, which peaked at 24 hours (Figure 4A, inset). Concomitantly, we observed an increase in angiopoietin 1, angiopoietin 2, and angiogenic inflammatory mediators interleukin-1 β and interleukin-6.²⁷ In contrast, no increase in any of these factors was detected in brain of GPR91-null mice treated with succinate (Figure 4A). Similarly, VEGF, angiopoietin 1, angiopoietin 2, interleukin-1, and interleukin-6 increased 24 hours after HI insult in brain of wild-type mice (Figure 4B); these increases were significantly attenuated in GPR91-null mice. Correspondingly, induction of these major angiogenic genes was also detected 4 hours after succinate stimulation of RGC and RCA to values somewhat equivalent to those after hypoxia (4% O₂; Figure 4C; Figure IIIA in the online-only Data Supplement); cerebrovascular endothelial cells (devoid of GPR91) did not exhibit a rise in VEGF expression on stimulation with succinate (Figure IIIB in the online-only Data Supplement). No induction of proangiogenic genes was observed in RGC-5 cells knocked down for GPR91 (shRNA-GPR91; Figure IVA and inset of Figure IVB in the online-only Data Supplement).

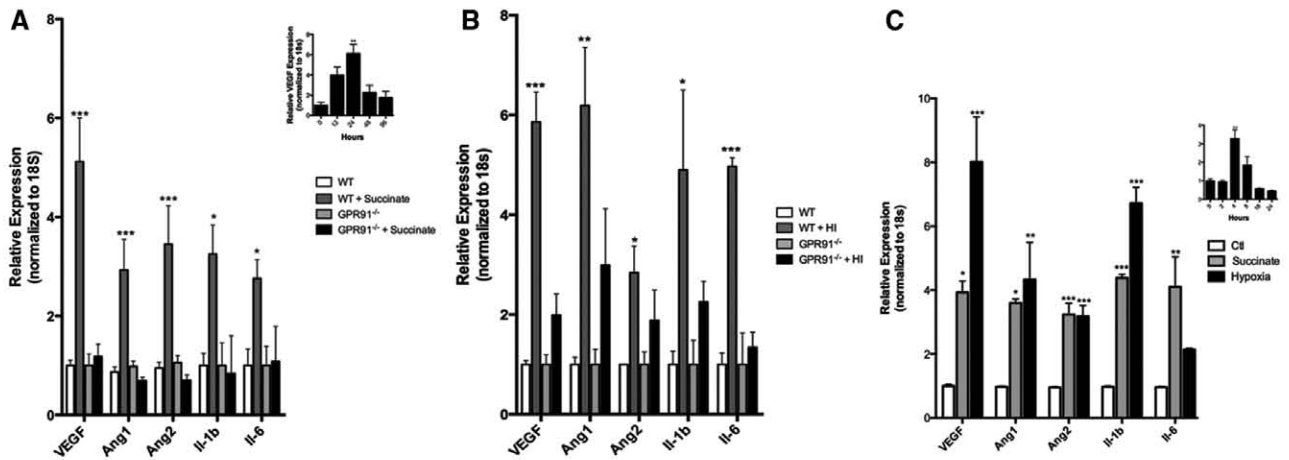


Figure 4. Gene expression induced by succinate stimulation. **A**, Expression level of major growth factors measured by real time-quantitative polymerase chain reaction after succinate injection was evaluated at 24 hours because vascular endothelial growth factor (VEGF) expression is maximal at this time-point (inset). No increase in expression is observed in GPR91^{-/-} animals after intracerebroventricular injection of 100 μ mol/L succinate. Samples were normalized to 18S (n=4–10; * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001). **B**, Similarly, induction of gene expression after hypoxia-ischemia (HI) model in wild-type (WT) and GPR91^{-/-} mice shows significant reduction in growth factor mRNA in mice devoid of GPR91 (n=4–10; * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001). **C**, Similarly, gene expression in cells treated for 4 hours were analyzed in retinal ganglion cells-5 as VEGF expression was maximal at this time-point (inset; n=6; * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001). Ang indicates angiopoietin; GPR, G-protein-coupled receptor; and IL, interleukin.

Role of Prostaglandin Signaling in Response to GPR91-Dependent VEGF Expression

We proceeded to explore mechanisms for GPR91 induction of major angiogenic factors in brain cells. GPR91 has been reported to signal via PGE₂ and extracellular signal-regulated kinase-1/2 in renal cells.²⁸ We investigated whether succinate induced these signals in neurons and glia, which express GPR91, specifically in RGC and RCA cells (Figure 1A). Succinate induced a rapid and transient activation of extracellular signal-regulated kinase-1/2 (Figure 5Ai and 5Aii), which was not observed in cells infected with a lentivirus encoding a reported shRNA-GPR91,²⁴ confirming again dependence on GPR91 (Figure IVB in the online-only Data Supplement). Succinate also increased PGE₂ concentrations in RGC (Figure 5Aii) and RCA (Figure VA in the online-only Data Supplement) cell lines. However, extracellular signal-regulated kinase inhibitors did not affect succinate-induced VEGF expression (Figure 5B); the same was observed with disruptors of hypoxia-inducible factor,²⁹ consistent with reported lack of its role in this process.²⁴ Inhibition of prostaglandin synthesis with indomethacin abrogated succinate-induced VEGF expression (Figure 5B; Figure VB in the online-only Data Supplement). Along these lines, prostaglandin levels are long known to increase in HI brain insult,³⁰ and more specifically EP₄ has been shown to exert a role in promoting angiogenesis^{31–35} by upregulating VEGF expression.^{36,37} Therefore, we evaluated the contribution of the PGE₂–EP₄ axis in GPR91-dependent biochemical processes of brain vascularization.

To ascertain that prostaglandins are also generated in vivo in response to succinate, we first measured the levels of PGE₂ after intracerebroventricular injection of succinate. We detected a time-dependent rise in brain PGE₂ in wild-type mice, which significantly increased by 60 minutes after succinate (Figure 5C); succinate was ineffective in raising PGE₂ levels in GPR91-null mice. We then showed in RGC (as well as in RCA; Figure VB in the online-only Data Supplement)

that succinate-induced VEGF was abolished by selective EP₄ antagonist L-161982³⁸ but not by the EP_{1,2,3} antagonist AH6809³⁹ (Figure 5B); concordantly, PGE₂ increased VEGF expression in a dose-dependent manner (Figure VC in the online-only Data Supplement). Finally, more relevantly, we demonstrated that GPR91-dependent (Figures 2 and 4) succinate-induced brain VEGF expression and increased microvascular density in vivo were markedly attenuated by L-161982 (Figure 5D). Together, these results indicate a major role for EP₄ in succinate-/GPR91-induced angiogenesis.

Discussion

The neonatal brain is particularly susceptible to HI insults. In this context, the vasculature of the newborn brain is vulnerable to damage, and its degeneration precedes that of parenchymal cells, as demonstrated under various adverse conditions regularly encountered by premature subjects, such as hyperoxia (relative to values in utero O₂),² hypercapnia (frequently observed with chronic lung disease of the premature infant),⁴⁰ and in HI insults.³ Therefore, we used the Rice–Vannucci rodent pup model of HI encephalopathy because the development of brain white matter and supporting vasculature of rodents is gestationally delayed relative to that of the human and increases after birth for the first 12 postnatal days.^{41,42} Despite widespread brain injury often encountered in the neonatal brain, remarkable recovery is observed.^{43,44} This brain recovery of course requires an orchestrated angiogenesis.^{45–47} Accordingly, mechanisms that sense the early local HI would be critical to trigger a process of revascularization and repair. Because carbohydrate metabolites of the Krebs cycle, notably succinate,⁴⁸ accumulate under HI conditions, these metabolites have been proposed as preconditioning molecules.⁴⁹ The discovery of a specific receptor for succinate, namely GPR91,²³ led us to explore its role in post-HI brain vascularization. In this study, we demonstrate for the first time, the essential role played by GPR91 in sensing hypoxic stress during cerebral HI and the benefits of its activation in

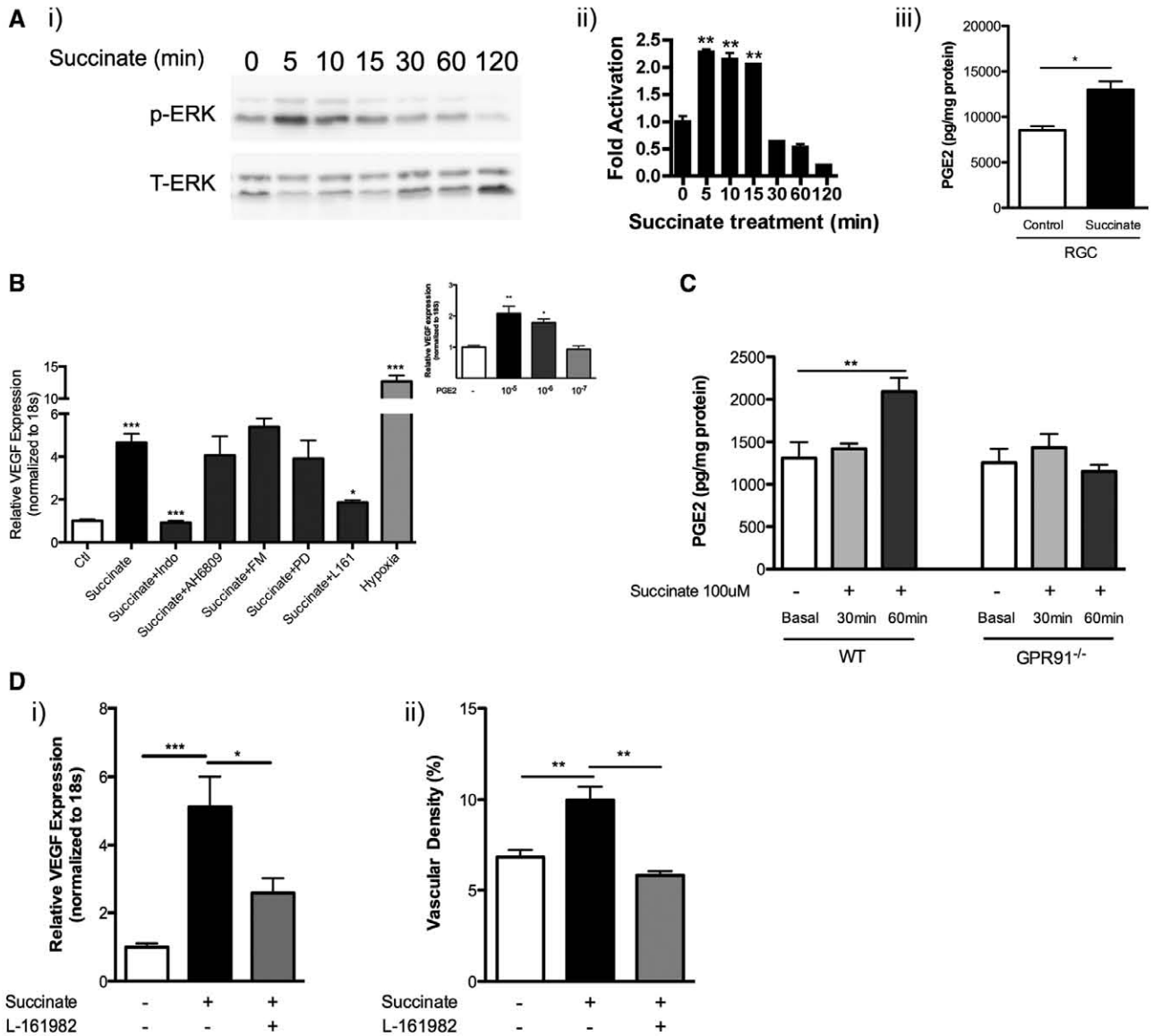


Figure 5. Involvement of prostaglandin E₂ (PGE₂) and prostaglandin E receptor 4 (EP₄) in G-protein-coupled receptor (GPR) 91 signaling. **A**, Stimulation of retinal ganglion cells-5 with 100 μmol/L succinate leads to induction of extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2 phosphorylation (i). Fold activation of ERK1/2 activation (ii; n=3, ^{***}P<0.01). Similarly, PGE₂ can be detected in RGC-5 cell lysates (iii; n=3; ^{*}P<0.05). **B**, Vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA expression after stimulation of RGC-5 cells with succinate is strongly affected by cyclooxygenase inhibitor indomethacin (100 μmol/L; Indo), and EP₄ antagonist L-161 (L-161982) (10 μmol/L); concentrations reported to be effective were used.³⁸ No effects are observed with multispecific EP_{1,2,3} antagonist (AH6809; 1.5×10⁻⁵ mol/L) or with hypoxia-inducible factor (HIF)-1a/2a antagonist FM19G11 (FM) or ERK1/2 inhibitor PD98059 (PD; 50 μmol/L; n=6; ^{*}P<0.05, ^{***}P<0.001); effective concentrations were used as reported.^{29,39} Stimulation of RGC-5 for 4 hours with PGE₂ induces expression of VEGF mRNA in a dose-dependent fashion (n=3; ^{*}P<0.05, ^{**}P<0.01; inset). **C**, Measurement of PGE₂ in brain tissue of wild-type (WT) and GPR91^{-/-} mice at different time-point after intracerebroventricular injection of succinate. Significant increase is noted only in WT mice at 60 minutes after the injection (n=4; ^{**}P<0.01). **D**, In vivo, intracerebroventricular injection of succinate induces VEGF mRNA in WT mice that is strongly affected when coinjected with EP₄ antagonist L-161982 (estimated final concentration of 10 μmol/L; i) This effect on the gene induction is paralleled by corresponding differences in vascular density (ii; n=5–10; ^{*}P<0.05, ^{**}P<0.01, ^{***}P<0.001). Ctrl indicates control.

preserving tissue integrity by stimulating angiogenesis by governing the expression of numerous proangiogenic factors, including VEGF. We also show that this angiogenic gene regulation is dependent on a succinate-induced generation of PGE₂ acting specifically via its EP₄ receptor. Collectively the data reveal that succinate/GPR91 signaling plays a determining role in post-HI cerebral revascularization and brain recovery and provides a novel link through which metabolic intermediates acting via specific receptors participate in post-HI cerebrovascular functions by reinstating energy supply.

Succinate and other energy intermediates have been extensively studied in the last decades; however, this was mostly in the context of energy production. Only recently was it demonstrated that succinate, via a specific receptor GPR91, can induce physiological changes beyond its well-documented role in metabolism, in which rising concentrations after hypoxic events can trigger specific cell functions.²³ Metabolic intermediates have been largely overlooked in the study of poststroke recovery, despite results showing concentration fluctuations during cerebral hypoxia since the 1970s.²⁰ Lactate

has recently been reported to exert neuroprotective effects.⁵⁰ Exogenous lactate is neuroprotective in an in vivo model of brain ischemia, yet the mechanism of protection triggered by lactate is still unknown, and its mode of action is influenced by the type of anesthetic agent used.⁵¹ Furthermore, ischemia results in a profound (8–10-fold) depletion of all NAD-linked substrates in brain, specifically pyruvate, citrate, α -ketoglutarate, oxaloacetate, fumarate, and malate.⁵² In contrast, only succinate concentration was shown to be robustly increased by $\approx 300\%$ ⁵² and remain elevated after reperfusion.⁵³ Because succinate has recently been shown to induce angiogenesis in the developing retina,²⁴ we proceeded to explore its role and mode of action in post-HI newborn brain vascularization (and hence recovery).

Angiogenesis allows the reestablishment of appropriate blood supply, which in turn allows tissue reoxygenation, facilitates infiltration of relevant inflammatory cells (notably macrophages), and consequently triggers late repair processes.⁵⁴ Evidence from human studies demonstrated the beneficial role of increased blood supply,¹⁶ as it correlates with better survival and angiogenesis in general.⁵⁵ Numerous bodies of evidence from the present study support angiogenic effects of succinate/GPR91 in brain. After HI, we observed an increase in succinate levels that was associated with an increase in vascular density in mice expressing the succinate receptor. GPR91-dependent angiogenesis was coupled to a substantial decrease in the penumbral, as well as the core infarct size; this was not observed in GPR91^{-/-} mice, implicating GPR91 as a regulator of angiogenesis. Injection of succinate in WT mice led to an approximate 2-fold increase in vascular density not observed in GPR91^{-/-} mice. These in vivo results are supported by ex vivo experiments demonstrating a similar 30% increase in vascular density after treatment with succinate. Concordantly, administration of succinate before performing the HI model increased brain vascular density and correspondingly reduced infarct size. The robust angiogenic effects of succinate/GPR91 result from an induction of various angiogenic factors, as corroborated in vitro on cultured neuronal and astrocyte cell lines.

An important feature of this study applies to the mechanism by which GPR91 induces angiogenic factors to exert a beneficial neovascularization. It is known that GPR91 can signal via prostaglandins,²⁸ and PGE₂ acting via EP₄ has been shown to affect retinal angiogenesis^{52–55} and inhibit apoptosis.^{56,57} PGE₂ was increased after succinate injection in WT mice but not in GPR91^{-/-}; of course, prostaglandin synthesis after HI arises through activation of various pathways, foremost by oxidant stress, inflammatory factors, excitatory mediators,^{30,58,59} in addition to succinate/GPR91. In neurons and astrocytes, succinate also stimulated PGE₂ formation, which resulted in a dose-dependent induction of VEGF mRNA.⁶⁰ In addition, succinate-induced VEGF mRNA expression was markedly diminished by prostaglandin synthase inhibitor indomethacin and by the selective EP₄ antagonist L-161982 but not by the nonspecific EP_{1,2,3} nonspecific antagonist AH6809. Our findings are consistent with a robust expression of EP₄ in neurons and in endothelial cells after cerebral ischemia, suggesting a protective sensory cellular mechanism.⁶¹ Along these lines, PGE₂ and EP₄ agonists have recently been patented as a method to treat ischemic episodes (US 2010/0267826 A1).

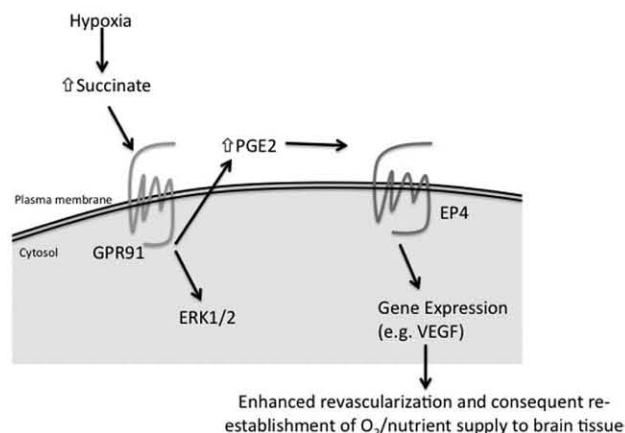


Figure 6. Schematic representation of G-protein-coupled receptor (GPR) 91 activation by succinate after hypoxia. EP₄ indicates prostaglandin E receptor 4; ERK, extracellular signal-regulated kinase; and VEGF, vascular endothelial growth factor.

In summary, our findings unveil a novel concept in post-HI brain vascularization and recovery through actions of metabolic intermediates acting via a specific receptor, namely the succinate receptor GPR91 (Figure 6). Current treatments of HI stroke are mostly limited to supportive therapy, with an effort at protecting neuronal function by preventing hyperthermia or hypoglycemia, normalizing perfusion and ventilation parameters, and recanalizing obstructed arteries (in adults).^{62,63} Other approaches focus on reducing the extent of the injury, such as with the use of inhibitors of excitatory and inflammatory mediators or administration of cytoprotective growth factors.⁶⁴ By considering the development of combinatorial therapies to restrict and relieve injury to the brain, it is likely that one would increase the therapeutic window for prevention, rescue, and repair. Pharmacological modulation of pathways involved in the natural recovery process could provide formidable tools to treat these patients. Hence, our observations lend support to the idea that the identification of specific receptors conveying signaling of metabolic intermediates in brain recovery offers potentially important targets to develop therapeutic interventions to optimize poststroke recovery. Considering that succinate accumulates only transiently after HI insult, longer acting agonists of GPR91 may exert more favorable benefits.

Acknowledgments

We acknowledge Hensy Fernandez and Isabelle Lahaie for valuable assistance.

Sources of Funding

This study was supported in part by grants from the Canadian Institutes of Health Research. D. Hamel was supported by a studentship from Centre Hospitalier Ste-Justine; J.C. Honoré was supported by a fellowship from the Heart and Stroke Foundation of Canada and the Canadian Stroke Network; T. Zhou and O. Roy were recipients, respectively, of studentships from the Suzanne Véronneau-Troutman Fund and the Réseau Vision en Santé du Québec (FRQS). S.C. holds a Canada Research Chair (Translational Research in Vision) and the Leopoldine Wolfe Chair in translational research in age-related macular degeneration.

Disclosures

None.

References

- Cardenas JF, Rho JM, Kirton A. Pediatric stroke. *Childs Nerv Syst*. 2011;27:1375–1390.
- Sirinyan M, Sennlaub F, Dorfman A, Sapielha P, Gobeil F Jr, Hardy P, Lachapelle P, Chemtob S. Hyperoxic exposure leads to nitrate stress and ensuing microvascular degeneration and diminished brain mass and function in the immature subject. *Stroke*. 2006;37:2807–2815.
- Honoré JC, Kooli A, Hamel D, Alquier T, Rivera JC, Quiniou C, Hou X, Kermorvant-Duchemin E, Hardy P, Poitout V, Chemtob S. Fatty acid receptor Gpr40 mediates neuromicrovascular degeneration induced by transarachidonic acids in rodents. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33:954–961.
- Ferriero DM. Neonatal brain injury. *N Engl J Med*. 2004;351:1985–1995.
- Buonocore G, Groenendaal F. Anti-oxidant strategies. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2007;12:287–295.
- Liman TG, Endres M. New vessels after stroke: postischemic neovascularization and regeneration. *Cerebrovasc Dis*. 2012;33:492–499.
- Thwaites JW, Reebye V, Mintz P, Levicar N, Habib N. Cellular replacement and regenerative medicine therapies in ischemic stroke. *Regen Med*. 2012;7:387–395.
- Dizon M, Szele F, Kessler JA. Hypoxia-ischemia induces an endogenous reparative response by local neural progenitors in the postnatal mouse telencephalon. *Dev Neurosci*. 2010;32:173–183.
- Bennet L, Tan S, Van den Heuvel L, Derrick M, Groenendaal F, van Bel F, Juul S, Back SA, Northington F, Robertson NJ, Mallard C, Gunn AJ. Cell therapy for neonatal hypoxia-ischemia and cerebral palsy. *Ann Neurol*. 2012;71:589–600.
- Gonzalez FF, Larphaveesarp A, McQuillen P, Derugin N, Wendland M, Spadafora R, Ferriero DM. Erythropoietin increases neurogenesis and oligodendroglial precursor cells after neonatal stroke. *Stroke*. 2013;44:753–758.
- Komitova M, Mattsson B, Johansson BB, Eriksson PS. Enriched environment increases neural stem/progenitor cell proliferation and neurogenesis in the subventricular zone of stroke-lesioned adult rats. *Stroke*. 2005;36:1278–1282.
- Cui X, Chopp M, Zacharek A, Dai J, Zhang C, Yan T, Ning R, Roberts C, Shehadah A, Kuzmin-Nichols N, Sanberg CD, Chen J. Combination treatment of stroke with sub-therapeutic doses of Simvastatin and human umbilical cord blood cells enhances vascular remodeling and improves functional outcome. *Neuroscience*. 2012;227:223–231.
- Hoang S, Liauw J, Choi M, Choi M, Guzman RG, Steinberg GK. Netrin-4 enhances angiogenesis and neurologic outcome after cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2009;29:385–397.
- Mazighi M, Meseguer E, Labreuche J, Serfaty JM, Laissy JP, Lavallée PC, Cabrejo L, Guidoux C, Lapergue B, Klein IF, Olivot JM, Rouchaud A, Desilles JP, Schouman-Claeys E, Amarenco P. Dramatic recovery in acute ischemic stroke is associated with arterial recanalization grade and speed. *Stroke*. 2012;43:2998–3002.
- Issa R, Krupinski J, Bujny T, Kumar S, Kaluza J, Kumar P. Vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, in human brain tissue after ischemic stroke. *Lab Invest*. 1999;79:417–425.
- Krupinski J, Kaluza J, Kumar P, Kumar S, Wang JM. Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke. *Stroke*. 1994;25:1794–1798.
- Lee HJ, Kim KS, Park IH, Kim SU. Human neural stem cells overexpressing VEGF provide neuroprotection, angiogenesis and functional recovery in mouse stroke model. *PLoS One*. 2007;2:e156.
- Jenkins DD, Chang E, Singh I. Neuroprotective interventions: is it too late? *J Child Neurol*. 2009;24:1212–1219.
- Sahota P, Savitz SI. Investigational therapies for ischemic stroke: neuroprotection and neurorecovery. *Neurotherapeutics*. 2011;8:434–451.
- Adair TH, Gay WJ, Montani JP. Growth regulation of the vascular system: evidence for a metabolic hypothesis. *Am J Physiol*. 1990;259(3 Pt 2):R393–R404.
- Burns PA, Wilson DJ. Angiogenesis mediated by metabolites is dependent on vascular endothelial growth factor (VEGF). *Angiogenesis*. 2003;6:73–77.
- Nawab ZM, Daugirdas JT, Ing TS, Leehy DJ, Reid RW, Klok MA. Calcium-complexing versus vasorelaxant effect of acetate, lactate, and other bases. *Trans Am Soc Artif Intern Organs*. 1984;30:184–188.
- He W, Miao FJ, Lin DC, Schwandner RT, Wang Z, Gao J, Chen JL, Tian H, Ling L. Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors. *Nature*. 2004;429:188–193.
- Sapielha P, Sirinyan M, Hamel D, et al. The succinate receptor GPR91 in neurons has a major role in retinal angiogenesis. *Nat Med*. 2008;14:1067–1076.
- Matsuda T, Abe T, Wu JL, Fujiki M, Kobayashi H. Hypoxia-inducible factor-1alpha DNA induced angiogenesis in a rat cerebral ischemia model. *Neuro Res*. 2005;27:503–508.
- Ndubuizu OI, Tspis CP, Li A, LaManna JC. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)-independent microvascular angiogenesis in the aged rat brain. *Brain Res*. 2010;1366:101–109.
- Naldini A, Carraro F. Role of inflammatory mediators in angiogenesis. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2005;4:3–8.
- Robben JH, Fenton RA, Vargas SL, Schweer H, Peti-Peterdi J, Deen PM, Milligan G. Localization of the succinate receptor in the distal nephron and its signaling in polarized MDCK cells. *Kidney Int*. 2009;76:1258–1267.
- Moreno-Manzano V, Rodríguez-Jiménez FJ, Aceña-Bonilla JL, Fustero-Lardies S, Erceg S, Dopazo J, Montaner D, Stojkovic M, Sánchez-Puelles JM. FM19G11, a new hypoxia-inducible factor (HIF) modulator, affects stem cell differentiation status. *J Biol Chem*. 2010;285:1333–1342.
- Walker V, Pickard JD. Prostaglandins, thromboxane, leukotrienes and the cerebral circulation in health and disease. *Adv Tech Stand Neurosurg*. 1985;12:3–90.
- Barnett JM, McCollum GW, Penn JS. Role of cytosolic phospholipase A(2) in retinal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51:1136–1142.
- Xin X, Majumder M, Girish GV, Mohindra V, Maruyama T, Lala PK. Targeting COX-2 and EP4 to control tumor growth, angiogenesis, lymphangiogenesis and metastasis to the lungs and lymph nodes in a breast cancer model. *Lab Invest*. 2012;92:1115–1128.
- Yanni SE, Barnett JM, Clark ML, Penn JS. The role of PGE2 receptor EP4 in pathologic ocular angiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50:5479–5486.
- Yanni SE, Clark ML, Yang R, Bingaman DP, Penn JS. The effects of nepafenac and amfenac on retinal angiogenesis. *Brain Res Bull*. 2010;81:310–319.
- Zhang Y, Daaka Y. PGE2 promotes angiogenesis through EP4 and PKA Cgamma pathway. *Blood*. 2011;118:5355–5364.
- Spinella F, Rosanò L, Di Castro V, Natali PG, Bagnato A. Endothelin-1-induced prostaglandin E2-EP2, EP4 signaling regulates vascular endothelial growth factor production and ovarian carcinoma cell invasion. *J Biol Chem*. 2004;279:46700–46705.
- Hatazawa R, Tanigami M, Izumi N, Kamei K, Tanaka A, Takeuchi K. Prostaglandin E2 stimulates VEGF expression in primary rat gastric fibroblasts through EP4 receptors. *Inflammopharmacology*. 2007;15:214–217.
- Leduc M, Hou X, Hamel D, et al. Restoration of renal function by a novel prostaglandin EP4 receptor-derived peptide in models of acute renal failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2013;304:R10–R22.
- Kermorvant-Duchemin E, Sennlaub F, Sirinyan M, et al. Trans-arachidonic acids generated during nitrate stress induce a thrombospondin-1-dependent microvascular degeneration. *Nat Med*. 2005;11:1339–1345.
- Honoré JC, Kooli A, Hou X, Hamel D, Rivera JC, Picard E, Hardy P, Tremblay S, Varma DR, Jankov RP, Mancini JA, Balazy M, Chemtob S. Sustained hypercapnia induces cerebral microvascular degeneration in the immature brain through induction of nitrate stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010;298:R1522–R1530.
- Robertson PL, Du Bois M, Bowman PD, Goldstein GW. Angiogenesis in developing rat brain: an *in vivo* and *in vitro* study. *Brain Res*. 1985;355:219–223.
- Wang DB, Blocher NC, Spence ME, Rovainen CM, Woolsey TA. Development and remodeling of cerebral blood vessels and their flow in postnatal mice observed with *in vivo* videomicroscopy. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1992;12:935–946.
- Cioni G, D'Acunto G, Guzzetta A. Perinatal brain damage in children: neuroplasticity, early intervention, and molecular mechanisms of recovery. *Prog Brain Res*. 2011;189:139–154.
- Staudt M. Brain plasticity following early life brain injury: insights from neuroimaging. *Semin Perinatol*. 2010;34:87–92.
- Madril JA. Modeling the neurovascular niche: implications for recovery from CNS injury. *J Physiol Pharmacol*. 2009;60(suppl 4):95–104.
- Li WL, Yu SP, Ogle ME, Ding XS, Wei L. Enhanced neurogenesis and cell migration following focal ischemia and peripheral stimulation in mice. *Dev Neurobiol*. 2008;68:1474–1486.
- Risser L, Plouraboué F, Cloetens P, Fonta C. A 3D-investigation shows that angiogenesis in primate cerebral cortex mainly occurs at capillary level. *Int J Dev Neurosci*. 2009;27:185–196.
- Villa RF, Gorini A, Hoyer S. Effect of ageing and ischemia on enzymatic activities linked to Krebs' cycle, electron transfer chain, glutamate and aminoacids metabolism of free and intrasynaptic mitochondria of cerebral cortex. *Neurochem Res*. 2009;34:2102–2116.
- Pomytkin IA, Semanova NA. Study of the effect of preconditioning with succinic acid salt of choline (1:2) on the disturbances of energy metabolism

- in the brain during ischemia by ^31P NMR in vivo. *Dokl Biochem Biophys*. 2005;403:289–292.
50. Alessandri B, GM, Levasseur J, Bullock M.R. Lactate and glucose as energy substrates and their role in traumatic brain injury and therapy. *Future Neurol*. 2009;4:209–228.
 51. Horn T, Klein J. Neuroprotective effects of lactate in brain ischemia: dependence on anesthetic drugs. *Neurochem Int*. 2013;62:251–257.
 52. Folbergrová J, Ljunggren B, Norberg K, Siesjö BK. Influence of complete ischemia on glycolytic metabolites, citric acid cycle intermediates, and associated amino acids in the rat cerebral cortex. *Brain Res*. 1974;80:265–279.
 53. Benzi G, Arrigoni E, Marzatico F, Villa RF. Influence of some biological pyrimidines on the succinate cycle during and after cerebral ischemia. *Biochem Pharmacol*. 1979;28:2545–2550.
 54. Manoonkitiwongsa PS, Jackson-Friedman C, McMillan PJ, Schultz RL, Lyden PD. Angiogenesis after stroke is correlated with increased numbers of macrophages: the clean-up hypothesis. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2001;21:1223–1231.
 55. Ergul A, Alhusban A, Fagan SC. Angiogenesis: a harmonized target for recovery after stroke. *Stroke*. 2012;43:2270–2274.
 56. Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, DuBois RN. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res*. 1998;58:362–366.
 57. Tsujii M, DuBois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell*. 1995;83:493–501.
 58. Takemiya T, Matsumura K, Yamagata K. Roles of prostaglandin synthesis in excitotoxic brain diseases. *Neurochem Int*. 2007;51:112–120.
 59. Zheng Z, Yenari MA. Post-ischemic inflammation: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Neurol Res*. 2004;26:884–892.
 60. Nakanishi M, Sato T, Li Y, et al. Prostaglandin E2 stimulates the production of vascular endothelial growth factor through the E-prostanoid-2 receptor in cultured human lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2012;46:217–223.
 61. Liang X, Lin L, Woodling NS, Wang Q, Anacker C, Pan T, Merchant M, Andreasson K. Signaling via the prostaglandin E(2) receptor EP4 exerts neuronal and vascular protection in a mouse model of cerebral ischemia. *The Journal of clinical investigation*. 2011;121:4362–4371.
 62. Smadja D. Pharmacological revascularization of acute ischaemic stroke: focus on challenges and novel strategies. *CNS Drugs*. 2012;26:309–318.
 63. Yenari MA, Han HS. Neuroprotective mechanisms of hypothermia in brain ischaemia. *Nat Rev Neurosci*. 2012;13:267–278.
 64. Liu R, Yuan H, Yuan F, Yang SH. Neuroprotection targeting ischemic penumbra and beyond for the treatment of ischemic stroke. *Neurol Res*. 2012;34:331–337.

Significance

This study demonstrates the importance of G-protein-coupled receptor 91 and the Krebs cycle metabolite succinate in angiogenic process taking place in the recovery after cerebral hypoxic-ischemic events. We uncovered a cellular mechanism involving the production of a specific prostaglandin and the induction of proangiogenic genes. This work, we think, contributes to the understanding of brain angiogenesis and recovery in general.

Hamel D et al.

Short title: GPR91 in Post-Cerebral Hypoxia-Ischemia Revascularization

Methods

- Detailed methods
- References

Detailed Methods

Animal experimentation and Rice-Vannucci model

Animal experimentations were approved by the Animal Care Committee of the Université de Montréal in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Research. Cerebral hypoxia-ischemia was generated using the Rice-Vannucci model of permanent unilateral ligation in 7 days old (P7) rodents,^{1,2} followed by exposure to 8% O₂ for 90 minutes with ambient temperature maintained at 37°C. C57Bl/6 wild-type mice (The Jackson Laboratory) and GPR91^{-/-} mice (a kind gift from Novartis Pharma, Switzerland)³ were utilized. Intracerebroventricular injections of succinate were performed with a 10uL Hamilton syringe at age P4 (Fig. 3A) or P7 (all other injections). Final concentration is estimated at 100µM (3 uL of 1 mM succinate solution; approx. 3.54 nmoles) (stereotaxic coordinates: PA-1.0 mm, lateral-1.0 mm from bregma and ventral-2.0 mm relative to dura).

Succinate quantification

Following HI, succinate dosage was performed by gas chromatography-mass spectrometry in selected ion monitoring mode as previously described.⁴ Brain tissues were collected at different time-points after insult and exactly weighed prior to being resuspended in distilled water (25 mg in 200 uL) and homogenized by ultrasonication. Reduction of samples including the internal standard with sodium borodeuteride was performed at 50 °C for 30 minutes.

Infarct Volume

Infarct and penumbra volumes were measured using 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining as described elsewhere⁵; essentially lack of staining resulting from mitochondrial inactivity indicated infarct, partial activity (faint pink staining) the penumbra, and full activity (bright reddish-pink staining) indicated normal metabolically active tissue; color distinction is computer intensified. This method for quantifying the infarct and penumbral size, albeit semi-quantitative, is successfully utilized by others^{6,7}. Thickness of sections was measured with a digital caliper and regions corresponding to infarct and penumbra were quantified using Image J (NIH software). Absolute volumes were converted to percentage of total measured volume.⁵

Vessel density

Brain samples subjected to different treatments were collected after perfusion of the animal with 4% PFA. Tissues were fixed for an additional 4 hours at 4°C and consequently placed in 30% sucrose for approximately 24 hours. Adequately dehydrated samples were frozen and sectioned (12µm thickness). Density of the cortical capillary network was assayed by quantification of *Griffonia simplicifolia* (1:100, Sigma) stained cryosections using Image J (NIH software), as reported by us.^{8,9} For every animal, the vascular density of three to five consecutive sections was averaged.

PGE₂ quantification

PGE₂ was extracted with SPE purification tC18 columns (Water) from brain, cells extract and culture medium. Quantification was made with PGE₂ EIA Kit (Cayman Chemical). The amount of PGE₂ was normalized to protein content.

Cell Culture

The neuronal cell line RGC-5, rodent brain cortex astrocytes (RCA) and microvascular endothelial cells (RBMEC) were used (instead of primary corresponding brain cells) because of the prohibitive nature of the number of animals required to be euthanized to conduct *in vitro* experiments. RGC-5 cell line was kindly provided by Neeraj Agarwal (University of North Texas Health Science Center, Fort Worth, Tx). RCA were obtained from Lonza and RBMEC were purchased from Cedarlane Laboratories and used at passages below 10. Cells were propagated in regular conditions (37°C, 5% CO₂). A final concentration of 100 µM succinate was utilized in all *in vitro* experiments.

RT-PCR

Brain tissues and cells were rapidly preserved in TRIzol (Invitrogen). RNA was extracted according to manufacturer's protocol and cDNA synthesized using qScript cDNA SuperMix (Quanta Biosciences). Primers were designed using NCBI Primer Blast (see Suppl. Table I). Quantitative gene expression analysis was performed on Stratagene MXPro3000 (Stratagene) with SYBR Green Master Mix (BioRad). Expression was normalized to 18S universal primer (Ambion) and calculation made using the Ct method. Expression of GPR91 was determined by conventional PCR using TAQ (Fermentas) on cDNA prepared as mentioned above.

Slice Culture

Cerebral cortex from mice pups (P2) were sectioned with a Chopper (Stoelting Wood Dale, IL) and placed on Millicell membrane inserts (Millipore). Slices were left to adhere for 24 hours and then stimulated with a single dose of succinate. 72 hours post stimulation, explants were fixed with 4% PFA and stained with FITC-conjugated Lectin from *Griffonia Simplicifolia*. Detailed method for explants preparation can be found in Stoppini *et al.*¹⁰

Western Blotting

Proteins from homogenized brain tissues and cell samples lysed in RIPA buffer were quantified using Bradford's method (Bio-Rad). 50 ug of protein sample was loaded onto SDS-PAGE gel and electrotransferred onto PVDF membranes. After blocking, membranes were incubated with either an antibody against GPR91 (Accris) or β -actin (Santa Cruz Biotechnology). After washing, membranes were incubated for 2 h with their respective secondary antibodies conjugated to HRP (Sigma). For ERK1/2 activation, membranes were incubated with an antibody against p42/p44 (#4376S; Cell Signaling) and phospho-p42/p44 (4695S; Cell Signaling). After washing, membranes were incubated for 1 hour with their respective secondary antibodies conjugated to HRP (Sigma).

Immunohistochemistry

Localization of GPR91 was determined on 12 μ m brain sagittal cryosections. Sections blocked with 5% bovine serum albumin and 0.1% TritonX-100 (T-8787; Sigma) in PBS were subsequently incubated overnight with rabbit anti-GPR91 (Accris; 1/100), mouse anti-NeuN (Millipore; 1/200) or mouse anti-GFAP (IF03L-100ug (Millipore), 1/200). Secondary antibodies conjugated with Alexa Fluor (Molecular Probes) directed against mouse and rabbit (Alexa Fluor 488, (#A11070) (1/1000) and Alexa Fluor 594, (#A11012) (1/1000) respectively) were incubated for 2 hours at ambient temperature. Nuclei were stained with Dapi (Invitrogen; 1/1000). Images were captured using 40x objective with Eclipse E800 (Nikon) fluorescence microscope.

Chemicals

Chemicals were purchased from the following manufacturers: Succinate (Sigma, #224731), Idomethacin (Sigma, #17378), L-161,982 (Cayman Chemical, #10011565), AH-6809 (Biomol, #RA110), PD98059 (Cayman Chemical, #10006726), FM19G11 (EMD Millipore, # 400089-10mg) and Prostaglandin E2 (Cayman Chemical, #14010).

Statistical Analysis

Groups were compared by two-tailed student's t-test or one-way analysis of variance with Tukey *post-hoc* correction when more than two groups were compared. Dunnett's multiple comparison method was employed when treatments were compared to a single control. A value of $p \leq 0.05$ was considered statistically significant. Data are presented as means \pm s.e.m.

References

1. Vannucci RC, Vannucci SJ. A model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1997;835:234-249.
2. Sheldon RA, Sedik C, Ferriero DM. Strain-related brain injury in neonatal mice subjected to hypoxia-ischemia. *Brain research*. 1998;810:114-122.
3. Rubic T, Lametschwandtner G, Jost S, Hinteregger S, Kund J, Carballido-Perrig N, Schwärzler C, Junt T, Voshol H, Meingassner JG, Mao X, Werner G, Rot A, Carballido JM. Triggering the succinate receptor GPR91 on dendritic cells enhances immunity. *Nat Immunol*. 2008;9:1261-1269.
4. Sapiuha P, Sirinyan M, Hamel D, et al. The succinate receptor GPR91 in neurons has a major role in retinal angiogenesis. *Nature medicine*. 2008;14:1067-1076.
5. Joshi CN, Jain SK, Murthy PS. An optimized triphenyltetrazolium chloride method for identification of cerebral infarcts. *Brain research protocols*. 2004;13:11-17.
6. Umemura K, Kato I, Hirashima Y, et al. Neuroprotective role of transgenic PAF-acetylhydrolase II in mouse models of focal cerebral ischemia. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2007;38:1063-1068.
7. Xiong X, White RE, Xu L, Yang L, Sun X, Zou B, Pascual C, Sakurai T, Giffard RG, Xie XS. Mitigation of murine focal cerebral ischemia by the hypocretin/orexin system is associated with reduced inflammation. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2013;44:764-770.
8. Honore JC, Kooli A, Hamel D, Alquier T, Rivera JC, Quiniou C, Hou X, Kermorvant-Duchemin E, Hardy P, Poitout V, Chemtob S. Fatty Acid Receptor Gpr40 Mediates Neuromicrovascular Degeneration Induced by Transarachidonic Acids in Rodents. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2013.
9. Sirinyan M, Sennlaub F, Dorfman A, Sapiuha P, Gobeil F, Jr., Hardy P, Lachapelle P, Chemtob S. Hyperoxic exposure leads to nitrative stress and ensuing microvascular degeneration and diminished brain mass and function in the immature subject. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2006;37:2807-2815.
10. Stoppini L, Duport S, Correges P. A new extracellular multirecording system for electrophysiological studies: application to hippocampal organotypic cultures. *Journal of neuroscience methods*. 1997;72:23-33.

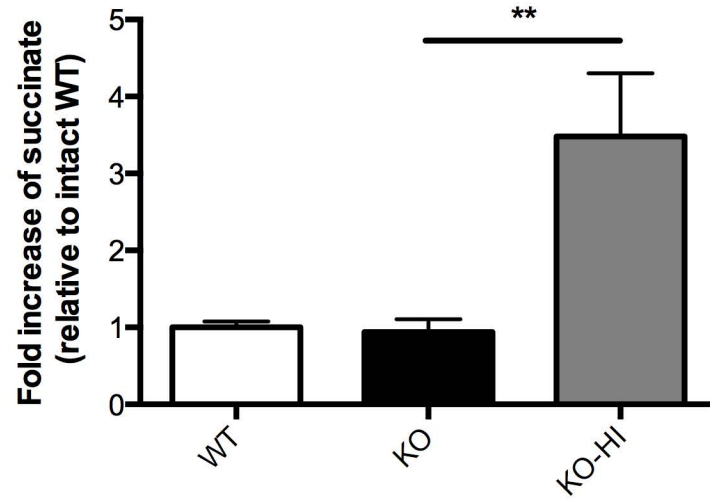
Hamel D et al.

Short title: GPR91 in Post-Cerebral Hypoxia-Ischemia Revascularization

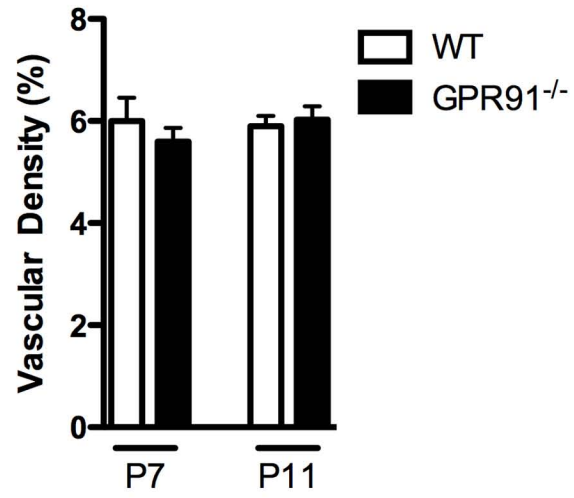
Supplementary Material

- Supplementary Figures
- Legends of Supplementary Figures
- Supplementary Table 1: Primers used for Real-Time PCR gene expression quantification

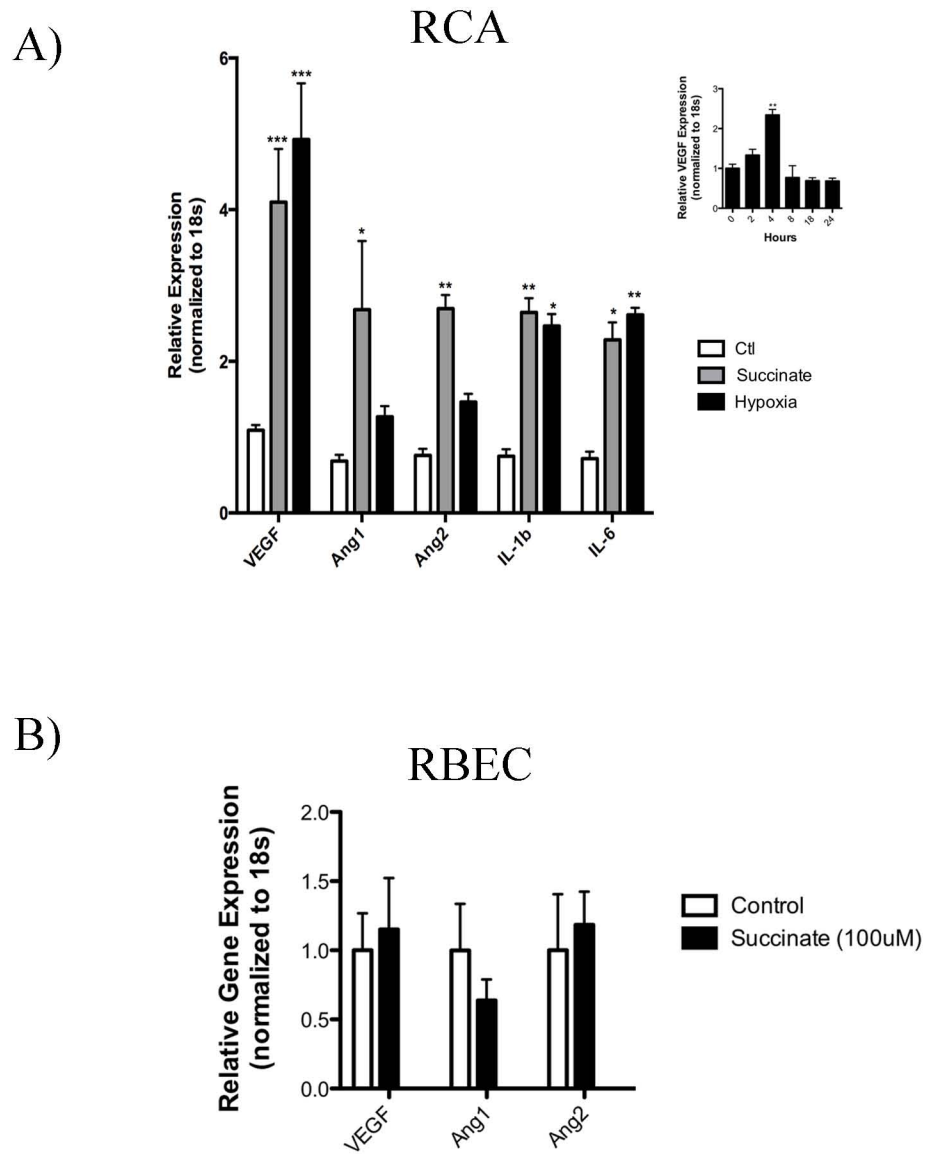
Supplementary Figure I



Supplementary Figure II

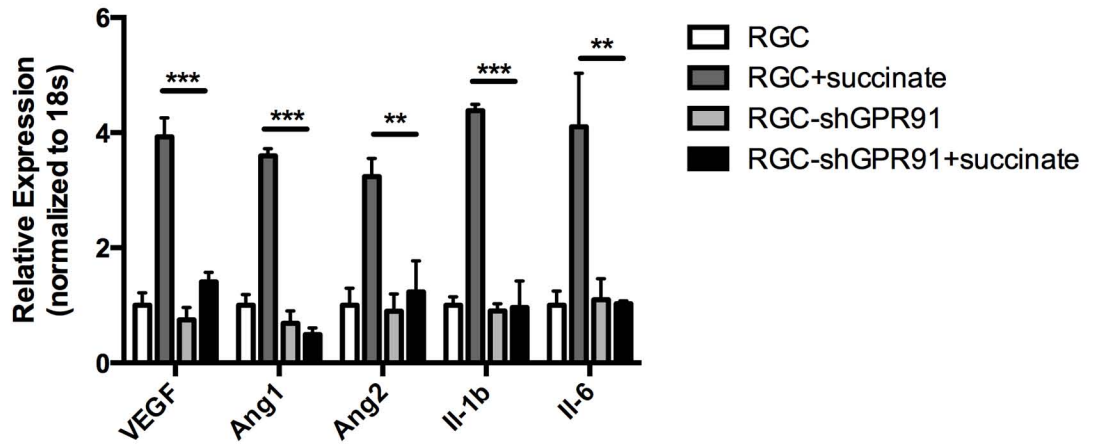


Supplementary Figure III

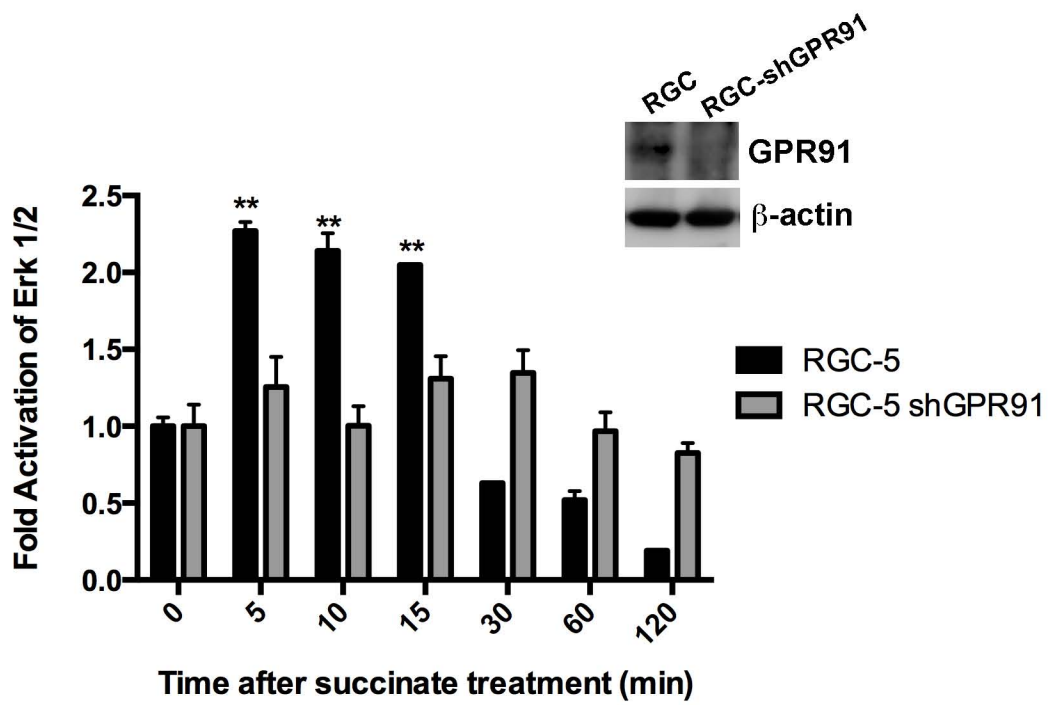


Supplementary Figure IV

A)

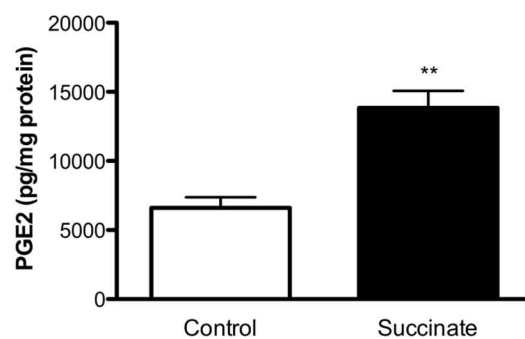


B)

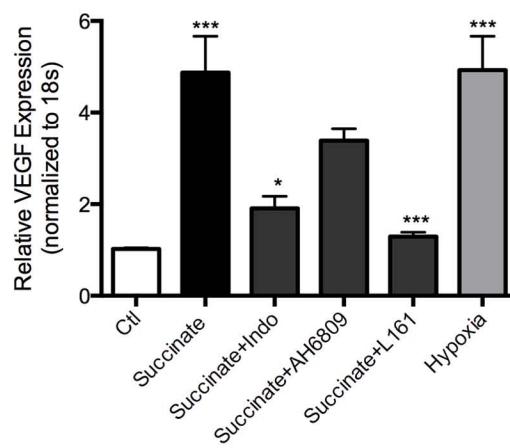


Supplementary Figure V

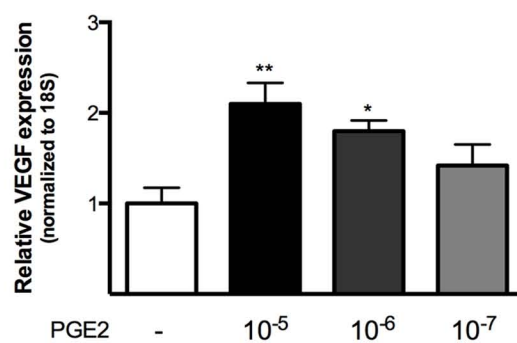
A)



B)



C)



Legends of Supplementary Figures

Supplementary Figure I: Succinate accumulates in GPR91^{-/-} mice following HI.

Levels of succinate in WT vs GPR91^{-/-} mice were quantified by gas chromatography-mass spectrometry.

Supplementary Figure II: Vascular density in normal development of the GPR91^{-/-} mice. Vascular density in normal development of the WT and GPR91^{-/-} mice as measured on lectin-stained cryosections. No significant difference in vascular density is observed.

Supplementary Figure III: Gene expression analysis in astrocyte and endothelial cell lines. A) Gene expression in RCA cells treated for 4 hours were analyzed (n=6; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001). Maximal expression was determined in VEGF time-course assay (inset) B) Absence of gene induction in rat brain endothelial cell (RBEC) treated in a similar fashion to A (n=3).

Supplementary Figure IV: Succinate-induced Erk1/2 phosphorylation and gene expression in RGC-5 cells are GPR91-dependent. A) Gene expression in RGC cells stably expressing or not a shRNA against GPR91 treated for 4 hours with/without 100 μ M succinate were analyzed (n=6; **p<0.01, ***p<0.001). B) Stimulation with succinate (100 μ M) of RGC-5, expressing a shRNA against GPR91, prevents increase in ERK1/2 phosphorylation (n=3). Inset- western blot analysis confirm GPR91 knockdown in RGC-5 cells expressing a shRNA against GPR91. β -actin was used as loading control.

Supplementary Figure V: Gene expression induced by succinate in RCA is PGE₂-EP₄-dependent. A) Stimulation of RCA with 100 μM succinate leads to production of PGE₂ (n=3; **p<0.01) B) VEGF mRNA expression, following stimulation of RCA with succinate, is strongly affected by cyclooxygenase inhibitor indomethacin (100 μM) (Indo), and EP₄ antagonist L-161 (L-161982) (10 μM). No effects are observed with multi-specific EP₁₋₂₋₃ antagonist (AH6809) (1.5x10⁻⁵ M) (n=6; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001). C) Dose-dependent expression of VEGF in RCA following stimulation with PGE₂ (n=3; *p<0.05, **p<0.01).

Supplementary Table I: Primers used for Real-Time PCR gene expression quantification

VEGF-F: CAATGATGAAGCCCTGGAGT	VEGF-R : AATGCTTTCTCCGCTCTGAA
ANG1-F: ACAGGAGGATGGTGGTTTGATGCT	ANG1-RTCACCTGGCAGCTTCTCCGGA
ANG2-F: ACAGGAGGCTGGTGGTTTGATGC	ANG2-R: TGCGCAGCCGTGACTTTCAGT
IL-1b-F: AGTCGGCAAAGAAATCAAGATGGCC	IL-1b-R: TCACCCGGCTCTCCTTGAAGGT
IL-6-F: GCAAGAGACTTCCAGCCAGT	IL-6-R: TTGCCATTGCACAACCTTTTTCT

B) Article 2

The succinate receptor GPR91 signals from the Endoplasmic Reticulum

Hamel D*, Sanchez M*, Roy O, Julien LA, Zhu T, Rivera C, Sitaras N, Sapiha P, Duhamel F, Bhosle V, Hou X, Mitchell G, Ribeiro-Da-Silva A, Chemtob S

Contributions des auteurs

David Hamel et Mélanie Sanchez ont contribué, de façon égale, à l'établissement du projet, la formulation des hypothèses, le désign expérimental, les expérimentations, l'analyse des données et la rédaction de l'article.

Olivier Roy, Louis-André Julien, Tang Zhu, Carlos Rivera, Nicholas Sitaras, Premyzlaw Sapięha, François Duhamel, Vikrant Bhosle, Xin Hou ont participé à quelques expérimentations.

Alfredo Ribeiro-Da-Silva et Grant Mitchell ont contribué à la formulation des hypothèses initiales.

Sylvain Chemtob contribua à l'établissement et au financement du projet, la formulation des hypothèses et la rédaction de l'article.

The succinate receptor GPR91 signals from the Endoplasmic Reticulum

One-sentence summary: *This study presents a novel intracellular signaling modality by which the mitochondrial metabolite succinate activates is cognate receptor (present at the ER) to reinstate tissue homeostasis.*

Hamel D*¹ Sanchez M*², Roy O⁴, Julien LA⁵, Zhu T³, Rivera C⁶, Sitaras N¹, Duhamel F¹,
Bhosle V², Hou X³, Sapiha P⁶, Mitchell G³, Ribeiro-Da-Silva A², Chemtob S^{1,2,3,5}

- 1- Department of Pharmacology, Université de Montréal, QC, Canada
- 2- Department of Pharmacology and Therapeutics, McGill University, Montréal, QC, Canada
- 3- Department of Pediatrics, Research Center - CHU Ste-Justine, Montréal, QC, Canada
- 4- Department of Biomedical Sciences, Université de Montréal, QC, Canada
- 5- Faculty of Medicine, Université de Montréal, QC, Canada
- 6- Department of Ophthalmology, Research Center of Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

Corresponding author:

Sylvain CHEMTOB, M.D., Ph.D.

Research Center - CHU Ste-Justine

Departments of Pediatrics, Ophthalmology, and Pharmacology

3175, Chemin Côte Ste-Catherine, Montréal, QC, Canada, H3T 1C5

Tel: 1-514-345-4931 ext 2978; Fax: 1-514-345-4801



* These authors contributed equally to this work.

Keywords: GPR91, succinate, glycosylation, endoplasmic reticulum,

List of abbreviations: G protein-coupled receptor (GPCR), Hypoxia-ischemia (HI), Hypoxia-inducible factor (HIF), Vascular endothelial growth factor (VEGF), Angiopoetin (Ang), Endoplasmic Reticulum (ER),

Abstract:

The efficiency by which cells transduce stimuli is key to tissue homeostasis. Previously, we demonstrated that following hypoxic/ischemic stress, neurons retort by mounting a compensatory revascularization in response to spikes in tissue succinate. Here we reveal that the physiological effects of succinate takes place within a given neuron by mechanisms involving endoplasmic reticulum (ER) resident GPR91 likely stimulated by intracellular release of succinate from neighbouring mitochondria. We show that GPR91 is primarily ER bound and fully able to induce calcium transients, produce PGE₂ and induce *vegfa* transcription from this sub-cellular location, which occur via a Cyclooxygenase-dependant mechanism. Furthermore we demonstrate that following hypoxia, newly synthesized GPR91 localizes to the plasma membrane following post-translational modifications. This relocalization affects signaling pathways, gene expression and ultimately leads to an observable difference in vascularisation. These novel findings support the importance of cellular location for proper cell function and demonstrate the delicate nature of metabolic equilibrium.

Body

The tendency for metabolites, such as Krebs cycle intermediates, to exert biological functions beyond that of energy production has revolutionized our understanding of these molecules. In fact, the discovery of cognate G-protein coupled receptors (GPCRs) for metabolites such as succinate, α -ketoglutarate, lactate and adenosine¹⁻⁴ brought to light these non-classical roles. Our recent studies established the angiogenic properties of succinate in neurons, through activation of its specific receptor, GPR91, introducing the prospect that this metabolite could link vascular supply to metabolic demand⁵. Nevertheless not much is understood about the succinate-GPR91 axis, and the intracellular signaling mechanisms by which neurons mediate angiogenesis in response to succinate. Interestingly, in the retina GPR91 is primarily expressed in the cell body, unlike in kidneys where a plasma membrane location has been described⁶.

The conventional concept of an extracellular ligand activating a plasma membrane bound receptor has been the dogma in cell biology. Yet examples abound of intracellular receptors that signal via mechanism analogous to those of their cell surface counterparts. Perhaps the best described are nuclear GPCRs that can mediate *in situ* signalling⁷. Nuclear localization of receptors for prolactin, interleukin-1, parathyroid hormone, angiotensin as well as lipopolysaccharides⁸⁻¹⁰ has been proposed to mediate gene regulation, enhancement or inhibition of effects elicited by cell surface receptor activation, maintenance of cell homeostasis and in the regulation of cell proliferation^{11, 12}. Importantly, the presence of nuclear transmembrane receptors, specifically for the lipid prostanoids, platelet-activating factor and lysophosphatidic acid, was shown to directly evoke gene transcription while plasma membrane receptors induced mostly acute non-genomic effects^{13, 14}. The mitochondria is the primary cellular source of succinate, hence, intracellular localization of GPR91 would confer an efficient and profitable signaling modality. Here we elucidate a previously undisclosed signaling paradigm where ER-resident GPR91 responds to succinate activating transcription of proangiogenic genes; intriguingly a decrease in oxygen levels alters GPR91 sub-cellular location provoking a change in proangiogenic gene activation that ultimately affects vessel formation.

Firstly, by immunohistochemistry in retinal ganglion neurons shown to express GPR91⁵, we detected a predominantly intracellular localization of the receptor. Upon further analysis, we established that GPR91 (red) immuno-staining overlapped with various markers of the endoplasmic reticulum (ER) such as the KDEL receptor (green) or the chaperone protein BiP (**Fig. 1a**). We observed no expression of GPR91 in nuclei (stained with DAPI) suggesting that GPR91 specifically localized to the ER. To ascertain this intracellular staining pattern of GPR91 in neurons, we proceeded to investigate *in vivo* by high-resolution immunogold electron microscopy on cortical brain sections. Confirming the observations aforementioned at an ultra-structural level, GPR91 expression was largely confined to the ER (**Fig. 1b**) and on the outer nuclear envelope in-folding (**Fig. 1b iii & iv**) thought to constitute a continuum with the ER¹⁵. As expected, considerably less GPR91 was found at the plasma membrane (**Fig. 1b ii**). Of relevance, GPR91 was present in the vicinity of mitochondria (**Fig. 1b iii & iv**); the cellular production sites of succinate, yet succinate treatment does not affect the intracellular location of GPR91 (**Supplementary Fig. 1a**).

Upon confirming the substantial presence of GPR91 at the ER of neurons (both in tissue⁵ and in culture), we pursued the possibility of this receptor being able to respond to its ligand (succinate) from this location. Sources of succinate include the mitochondria and systemic circulations. Transport of succinate occurs through means of dicarboxylate transporters^{16, 17} and organic anion transporters (OATs) expressed both at the plasma membrane¹⁸ and mitochondrial membranes¹⁹. Intraocular injection of succinate was performed in mice enhancing vascular growth observable by a significant increase in vascular tufts (**Fig. 1c**). The non-specific transporter inhibitor, probenecid²⁰ did not disrupt basal angiogenesis, however it resulted in a lack of enhanced angiogenic growth following succinate stimulation, supporting our results of a functional intracellular receptor (**Fig. 1c**). In a similar manner, intraocular injection of probenecid decreased succinate-induced *vegfa* expression (**Fig. 1d**), a well-established target of GPR91-succinate activation, further supporting our findings of a seemingly functional intracellular GPR91 which continues to respond to its endogenous ligand, succinate.

To assess the activity of intracellular GPR91 we devised a cell-free system to directly address the functional role of GPR91 at the ER. Our cell-free preparations consisted of two

distinct procedure performed on cultured retinal ganglion neurons to yield either cell nuclei with a preserved ER network attached (Nu-ER) or alternatively, solely ER-free nuclei (Nu). Great care was taken to gently remove plasma membranes using a Dounce cell tissue grinder while preserving the biological integrity of the preparations²¹. Activation of GPR91 with succinate has been shown to trigger the expression of angiogenic factors in mouse retinas⁵, one of which is vascular endothelial growth factor (*vegfa*). Consequently, *vegfa* expression following stimulation of nuclei alone or in the presence of the ER, was examined. Only in the presence of the ER (or whole cell extracts-WCE) could we observe an induction of *vegfa* gene expression (**Fig. 2a**), the nuclear fraction stimulated with succinate did not affect *vegfa* expression (**Fig. 2a**). To confirm that the signal of succinate was transduced by GPR91, we knocked down GPR91 (**Supplementary Fig. 1b**) using neurons stably expressing shRNA against GPR91 and isolated the nuclei+ER fraction. We observed that in absence of GPR91, succinate does not induce *vegfa* gene expression (**Fig. 2b**) confirming that endogenous GPR91 signals in the presence of succinate.

The presence of a GPCR at the ER could be attributed to folding or transport, therefore to substantiate that ER-resident GPR91 is a functional receptor, we proceeded to investigate the ability of succinate to induce calcium mobilization from this location. GPR91 has been previously established to increase intracellular calcium levels²² in the presence of succinate. Calcium transients were performed on whole cells (RGCs), Nucleus-ER and Nuclear fractions (**Fig. 2c**). The calcium ionophore, Ionomycin (positive control), effectively provoked a release of calcium from whole cells as well as the Nu-ER and Nu fractions indicating that biological integrity was maintained following cell fractionation protocols (data not shown). As expected, following succinate treatment, whole cells released 75% of calcium stores. Interestingly, the fraction containing the Nucleus-ER also showed a release of 50% of calcium stores however the nuclear fraction alone did not show any significant amount of Ca²⁺ release (**Fig. 2c**). These results support the observation of an intracellular GPCR that is preferentially localized at the ER. To further reinforce that intracellular GPR91, following succinate treatment, releases Ca²⁺ pools from its intracellular location, GPR91 was knocked down by expressing an shRNA targeting the receptor, prior to isolating the nuclear-ER fraction. Consequently, loss of GPR91 expression led to approximately 50% inhibition of calcium store

release. An off-target shRNA was used as a negative control (**Fig. 2d**) with no observable effects on calcium release.

To elucidate the potential mechanisms that drive the retention of GPR91 at the ER, we examined the amino acid sequence of GPR91 (**Fig. 3a**) for queues of intracellular retention signals. Several groups have reported ER retention signal sequences of GPCR mutations²³⁻²⁸, which leads to receptor displacement. No consensus retention signals were observed in GPR91 (**Fig. 3a**), however this receptor contains two potential glycosylation sites²⁹, which enclose the consensus sequence for N-glycosylation, NXS/T³⁰ known to regulate the final location of proteins harbouring this modification (**Fig. 3a**). One site is located on the N-terminal extracellular tail, asparagine (N) 4 and the second is located on the second extracellular loop, N164 (**Fig. 3a**). We generated point mutations of GPR91 at both glycosylation sites, N4 and N164 to abolish glycosylation at those positions. We used 293T cells devoid of GPR91 expression (**supplementary Fig. 2a**) and transiently transfected wild-type (WT) GPR91 or mutant GPR91 constructs and established if glycosylation would regulate the cellular location of GPR91 by immunohistochemistry. Remarkably, inhibiting glycosylation at position N4, not N164, lead to the expression of GPR91 at the plasma membrane (**Fig. 3b**). Furthermore position N4 is conserved amongst species, not N164; (**Fig. 3a**) revealing a potentially important region in GPR91 function and regulation. Mutation of the glycosylation site on the third extracellular loop (N164) had no effect on GPR91 location, which similar to WT-GPR91, remained at the ER, near the nucleus. Supporting results were obtained following transfection of 293T cells, which were not permeabilised; only GPR91 N4A was detected (**Fig. 3c**) by immunohistochemistry. In fact GPR91 N4A colocalized with pan-Cadherin, a marker for the plasma membrane (**Fig. 3c-lower panels**).

Steady state assessment of WT-GPR91 levels compared to the glycosylation-defective mutants (GPR91 N4A and N164A) shows a downshift in molecular mass correlating with a loss of a sugar moiety (**Fig. 3d**). We noted that the steady state levels of GPR91 N4A expression were lower than both WT GPR91 and GPR91 N164A, suggesting the N-terminal site could not only affect receptor localization, but in addition, control receptor turnover. GPCRs are degraded by cellular mechanisms such as the lysosomal and/or the proteasomal pathway^{31, 32}. By blocking the proteasomal pathway with the pharmacological inhibitor MG-

132 we observed an increase WT GPR91 receptor levels within the cell (**supplementary Fig. 2b**), yet inhibition of the lysosomal pathway, using inhibitors Leupeptin or NH₄Cl, yielded a slight to no increase in protein levels, indicating that GPR91 levels are primarily regulated by the 26S proteasomal degradation pathway. Interestingly, the mutant GPR91 N4A appeared to be regulated by both the proteasomal and the lysosomal pathway, since blocking either pathway with the aforementioned drugs led to an accumulation of the mutant receptor (**supplementary Fig. 2c**). Cycloheximide chase experiments did reveal that the turnover of GPR91 N4A was greater than that of WT-GPR91 or GPR91 N164A (**supplementary Fig. 2d**) corroborating the steady state levels observed (**Fig. 3d**) and accounting for the fact that the N4A mutant is targeted by two degradation pathways. Since glycosylation can affect protein folding as well as protein-protein interaction^{33, 34}, the glycosylation status of GPR91 was analysed. PNGase F treatment of transfected 293T cells shows that complete deglycosylation of GPR91 was achieved rendering GPR91 to its theoretical molecular weight of 37 KDa (**Fig. 3e**). Furthermore, mutants GPR91 N4A or N164A were also deglycosylated further suggesting that each mutation does not affect glycosylation at the other consensus glycosylation site (**Fig. 3e**). In addition to proper folding by glycosylation, shuttling proteins also participate in directing receptors to specific cellular compartment, in fact, the vast family of rab GTPases is responsible for proper membrane trafficking between organelles, vesicle budding and uncoating³⁵. By immunoprecipitation of WT GPR91 or the mutant GPR91 N4A/N164A, we observed that WT GPR91 and GPR91 N164A (**Fig. 3f**) both interact with Rab 2, which participate in shuttling of proteins from the Golgi to the ER³⁶, conversely GPR91 N4A interacted with Rab 11, responsible in delivering proteins to the plasma membrane³⁷ (**Fig. 3f**) suggesting that the state of glycosylation of GPR91 can determine its interaction partners which consequently impacts its cellular location.

To our knowledge, this is the first account that a change in glycosylation status of a GPCR can redirect the receptor towards the plasma membrane of a cell. As such we were keen to determine if the glycosylation deficient GPR91 N4A was, in fact, active. To verify the mutant's activity, we examined if and how known intracellular signaling pathways were affected by ligand-activated GPR91 N4A compared to the WT receptor¹. HEK 293 cells were transiently transfected with either GPR91 or GPR91 N4A/N164A and following treatment of

cells with succinate at several time points, the pro-angiogenic p42/44 and Akt pathways were examined³⁸. Succinate-stimulated GPR91 resulted in activation of Akt for a prolonged period of time (**Fig. 4a**). GPR91 N164A, which behaves comparably to the WT, also activated the Akt pathway in a prolonged and increasing manner. Conversely the glycosylation-deficient GPR91 N4A was not able to activate the pro-angiogenic Akt pathway. Nevertheless, GPR91 N4A was able to trigger pERK, with peak activation at 15 min (**Fig. 4b**) compared to WT GPR91, which activated ERK more robustly and faster, within 5 to 10 min (**Fig. 4b**). Interestingly, the differential activation of these signaling pathways had a distinct effect upon gene expression characteristically regulated by GPR91. GPR91 participates in the induction of several angiogenic factors in the retina such VEGFA, Angiopoietin 1 (Ang1) and Ang2⁵, leading us to examine if the glycosylation-deficient GPR91 N4A would affect the expression of these pro-angiogenic factors. Following stimulation of succinate, WT GPR91 strongly induced *vegfa* expression whereas PM bound GPR91 N4A (**Fig. 4c**) did not promote a significant level *vegfa*. Nonetheless, succinate activation of GPR91 N4A did lead to a significant increase in *fgf-2*, *Ang1* and *Ang2* compared to WT GPR91, which was also capable of activating these genes following succinate activation, yet to a lesser extent. These results establish that removing the glycosylation site does not affect the receptor's activity responds to succinate albeit in a distinctive manner to the WT receptor.

Having established that the cellular location of GPR91 can alter the pattern of signaling pathways activation and gene expression we proceeded to investigate the impact of its location on angiogenesis by examining vascular sprouting. In order to quantify the angiogenic potential of intracellular GPR91, aortic rings from Sprague-Dawley rats were placed in nutrient-deficient matrigel and stimulated with conditioned medium obtained from WT GPR91 or GPR91 N4A expressing 293T cells treated or not with succinate. Following 3 days of incubation, we analyzed the sprouting of vessels. Media from WT-GPR91 transfected 293T stimulated with succinate led to sprouting covering a greater surface area compared to medium from GPR91 N4A transfected HEK cells stimulated with succinate (**Fig. 4d**). Nonetheless, the mutant receptor was able to promote blood vessel sprouting, albeit with shorter and less organized protrusions than WT-GPR91 treated vessels. In addition, closer examination revealed that conditioned media from GPR91 N4A expressing cells led to a

network with a greater microvascular density and several tufts compared to the vessels obtained by pro-angiogenic factors released from activated WT GPR91. In fact PM-bound GPR91 N4A provokes a greater release of *ang2* which disrupts vessel growth in the absence of sufficient VEGFA (**Fig. 4c**) since expression of VEGFA is required to promote endothelial cell proliferation and migration³⁹ (**Fig. 4c and d**). Ang1 and Ang2 bind to the same receptor (Tie-2) yet their actions oppose one another, with Ang1 being able to stabilize vessels and Ang2 opposing this effect⁴⁰. In fact Ang1 acts as a survival factor promoting the recruitment of pericytes and smooth muscle cells to stabilize vascular networks^{41, 42}. Conversely, Ang2 is a biological antagonist of Ang1 and its expression stimulates vascular remodelling by reducing vascular stability and facilitating access to VEGF to endothelial cells^{43, 44}. Given that GPR91 N4A activation generates greater levels of *ang1* and *ang2* with no *vegfa*, it is not surprising the sprouting is not as extensive as the under the influence of activated WT GPR91. Yet the PM bound mutant receptor does generate 1.5X more FGF2 and presumably several other angiogenic factors which would lead to the observed growth of vessels, even in the absence of succinate (**Fig. 4d**). These results strongly imply that post-translation modification of GPR91, more specifically glycosylation, can regulate the cellular location of the receptor, which leads to a differential activation pattern, ultimately affecting microvascular growth.

Glycosylation is a tightly regulated process yet there are conditions where the enzymes involved in attaching and modifying the sugar moiety are affected. In fact lower levels of oxygen can reduce by 50% the levels of UDP-Glc-NAc⁴⁵. Therefore to assess if reducing the level of oxygen could affect endogenous GPR91 regulation, cultured retinal ganglion cells (RGC-5) were placed in a hypoxic chamber and levels of O₂ were reduced to 2%. Interestingly we observed that following 24 hours of hypoxia the location of GPR91 differed from its original location, surrounding the nuclear membrane (**Fig. 5a**). In fact, as cells were maintained during longer periods of time in hypoxia, we observed that GPR91 presented a more diffuse pattern within the cell and following 72 hours of hypoxia, GPR91 was observed primarily at the plasma membrane. WCE of RGC-5 in normoxia (21% O₂) showed that GPR91 appears at a molecular weight which represents a fully glycosylated receptor (58 KDa) (**Fig. 5b**). However, following 48 hours of hypoxia and longer, we observed that the levels of higher molecular weight GPR91 decreased and simultaneously, the expression of a lower

molecular weight GPR91 becomes visible, corresponding to a loss of sugar moiety (**Fig. 5b-GPR91***). To ensure that endogenous GPR91 was indeed glycosylated in neurons, PNGase treated RGC-5 cells were treated with PNGase F in a similar manner as in Figure 3 resulting in a 37 KDa GPR91, confirming that similarly to 293T cells, GPR91 is glycosylated in RGC-5 cells (**Fig. 5c**). Furthermore, confocal imaging of rat retinal cryosections exposed to hyperoxia, recreating ischemic retinopathies⁴⁶, showed that GPR91 was preferentially localised at the plasma membrane (colocalization with pan-cadherin) (**Fig. 5d-lower panels-white arrows**), compared to retinas in normoxia (**Fig. 5d upper panels**).

The less usual location of GPR91 does conjure the question as to its role. Interestingly, there are other GPCRs that have been uncovered to function intracellularly. Namely, the prostaglandin PGE2 is known to interact with its receptor, EP4, at the nuclear envelope¹⁴. Furthermore, recent findings have shown that EP4 activation by PGE2 led to an increase in blood vessel formation due to an increase in VEGF production⁴⁷. In fact, similar studies have shown that succinate-activated GPR91 can trigger an increase in PGE2 leading to EP4 receptor activation and *vegfa* transcription, ultimately promoting angiogenesis in the brain (data unpublished). Interestingly, both cPLA₂, which hydrolyses the membrane phospholipids resulting in the release of arachidonic acid (AA)⁴⁸, and COX-2, which converts AA to biologically active prostaglandins, co-existed intracellularly and colocalized with calnexin (**Fig. 6a**), as did GPR91 (**Fig. 1a & b**). Therefore, we investigated if there was a potential interplay between intracellular GPR91 and PGE2 by isolating nuclear fractions from RGC-5 cells and subsequently placing the nuclei in the presence of isolated and purified ER fractions stimulated or not with succinate. As expected, stimulated ER was able to promote *vegfa* expression whilst inhibiting the EP4 receptor with the antagonist L-161982, led to a decrease in the pro-angiogenic factor (**Fig. 6b**). In addition knock down of GPR91 in RGC-5 cells led to a decrease in PGE2 production following succinate treatment (**Fig.6c**) supporting a pathway for *vegfa* induction by PGE2/EP4 regulated by GPR91 activation and comparably to 293T cells, involved the activation of p42/p44 signaling pathway (**Supplementary Fig.3**). In support of our findings we observed that GPR91 is able to interact with cPLA2 and COX-2 following succinate treatment (**Fig. 6d**) in neuronal cells however the mutant GPR91 N4A was not able to interact with COX-2 (**Fig. 6e**) pointing to a possible explanation for GPR91 N4A

being unable to induce *vegfa* expression (**Fig. 4c**), even in 293T cells stably expressing the EP4 receptor (**Fig. 6f**), compared to WT-GPR91 where we observed a greater induction of *vegfa* gene expression (**Fig. 6f**).

Taken together, our data point to the importance of cellular localization in order to carry out proper biological functions. The intracellular site of GPR91 under normoxic conditions allows the receptor to interact with key players involved in retinal angiogenesis^{49, 50}. This location is controlled by the glycosylation of the N-terminal asparagine found at position 4. In fact this position is conserved amongst rodents and humans pointing to a central region for GPR91. Initial findings positioned GPR91 at the ER in the neighborhood of the nucleus. Unlike the EP4 receptor, which resides on the nuclear membrane⁵¹, we established that induction of the pro-angiogenic *vegfa* gene following activation of the receptor with succinate was achieved if the ER fraction was present (**Fig. 2a and Fig. 6b**). In fact activation of GPR91 with succinate activated both Akt and ERK signaling pathway, which led to the transcription of various pro-angiogenic genes⁵² (**Fig. 4c**). These factors can subsequently stimulate endothelial cells to promote proper vessel growth in order to vascularize necessary regions such as the retina⁵. We uncovered that mutation of the conserved glycosylation-targeted N4 led to not only a differential activation of signaling pathways, which translated to a differential pattern of pro-angiogenic gene expression (**Fig. 4**), but that ultimately resulted in vessel formation that was denser and travelled a smaller distance when compared to the effect of activating the wild-type receptor. Signaling through Tie2 depends on the balance between Ang1 and Ang2, where Ang2 induces hypoxia or other factors that suppress the effects of Ang1, resulting in vessel destabilization. Normally VEGF sends the classical proliferative signal, including cell-cell interaction and capillary tube formation. When Ang2 binds Tie2, it loosens the vessel structures rendering endothelial cells more accessible and responsive towards the angiogenic inducer VEGF (and likely other inducers). In addition, Ang1 acts synergistically with VEGF to promote endothelial cell sprouting and angiogenesis^{53, 54}. However when Ang2 is expressed in absence of VEGF it leads to loosening of cell-matrix interactions instigating endothelial cell death. The glycosylation status of a protein can be affected by a deprivation in oxygen leading to a decrease in components such as UDP-GlcNAc⁴⁵. Having previously shown an arrest of blood vessel formation in a hypoxic

environment, here we observed that hypoxia was able to disrupt the typical location of GPR91 at the ER and promote the receptor to locate at the plasma membrane. Furthermore we found that mutation of the N-terminal glycosylation site led to a plasma membrane located GPR91, induced levels of angiogenic factors that differ from ER-bound GR91, and ultimately affected microvascular vessel formation in a similar manner to retinas altered by ischemic lesions.

Methods

Cells culture, DNA transfection

In vitro experiments were performed in retinal ganglion cells (RGC-5) or Human embryonic kidney cells (HEK293T). RGC-5 cells were a kind gift from Neeraj Agarwal (University of North Texas Health Science Center, Fort Worth, Tx). Typically, 50-60% confluent cells were transfected using the plasmid vector pcDNA 3.1 (Invitrogen) coding for the different constructions of GPR91. Point mutations of GPR91 were generated by PCR mutagenesis using *pfu* polymerase (Stratagene). All constructs were verified by automated sequencing. For each well, 2 µg of plasmid DNA was incubated with the transfection agent PEI (Polysciences #23966) and were consequently delivered on cells following a 30 min incubation period at RT. Cells were cultured in dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) enriched with 10% fetal bovine serum and incubated in a 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂.

Chemicals

Chemicals were purchased from the following manufacturers: Succinate (Sigma; S3674), Probenicid (Sigma; P-8761), L-161,982 (Cayman Chemical, #10011565), and Prostaglandin E2 (Cayman Chemical, #14010).

Immunohistochemistry

Localization of endogenous GPR91 was determined by fluorescence microscopy using anti-GPR91 (novus biotechnologies, 1:300). Colocalisation was made with organelle specific marker such as BiP (Abcam; 1:300), KDEL receptor (Abcam; 1:300); calnexin (Pierce-Thermo Scientific, 1:300). Briefly, 30-40% confluent RGC-5 cells were cultured on cover slips and fixed in 2% paraformaldehyde. Next cells were permeabilized or not in 0.1% Triton

X-100 diluted in PBS and blocked with 5% goat serum. Cover slips were incubated O/N with an appropriate combination of primary antibodies. Subsequently, suitable secondary antibodies conjugated to Alexa Fluor (Molecular Probes); Alexa Fluor 488, (#A11070, conc. 1:1000 and Alexa Fluor 594, (#A11012), conc. 1:1000, were prepared and delivered on cover slips for 1 hour at RT, washes were carried out with PBS. Nuclei were stained with DAPI (Invitrogen; 1:5000). Images were taken with a laser scanning confocal microscope (Olympus FV1000). In transfected cells 293T cells were seeded onto a 6-well culture dish with a circle coverslip and transfected with the appropriate plasmid GPR91, GPR91 N4A, or GPR91 N164A plasmid as required. The final confluency rate was kept ~20–30%. N-terminal FLAG-tagged GPR91 was visualized as described above and using a FLAG specific antibody (SIGMA; 1/500) and was co-stained with either ER markers calnexin or pan-Cadherin (anti-pan-Cadherin; Cell signaling 1:300).

Electron microscopy

Specimens for electron microscopy were prepared as previously described⁵⁵. Briefly male Sprague-Dawley rats were used. Rat parietal cortex tissue sectioning and pre-embedding immunogold staining was done as described in detail previously⁵⁶. Vibratome sections (50 μm) of cortex were incubated with the primary antibody (a rabbit anti-GPR91 antibody) (1:50) overnight at 4 °C followed by another overnight incubation with goat anti-rabbit gold (10 nm)-conjugated IgG (1:50) (British Biocell International). Thereafter, specimens were postfixed in 1% osmium tetroxide, subsequently dehydrated in graded ethanol, and embedded in Epon according to standard technique. Ultrathin sections were cut using a Reichert Ultracut ultramicrotome, mounted on Formvar-coated copper grids, stained with uranyl acetate and lead nitrate, and examined with a transmission electron microscope (Philips 410LS, Netherlands).

For immunolabelling assays, cells were incubated with 1mg/mL rabbit polyclonal GPR91 antibody, subsequently with a mouse anti-rabbit gold (1nm)-conjugated IgG (1:100; Electron Microscopy Sciences). Negative controls were analyzed by omitting primary antibodies. Specimens were examined with a transmission electron microscope (Philips 410LS).

Intraocular injections and retinal vascular density quantification

Rat pups were injected at post-natal day (P) 4 with succinate (final concentration 100 μ M) +/- probenecid (final concentration 1mM) using 10 μ L Hamilton syringe (volume of injection = 1 μ L). Animals were sacrificed and perfused with PFA 4% at P8. The density of the capillary network was assayed by quantification of *Bandeiraea simplicifolia* (1:100, Sigma) stained flatmount using Image J (NIH software), as reported by us⁵⁷.

Gene expression quantification

RGC-5, RGC-5 stably expressing shRNA against GPR91 or transfected HEK293 cells were seeded in 6-well plates and treated the next day or 36 hours post transfection with or without 100 μ M succinate for 4 hours in serum-depleted DMEM for 4 hours. Where appropriate cells were pre-treated with 1mM probenecid 30 min prior to succinate addition. Cells were rapidly preserved in TRIzol (Invitrogen). RNA was extracted according to manufacturer's protocol and cDNA synthesized using qScript cDNA SuperMix (Quanta Biosciences). Primers were designed using NCBI Primer Blast. Quantitative gene expression analysis was performed on MXPro3000 (Stratagene) with SYBR Green Master Mix (BioRad). Expression was normalized to 18S universal primer (Ambion; #AM1718). Expression of GPR91 in HEK 293T cells was determined by traditional PCR using TAQ (Fermentas).

Fraction purification/ preparation

Sub-cellular fractions of RGC-5 cells were obtained by resuspending cells in ice-cold Hepes buffer using a pre-chilled Dounce homogenizer for 40 min on ice. Fractions were obtained by discontinuous sucrose gradient ultracentrifugation. The purity of subcellular fractions was validated by immunoblotting with anti-Na⁺/K⁺ ATPase (1:250), anti-calnexin (1:500) and anti-lamin A/C previously described⁹. Briefly, crude nuclear fractions were resuspended in buffer containing 1.2M sucrose and layered on top of a buffer solution containing 1.8M sucrose prior to centrifugation at 60 000 \times g for 60 min at 4°C. ⁹Reactions were subsequently performed for 30 min at 37°C prior to extracting RNA from nuclei for gene expression analysis.

Calcium Release Kinetic

Cellular Ca^{2+} signals were measured using fura-2-AM technique as previously described⁹. Briefly, RGC-5 or shGFP/shRNA91 stably expressing RGC-5 cells were loaded with fura-2-AM and stimulated with 100 μM of succinate. In another experiment, RGC-5 isolated nuclei or nuclei+ER or whole cells were treated with 100 μM of succinate. Intracellular calcium signals were measured by spectrofluorometry (LS50, PerkinElmer Life Sciences) and the fluorescent signal appropriately calibrated⁹. The calcium concentrations were calculated according to Grynkiewicz *et al.*⁵⁸.

Western Blot and Immunoprecipitation

To determine protein levels western analysis was carried out in RGC-5 cells or by transfecting 293T cells with myc-tagged GPR91 or mutants GPR91 N4A or GPR91 N164A. ERK and AKT phosphorylation were examined after treatment with succinic acid 100 μM in serum-starved DMEM at several time points. Cells were harvested using RIPA buffer. Immunoblotting was performed using specific antibodies; anti-GPR91 (Novus Biologicals; #NBP1-00861), Myc-tag (Cell Signaling; #2276), p42/p44 (Cell Signaling; #4376S), and phospho-p42/p44 (Cell Signaling; # 4695S). Signals were revealed by chemiluminescence using appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies and observed by Image Quant LAS 500 (GE healthcare). Total protein content was normalized using an anti- β -actin antibody (Santa Cruz Biotechnology) where appropriate.

For phosphorylated ERK or Akt, the membranes were stripped and reblotted with an antibody against total ERK or AKT. The activation was estimated by comparing the signal between phosphorylated and total forms of ERK/AKT using the imageJ (NIH software) from at least three independent experiments. To measure the degradation of GPR91 HEK293 cells were transfected as previously mentioned and after 36 hours, cells were treated with 1 μM proteasome inhibitor MG-132 (Enzo Life Sciences) or the lysosomes inhibitors Leupeptin (Sigma-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or NH_4Cl (Sigma-10 mM) for 8h. For western analysis cells were treated as mentioned above.

To analyze GPR91 interaction with other proteins, coimmunoprecipitation analysis was performed in cells transfected with wild type or mutated GPR91 (myc-tagged). For immunoprecipitation of GPR91, cell lysates were precleared before incubation with an anti-

GPR91 antibody (Novus) and protein A/G-Sepharose beads at 4°C. Immunoprecipitates were washed in lysis buffer except that NaCl concentration was raised to 0.7 M and no SDS was added in the lysis buffer. Samples resolved by SDS-PAGE, and analysed by western blotting using the indicated antibody, RAb2 (SCBT), Rab 11(SCBT), Cox-2 (Cell Signaling), cPLA2 (SCBT) and HIF-1 α (Novus). Membranes were also probed with an anti-GPR91 antibody for standardization of GPR91 levels in each well.

Aortic explants

We removed aortae from adult Sprague-Dawley rats and cut the aorta into 1 mm thick sections. The rings were embedded in growth factor-reduced Matrigel (BD Biosciences; 354230) in 24-well plates and cultured for 3 days in conditioned media obtained from HEK293T transfected with either GPR91 or GPR91-N4A construction or left untransfected and stimulated with 100 μ M succinate or not for 24 hours. Photomicrographs of individual explants were taken for each day and micro-vascular sprouting measured by the area covered by outgrowth of the aortic ring using the ImageJ (NIH software).

PGE₂ dosage

PGE₂ was extracted with SPE purification tC18 columns (Water) from cultured medium of EGC-5 stimulated or not with 100 μ M succinate. Quantification was made with PGE₂ EIA Kit (Cayman Chemical). The amount of PGE₂ was normalized to protein content.

Cycloheximide Chase

293T cells were transiently transfected with plasmids expressing myc-tagged wild type or GPR91 or GPR91 N4A or GPR91 N164A plasmids. At 12 h after transfection, cycloheximide (Sigma) was added at a concentration of 50 μ M and cells were lysed for Western analysis at the indicated time points. Each signal intensity were derived from four separate experiments and quantified using an image analyzer (Image J, NIH software) and expressed relative to β -actin levels.

Statistical Analysis

Comparison between groups was made using one-way analysis of variance followed by Bonferroni's test to compare means. Data are presented as means \pm s.e.m.

Figure Legends

Figure 1: GPR91 is an intracellular GPCR. (a) Endogenous GPR91 in RGC-5 cells co-localize with ER markers, KDEL receptor and BiP. (b) *In situ* ultrastructural ER localization of GPR91 in rat parietal cortex tissue sections by electron microscopy of rat parietal cortex shows that GPR91 can be found in ER foldings. (c) Superficial retinal vascular density stained with lectin in WT mice injected with succinate (final concentration of 100 μ M) with or without the organic anion transporters (OATs) inhibitor probenecid (final concentration of 1mM). (d) 4 hours succinate-induced (100 μ M) *vegfa* expression in RGC-5 cells is abolished when cells were treated with 1mM probenecid.

Figure 2: Response of isolated fractions to succinate. (a) 4h stimulation with 100 μ M succinate induced *vegfa* on isolated fractions of RGC-5 cells. Absence of the ER results in abolished gene expression of *vegfa*. (b) In isolated fractions of RGC-5 cells, shRNA against GPR91 significantly reduces the expression of succinate-driven *vegfa* expression. (c) Parallel to gene induction, calcium (Ca^{2+}) release was performed on isolated fraction containing or not ER. Calcium release was measured for 30 min and is only observed in presence of ER. The grey bar illustrates the moment of succinate (100 μ M) injection. (d) Similarly, calcium release in the ER fraction is inhibited when GPR91 is knocked-down.

Figure 3: Identification of theoretical glycosylation retention site. (a) Snake plot representation of theoretical human GPR91 topology and potential ER-retention signals. (b) Cellular localization of GPR91 by confocal microscopy. 293T cells were transfected with FLAG-GPR91 or mutants FLAG-GPR91 N4A/ FLAG-GPR91 N164A plasmids. Co-localisation with the endogenous ER marker calnexin can be observed. Fluorescence signals were visualized using filters for 488nm (FLAG-GPR91) wavelength and 594nm (calnexin) shown alone and merged. Cell nuclei were stained with 4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI). (c) Similar to (b) but cells were not permeabilised. (d) Steady-state levels of GPR91 and glycosylation-deficient mutants (N4A and N164A) in transiently transfected HEK 293 cells. (e) PNGaseF-treated transfected HEK 293 lysates fully deglycosylate GPR91 variants to its theoretical molecular weight of 37 KDa (*). (f) Co-immunoprecipitation of transiently transfected GPR91 and mutants GPR91 N4A and N164A in HEK cells was carried out with an

antibody specific to myc-tagged (mouse) GPR91 and endogenously-expressing GTPases Rab 2 and Rab 11 were detected by immunoblot analysis (IB) using a specific antibody for each GTPase. GPR91 was monitored in each sample using an anti-myc antibody (rabbit).

Figure 4: Functions of ER and PM bound GPR91 receptors. (a) HEK293 cells were transiently transfected with WT-GPR91 or the glycosylation mutants and treated or not with 100 μ M succinate. Subsequently cells were lysed at the indicated times. AKT phosphorylation was monitored using a specific anti-phospho Akt antibody and phosphorylation was measured against levels of expressed AKT using an antibody against total AKT. Results represent 4 independent experiments and illustrated as a histogram. (b) Similar as in (a), expect that activation of p42/44 was measured. (c) Expression of pro-angiogenic genes *vegfa*, *fgf-2*, *angpt-1* and *angpt-2* from transiently transfected HEK293 cells with WT-GPR91 or mutants GPR91 N4A/GPR91 N164A treated or not with succinate (100 μ M) for 4 hours. N=4 (**p<0.01, ***p<0.001). (d) Female rat aortic explants treated with conditioned media from transfected HEK293 cells stimulated or not with succinate. Representative micrograph (left) and corresponding histogram (right). N=10 (**p<0.01, ***p<0.001).

Figure 5: Hypoxia-induced change in localisation is cause by modification of glycosylation profile. (a) Immunohistochemistry of endogenous GPR91 in permeabilised RGC-5 cells exposed to various periods of hypoxia (2% O₂). Cell nuclei were stained with DAPI. (b) Western blot analysis of endogenous GPR91 levels in RGC-5 cells exposed to corresponding periods of hypoxia as in (a) Top grey arrow shows fully glycosylated GPR91 whilst the bottom black arrow shows GPR91 with a lower molecular weight corresponding to a loss of a sugar moiety. β -actin was used as a loading control. (c) PNGaseF-treated RGC-5 cell lysates show fully deglycosylate GPR91 to its theoretical molecular weight of 37 KDa. (d) Representative confocal imaging of GPR91 (green) and plasma membrane marker, pan-cadherin, (red) merged with DAPI (blue) in retinal cryosections from 14-day-old rats (n=3) after 3 days in normoxia (21% O₂) or hyperoxia (80% O₂). Co-staining was detected mainly on the retinal ganglion cell layer (RGC).

Figure 6: Succinate induces PGE₂ synthesis at the ER. (a) *vegfa* expression following stimulation of isolated nuclei from RGC-5 cells with the ER fraction treated or not with

100 μ M succinate for 30 min at 37°C and pre-treated or not with EP4 antagonist L-161,982. N=4 (*p<0.05, **p<0.01). (b) Production of PGE₂ induced by stimulation of succinate from RGC5 is abolished following knock-down of GPR91. N=4 (*p<0.05). (c) Interaction of GPR91 with cPLA2 or COX-2 was examined in whole cell extract and nucleus+ER fraction of RGC-5 cells by co-immunoprecipitation. Immunoprecipitation was carried with an antibody specific to GPR91 and subsequently used as loading control. (d) Co-immunoprecipitation of myc-tagged GPR91 or GPR91 N4A or GPR91 N164A transiently transfected in HEK293 cells. and endogenously-expressing Cox-2 was detected by immunoblot analysis (IB) using a specific antibody for Cox-2. GPR91 was monitored in each sample using an anti-myc antibody. (e) Expression of pro-angiogenic gene *vegfa* from transiently transfected HEK293 cells stably expressing the EP4 receptor with WT-GPR91 or mutants GPR91 N4A/GPR91 N164A treated or not with succinate (100 μ M) for 4 hours. Histogram is a representative of 5 independent experiments. (f) Immunohistochemistry presenting co-localisation of cPLA2 and COX-2 with ER-marker calnexin in RGC-5 cells.

Supplementary Figure 1: Degradation pathways and half-life of GPR91. (a) PCR analysis of HEK293T shows that GPR91 is only expressed when transfected. Normalizing gene is 18S (b) Western blot analysis of GPR91 steady-state expression following inhibition of the proteosomal (1 μ M MG-132) and the lysosomal (Leupeptin; 100 μ g/mL and NH₄Cl; 10mM) degradation pathways. Chemical treatments were carried out for 6 hours. b-actin was used as loading control. (c) Same as in (b) but for GPR91 N4A mutant. (d) Cycloheximide chase experiment in 293T cells expressing either GPR91, GPR91 N4A or GPR91 N164A. Cells were treated with 50 μ M cycloheximide (CHX) and lysed at the indicated time points for Western analysis. Results are normalized to β -actin content and expressed as a percentage of change of time zero, which was set at 100%.

Supplementary Figure 2: Role of ERK1/2 and HIF pathways with succinate. (a) In RGC-5 stimulation with succinate leads to a transient activation of the ERK1/2 pathway. (b) Western blot analysis shows that stimulation with 10 μ M and 100 μ M succinate for 4 hours does not induce the accumulation of HIF-1 α in RGC-5.

Supplementary Figure 3: Succinate does not induce GPR91 relocalization.

Immunohistochemistry of endogenous GPR91 in permeabilised RGC-5 cells treated with 100 μ M succinate for 5 or 10 min. Cell nuclei were stained with DAPI.

References

1. He, W. *et al.* Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors. *Nature* **429**, 188-193 (2004).
2. Liu, C. *et al.* Lactate inhibits lipolysis in fat cells through activation of an orphan G-protein-coupled receptor, GPR81. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 2811-2822 (2009).
3. Cai, T.-Q. *et al.* Role of GPR81 in lactate-mediated reduction of adipose lipolysis. *Biochem Biophys Res Commun* **377**, 987-991 (2008).
4. Londos, C., Cooper, D.M. & Wolff, J. Subclasses of external adenosine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 2551-2554 (1980).
5. Sapielha, P. *et al.* The succinate receptor GPR91 in neurons has a major role in retinal angiogenesis. *Nature medicine* **14**, 1067-1076 (2008).
6. Robben, J.H. *et al.* Localization of the succinate receptor in the distal nephron and its signaling in polarized MDCK cells. *Kidney international* **76**, 1258-1267 (2009).
7. Jr, F.G. *et al.* MINIREVIEW / MINISYNTHESIS G-protein-coupled receptors signalling at the cell nucleus : an emerging paradigm 1. *Cell* **297**, 287-297 (2006).
8. Weitzmann, M.N. NUCLEAR INTERNALISATION AND DNA BINDING ACTIVITIES OF INTERLEUKIN-1 , RECEPTOR AND INTERLEUKIN-1 / RECEPTOR COMPLEXES. *Biochem Biophys Res Commun* **187** (1992).
9. Gobeil, F. *et al.* Modulation of pro-inflammatory gene expression by nuclear lysophosphatidic acid receptor type-1. *J Biol Chem* **278**, 38875-38883 (2003).
10. Faucheux, C., Horton, M.A. & Price, J.S. Nuclear localization of type I parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptors in deer antler osteoclasts: evidence for parathyroid hormone-related protein and receptor activator of NF-kappaB-dependent effects on osteoclast formation in regenerating mammalian bone. *J Bone Miner Res* **17**, 455-464 (2002).

11. Dunaif, A.E., Zimmerman, E.A., Friesen, H.G. & Frantz, A.G. Intracellular localization of prolactin receptor and prolactin in the rat ovary by immunocytochemistry. *Endocrinology* **110**, 1465-1471 (1982).
12. De Mello, W.C. Is an intracellular renin-angiotensin system involved in control of cell communication in heart? *J Cardiovasc Pharmacol* **23**, 640-646 (1994).
13. Marrache, A.M. *et al.* Proinflammatory gene induction by platelet-activating factor mediated via its cognate nuclear receptor. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **169**, 6474-6481 (2002).
14. Zhu, T. *et al.* Intracrine signaling through lipid mediators and their cognate nuclear G-protein-coupled receptors: a paradigm based on PGE2, PAF, and LPA1 receptors This paper is one of a selection of papers published in this Special Issue, entitled The Nucleus: A Cell W. (2011).
15. Tabares, L., Mazzanti, M. & Clapham, D.E. Chloride channels in the nuclear membrane. *J Membr Biol* **123**, 49-54 (1991).
16. Pajor, A.M., Gangula, R. & Yao, X. Cloning and functional characterization of a high-affinity Na(+)/dicarboxylate cotransporter from mouse brain. *Am J Physiol Cell Physiol* **280**, C1215-1223 (2001).
17. Inoue, K. *et al.* Functional features and genomic organization of mouse NaCT, a sodium-coupled transporter for tricarboxylic acid cycle intermediates. *The Biochemical journal* **378**, 949-957 (2004).
18. Emami Riedmaier, A., Nies, A.T., Schaeffeler, E. & Schwab, M. Organic anion transporters and their implications in pharmacotherapy. *Pharmacol Rev* **64**, 421-449 (2012).
19. Terlouw, S.A., Tanriseven, O., Russel, F.G. & Masereeuw, R. Metabolite anion carriers mediate the uptake of the anionic drug fluorescein in renal cortical mitochondria. *J Pharmacol Exp Ther* **292**, 968-973 (2000).
20. Yasui-Furukori, N., Uno, T., Sugawara, K. & Tateishi, T. Different effects of three transporting inhibitors, verapamil, cimetidine, and probenecid, on fexofenadine pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* **77**, 17-23 (2005).
21. Graham, J.M. & Coffey, K.H. Tissue-culture cell fractionation. Fractionation of cellular membranes from 125I/lactoperoxidase-labelled Lettuce cells homogenized by bicarbonate-induced lysis: resolution of membranes by zonal centrifugation and in sucrose and metrizamide gradients. *The Biochemical journal* **182**, 173-180 (1979).
22. Sundstrom, L., Greasley, P.J., Engberg, S., Wallander, M. & Ryberg, E. Succinate receptor GPR91, a G α (i) coupled receptor that increases intracellular calcium concentrations through PLC β . *FEBS Lett* **587**, 2399-2404 (2013).

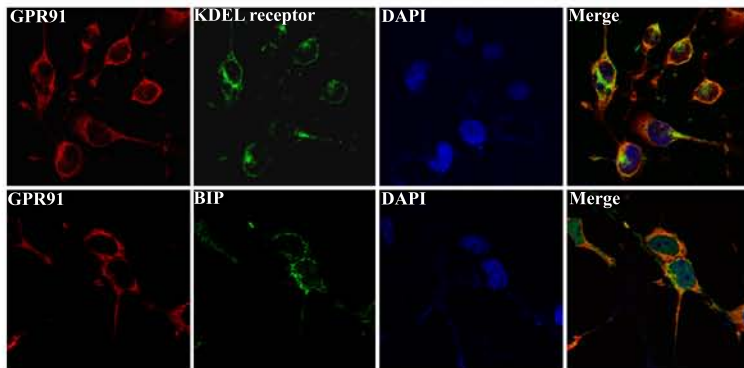
23. Angelotti, T., Daunt, D., Shcherbakova, O.G., Kobilka, B. & Hurt, C.M. Regulation of G-protein coupled receptor traffic by an evolutionary conserved hydrophobic signal. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **11**, 560-578 (2010).
24. Margeta-Mitrovic, M., Jan, Y.N. & Jan, L.Y. A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization. *Neuron* **27**, 97-106 (2000).
25. Pagano, A. *et al.* C-terminal interaction is essential for surface trafficking but not for heteromeric assembly of GABA(b) receptors. *J Neurosci* **21**, 1189-1202 (2001).
26. Gassmann, M. *et al.* The RXR-type endoplasmic reticulum-retention/retrieval signal of GABAB1 requires distant spacing from the membrane to function. *Mol Pharmacol* **68**, 137-144 (2005).
27. Chan, W.Y., Soloviev, M.M., Ciruela, F. & McIlhinney, R.A. Molecular determinants of metabotropic glutamate receptor 1B trafficking. *Mol Cell Neurosci* **17**, 577-588 (2001).
28. Jackson, M.R., Nilsson, T. & Peterson, P.A. Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *The EMBO journal* **9**, 3153-3162 (1990).
29. Peti-Peterdi, J.n. High glucose and renin release: the role of succinate and GPR91. *Kidney international* **78**, 1214-1217 (2010).
30. Medzihradzsky, K.F. Characterization of site-specific N-glycosylation. *Methods Mol Biol* **446**, 293-316 (2008).
31. Bohm, S.K., Grady, E.F. & Bunnett, N.W. Regulatory mechanisms that modulate signalling by G-protein-coupled receptors. *The Biochemical journal* **322 (Pt 1)**, 1-18 (1997).
32. Does, M.R. & Trejo, J. Ubiquitination of G protein-coupled receptors: functional implications and drug discovery. *Mol Pharmacol* **82**, 563-570 (2012).
33. Kim, P.J., Lee, D.Y. & Jeong, H. Centralized modularity of N-linked glycosylation pathways in mammalian cells. *PLoS One* **4**, e7317 (2009).
34. Lenertz, L.Y. *et al.* Mutation of putative N-linked glycosylation sites on the human nucleotide receptor P2X7 reveals a key residue important for receptor function. *Biochemistry* **49**, 4611-4619 (2010).
35. Stenmark, H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nature reviews. Molecular cell biology* **10**, 513-525 (2009).
36. Dong, C. & Wu, G. Regulation of anterograde transport of adrenergic and angiotensin II receptors by Rab2 and Rab6 GTPases. *Cellular signalling* **19**, 2388-2399 (2007).

37. Chen, W., Feng, Y., Chen, D. & Wandinger-Ness, A. Rab11 is required for trans-golgi network-to-plasma membrane transport and a preferential target for GDP dissociation inhibitor. *Mol Biol Cell* **9**, 3241-3257 (1998).
38. Rasmussen, J.G. *et al.* Activation of protease-activated receptor 2 induces VEGF independently of HIF-1. *PLoS One* **7**, e46087 (2012).
39. Lobov, I.B., Brooks, P.C. & Lang, R.A. Angiopoietin-2 displays VEGF-dependent modulation of capillary structure and endothelial cell survival in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 11205-11210 (2002).
40. Sugimachi, K. *et al.* Angiopoietin switching regulates angiogenesis and progression of human hepatocellular carcinoma. *J Clin Pathol* **56**, 854-860 (2003).
41. Papapetropoulos, A. *et al.* Direct actions of angiopoietin-1 on human endothelium: evidence for network stabilization, cell survival, and interaction with other angiogenic growth factors. *Lab Invest* **79**, 213-223 (1999).
42. Kwak, H.J., So, J.N., Lee, S.J., Kim, I. & Koh, G.Y. Angiopoietin-1 is an apoptosis survival factor for endothelial cells. *FEBS Lett* **448**, 249-253 (1999).
43. Holash, J. *et al.* Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* **284**, 1994-1998 (1999).
44. Lauren, J., Gunji, Y. & Alitalo, K. Is angiopoietin-2 necessary for the initiation of tumor angiogenesis? *Am J Pathol* **153**, 1333-1339 (1998).
45. Shirato, K. *et al.* Hypoxic regulation of glycosylation via the N acetylglucosamine cycle. **48**, 20-25 (2011).
46. Chen, J. & Smith, Ü.L.E.H. Retinopathy of prematurity. *Angiogenesis*, 133-140 (2007).
47. Yanni, S.E., Barnett, J.M., Clark, M.L. & Penn, J.S. The role of PGE2 receptor EP4 in pathologic ocular angiogenesis. *Investigative ophthalmology & visual science* **50**, 5479-5486 (2009).
48. Pavicevic, Z., Leslie, C.C. & Malik, K.U. cPLA2 phosphorylation at serine-515 and serine-505 is required for arachidonic acid release in vascular smooth muscle cells. *J Lipid Res* **49**, 724-737 (2008).
49. Wu, G. *et al.* Involvement of COX-2 in VEGF-induced angiogenesis via P38 and JNK pathways in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res* **69**, 512-519 (2006).
50. Herbert, S.P., Odell, A.F., Ponnambalam, S. & Walker, J.H. Activation of cytosolic phospholipase A2- α as a novel mechanism regulating endothelial cell cycle progression and angiogenesis. *J Biol Chem* **284**, 5784-5796 (2009).

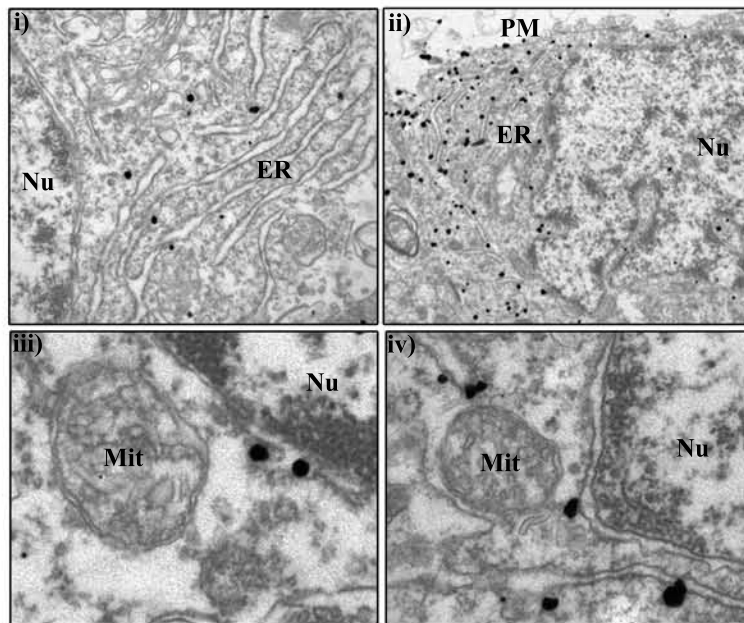
51. Bhattacharya, M. Localization of Functional Prostaglandin E2 Receptors EP3 and EP4 in the Nuclear Envelope. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 15719-15724 (1999).
52. Pages, G. & Pouyssegur, J. Transcriptional regulation of the Vascular Endothelial Growth Factor gene--a concert of activating factors. *Cardiovasc Res* **65**, 564-573 (2005).
53. Asahara, T. *et al.* Tie2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2, modulate VEGF-induced postnatal neovascularization. *Circ Res* **83**, 233-240 (1998).
54. Saito, M., Hamasaki, M. & Shibuya, M. Induction of tube formation by angiopoietin-1 in endothelial cell/fibroblast co-culture is dependent on endogenous VEGF. *Cancer Sci* **94**, 782-790 (2003).
55. Gobeil, F. *et al.* Nitric oxide signaling via nuclearized endothelial nitric-oxide synthase modulates expression of the immediate early genes iNOS and mPGES-1. *J Biol Chem* **281**, 16058-16067 (2006).
56. Ribeiro-da-Silva, A., Priestley, J.V., Cuello, A.C. Pre-embedding ultrastructural immunocytochemistry. *Immunocytochemistry* **II**, 181-227 (1993).
57. Rivera, J.C. *et al.* Microglia and Interleukin-1beta in Ischemic Retinopathy Elicit Microvascular Degeneration Through Neuronal Semaphorin-3A. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **33**, 1881-1891 (2013).
58. Grynkiewicz, G., Poenie, M. & Tsien, R.Y. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* **260**, 3440-3450 (1985).

Figure 1

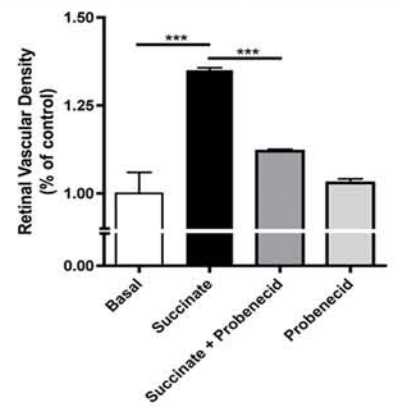
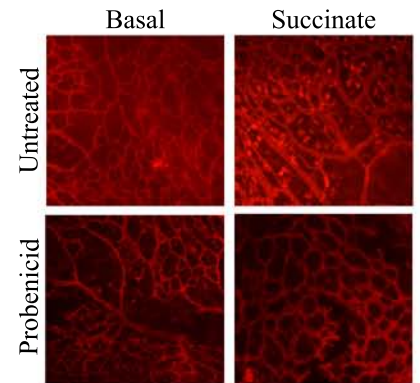
a



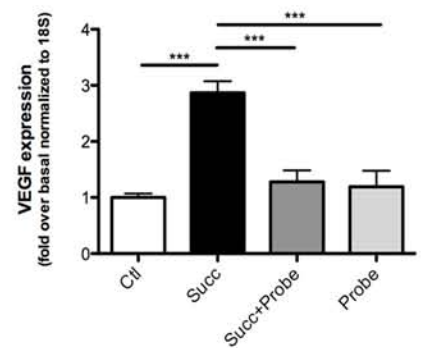
b



c

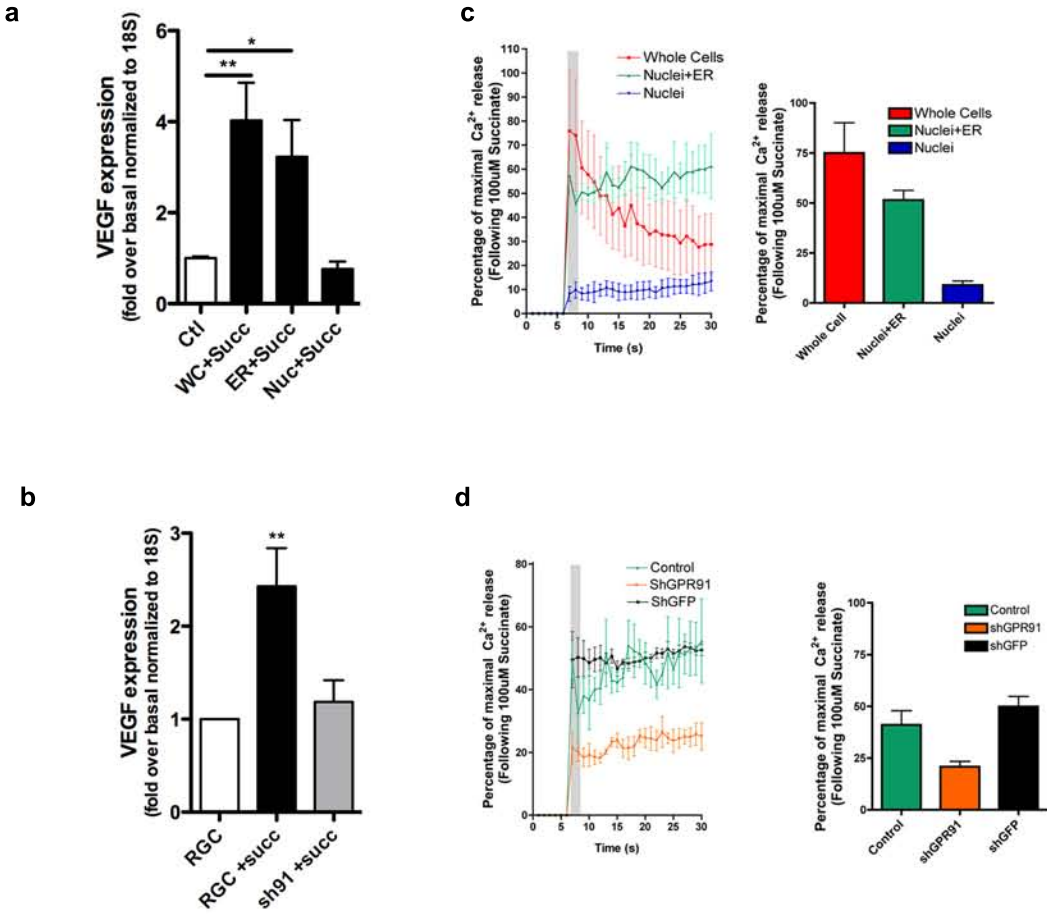


d



Hamel, Sanchez *et al.*

Figure 2



Hamel, Sanchez *et al.*

Figure 3

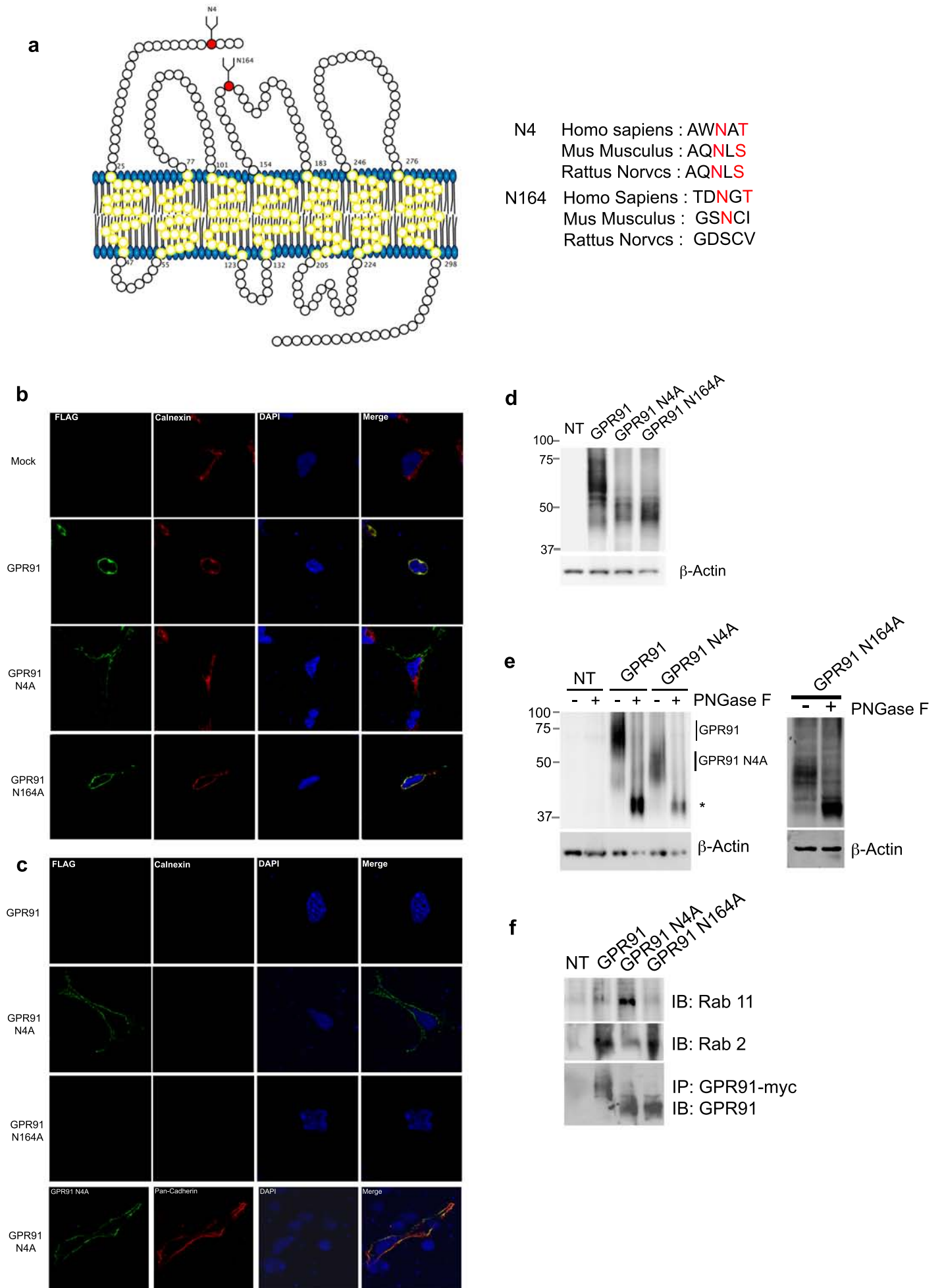


Figure 4

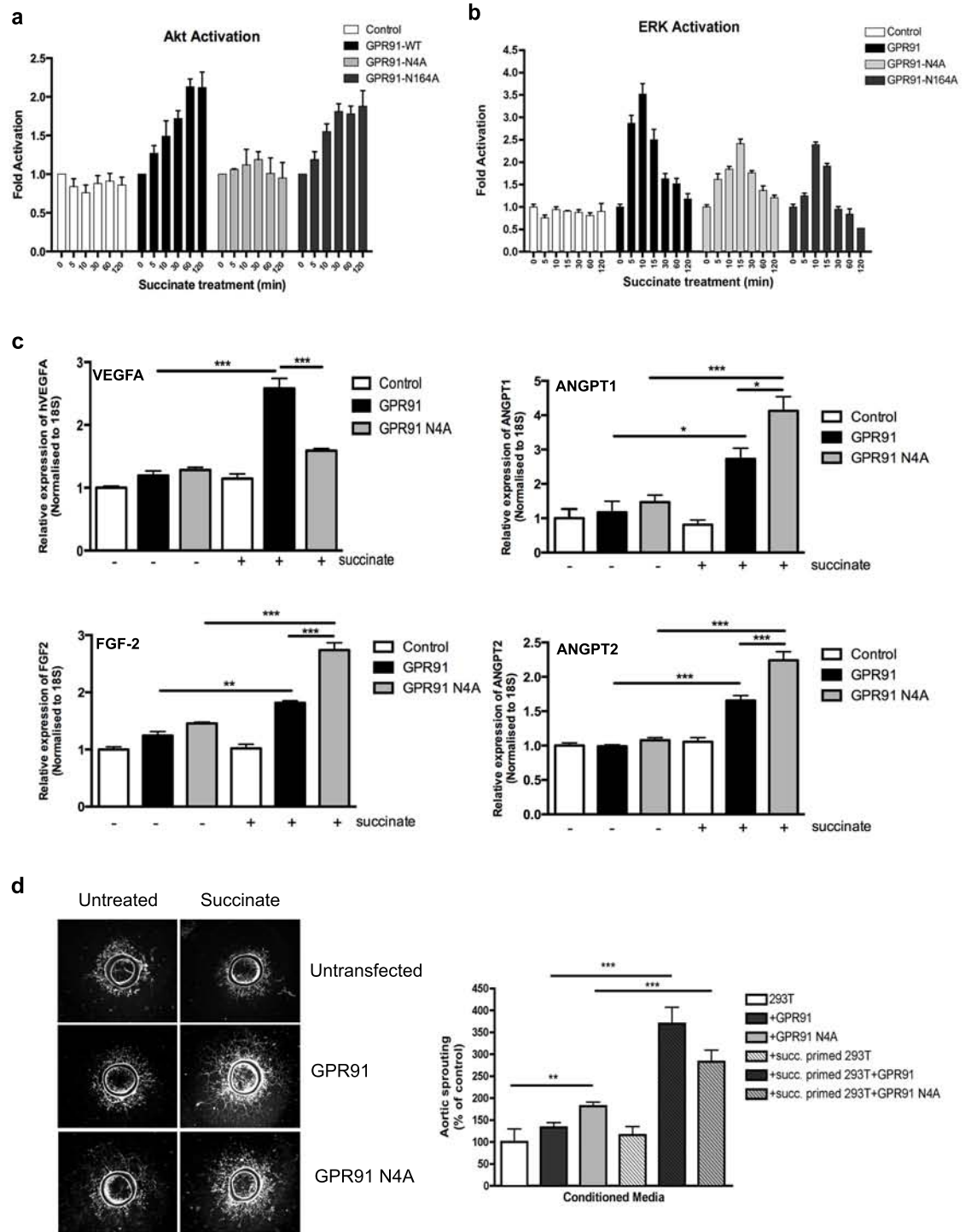


Figure 5

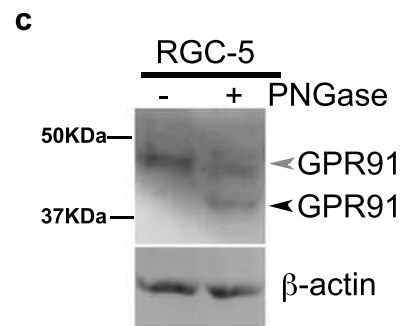
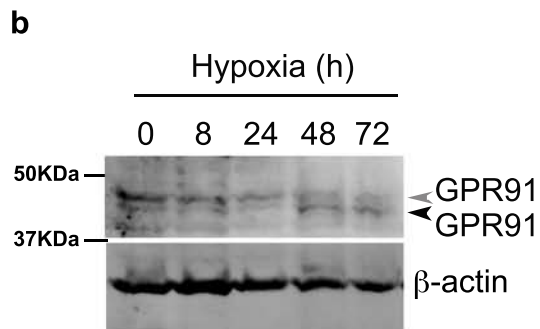
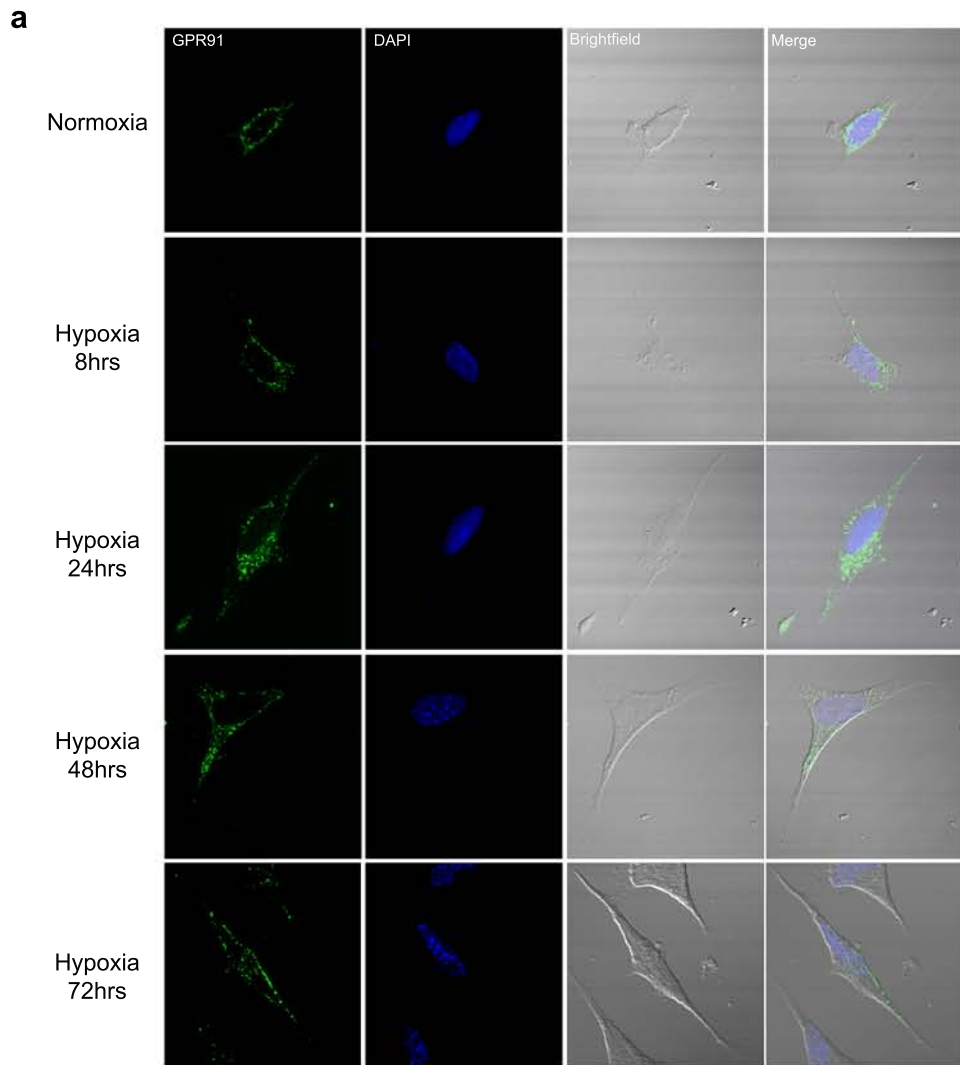
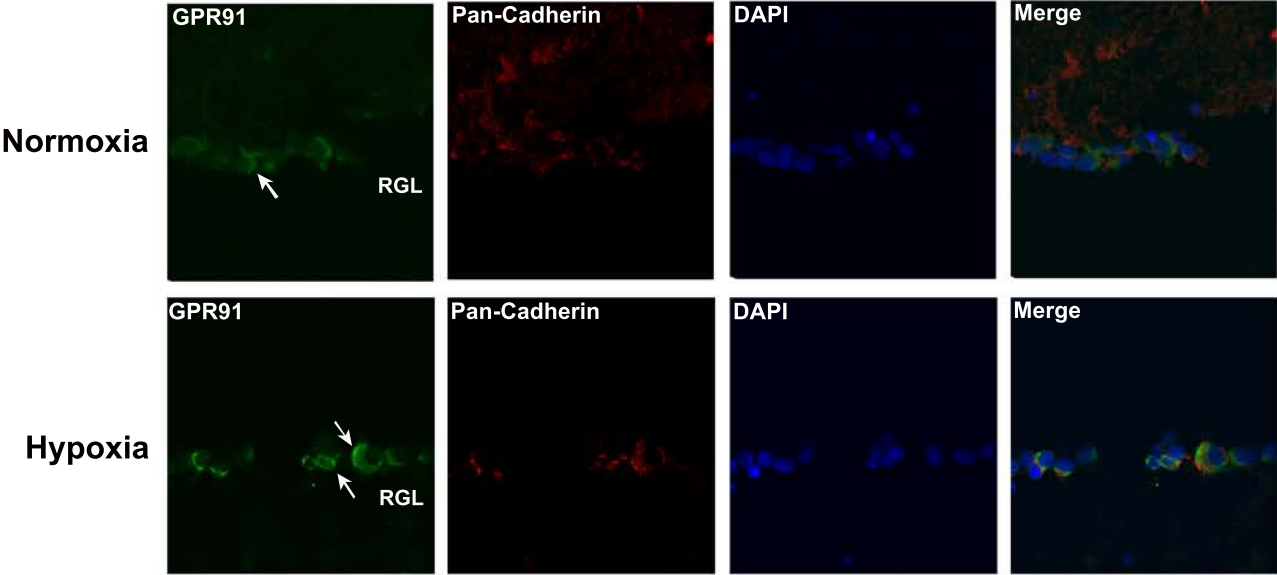


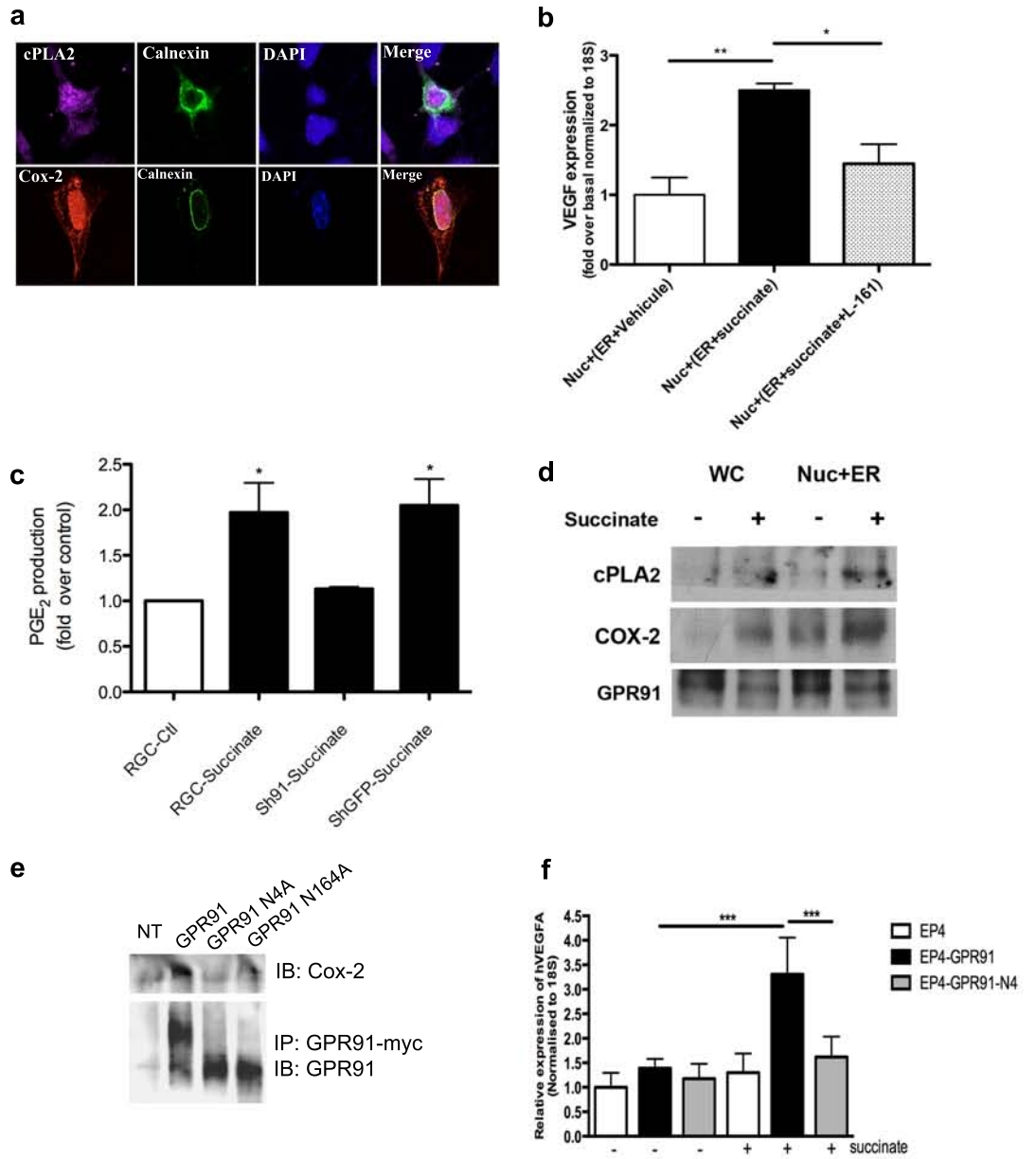
Figure 5

d



Hamel, Sanchez *et al.*

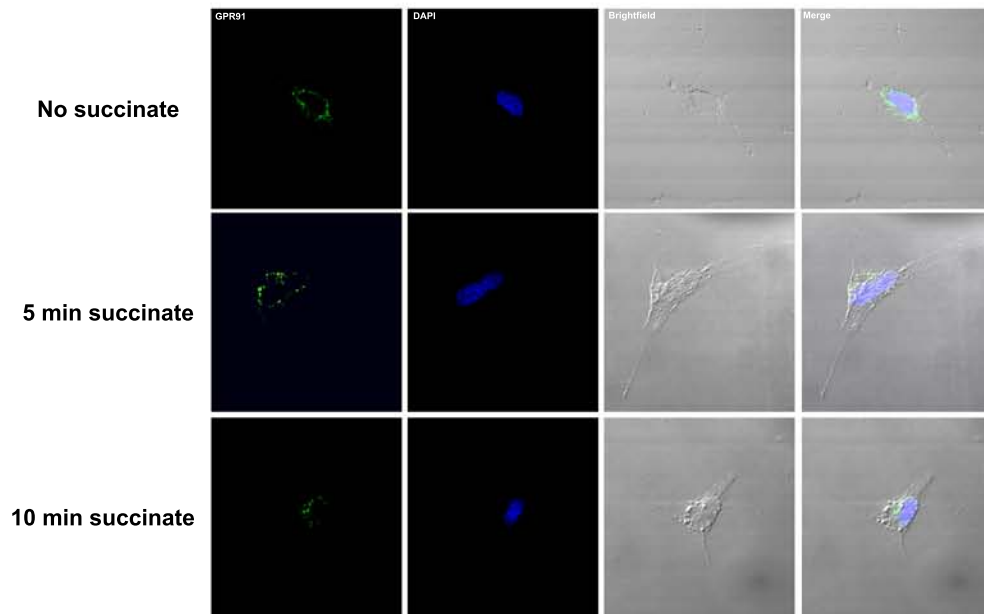
Figure 6



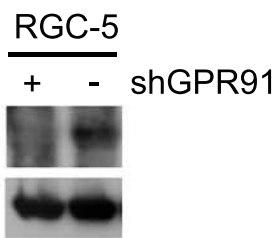
Hamel, Sanchez *et al.*

Supplementary Figure 1

a

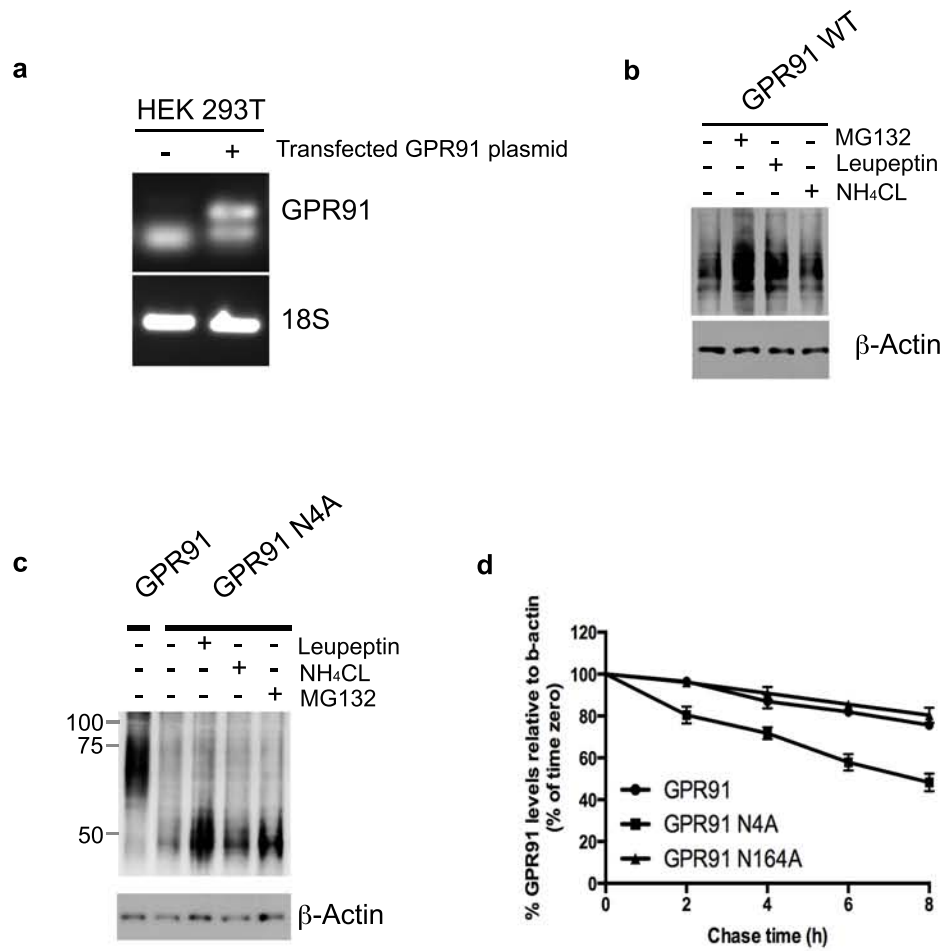


b



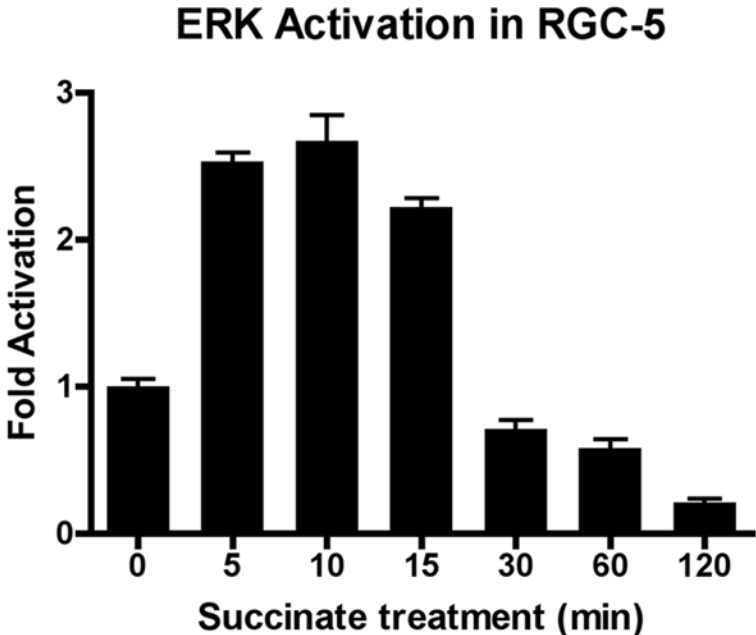
Hamel, Sanchez *et al.*

Supplementary Figure 2



Hamel, Sanchez *et al.*

Supplementary Figure 3



Hamel, Sanchez *et al.*

Discussion

Les RCPG sont essentiels au bon fonctionnement de l'organisme. Participant au contrôle de grands systèmes physiologiques il n'est pas surprenant qu'ils soient la cible de nombreux composés pharmacologiques. Le développement de ces composés a, jusqu'à maintenant, peu tenu compte de la localisation intracellulaire des récepteurs, et ce malgré le nombre croissant d'études démontrant qu'il s'agit d'une caractéristique relativement fréquente (Tableau III). Ces récepteurs pour lesquelles une localisation intracellulaire a été observée sont impliqués dans une diversité de fonctions physiologiques tel que le tonus vasculaire, le fonctionnement du système nerveux ou du système hormonal.

Les rôles du GPR91 commencent seulement à être identifiés. Plusieurs se sont penchés sur les fonctions rénales de ce récepteur et de l'effet hypertenseur qu'il cause suite à la stimulation par le succinate; le ligand endogène ayant été identifié en 2004 (He et al., 2004). D'autres ont démontré son rôle dans la migration des cellules immunitaires dendritiques. Notre laboratoire s'est intéressé aux effets vasculaires du GPR91 et de sa capacité à contrôler le réseau de vaisseaux sanguins dans le système nerveux central.

GPR91: un récepteur au réticulum endoplasmique

Au cours des travaux sur le rôle du GPR91 dans l'angiogenèse rétinienne nous avons suggéré qu'une localisation intracellulaire du récepteur faciliterait la détection de son ligand et l'efficacité de la réponse. Les résultats de microscopie confocale dans notre première étude suggéra d'ailleurs la possibilité d'une telle localisation (Sapieha et al., 2008). On y observe un marquage intracellulaire où l'on distingue une zone sombre sans marquage et qui correspond au noyau. Cette observation a été répétée dans le cortex cérébral où le marquage du GPR91 enrobe celui du NeuN, un facteur de transcription neuronal principalement localisé au

noyau. (Article 1; Figure 1). La difficulté d'interpréter correctement ces données repose sur l'absence de co-marqueurs spécifiques pour une organelle intracellulaire. Ce n'est que dans notre seconde étude que nous avons co-localisé GPR91, endogène et transfecté, avec des marqueurs de réticulum endoplasmique (RE), en utilisant calnexine et Bip (Article 2; Figure 1). Nous avons également observé la présence du GPR91 dans les repliements du RE par microscopie électronique (Article 2; Figure 1). Dans l'ensemble ces données supportent très bien l'idée d'une localisation intracellulaire. Elles pourront certes être renforcées par des expériences de fractionnement cellulaire, mais les données fonctionnelles, en présence d'inhibiteur du transport du succinate, viennent confirmer ces observations.

Il faut noter qu'une publication portant sur le rôle du GPR91 au niveau du rein a rapporté, de façon peu convaincante et sans liens approfondi avec l'étude, que ce récepteur avait une localisation intracellulaire (Robben et al., 2009). Par marquage à l'or colloïdal, les auteurs suggèrent une localisation du GPR91 dans des endosomes intracellulaires (Figure 21). Cette mention n'est supportée que par une figure de microscopie électronique d'une qualité très médiocre et aucune autre mention de cette information n'est fait dans cet article. Aucune autre étude n'a repris ce concept jusqu'à maintenant.

L'une des questions qui demeure entière et pour laquelle nous ne pourrions qu'avoir des hypothèses est la raison pour laquelle l'évolution favorisa la sélection d'un signal de rétention tel qu'observé dans le GPR91. S'il est vrai que la majorité de l'induction du VEGF dépend de la signalisation par un autre récepteur, le EP4, et de la production de PGE₂, la localisation au RE fait conceptuellement beaucoup de sens. Elle favorise l'interaction et la proximité entre le GPR91, la machinerie de synthèse de PGE₂ et le récepteur nucléaire EP4. La synthèse de PGE₂ a également été observée par d'autres qui l'on identifié comme l'une des voies de signalisation du GPR91 (Vargas et al., 2009). L'implication du récepteur EP4 dans l'angiogenèse a d'ailleurs été démontrée dans un modèle oculaire (Yanni et al., 2009) et ses effets bénéfiques dans le traitement des maladies ischémiques ont été présentées dans un brevet récent (US 2010/0267826 A1). Ce récepteur est localisé à la membrane nucléaire (Bhattacharya et al., 1999).

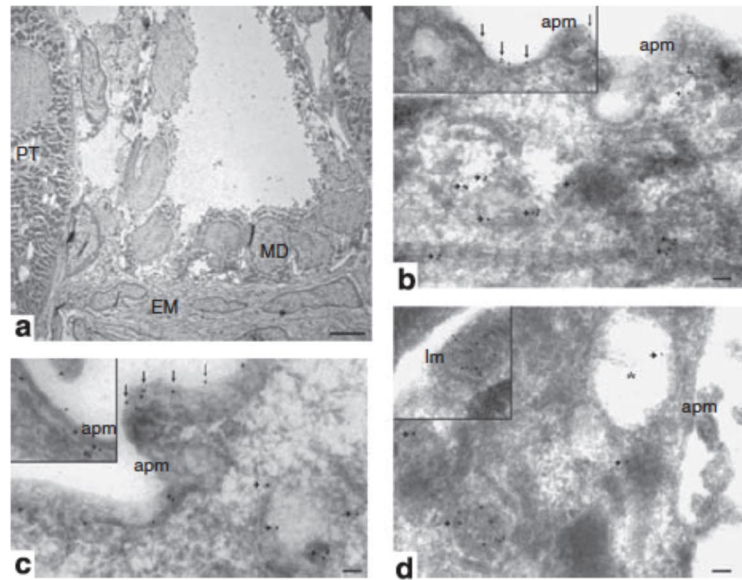


Figure 21. Mention d'une localisation intracellulaire du GPR91. Seule autre mention d'une localisation intracellulaire du GPR91 dans la littérature. Selon les auteurs, les cellules de la macula dans de l'Anse de Henlé expriment un GPR91 intracellulaire (particulière en b) (Tiré de Robben et al., *Kidney International*, 2009)

La localisation favorise également une proximité avec les mitochondries, source du succinate. Cette facilitation géographique permet la détection d'un stress hypoxique au moindre changement métabolique et, selon nous, confère un avantage indéniable.

Importance de la N-glycosylation pour la rétention

Le mode de rétention quant à lui est très novateur. La glycosylation est certainement importante dans le contrôle de la localisation cellulaire. Tel que décrit précédemment, cette modification post-traductionnelle a largement été étudiée dans le contexte de la maturation des protéines en cours de synthèse. Parmi ces travaux, la grande majorité suggère que la glycosylation est essentielle à la migration à la membrane des récepteurs. Malgré cela, la variabilité des signaux de rétention est telle qu'il demeure probable que dans le cas du GPR91 la glycosylation soit centrale à la rétention. Nos résultats démontrent qu'il s'agit bien d'un site de glycosylation. Le site identifié correspond à une séquence consensus de glycosylation NXS/T, la mutation de l'asparagine entraîne une chute du poids moléculaire en comparaison au récepteur de type sauvage. Finalement, cette portion N-terminal des RCPG est bien reconnue comme contenant de tels sites de glycosylation.

La mutation du site de glycosylation N4 affecte incontestablement la localisation cellulaire (Article 2; Figure 3). Certes ces données ont été obtenues dans un système artificiel, mais il serait techniquement très complexe d'effectuer ces mêmes expériences dans les cellules nerveuses exprimant de façons endogènes un GPR91 mutant. Tout de même, ce système exogène permet de comparer les interactions entre le récepteur et des partenaires de signalisation. Dans le cadre de nos travaux, nous avons rapporté la perte d'interaction entre le GPR91 et rab2 ainsi qu'avec COX-2. Rab2 est une petite protéine G responsable du triage cellulaire entre le Golgi et le RE (Dong et al., 2007). Conséquemment, le changement de localisation entraîne la perte d'interaction avec COX-2; une enzyme essentielle à la production de prostaglandine E2. Ces évidences n'écartent pas la possibilité d'interaction entre le GPR91

et d'autres partenaires, certains pouvant être spécifiques aux types cellulaires (Hurt et al., 2000).

Le fait que le site identifié est conservé à travers les espèces pour lesquelles des données concernant la localisation par microscopie ont été collectées constitue une autre caractéristique intéressante. Cette conservation renforce l'importance d'une telle séquence. Une telle conservation a également été observée dans le cas du signal de rétention du récepteur adrénérgique- α_2C (Angelotti et al., 2010). Spécifiquement en relation avec la glycosylation, il est d'autant plus important que les motifs de glycosylation sont sujets à de fortes variations. Helenius considère même cela comme un avantage dans certains cas, car ils procurent une versatilité et un dynamisme (Helenius et al., 2004).

Hypoxie, glycosylation et localisation?

Le rôle de l'hypoxie dans la glycosylation du récepteur est l'un des aspects qui demeure à investiguer. Certes nos données démontrent un changement de localisation du GPR91 ainsi qu'une réduction de la masse moléculaire suite à l'exposition prolongée à l'hypoxie, mais les connaissances actuelles concernant l'effet de l'hypoxie sur les mécanismes de glycosylation demeurent embryonnaires. Ces maigres connaissances vont toutefois dans le sens de notre hypothèse, soit que l'hypoxie entraîne une réduction de l'efficacité de la machinerie glycolytique. Cette réduction d'efficacité est principalement due à une diminution des pools de précurseurs requis pour la synthèse de l'UDP-GlcNAc.

Cette question devra être abordée par immunoprécipitation du récepteur suivie par une détection de la glycosylation par marquage colorimétrique sur gel d'acrylamide ou par spectrométrie de masse.

Effets biologiques d'un mutant

À l'échelle cellulaire, les effets de la mutation du site de glycosylation N4 sont clairs: changement de localisation et réduction de la masse moléculaire. D'un point de vue fonctionnel les modifications observées sont d'autant plus intéressantes. La stimulation d'anneaux aortiques par du milieu de culture conditionné par des cellules HEK293 exprimant un récepteur GPR91 de type sauvage ou mutant, stimulé ou non avec le succinate, induit un profil de croissance complètement différent. Dans le cas des anneaux stimulés par le milieu issu des cellules HEK293 exprimant le récepteur de type sauvage, la croissance peut être considérée de "normale". Les vaisseaux couvrent une superficie supérieure lorsque le milieu conditionné provient de cellules exprimant le type sauvage. À l'inverse, les anneaux stimulés par un milieu de culture provenant de cellules exprimant le récepteur mutant stimulé avec le succinate présentent une certaine désorganisation. Une anarchie dans l'organisation caractérisée par un ratio de branchement très élevé ainsi qu'une faible superficie couverte.

Ces observations coïncident avec les résultats d'expression génique effectués dans les cellules HEK293 transfectées. Dans ces cellules, le mutant N4 induit moins efficacement l'expression de VEGF et plus de ANG1 et d'ANG2 comparativement au type sauvage. Un profil d'expression qui favorise un développement vasculaire restreint (Chen et al., 2012; Felcht et al., 2012).

Un mécanisme de régulation de l'activité du GPR91

En somme, le concept supporté par cet article consiste en un mode de régulation de l'activité du GPR91 en condition d'hypoxie. Dans une situation d'hypoxie à court terme, l'accumulation du succinate entraîne, de sa localisation périnucléaire, l'activation de plusieurs gènes proangiogéniques qui favorise la récupération. À l'inverse, une exposition à long terme entraîne la formation d'un pool de GPR91 à la membrane plasmique. Ce changement de localisation, fort probablement causé par l'absence de glycosylation, induit un changement

dans le profil d'expression des gènes favorisant non plus le développement superficiel, mais une augmentation de la ramification du réseau vasculaire.

Sur la base de cette hypothèse s'ouvrent de nouvelles possibilités pour le développement de composé ciblant le GPR91. Selon la pathologie ciblée, il sera possible de s'attaquer à l'activité du récepteur en tant que tel ou à sa localisation. En utilisant des composées agissant de chaperone il serait théoriquement possible de modifier l'effet du récepteur en changeant sa localisation cellulaire.

Rôle dans l'angiogenèse cérébrale

D'un point de vue physiologique, nos travaux démontrent également le rôle du GPR91 et du succinate dans la revascularisation cérébrale suite à une période d'hypoxie-ischémie (Article 1; Figure 2). Nous concluons, encore une fois, que ce récepteur agit de régulateur maître de l'angiogenèse en condition d'hypoxie.

Nous avons déterminé que le modèle d'hypoxie-ischémie néonatal (Rice-Vannucci) entraîne une augmentation de la concentration du succinate. Cette augmentation est très transitoire, car un retour à la concentration basale est observé moins d'une heure suite au retour à l'air ambiant (Article 1; Figure 1). Ce retour aussi rapide à une concentration normale est probablement facilité par l'apport sanguin continu assuré par le cercle de Willis. L'expression du GPR91 a été observée dans les neurones et astrocytes. C'est deux types cellulaires répondent, à la stimulation par le succinate de façon similaire (Article 1; Figure 4 et Suppl. Figure II).

Du côté de l'angiogenèse nos résultats montrent clairement qu'en l'absence du GPR91 le réseau vasculaire cérébrale n'arrive pas à récupérer aussi rapidement (Article 1; Figure 2). À l'inverse l'injection de succinate antérieurement au modèle diminue considérablement la taille de l'infarctus et donc du volume cérébral perdu (Article 1; Figure 2). Cette perte de masse

cérébrale, bien que nous ne l'ayons pas évaluée, ce traduira certainement par une perte fonctionnelle. Cette réduction du volume de l'infarctus s'explique par l'établissement, entre l'injection et la période d'ischémie, d'un surplus de vasculature permet de maintenir un apport sanguin suffisant dans une plus grande région du cerveau malgré la ligation. Ces effets angiogéniques sont également observés *ex vivo* dans des essais d'explants corticaux stimulés avec le succinate (Article 1; Figure 3). Chez l'humain, le rétablissement rapide d'un apport vasculaire adéquat est bénéfique et est corrélé avec des meilleures chances de survie (Krupinski et al., 1994; Ergul et al., 2012).

Ce rôle angiogénique dépend de l'expression de facteurs de croissance ayant des effets angiogéniques tels que le VEGF, Ang1/2, l'IL-1 β et l'IL-6. Si le rôle de VEGF et des angiopoïétines dans l'angiogenèse ont été décrits précédemment, les effets d'IL-1 β et d'IL-6 n'ont pas été abordés spécifiquement. L'IL-1 β constitue un médiateur central de la réponse inflammatoire (Dinarello, 1996; Dinarello, 2009). Il influence l'expression de la cyclooxygénase de type 2, de la phospholipase A, de la synthèse d'oxyde nitrique inductible ainsi que l'expression de molécules d'adhésion. Ces signaux facilitent la migration et l'infiltration de cellules immunocompétentes qui induisent à leur tour de l'inflammation. IL-1 β est également impliqué dans le remodelage vasculaire. Il est à la fois neurotoxique et facilite la production de facteurs de proangiogéniques. Il peut également agir directement sur les cellules endothéliales. Notre laboratoire a d'ailleurs démontré les avantages d'employer un antagoniste peptidique de l'IL-1 β pour le traitement des rétinopathies prolifératives (Rivera et al., 2013).

Au cours du développement, le profil d'expression de VEGF est suivi par celui d'IL-6 qui influence la prolifération des cellules endothéliales (Fee et al., 2000). D'ailleurs, mettre l'expression de l'IL-6 sous le contrôle du promoteur de la protéine acide des fibres gliales (GFAP) cause une hypervascularisation dans le système nerveux central (Campbell et al., 1993). Ainsi, que l'expression de ces gènes à caractère inflammatoire soit régulée par le GPR91 n'est pas surprenant. Leur contribution dans l'angiogenèse est suffisamment connue pour qu'ils soient également influencés par l'accumulation de succinate.

L'expression de ces facteurs augmente en condition d'hypoxie ainsi que suite à l'injection intracérébroventriculaire de succinate dans les souris de type sauvage. Dans les souris n'exprimant pas le GPR91, l'expression est fortement affectée (Article 1; Figure 4). Ceci souligne encore l'importance du récepteur dans la médiation des effets du succinate et consolide l'idée qu'il est au centre d'un processus complexe. Par analogie, lors de nos travaux portant sur l'angiogenèse rétinienne la réduction de l'expression du GPR91 par un ARN interférant démontra un effet similaire sur l'expression des facteurs proangiogéniques VEGF et Ang1/2.

La dernière portion de notre étude démontre le rôle de la production de PGE₂ et de l'activation du EP4 dans la transmission du signal. *In vivo*, l'injection de succinate induit la production de PGE₂ (Article 1; Figure 5). Parallèlement, l'induction de VEGF et l'augmentation de densité vasculaire suite à l'injection intracérébroventriculaire de succinate sont grandement affectées par la co-injection d'un antagoniste du EP4, le L-161982 (Article 1; Figure 5). Ces expériences ont été reprises *in vitro* où la spécificité de ce couplage est démontrée par l'emploi de l'antagoniste multispécifique d'EP1-2-3 AH6809 qui est sans effet. Un phénomène de spécificité similaire a été observé dans un système de métastase du cancer du sein où seul le EP4 influence significativement la production de VEGF (Xin et al., 2012). Ces expériences *in vitro* démontrent également l'effet du L-161982 et de l'indométhacine. En parallèle, il est connu que l'expression du récepteur EP4 augmente de façon significative lors d'ischémie, renforçant son rôle dans la pathologie (Liang et al., 2011). L'impact de l'axe PGE₂-EP4 sur l'angiogenèse rétinienne a d'ailleurs été démontré antérieurement (Yanni et al., 2009; Yanni et al., 2010; Zhang et al., 2011; Xin et al., 2012).

De façon intéressante, une autre voie de signalisation activée par GPR91, ERK1/2, n'est pas impliquée dans l'induction du VEGF suite à la stimulation par le succinate. L'ajout de PD98059 n'ayant aucun effet inhibiteur (Article 1; Figure 5). Ce résultat est particulièrement intéressant, car plusieurs travaux ont démontré la capacité des voies des kinases d'influencer l'expression du VEGF (Pages et al., 2005; Liu et al., 2013). Cela renforce l'idée que dans ce cas particulier la contribution de la signalisation par les kinases est faible par rapport au PGE₂.

De plus, si l'oxygène influence l'angiogenèse, principalement via HIF, nous démontrons l'effet d'un intermédiaire du cycle de Krebs dans la réponse suite à une hypoxie-ischémie cérébrale. Sous cet aspect, le succinate est d'ailleurs un régulateur des prolyl-4-hydroxylases (PHD) qui régulent HIF. Cet effet inhibiteur sur le PHD requiert des concentrations de l'ordre du milimolaire alors que nous utilisons 100 μ M. Néanmoins, afin de s'assurer que les effets observés à 100 μ M ne dépendent pas de HIF, nous avons employé l'inhibiteur de HIF FM19G11 et noté qu'il est sans effet (Article 1; Figure 5). Ces résultats suggèrent que le couple GPR91/succinate est responsable de détecter de plus faible situation d'hypoxie alors que le système du HIF serait enclenché en cas d'hypoxie plus sévère.

Une cible valable pour le développement de médicament?

La famille des RCPG contribua de façon importante au développement du médicament en général. L'expertise entourant cette famille de récepteur croît sans cesse et nombre de nouvelles méthodes permettant de confirmer la spécificité des composés apparaît. Parmi celles-ci, citons l'exemple d'une plateforme permettant de déterminer les récepteurs activés par un composé donnée. Ces essais reposent sur la création d'une librairie permettant l'expression de tous les RCPG non-olfactif (Allen et al., 2011).

La question de développer des agents pharmacologiques ciblant le GPR91 est centrale. D'une part, les connaissances sur les fonctions de ce récepteur sont encore élémentaires. Autre ses effets sur la pression artérielle, la migration de cellules immunitaires et nos travaux sur l'angiogenèse peu d'études sont encore disponible. Quand est-il du foie et du pancréas qui expriment de façon massive le GPR91? Si l'on tient compte uniquement de nos travaux sur le système nerveux central il serait effectivement souhaitable de développer un antagoniste pour le traitement de l'angiogenèse pathologique rétinienne et un agoniste pour favoriser la récupération suite à une ischémie cérébrale. Un antagoniste a d'ailleurs été produit pour le variant humain de GPR91 (Bhuniya et al., 2011). Le groupe ayant mis au point ce composé

démontra son effet inhibiteur sur la pression artérielle lors d'une injection de succinate. Bien que plusieurs brevets aient protégé des méthodes de développement de composés pouvant s'appliquer au GPR91, aucun autre résultat scientifique n'a été publié.

Perspectives

Au cours des dernières années, nous avons démontré l'importance du GPR91 et du succinate dans le contrôle de l'expression de gènes impliqués dans l'angiogenèse. D'abord dans la rétine puis dans le cerveau, ces effets reposent sur la capacité du récepteur à réguler l'expression de plusieurs facteurs et c'est pourquoi nous avons utilisé le terme régulateur maître ("*master regulator*") à plusieurs reprises.

Sur l'aspect du contrôle des gènes, il aurait été avantageux d'utiliser, en tout début de projet, une approche par puce à ARN qui aurait permis de déterminer l'ensemble des gènes qui sont induits *in vivo* suite à l'injection de succinate. Parallèlement, cette méthode aurait pu servir à déterminer les gènes sous-régulés dans les souris GPR91^{-/-}. Nous aurions alors eu l'opportunité d'étudier d'autres processus impliqués dans le système nerveux central.

Du point de vue de la localisation, il est essentiel de voir l'impact d'un modèle d'hypoxie, préférablement dans la rétine, sur la localisation intracellulaire du GPR91. Selon nos résultats *in vitro*, l'exposition à quelques jours d'hypoxie devrait permettre d'observer un changement de distribution en faveur de la membrane plasmique. Le modèle de rétinopathie induit par l'oxygène est plus favorable à cette expérience, car la période d'hypoxie dure aussi longtemps que le processus de revascularisation n'est pas complété.

Dans la même veine, l'injection intraoculaire dans les souris GPR91^{-/-} de lentivirus codant pour les constructions du GPR91 permettra de reproduire *in vivo* l'expérience sur les anneaux aortiques. Elle confirmera l'effet du changement de la localisation sur l'organisation des vaisseaux rétiniens ainsi que le profil d'expression génique.

Conclusion

Ensemble ces deux articles pavent la voie à un champ d'étude visant à déterminer le rôle des modifications post-traductionnelles reflétant un état métabolique, sur la fonction d'un RCPG et, de ce fait, son rôle physiologique. En effet, il ne suffit plus de comprendre comment et quand les RCPG interagissent avec leurs partenaires, mais il faut maintenant déterminer la localisation de ces interactions.

Dans le cas du GPR91, les effets proangiogéniques semblent dépendre de la localisation au réticulum endoplasmique; une localisation qui permet l'interaction avec, notamment, la machinerie de synthèse de PGE₂ qui permet l'induction du VEGF.

L'importance biologique de cette localisation est diverse, mais soulignons les points suivants:

- 1- Couplage différent selon la localisation (effet sur la signalisation en aval et l'expression génique)
- 2- Accès aux ligands est affecté. La localisation peut favoriser un ligand parmi d'autres
- 3- Permet d'établir une liste de site d'importance dont des mutations ou des polymorphismes peuvent influencer les fonctions biologiques
- 4- Modifie les paramètres de criblage pour l'identification de nouvelles molécules thérapeutiques.

En conclusion, nos travaux démontrent le rôle du GPR91 dans la revascularisation post hypoxie-ischémie cérébral ainsi que le rôle de la localisation intracellulaire dans cette réponse (Figure 22).

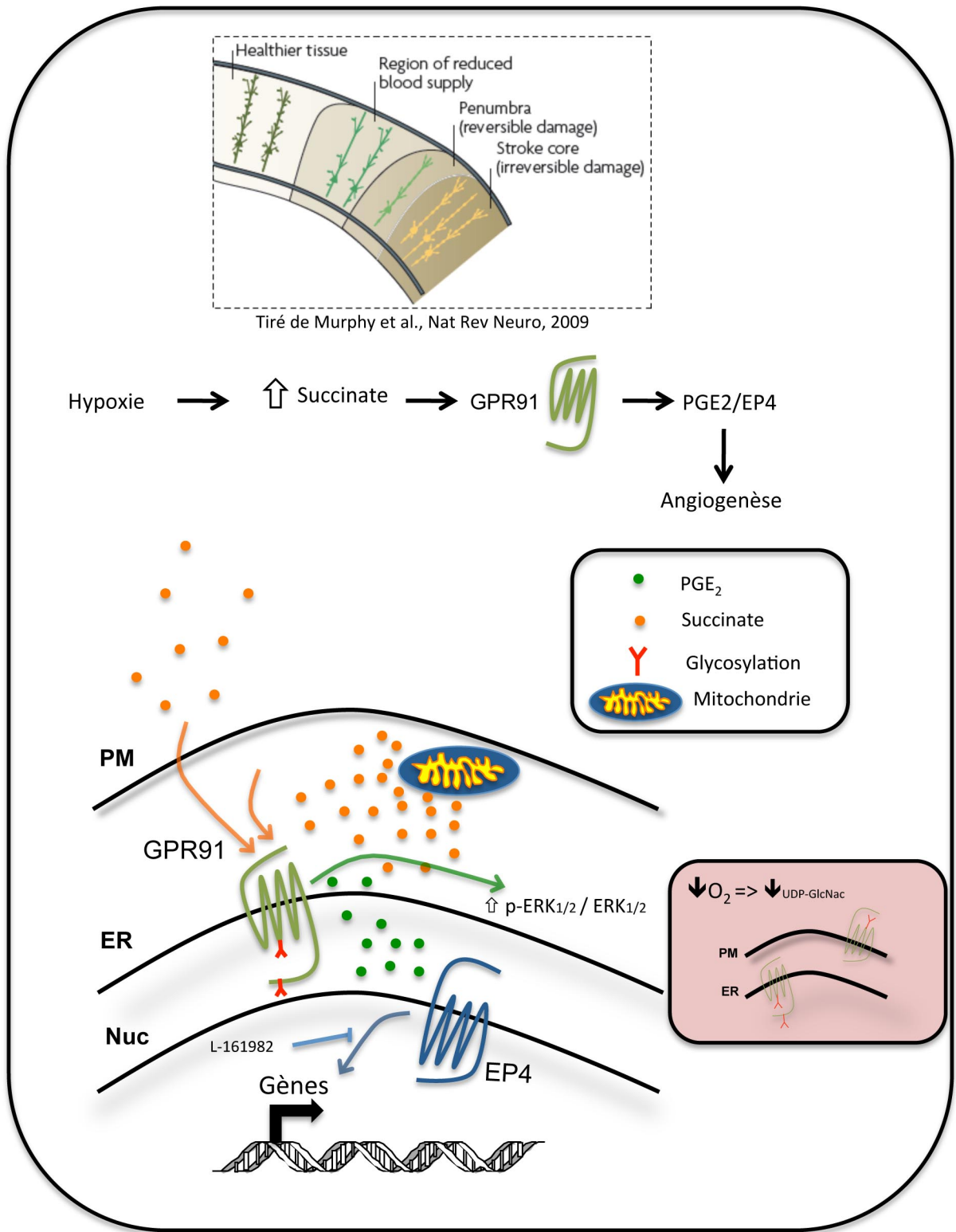


Figure 22. Conclusion. D'une part, nos travaux démontrent le rôle du GPR91 et du succinate dans la revascularisation cérébrale. Cet effet est notamment médié par la sécrétion de facteurs de croissances. D'autre part, nous avons montré que cette fonction de régulateur de l'angiogenèse repose largement sur le récepteur intracellulaire et la production de PGE2 ainsi que l'activation du EP4. Finalement nous avons montré que l'hypoxie cellulaire régule la localisation du récepteur en modifiant l'état de glycosylation.

Références des figures

(Adair et al., 2010), (Hogan et al., 2002), (Carmeliet et al., 2000), (Kanehisa et al., 2004), (Trollmann et al., 2009), (Ke et al., 2006), (Hoyer et al., 1986), (Folbergrová et al., 1974), (Shibuya, 2013), (Miura et al., 2012), (Ferrara et al., 2003), (Claesson-Welsh et al., 2013), (Fagian et al., 2013), (Singh et al., 2011), (Sehgal, 2012), (Bockaert et al., 1999), (Lodish, 2000), (Palczewski et al., 2000), (Offermanns, 2003), (Pouyssegur, 2000), (Vazquez-Tello et al., 2004), (Boivin et al., 2008), (Albert, 2002), (Goddard et al., 2012)

Tableau III

(Robertson et al., 1971; Re et al., 1983; Re et al., 1984; Omary et al., 1987; Chabot et al., 1988; Cavanagh et al., 1989; Booz et al., 1992; Hoche et al., 1992; Belcheva et al., 1993; Buu et al., 1993; Eggena et al., 1993; Lind et al., 1993; Lind et al., 1995; Erdmann et al., 1996; Bkaily, 1997; Bhattacharya et al., 1998; De Mello, 1998; Lu et al., 1998; Ventura et al., 1998; Bhattacharya et al., 1999; Haller et al., 1999; Bkaily et al., 2000; Watson et al., 2000; Watson et al., 2000; Miguel et al., 2001; Faucheux et al., 2002; Gobeil et al., 2002; Marrache et al., 2002; Shibuta et al., 2002; Bkaily et al., 2003; Gobeil et al., 2003; Jacques et al., 2003; Jacques et al., 2003; O'Malley et al., 2003; Cook et al., 2004; Lee et al., 2004; Spano et al., 2004; Jacques et al., 2005; Nielsen et al., 2005; Boer et al., 2006; Boivin et al., 2006; Cook et al., 2006; Gobeil et al., 2006; Gobeil et al., 2006; Jacques et al., 2006; Lanoix et al., 2006; Pickard et al., 2006; Vadakkadath Meethal et al., 2006; Waters et al., 2006; Zhu et al., 2006; Doufexis et al., 2007; Huang et al., 2007; Leung et al., 2007)

Bibliographie

- Adair, T. H. (2005). "Growth regulation of the vascular system: an emerging role for adenosine." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **289**(2): R283-R296.
- Adair, T. H. and J. Montani (2010). *Angiogenesis*. San Rafael (CA), Morgan & Claypool Life Sciences.
- Adelson, P. D., S. R. Wisniewski, J. Beca, S. D. Brown, M. Bell, J. P. Muizelaar, P. Okada, S. R. Beers, G. K. Balasubramani and D. Hirtz (2013). "Comparison of hypothermia and normothermia after severe traumatic brain injury in children (Cool Kids): a phase 3, randomised controlled trial." *Lancet Neurol* **12**(6): 546-553.
- Albert, B. (2002). *Molecular Biology of the Cell*.
- Allen, J. A. and B. L. Roth (2011). "Strategies to discover unexpected targets for drugs active at G protein-coupled receptors." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **51**: 117-144.
- Angelotti, T., D. Daunt, O. G. Shcherbakova, B. Kobilka and C. M. Hurt (2010). "Regulation of G-protein coupled receptor traffic by an evolutionary conserved hydrophobic signal." *Traffic* **11**(4): 560-578.
- Apweiler, R., H. Hermjakob and N. Sharon (1999). "On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database." *Biochim Biophys Acta* **1473**(1): 4-8.
- Arany, Z., S.-Y. Foo, Y. Ma, J. L. Ruas, A. Bommi-Reddy, G. Girnun, M. Cooper, D. Laznik, J. Chinsomboon, S. M. Rangwala, K. H. Baek, A. Rosenzweig and B. M. Spiegelman (2008). "HIF-independent regulation of VEGF and angiogenesis by the transcriptional coactivator PGC-1 α ." *Nature* **451**(7181): 1008-1012.
- Ariza, A. C., P. M. Deen and J. H. Robben (2012). "The succinate receptor as a novel therapeutic target for oxidative and metabolic stress-related conditions." *Front Endocrinol (Lausanne)* **3**: 22.
- Bacic, M., N. A. Edwards and M. J. Merrill (1995). "Differential expression of vascular endothelial growth factor (vascular permeability factor) forms in rat tissues." *Growth Factors* **12**(1): 11-15.
- Belcheva, M., J. Barg, J. Rowinski, W. G. Clark, C. A. Gloeckner, A. Ho, X. M. Gao, D. M. Chuang and C. Coscia (1993). "Novel opioid binding sites associated with nuclei of NG108-15 neurohybrid cells." *J Neurosci* **13**(1): 104-114.
- Bergstedt, K., B. R. Hu and T. Wieloch (1993). "Postischaemic changes in protein synthesis in the rat brain: effects of hypothermia." *Exp Brain Res* **95**(1): 91-99.
- Bermak, J. C., M. Li, C. Bullock and Q. Y. Zhou (2001). "Regulation of transport of the dopamine D1 receptor by a new membrane-associated ER protein." *Nat Cell Biol* **3**(5): 492-498.
- Berthet, C., H. Lei, J. Thevenet, R. Gruetter, P. J. Magistretti and L. Hirt (2009). "Neuroprotective role of lactate after cerebral ischemia." *J Cereb Blood Flow Metab* **29**(11): 1780-1789.
- Bhattacharya, M., K. Peri, A. Ribeiro-da-Silva, G. Almazan, H. Shichi, X. Hou, D. R. Varma and S. Chemtob (1999). "Localization of functional prostaglandin E2 receptors EP3 and EP4 in the nuclear envelope." *J Biol Chem* **274**(22): 15719-15724.

- Bhattacharya, M., K. G. Peri, G. Almazan, A. Ribeiro-da-Silva, H. Shichi, Y. Durocher, M. Abramovitz, X. Hou, D. R. Varma and S. Chemtob (1998). "Nuclear localization of prostaglandin E2 receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(26): 15792-15797.
- Bhuniya, D., D. Umrani, B. Dave, D. Salunke, G. Kukreja, J. Gundu, M. Naykodi, N. S. Shaikh, P. Shitole, S. Kurhade, S. De, S. Majumdar, S. B. Reddy, S. Tambe, Y. Shejul, A. Chugh, V. P. Palle, K. A. Mookhtiar, D. Cully, J. Vacca, P. K. Chakravarty, R. P. Nargund, S. D. Wright, M. P. Graziano, S. B. Singh, S. Roy and T. Q. Cai (2011). "Discovery of a potent and selective small molecule hGPR91 antagonist." *Bioorg Med Chem Lett* **21**(12): 3596-3602.
- Bkaily, G., L. Avedanian, J. Al-Khoury, L. Ahmarani, C. Perreault and D. Jacques (2012). "Receptors and ionic transporters in nuclear membranes: new targets for therapeutical pharmacological interventions." *Can J Physiol Pharmacol* **90**(8): 953-965.
- Bkaily, G., S. Choufani, G. Hassan, N. El-Bizri, D. Jacques and P. D'Orléans-Juste (2000). "Presence of functional endothelin-1 receptors in nuclear membranes of human aortic vascular smooth muscle cells." *J Cardiovasc Pharmacol* **36**(5 Suppl 1): S414-417.
- Bkaily, G., D'Orléans-Juste, P., Pothier, P., Calixto, J. B. and Yunes, R (1997). "Nuclear membrane receptors and channels; potential therapeutical targets for drug action." *Drug Dev. Res.* **42**: 211-222.
- Bkaily, G., S. Sleiman, J. Stephan, C. Asselin, S. Choufani, M. Kamal, D. Jacques, F. Gobeil and P. D'Orléans-Juste (2003). "Angiotensin II AT1 receptor internalization, translocation and de novo synthesis modulate cytosolic and nuclear calcium in human vascular smooth muscle cells." *Can J Physiol Pharmacol* **81**(3): 274-287.
- Bockaert, J. and J. P. Pin (1999). "Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success." *EMBO J* **18**(7): 1723-1729.
- Boer, P. A. and J. A. Gontijo (2006). "Nuclear localization of SP, CGRP, and NK1R in a subpopulation of dorsal root ganglia subpopulation cells in rats." *Cell Mol Neurobiol* **26**(2): 191-207.
- Boivin, B., C. Lavoie, G. Vaniotis, A. Baragli, L. R. Villeneuve, N. Ethier, P. Trieu, B. G. Allen and T. E. Hebert (2006). "Functional beta-adrenergic receptor signalling on nuclear membranes in adult rat and mouse ventricular cardiomyocytes." *Cardiovasc Res* **71**(1): 69-78.
- Boivin, B., G. Vaniotis, B. G. Allen and T. E. Hebert (2008). "G protein-coupled receptors in and on the cell nucleus: a new signaling paradigm?" *J Recept Signal Transduct Res* **28**(1-2): 15-28.
- Boivin, B., L. R. Villeneuve, N. Farhat, D. Chevalier and B. G. Allen (2005). "Sub-cellular distribution of endothelin signaling pathway components in ventricular myocytes and heart: lack of preformed caveolar signalosomes." *J Mol Cell Cardiol* **38**(4): 665-676.
- Booz, G. W., K. M. Conrad, A. L. Hess, H. A. Singer and K. M. Baker (1992). "Angiotensin-II-binding sites on hepatocyte nuclei." *Endocrinology* **130**(6): 3641-3649.
- Brault, S., F. Gobeil, Jr., A. Fortier, J. C. Honore, J. S. Joyal, P. S. Sapiéha, A. Kooli, E. Martin, P. Hardy, A. Ribeiro-da-Silva, K. Peri, P. Lachapelle, D. Varma and S. Chemtob (2007). "Lysophosphatidic acid induces endothelial cell death by modulating the redox environment." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **292**(3): R1174-1183.

- Brault, S., A. K. Martinez-Bermudez, A. M. Marrache, F. Gobeil, Jr., X. Hou, M. Beauchamp, C. Quiniou, G. Almazan, C. Lachance, J. Roberts, 2nd, D. R. Varma and S. Chemtob (2003). "Selective neuromicrovascular endothelial cell death by 8-Iso-prostaglandin F2alpha: possible role in ischemic brain injury." *Stroke* **34**(3): 776-782.
- Brum, P. C., C. M. Hurt, O. G. Shcherbakova, B. Kobilka and T. Angelotti (2006). "Differential targeting and function of alpha2A and alpha2C adrenergic receptor subtypes in cultured sympathetic neurons." *Neuropharmacology* **51**(3): 397-413.
- Burns, P. A. and D. J. Wilson (2003). "Angiogenesis mediated by metabolites is dependent on vascular endothelial growth factor (VEGF)." *Angiogenesis* **6**(1): 73-77.
- Burnstock, G. (2004). "Hypoxia, endothelium and purine." *Drug Development Research* **28**(3): 301-305.
- Burnstock, G. (2006). "Historical review: ATP as a neurotransmitter." *Trends Pharmacol Sci* **27**(3): 166-176.
- Buu, N. T., R. Hui and P. Falardeau (1993). "Norepinephrine in neonatal rat ventricular myocytes: association with the cell nucleus and binding to nuclear alpha 1- and beta-adrenergic receptors." *J Mol Cell Cardiol* **25**(9): 1037-1046.
- Calebiro, D., V. O. Nikolaev, L. Persani and M. J. Lohse (2010). "Signaling by internalized G-protein-coupled receptors." *Trends Pharmacol Sci* **31**(5): 221-228.
- Campbell, I. L., C. R. Abraham, E. Masliah, P. Kemper, J. D. Inglis, M. B. Oldstone and L. Mucke (1993). "Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(21): 10061-10065.
- Carmeliet, P. and D. Collen (2000). "Transgenic mouse models in angiogenesis and cardiovascular disease." *J Pathol* **190**(3): 387-405.
- Carmeliet, P., V. Ferreira, G. Breier, S. Pollefeyt, L. Kieckens, M. Gertsenstein, M. Fahrig, A. Vandenhoek, K. Harpal, C. Eberhardt, C. Declercq, J. Pawling, L. Moons, D. Collen, W. Risau and A. Nagy (1996). "Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele." *Nature* **380**(6573): 435-439.
- Caron, M. G. and R. J. Lefkowitz (1976). "Solubilization and characterization of the beta-adrenergic receptor binding sites of frog erythrocytes." *J Biol Chem* **251**(8): 2374-2384.
- Cavanagh, H. D. and A. M. Colley (1989). "The molecular basis of neurotrophic keratitis." *Acta Ophthalmol Suppl* **192**: 115-134.
- Chabot, J. G., A. Enjalbert, G. Pelletier, P. M. Dubois and G. Morel (1988). "Evidence for a direct action of neuropeptide Y in the rat pituitary gland." *Neuroendocrinology* **47**(6): 511-517.
- Chen, J. X., H. Zeng, J. Reese, J. L. Aschner and B. Meyrick (2012). "Overexpression of angiopoietin-2 impairs myocardial angiogenesis and exacerbates cardiac fibrosis in the diabetic db/db mouse model." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **302**(4): H1003-1012.
- Cherezov, V., D. M. Rosenbaum, M. A. Hanson, S. G. Rasmussen, F. S. Thian, T. S. Kobilka, H. J. Choi, P. Kuhn, W. I. Weis, B. K. Kobilka and R. C. Stevens (2007). "High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor." *Science* **318**(5854): 1258-1265.
- Claesson-Welsh, L. and M. Welsh (2013). "VEGFA and tumour angiogenesis." *J Intern Med* **273**(2): 114-127.

- Cnossen, M. H., C. H. van Ommen and I. M. Appel (2009). "Etiology and treatment of perinatal stroke; a role for prothrombotic coagulation factors?" *Semin Fetal Neonatal Med* **14**(5): 311-317.
- Conn, P. M., P. E. Knollman, S. P. Brothers and J. A. Janovick (2006). "Protein folding as posttranslational regulation: evolution of a mechanism for controlled plasma membrane expression of a G protein-coupled receptor." *Mol Endocrinol* **20**(12): 3035-3041.
- Constant, J. S., J. J. Feng, D. D. Zabel, H. Yuan, D. Y. Suh, H. Scheuenstuhl, T. K. Hunt and M. Z. Hussain (2000). "Lactate elicits vascular endothelial growth factor from macrophages: a possible alternative to hypoxia." *Wound Repair Regen* **8**(5): 353-360.
- Cook, J. L., S. J. Mills, R. Naquin, J. Alam and R. N. Re (2006). "Nuclear accumulation of the AT1 receptor in a rat vascular smooth muscle cell line: effects upon signal transduction and cellular proliferation." *J Mol Cell Cardiol* **40**(5): 696-707.
- Cook, J. L., R. Re, J. Alam, M. Hart and Z. Zhang (2004). "Intracellular angiotensin II fusion protein alters AT1 receptor fusion protein distribution and activates CREB." *J Mol Cell Cardiol* **36**(1): 75-90.
- Cronstein, B. N. (2004). "Adenosine receptors and wound healing." *ScientificWorldJournal* **4**: 1-8.
- De Mello, W. C. (1998). "Intracellular angiotensin II regulates the inward calcium current in cardiac myocytes." *Hypertension* **32**(6): 976-982.
- DeFea, K. A., Z. D. Vaughn, E. M. O'Bryan, D. Nishijima, O. Dery and N. W. Bunnett (2000). "The proliferative and antiapoptotic effects of substance P are facilitated by formation of a beta -arrestin-dependent scaffolding complex." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(20): 11086-11091.
- Desai, A., C. Victor-Vega, S. Gadangi, M. C. Montesinos, C. C. Chu and B. N. Cronstein (2005). "Adenosine A2A receptor stimulation increases angiogenesis by down-regulating production of the antiangiogenic matrix protein thrombospondin 1." *Mol Pharmacol* **67**(5): 1406-1413.
- Desai, B. S., J. A. Schneider, J. L. Li, P. M. Carvey and B. Hendey (2009). "Evidence of angiogenic vessels in Alzheimer's disease." *J Neural Transm* **116**(5): 587-597.
- DeWire, S. M., S. Ahn, R. J. Lefkowitz and S. K. Shenoy (2007). "Beta-arrestins and cell signaling." *Annu Rev Physiol* **69**: 483-510.
- Dinarello, C. A. (1996). "Biologic basis for interleukin-1 in disease." *Blood* **87**(6): 2095-2147.
- Dinarello, C. A. (1998). "Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist." *Int Rev Immunol* **16**(5-6): 457-499.
- Dinarello, C. A. (2009). "Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family." *Annu Rev Immunol* **27**: 519-550.
- Dominguez, M., K. Dejgaard, J. Fullekrug, S. Dahan, A. Fazel, J. P. Paccaud, D. Y. Thomas, J. J. Bergeron and T. Nilsson (1998). "gp25L/emp24/p24 protein family members of the cis-Golgi network bind both COP I and II coatomer." *J Cell Biol* **140**(4): 751-765.
- Dong, C. and G. Wu (2006). "Regulation of anterograde transport of alpha2-adrenergic receptors by the N termini at multiple intracellular compartments." *J Biol Chem* **281**(50): 38543-38554.
- Dong, C. and G. Wu (2007). "Regulation of anterograde transport of adrenergic and angiotensin II receptors by Rab2 and Rab6 GTPases." *Cell Signal* **19**(11): 2388-2399.

- Doufexis, M., H. L. Storr, P. J. King and A. J. Clark (2007). "Interaction of the melanocortin 2 receptor with nucleoporin 50: evidence for a novel pathway between a G-protein-coupled receptor and the nucleus." *FASEB J* **21**(14): 4095-4100.
- Drury, A. N. and A. Szent-Gyorgyi (1929). "The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart." *J Physiol* **68**(3): 213-237.
- Dumont, D. J., T. P. Yamaguchi, R. A. Conlon, J. Rossant and M. L. Breitman (1992). "tek, a novel tyrosine kinase gene located on mouse chromosome 4, is expressed in endothelial cells and their presumptive precursors." *Oncogene* **7**(8): 1471-1480.
- Dupre, D. J., A. Baragli, R. V. Rebois, N. Ethier and T. E. Hebert (2007). "Signalling complexes associated with adenylyl cyclase II are assembled during their biosynthesis." *Cell Signal* **19**(3): 481-489.
- Dupre, D. J., M. Robitaille, N. Ethier, L. R. Villeneuve, A. M. Mamarbachi and T. E. Hebert (2006). "Seven transmembrane receptor core signaling complexes are assembled prior to plasma membrane trafficking." *J Biol Chem* **281**(45): 34561-34573.
- Duvernay, M. T., F. Zhou and G. Wu (2004). "A conserved motif for the transport of G protein-coupled receptors from the endoplasmic reticulum to the cell surface." *J Biol Chem* **279**(29): 30741-30750.
- Eggena, P., J. H. Zhu, K. Clegg and J. D. Barrett (1993). "Nuclear angiotensin receptors induce transcription of renin and angiotensinogen mRNA." *Hypertension* **22**(4): 496-501.
- Eliceiri, B. P., R. Paul, P. L. Schwartzberg, J. D. Hood, J. Leng and D. A. Cheresh (1999). "Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability." *Mol Cell* **4**(6): 915-924.
- Emami Riedmaier, A., A. T. Nies, E. Schaeffeler and M. Schwab (2012). "Organic anion transporters and their implications in pharmacotherapy." *Pharmacol Rev* **64**(3): 421-449.
- Erdmann, B., K. Fuxe and D. Ganten (1996). "Subcellular localization of angiotensin II immunoreactivity in the rat cerebellar cortex." *Hypertension* **28**(5): 818-824.
- Ergul, A., A. Alhusban and S. C. Fagan (2012). "Angiogenesis: a harmonized target for recovery after stroke." *Stroke* **43**(8): 2270-2274.
- Fagiani, E. and G. Christofori (2013). "Angiopoietins in angiogenesis." *Cancer Lett* **328**(1): 18-26.
- Fan, Y., J. Ye, F. Shen, Y. Zhu, Y. Yeghiazarians, W. Zhu, Y. Chen, M. T. Lawton, W. L. Young and G. Y. Yang (2008). "Interleukin-6 stimulates circulating blood-derived endothelial progenitor cell angiogenesis in vitro." *J Cereb Blood Flow Metab* **28**(1): 90-98.
- Faucheux, C., M. A. Horton and J. S. Price (2002). "Nuclear localization of type I parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptors in deer antler osteoclasts: evidence for parathyroid hormone-related protein and receptor activator of NF-kappaB-dependent effects on osteoclast formation in regenerating mammalian bone." *J Bone Miner Res* **17**(3): 455-464.
- Fee, D., D. Grzybicki, M. Dobbs, S. Ihyer, J. Clotfelter, S. Macvilay, M. N. Hart, M. Sandor and Z. Fabry (2000). "Interleukin 6 promotes vasculogenesis of murine brain microvessel endothelial cells." *Cytokine* **12**(6): 655-665.

- Feigl, E. O. (2004). "Berne's adenosine hypothesis of coronary blood flow control." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **287**(5): H1891-1894.
- Felcht, M., R. Luck, A. Schering, P. Seidel, K. Srivastava, J. Hu, A. Bartol, Y. Kienast, C. Vettel, E. K. Loos, S. Kutschera, S. Bartels, S. Appak, E. Besemfelder, D. Terhardt, E. Chavakis, T. Wieland, C. Klein, M. Thomas, A. Uemura, S. Goerdts and H. G. Augustin (2012). "Angiopoietin-2 differentially regulates angiogenesis through TIE2 and integrin signaling." *J Clin Invest* **122**(6): 1991-2005.
- Feoktistov, I., A. E. Goldstein, S. Ryzhov, D. Zeng, L. Belardinelli, T. Voyno-Yasenetskaya and I. Biaggioni (2002). "Differential expression of adenosine receptors in human endothelial cells: role of A2B receptors in angiogenic factor regulation." *Circ Res* **90**(5): 531-538.
- Fernandez-Lopez, D., J. M. Pradillo, I. Garcia-Yebenes, J. A. Martinez-Orgado, M. A. Moro and I. Lizasoain (2010). "The cannabinoid WIN55212-2 promotes neural repair after neonatal hypoxia-ischemia." *Stroke* **41**(12): 2956-2964.
- Ferrara, N., K. Carver-Moore, H. Chen, M. Dowd, L. Lu, K. S. O'Shea, L. Powell-Braxton, K. J. Hillan and M. W. Moore (1996). "Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene." *Nature* **380**(6573): 439-442.
- Ferrara, N., H. P. Gerber and J. LeCouter (2003). "The biology of VEGF and its receptors." *Nat Med* **9**(6): 669-676.
- Ferriero, D. M. (2004). "Neonatal brain injury." *N Engl J Med* **351**(19): 1985-1995.
- Fiedler, K., M. Veit, M. A. Stamnes and J. E. Rothman (1996). "Bimodal interaction of coatamer with the p24 family of putative cargo receptors." *Science* **273**(5280): 1396-1399.
- Filipeanu, C. M., R. de Vries, A. H. Danser and D. R. Kapusta (2011). "Modulation of alpha(2C) adrenergic receptor temperature-sensitive trafficking by HSP90." *Biochim Biophys Acta* **1813**(2): 346-357.
- Folbergrová, J., B. Ljunggren, K. Norberg and B. K. Siesjö (1974). "Influence of complete ischemia on glycolytic metabolites, citric acid cycle intermediates, and associated amino acids in the rat cerebral cortex." *Brain Res* **80**(2): 265-279.
- Folkman, J. (1971). "Tumor angiogenesis: therapeutic implications." *N Engl J Med* **285**(21): 1182-1186.
- Foord, S. M., T. I. Bonner, R. R. Neubig, E. M. Rosser, J. P. Pin, A. P. Davenport, M. Spedding and A. J. Harmar (2005). "International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list." *Pharmacol Rev* **57**(2): 279-288.
- Fredriksson, R., M. C. Lagerstrom, L. G. Lundin and H. B. Schioth (2003). "The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints." *Mol Pharmacol* **63**(6): 1256-1272.
- Freyberg, Z., D. Sweeney, A. Siddhanta, S. Bourgoin, M. Frohman and D. Shields (2001). "Intracellular localization of phospholipase D1 in mammalian cells." *Mol Biol Cell* **12**(4): 943-955.
- Fukushima, Y., T. Saitoh, M. Anai, T. Ogihara, K. Inukai, M. Funaki, H. Sakoda, Y. Onishi, H. Ono, M. Fujishiro, T. Ishikawa, K. Takata, R. Nagai, M. Omata and T. Asano (2001). "Palmitoylation of the canine histamine H2 receptor occurs at Cys(305) and is important for cell surface targeting." *Biochim Biophys Acta* **1539**(3): 181-191.

- Giordano, F., S. Simoes and G. Raposo (2011). "The ocular albinism type 1 (OA1) GPCR is ubiquitinated and its traffic requires endosomal sorting complex responsible for transport (ESCRT) function." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(29): 11906-11911.
- Gobeil, F., A. Fortier, T. Zhu, M. Bossolasco, M. Leduc, M. Grandbois, N. Heveker, G. Bkaily, S. Chemtob and D. Barbaz (2006). "G-protein-coupled receptors signalling at the cell nucleus: an emerging paradigm." *Can J Physiol Pharmacol* **84**(3-4): 287-297.
- Gobeil, F., Jr., S. G. Bernier, A. Vazquez-Tello, S. Brault, M. H. Beauchamp, C. Quiniou, A. M. Marrache, D. Checchin, F. Sennlaub, X. Hou, M. Nader, G. Bkaily, A. Ribeiro-da-Silva, E. J. Goetzl and S. Chemtob (2003). "Modulation of pro-inflammatory gene expression by nuclear lysophosphatidic acid receptor type-1." *J Biol Chem* **278**(40): 38875-38883.
- Gobeil, F., Jr., I. Dumont, A. M. Marrache, A. Vazquez-Tello, S. G. Bernier, D. Abran, X. Hou, M. H. Beauchamp, C. Quiniou, A. Bouayad, S. Choufani, M. Bhattacharya, S. Molotchnikoff, A. Ribeiro-Da-Silva, D. R. Varma, G. Bkaily and S. Chemtob (2002). "Regulation of eNOS expression in brain endothelial cells by perinuclear EP(3) receptors." *Circ Res* **90**(6): 682-689.
- Gobeil, F., Jr., T. Zhu, S. Brault, A. Geha, A. Vazquez-Tello, A. Fortier, D. Barbaz, D. Checchin, X. Hou, M. Nader, G. Bkaily, J. P. Gratton, N. Heveker, A. Ribeiro-da-Silva, K. Peri, H. Bard, A. Chorvatova, P. D'Orleans-Juste, E. J. Goetzl and S. Chemtob (2006). "Nitric oxide signaling via nuclearized endothelial nitric-oxide synthase modulates expression of the immediate early genes iNOS and mPGES-1." *J Biol Chem* **281**(23): 16058-16067.
- Goddard, A. D. and A. Watts (2012). "Regulation of G protein-coupled receptors by palmitoylation and cholesterol." *BMC Biol* **10**: 27.
- Groenendaal, F. and A. J. Brouwer (2009). "Clinical aspects of induced hypothermia in full term neonates with perinatal asphyxia." *Early Hum Dev* **85**(2): 73-76.
- Guo, D., Q. Jia, H. Y. Song, R. S. Warren and D. B. Donner (1995). "Vascular endothelial cell growth factor promotes tyrosine phosphorylation of mediators of signal transduction that contain SH2 domains. Association with endothelial cell proliferation." *J Biol Chem* **270**(12): 6729-6733.
- Haller, H., C. Lindschau, P. Quass and F. C. Luft (1999). "Intracellular actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells." *J Am Soc Nephrol* **10 Suppl 11**: S75-83.
- He, W., F. J. Miao, D. C. Lin, R. T. Schwandner, Z. Wang, J. Gao, J. L. Chen, H. Tian and L. Ling (2004). "Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors." *Nature* **429**(6988): 188-193.
- Heilker, R., U. Manning-Krieg, J. F. Zuber and M. Spiess (1996). "In vitro binding of clathrin adaptors to sorting signals correlates with endocytosis and basolateral sorting." *EMBO J* **15**(11): 2893-2899.
- Helenius, A. and M. Aebi (2004). "Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum." *Annu Rev Biochem* **73**: 1019-1049.
- Hermosilla, R. and R. Schulein (2001). "Sorting functions of the individual cytoplasmic domains of the G protein-coupled vasopressin V(2) receptor in Madin Darby canine kidney epithelial cells." *Mol Pharmacol* **60**(5): 1031-1039.
- Hernandez, C. and R. Simo (2012). "Erythropoietin produced by the retina: its role in physiology and diabetic retinopathy." *Endocrine* **41**(2): 220-226.

- Hisanaga, K., H. Onodera and K. Kogure (1986). "Changes in levels of purine and pyrimidine nucleotides during acute hypoxia and recovery in neonatal rat brain." *J Neurochem* **47**(5): 1344-1350.
- Hocher, B., C. Rubens, J. Hensen, P. Gross and C. Bauer (1992). "Intracellular distribution of endothelin-1 receptors in rat liver cells." *Biochem Biophys Res Commun* **184**(1): 498-503.
- Hogan, B. L. and P. A. Kolodziej (2002). "Organogenesis: molecular mechanisms of tubulogenesis." *Nat Rev Genet* **3**(7): 513-523.
- Honore, J. C., A. Kooli, D. Hamel, T. Alquier, J. C. Rivera, C. Quiniou, X. Hou, E. Kermorvant-Duchemin, P. Hardy, V. Poitout and S. Chemtob (2013). "Fatty acid receptor Gpr40 mediates neuromicrovascular degeneration induced by transarachidonic acids in rodents." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **33**(5): 954-961.
- Hoyer, S. and C. Krier (1986). "Ischemia and aging brain. Studies on glucose and energy metabolism in rat cerebral cortex." *Neurobiol Aging* **7**(1): 23-29.
- Huang, Y., C. D. Wright, C. L. Merkwang, N. L. Baye, Q. Liang, P. C. Simpson and T. D. O'Connell (2007). "An alpha1A-adrenergic-extracellular signal-regulated kinase survival signaling pathway in cardiac myocytes." *Circulation* **115**(6): 763-772.
- Hunter, J. (1840). *A treatise on the blood, inflammation and gunshot wounds*. P. JF. Philadelphia, Haswell, Barrington, and Haswell: 195.
- Hunter, J. M., J. Kwan, M. Malek-Ahmadi, C. L. Maarouf, T. A. Kokjohn, C. Belden, M. N. Sabbagh, T. G. Beach and A. E. Roher (2012). "Morphological and pathological evolution of the brain microcirculation in aging and Alzheimer's disease." *PLoS One* **7**(5): e36893.
- Hunziker, W. and C. Fumey (1994). "A di-leucine motif mediates endocytosis and basolateral sorting of macrophage IgG Fc receptors in MDCK cells." *EMBO J* **13**(13): 2963-2969.
- Hurt, C. M., F. Y. Feng and B. Kobilka (2000). "Cell-type specific targeting of the alpha 2c-adrenoceptor. Evidence for the organization of receptor microdomains during neuronal differentiation of PC12 cells." *J Biol Chem* **275**(45): 35424-35431.
- Iwama, A., I. Hamaguchi, M. Hashiyama, Y. Murayama, K. Yasunaga and T. Suda (1993). "Molecular cloning and characterization of mouse TIE and TEK receptor tyrosine kinase genes and their expression in hematopoietic stem cells." *Biochem Biophys Res Commun* **195**(1): 301-309.
- Jaakola, V. P., M. T. Griffith, M. A. Hanson, V. Cherezov, E. Y. Chien, J. R. Lane, A. P. Ijzerman and R. C. Stevens (2008). "The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist." *Science* **322**(5905): 1211-1217.
- Jackson, M. R., T. Nilsson and P. A. Peterson (1990). "Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum." *EMBO J* **9**(10): 3153-3162.
- Jacques, D., N. A. Abdel Malak, S. Sader and C. Perreault (2003). "Angiotensin II and its receptors in human endocardial endothelial cells: role in modulating intracellular calcium." *Can J Physiol Pharmacol* **81**(3): 259-266.
- Jacques, D., M. Descorbeth, D. Abdel-Samad, C. Provost, C. Perreault and F. Jules (2005). "The distribution and density of ET-1 and its receptors are different in human right and left ventricular endocardial endothelial cells." *Peptides* **26**(8): 1427-1435.

- Jacques, D., S. Sader, C. Perreault, D. Abdel-Samad, F. Jules and C. Provost (2006). "NPY, ET-1, and Ang II nuclear receptors in human endocardial endothelial cells." *Can J Physiol Pharmacol* **84**(3-4): 299-307.
- Jacques, D., S. Sader, C. Perreault, A. Fournier, G. Pelletier, A. G. Beck-Sickinger and M. Descorbeth (2003). "Presence of neuropeptide Y and the Y1 receptor in the plasma membrane and nuclear envelope of human endocardial endothelial cells: modulation of intracellular calcium." *Can J Physiol Pharmacol* **81**(3): 288-300.
- Janovick, J. A., P. E. Knollman, S. P. Brothers, R. Ayala-Yanez, A. S. Aziz and P. M. Conn (2006). "Regulation of G protein-coupled receptor trafficking by inefficient plasma membrane expression: molecular basis of an evolved strategy." *J Biol Chem* **281**(13): 8417-8425.
- Janovick, J. A., A. Ulloa-Aguirre and P. M. Conn (2003). "Evolved regulation of gonadotropin-releasing hormone receptor cell surface expression." *Endocrine* **22**(3): 317-327.
- JE, M. and F. AL (2008). *The Cerebral Vascular System. Clinical Neuroanatomy: A Neurobehavioral Approach*: 501-543.
- Johnson, L. R., M. G. Scott and J. A. Pitcher (2004). "G protein-coupled receptor kinase 5 contains a DNA-binding nuclear localization sequence." *Mol Cell Biol* **24**(23): 10169-10179.
- Jones, K. A., B. Borowsky, J. A. Tamm, D. A. Craig, M. M. Durkin, M. Dai, W. J. Yao, M. Johnson, C. Gunwaldsen, L. Y. Huang, C. Tang, Q. Shen, J. A. Salon, K. Morse, T. Laz, K. E. Smith, D. Nagarathnam, S. A. Noble, T. A. Branchek and C. Gerald (1998). "GABA(B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA(B)R1 and GABA(B)R2." *Nature* **396**(6712): 674-679.
- Kanai, N., R. Lu, J. A. Satriano, Y. Bao, A. W. Wolkoff and V. L. Schuster (1995). "Identification and characterization of a prostaglandin transporter." *Science* **268**(5212): 866-869.
- Kanehisa, M., S. Goto, S. Kawashima, Y. Okuno and M. Hattori (2004). "The KEGG resource for deciphering the genome." *Nucleic Acids Res* **32**(Database issue): D277-280.
- Karnik, S. S., K. D. Ridge, S. Bhattacharya and H. G. Khorana (1993). "Palmitoylation of bovine opsin and its cysteine mutants in COS cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(1): 40-44.
- Ke, Q. and M. Costa (2006). "Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)." *Mol Pharmacol* **70**(5): 1469-1480.
- Kertesz, N., J. Wu, T. H. Chen, H. M. Sucov and H. Wu (2004). "The role of erythropoietin in regulating angiogenesis." *Dev Biol* **276**(1): 101-110.
- Kim, C. G., D. Park and S. G. Rhee (1996). "The role of carboxyl-terminal basic amino acids in Gqalpha-dependent activation, particulate association, and nuclear localization of phospholipase C-beta1." *J Biol Chem* **271**(35): 21187-21192.
- Kirton, A. and G. deVeber (2009). "Advances in perinatal ischemic stroke." *Pediatr Neurol* **40**(3): 205-214.
- Kirton, A., R. Westmacott and G. deVeber (2007). "Pediatric stroke: rehabilitation of focal injury in the developing brain." *NeuroRehabilitation* **22**(5): 371-382.
- Krupinski, J., J. Kaluza, P. Kumar, S. Kumar and J. M. Wang (1994). "Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke." *Stroke* **25**(9): 1794-1798.

- Lambrechts, D., H. J. Lenz, S. de Haas, P. Carmeliet and S. J. Scherer (2013). "Markers of response for the antiangiogenic agent bevacizumab." *J Clin Oncol* **31**(9): 1219-1230.
- Lanctot, P. M., P. C. Leclerc, M. Clement, M. Auger-Messier, E. Escher, R. Leduc and G. Guillemette (2005). "Importance of N-glycosylation positioning for cell-surface expression, targeting, affinity and quality control of the human AT1 receptor." *Biochem J* **390**(Pt 1): 367-376.
- Lanctot, P. M., P. C. Leclerc, E. Escher, R. Leduc and G. Guillemette (1999). "Role of N-glycosylation in the expression and functional properties of human AT1 receptor." *Biochemistry* **38**(27): 8621-8627.
- Lanoix, D., R. Ouellette and C. Vaillancourt (2006). "Expression of melatoninergic receptors in human placental choriocarcinoma cell lines." *Hum Reprod* **21**(8): 1981-1989.
- Lee, D. K., A. J. Lanca, R. Cheng, T. Nguyen, X. D. Ji, F. Gobeil, Jr., S. Chemtob, S. R. George and B. F. O'Dowd (2004). "Agonist-independent nuclear localization of the Apelin, angiotensin AT1, and bradykinin B2 receptors." *J Biol Chem* **279**(9): 7901-7908.
- Lee, M. S., E. J. Moon, S. W. Lee, M. S. Kim, K. W. Kim and Y. J. Kim (2001). "Angiogenic activity of pyruvic acid in in vivo and in vitro angiogenesis models." *Cancer Res* **61**(8): 3290-3293.
- Lei, B., X. Tan, H. Cai, Q. Xu and Q. Guo (1994). "Effect of moderate hypothermia on lipid peroxidation in canine brain tissue after cardiac arrest and resuscitation." *Stroke* **25**(1): 147-152.
- Leung, D. W., G. Cachianes, W. J. Kuang, D. V. Goeddel and N. Ferrara (1989). "Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen." *Science* **246**(4935): 1306-1309.
- Leung, P. K., K. B. Chow, P. N. Lau, K. M. Chu, C. B. Chan, C. H. Cheng and H. Wise (2007). "The truncated ghrelin receptor polypeptide (GHS-R1b) acts as a dominant-negative mutant of the ghrelin receptor." *Cell Signal* **19**(5): 1011-1022.
- Levoye, A., J. Dam, M. A. Ayoub, J. L. Guillaume and R. Jockers (2006). "Do orphan G-protein-coupled receptors have ligand-independent functions? New insights from receptor heterodimers." *EMBO Rep* **7**(11): 1094-1098.
- Liang, X., L. Lin, N. S. Woodling, Q. Wang, C. Anacker, T. Pan, M. Merchant and K. Andreasson (2011). "Signaling via the prostaglandin E(2) receptor EP4 exerts neuronal and vascular protection in a mouse model of cerebral ischemia." *J Clin Invest* **121**(11): 4362-4371.
- Lind, G. J. and H. D. Cavanagh (1993). "Nuclear muscarinic acetylcholine receptors in corneal cells from rabbit." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **34**(10): 2943-2952.
- Lind, G. J. and H. D. Cavanagh (1995). "Identification and subcellular distribution of muscarinic acetylcholine receptor-related proteins in rabbit corneal and Chinese hamster ovary cells." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **36**(8): 1492-1507.
- Liu, C., J. Wu, J. Zhu, C. Kuei, J. Yu, J. Shelton, S. W. Sutton, X. Li, S. J. Yun, T. Mirzadegan, C. Mazur, F. Kamme and T. W. Lovenberg (2009). "Lactate inhibits lipolysis in fat cells through activation of an orphan G-protein-coupled receptor, GPR81." *J Biol Chem* **284**(5): 2811-2822.

- Liu, Y., Q. Zheng, H. Wu, X. Guo, J. Li and S. Hao (2013). "Rapamycin increases pCREB, Bcl-2, and VEGF-A through ERK under normoxia." *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **45**(4): 259-267.
- Lodish (2000). *Molecular Cell Biology*.
- Lombardero, M., K. Kovacs and B. W. Scheithauer (2011). "Erythropoietin: a hormone with multiple functions." *Pathobiology* **78**(1): 41-53.
- Lu, D., H. Yang, G. Shaw and M. K. Raizada (1998). "Angiotensin II-induced nuclear targeting of the angiotensin type 1 (AT1) receptor in brain neurons." *Endocrinology* **139**(1): 365-375.
- Ludwig, A., J. E. Ehlert, H. D. Flad and E. Brandt (2000). "Identification of distinct surface-expressed and intracellular CXC-chemokine receptor 2 glycoforms in neutrophils: N-glycosylation is essential for maintenance of receptor surface expression." *J Immunol* **165**(2): 1044-1052.
- Luttrell, L. M., S. S. Ferguson, Y. Daaka, W. E. Miller, S. Maudsley, G. J. Della Rocca, F. Lin, H. Kawakatsu, K. Owada, D. K. Luttrell, M. G. Caron and R. J. Lefkowitz (1999). "Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes." *Science* **283**(5402): 655-661.
- Maisonpierre, P. C., M. Goldfarb, G. D. Yancopoulos and G. Gao (1993). "Distinct rat genes with related profiles of expression define a TIE receptor tyrosine kinase family." *Oncogene* **8**(6): 1631-1637.
- Manzari, B., J. E. Kudlow, P. Fardin, E. Merello, C. Ottaviano, M. Puppo, A. Eva and L. Varesio (2007). "Induction of macrophage glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase expression by hypoxia and by picolinic acid." *Int J Immunopathol Pharmacol* **20**(1): 47-58.
- Margeta-Mitrovic, M., Y. N. Jan and L. Y. Jan (2000). "A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization." *Neuron* **27**(1): 97-106.
- Markkanen, P. M. and U. E. Petaja-Repo (2008). "N-glycan-mediated quality control in the endoplasmic reticulum is required for the expression of correctly folded delta-opioid receptors at the cell surface." *J Biol Chem* **283**(43): 29086-29098.
- Markovich, D. and H. Murer (2004). "The SLC13 gene family of sodium sulphate/carboxylate cotransporters." *Pflugers Arch* **447**(5): 594-602.
- Marrache, A. M., F. Gobeil, Jr., S. G. Bernier, J. Stankova, M. Rola-Pleszczynski, S. Choufani, G. Bkaily, A. Bourdeau, M. G. Sirois, A. Vazquez-Tello, L. Fan, J. S. Joyal, J. G. Filep, D. R. Varma, A. Ribeiro-Da-Silva and S. Chemtob (2002). "Proinflammatory gene induction by platelet-activating factor mediated via its cognate nuclear receptor." *J Immunol* **169**(11): 6474-6481.
- Michineau, S., F. Alhenc-Gelas and R. M. Rajerison (2006). "Human bradykinin B2 receptor sialylation and N-glycosylation participate with disulfide bonding in surface receptor dimerization." *Biochemistry* **45**(8): 2699-2707.
- Miguel, B. G., M. C. Calcerrada, L. Martin, R. E. Catalan and A. M. Martinez (2001). "Increase of phosphoinositide hydrolysis and diacylglycerol production by PAF in isolated rat liver nuclei." *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **65**(4): 159-166.
- Miura, K., W. Fujibuchi and M. Unno (2012). "Splice isoforms as therapeutic targets for colorectal cancer." *Carcinogenesis* **33**(12): 2311-2319.

- Morita, I., M. Schindler, M. K. Regier, J. C. Otto, T. Hori, D. L. DeWitt and W. L. Smith (1995). "Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2." *J Biol Chem* **270**(18): 10902-10908.
- Mukai, A., M. Yamamoto-Hino, W. Awano, W. Watanabe, M. Komada and S. Goto (2010). "Balanced ubiquitylation and deubiquitylation of Frizzled regulate cellular responsiveness to Wg/Wnt." *EMBO J* **29**(13): 2114-2125.
- Munro, S. and H. R. Pelham (1987). "A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins." *Cell* **48**(5): 899-907.
- Naldini, A. and F. Carraro (2005). "Role of inflammatory mediators in angiogenesis." *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* **4**(1): 3-8.
- Nelson, K. B. and J. K. Lynch (2004). "Stroke in newborn infants." *Lancet Neurol* **3**(3): 150-158.
- Neufeld, G., T. Cohen, S. Gengrinovitch and Z. Poltorak (1999). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors." *FASEB J* **13**(1): 9-22.
- Neuman, R. E. and C. T. Mc (1958). "Growth-promoting properties of pyruvate oxal-acetate, and alpha-ketoglutarate for isolated Walker carcinosarcoma 256 cells." *Proc Soc Exp Biol Med* **98**(2): 303-306.
- Ng, G. Y., J. Clark, N. Coulombe, N. Ethier, T. E. Hebert, R. Sullivan, S. Kargman, A. Chateaneuf, N. Tsukamoto, T. McDonald, P. Whiting, E. Mezey, M. P. Johnson, Q. Liu, L. F. Kolakowski, Jr., J. F. Evans, T. I. Bonner and G. P. O'Neill (1999). "Identification of a GABAB receptor subunit, gb2, required for functional GABAB receptor activity." *J Biol Chem* **274**(12): 7607-7610.
- Nielsen, C. K., J. I. Campbell, J. F. Ohd, M. Morgelin, K. Riesbeck, G. Landberg and A. Sjolander (2005). "A novel localization of the G-protein-coupled CysLT1 receptor in the nucleus of colorectal adenocarcinoma cells." *Cancer Res* **65**(3): 732-742.
- Nilsson, M. B., R. R. Langley and I. J. Fidler (2005). "Interleukin-6, secreted by human ovarian carcinoma cells, is a potent proangiogenic cytokine." *Cancer Res* **65**(23): 10794-10800.
- Nishimura, N. and W. E. Balch (1997). "A di-acidic signal required for selective export from the endoplasmic reticulum." *Science* **277**(5325): 556-558.
- Nishimura, N., S. Bannykh, S. Slabough, J. Matteson, Y. Altschuler, K. Hahn and W. E. Balch (1999). "A di-acidic (DXE) code directs concentration of cargo during export from the endoplasmic reticulum." *J Biol Chem* **274**(22): 15937-15946.
- Nishimura, N., H. Plutner, K. Hahn and W. E. Balch (2002). "The delta subunit of AP-3 is required for efficient transport of VSV-G from the trans-Golgi network to the cell surface." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(10): 6755-6760.
- Nufer, O., S. Guldbrandsen, M. Degen, F. Kappeler, J. P. Paccaud, K. Tani and H. P. Hauri (2002). "Role of cytoplasmic C-terminal amino acids of membrane proteins in ER export." *J Cell Sci* **115**(Pt 3): 619-628.
- Nufer, O., F. Kappeler, S. Guldbrandsen and H. P. Hauri (2003). "ER export of ERGIC-53 is controlled by cooperation of targeting determinants in all three of its domains." *J Cell Sci* **116**(Pt 21): 4429-4440.
- O'Malley, K. L., Y. J. Jong, Y. Gonchar, A. Burkhalter and C. Romano (2003). "Activation of metabotropic glutamate receptor mGlu5 on nuclear membranes mediates intranuclear

- Ca²⁺ changes in heterologous cell types and neurons." *J Biol Chem* **278**(30): 28210-28219.
- Offermanns, S. (2003). "G-proteins as transducers in transmembrane signalling." *Prog Biophys Mol Biol* **83**(2): 101-130.
- Omary, M. B. and M. F. Kagnoff (1987). "Identification of nuclear receptors for VIP on a human colonic adenocarcinoma cell line." *Science* **238**(4833): 1578-1581.
- Oswald, S., M. Grube, W. Siegmund and H. K. Kroemer (2007). "Transporter-mediated uptake into cellular compartments." *Xenobiotica* **37**(10-11): 1171-1195.
- Otte, S. and C. Barlowe (2002). "The Erv41p-Erv46p complex: multiple export signals are required in trans for COPII-dependent transport from the ER." *EMBO J* **21**(22): 6095-6104.
- Otto, C., B. Rohde-Schulz, G. Schwarz, I. Fuchs, M. Klewer, D. Brittain, G. Langer, B. Bader, K. Prella, R. Nubbemeyer and K. H. Fritzscheier (2008). "G protein-coupled receptor 30 localizes to the endoplasmic reticulum and is not activated by estradiol." *Endocrinology* **149**(10): 4846-4856.
- Pabon, M. M. and C. V. Borlongan (2013). "Advances in the Cell-Based Treatment of Neonatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury." *Future Neurol* **8**(2): 193-203.
- Pages, G. and J. Pouyssegur (2005). "Transcriptional regulation of the Vascular Endothelial Growth Factor gene--a concert of activating factors." *Cardiovasc Res* **65**(3): 564-573.
- Pajor, A. M. (2006). "Molecular properties of the SLC13 family of dicarboxylate and sulfate transporters." *Pflugers Arch* **451**(5): 597-605.
- Palczewski, K., T. Kumasaka, T. Hori, C. A. Behnke, H. Motoshima, B. A. Fox, I. Le Trong, D. C. Teller, T. Okada, R. E. Stenkamp, M. Yamamoto and M. Miyano (2000). "Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor." *Science* **289**(5480): 739-745.
- Partanen, J., E. Armstrong, T. P. Makela, J. Korhonen, M. Sandberg, R. Renkonen, S. Knuutila, K. Huebner and K. Alitalo (1992). "A novel endothelial cell surface receptor tyrosine kinase with extracellular epidermal growth factor homology domains." *Mol Cell Biol* **12**(4): 1698-1707.
- Percherancier, Y., T. Planchenault, A. Valenzuela-Fernandez, J. L. Virelizier, F. Arenzana-Seisdedos and F. Bachelierie (2001). "Palmitoylation-dependent control of degradation, life span, and membrane expression of the CCR5 receptor." *J Biol Chem* **276**(34): 31936-31944.
- Perkins, E., J. Stephens, H. Xiang and W. Lo (2009). "The cost of pediatric stroke acute care in the United States." *Stroke* **40**(8): 2820-2827.
- Pickard, B. W., A. B. Hodsmann, L. J. Fraher and P. H. Watson (2006). "Type 1 parathyroid hormone receptor (PTH1R) nuclear trafficking: association of PTH1R with importin alpha1 and beta." *Endocrinology* **147**(7): 3326-3332.
- Pietila, E. M., J. T. Tuusa, P. M. Apaja, J. T. Aatsinki, A. E. Hakalahti, H. J. Rajaniemi and U. E. Petaja-Repo (2005). "Inefficient maturation of the rat luteinizing hormone receptor. A putative way to regulate receptor numbers at the cell surface." *J Biol Chem* **280**(28): 26622-26629.
- Polet, F. and O. Feron (2013). "Endothelial cell metabolism and tumour angiogenesis: glucose and glutamine as essential fuels and lactate as the driving force." *J Intern Med* **273**(2): 156-165.

- Pouyssegur, J. (2000). "Signal transduction. An arresting start for MAPK." *Science* **290**(5496): 1515-1518.
- Pritchard-Jones, R. O., D. B. Dunn, Y. Qiu, A. H. Varey, A. Orlando, H. Rigby, S. J. Harper and D. O. Bates (2007). "Expression of VEGF(xxx)b, the inhibitory isoforms of VEGF, in malignant melanoma." *Br J Cancer* **97**(2): 223-230.
- Quiniou, C., E. Kooli, J. S. Joyal, P. Sapienza, F. Sennlaub, I. Lahaie, Z. Shao, X. Hou, P. Hardy, W. Lubell and S. Chemtob (2008). "Interleukin-1 and ischemic brain injury in the newborn: development of a small molecule inhibitor of IL-1 receptor." *Semin Perinatol* **32**(5): 325-333.
- Raju, T. N. (2008). "Ischemic perinatal stroke: challenge and opportunities." *Int J Stroke* **3**(3): 169-172.
- Raju, T. N., K. B. Nelson, D. Ferriero and J. K. Lynch (2007). "Ischemic perinatal stroke: summary of a workshop sponsored by the National Institute of Child Health and Human Development and the National Institute of Neurological Disorders and Stroke." *Pediatrics* **120**(3): 609-616.
- Rasmussen, S. G., H. J. Choi, D. M. Rosenbaum, T. S. Kobilka, F. S. Thian, P. C. Edwards, M. Burghammer, V. R. Ratnala, R. Sanishvili, R. F. Fischetti, G. F. Schertler, W. I. Weis and B. K. Kobilka (2007). "Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor." *Nature* **450**(7168): 383-387.
- Ravid, O., I. Shams, N. Ben Califa, E. Nevo, A. Avivi and D. Neumann (2007). "An extracellular region of the erythropoietin receptor of the subterranean blind mole rat *Spalax* enhances receptor maturation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(36): 14360-14365.
- Re, R. N., R. A. LaBiche and S. E. Bryan (1983). "Nuclear-hormone mediated changes in chromatin solubility." *Biochem Biophys Res Commun* **110**(1): 61-68.
- Re, R. N., D. L. Vizard, J. Brown and S. E. Bryan (1984). "Angiotensin II receptors in chromatin fragments generated by micrococcal nuclease." *Biochem Biophys Res Commun* **119**(1): 220-227.
- Reeves, P. J., N. Callewaert, R. Contreras and H. G. Khorana (2002). "Structure and function in rhodopsin: high-level expression of rhodopsin with restricted and homogeneous N-glycosylation by a tetracycline-inducible N-acetylglucosaminyltransferase I-negative HEK293S stable mammalian cell line." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(21): 13419-13424.
- Revankar, C. M., D. F. Cimino, L. A. Sklar, J. B. Arterburn and E. R. Prossnitz (2005). "A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling." *Science* **307**(5715): 1625-1630.
- Richman, J. G. and J. W. Regan (1998). "Alpha 2-adrenergic receptors increase cell migration and decrease F-actin labeling in rat aortic smooth muscle cells." *Am J Physiol* **274**(3 Pt 1): C654-662.
- Risau, W. (1997). "Mechanisms of angiogenesis." *Nature* **386**(6626): 671-674.
- Rivera, J. C., N. Sitaras, B. Noueihed, D. Hamel, A. Madaan, T. Zhou, J. C. Honore, C. Quiniou, J. S. Joyal, P. Hardy, F. Sennlaub, W. Lubell and S. Chemtob (2013). "Microglia and Interleukin-1beta in Ischemic Retinopathy Elicit Microvascular Degeneration Through Neuronal Semaphorin-3A." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **33**(8): 1881-1891.

- Robben, J. H., R. A. Fenton, S. L. Vargas, H. Schweer, J. Peti-Peterdi, P. M. Deen and G. Milligan (2009). "Localization of the succinate receptor in the distal nephron and its signaling in polarized MDCK cells." *Kidney Int* **76**(12): 1258-1267.
- Robert, J., E. Clauser, P. X. Petit and M. A. Ventura (2005). "A novel C-terminal motif is necessary for the export of the vasopressin V1b/V3 receptor to the plasma membrane." *J Biol Chem* **280**(3): 2300-2308.
- Robertson, A. L., Jr. and P. A. Khairallah (1971). "Angiotensin II: rapid localization in nuclei of smooth and cardiac muscle." *Science* **172**(3988): 1138-1139.
- Rosin, D. L., E. M. Talley, A. Lee, R. L. Stornetta, B. D. Gaylenn, P. G. Guyenet and K. R. Lynch (1996). "Distribution of alpha 2C-adrenergic receptor-like immunoreactivity in the rat central nervous system." *J Comp Neurol* **372**(1): 135-165.
- Rubic, T., G. Lametschwandtner, S. Jost, S. Hinteregger, J. Kund, N. Carballido-Perrig, C. Schwärzler, T. Junt, H. Voshol, J. G. Meingassner, X. Mao, G. Werner, A. Rot and J. M. Carballido (2008). "Triggering the succinate receptor GPR91 on dendritic cells enhances immunity." *Nat Immunol* **9**(11): 1261-1269.
- Sapieha, P., M. Sirinyan, D. Hamel, K. Zaniolo, J. S. Joyal, J. H. Cho, J. C. Honore, E. Kermorvant-Duchemin, D. R. Varma, S. Tremblay, M. Leduc, L. Rihakova, P. Hardy, W. H. Klein, X. Mu, O. Mamer, P. Lachapelle, A. Di Polo, C. Beausejour, G. Andelfinger, G. Mitchell, F. Sennlaub and S. Chemtob (2008). "The succinate receptor GPR91 in neurons has a major role in retinal angiogenesis." *Nat Med* **14**(10): 1067-1076.
- Sastri, M., D. M. Barraclough, P. T. Carmichael and S. S. Taylor (2005). "A-kinase-interacting protein localizes protein kinase A in the nucleus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(2): 349-354.
- Sato, T. N., Y. Qin, C. A. Kozak and K. L. Audus (1993). "Tie-1 and tie-2 define another class of putative receptor tyrosine kinase genes expressed in early embryonic vascular system." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(20): 9355-9358.
- Schievella, A. R., M. K. Regier, W. L. Smith and L. L. Lin (1995). "Calcium-mediated translocation of cytosolic phospholipase A2 to the nuclear envelope and endoplasmic reticulum." *J Biol Chem* **270**(51): 30749-30754.
- Schulein, R., R. Hermosilla, A. Oksche, M. Dehe, B. Wiesner, G. Krause and W. Rosenthal (1998). "A dileucine sequence and an upstream glutamate residue in the intracellular carboxyl terminus of the vasopressin V2 receptor are essential for cell surface transport in COS.M6 cells." *Mol Pharmacol* **54**(3): 525-535.
- Schurr, A., C. A. West and B. M. Rigor (1988). "Lactate-supported synaptic function in the rat hippocampal slice preparation." *Science* **240**(4857): 1326-1328.
- Sehgal, A. (2012). "Perinatal stroke: a case-based review." *Eur J Pediatr* **171**(2): 225-234.
- Shibuta, K., M. Mori, K. Shimoda, H. Inoue, P. Mitra and G. F. Barnard (2002). "Regional expression of CXCL12/CXCR4 in liver and hepatocellular carcinoma and cell-cycle variation during in vitro differentiation." *Jpn J Cancer Res* **93**(7): 789-797.
- Shibuya, M. (2013). "Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases." *J Biochem* **153**(1): 13-19.

- Shirato, K., K. Nakajima, H. Korekane, S. Takamatsu, C. Gao, T. Angata, K. Ohtsubo and N. Taniguchi (2011). "Hypoxic regulation of glycosylation via the N-acetylglucosamine cycle." *J Clin Biochem Nutr* **48**(1): 20-25.
- Singh, H., T. A. Tahir, D. O. Alawo, E. Issa and N. P. Brindle (2011). "Molecular control of angiopoietin signalling." *Biochem Soc Trans* **39**(6): 1592-1596.
- Sirinyan, M., F. Sennlaub, A. Dorfman, P. Sapieha, F. Gobeil, Jr., P. Hardy, P. Lachapelle and S. Chemtob (2006). "Hyperoxic exposure leads to nitrate stress and ensuing microvascular degeneration and diminished brain mass and function in the immature subject." *Stroke* **37**(11): 2807-2815.
- Spano, J. P., F. Andre, L. Morat, L. Sabatier, B. Besse, C. Combadiere, P. Deterre, A. Martin, J. Azorin, D. Valeyre, D. Khayat, T. Le Chevalier and J. C. Soria (2004). "Chemokine receptor CXCR4 and early-stage non-small cell lung cancer: pattern of expression and correlation with outcome." *Ann Oncol* **15**(4): 613-617.
- Stornaiuolo, M., L. V. Lotti, N. Borgese, M. R. Torrissi, G. Mottola, G. Martire and S. Bonatti (2003). "KDEL and KKXX retrieval signals appended to the same reporter protein determine different trafficking between endoplasmic reticulum, intermediate compartment, and Golgi complex." *Mol Biol Cell* **14**(3): 889-902.
- Tang, X. L., Y. Wang, D. L. Li, J. Luo and M. Y. Liu (2012). "Orphan G protein-coupled receptors (GPCRs): biological functions and potential drug targets." *Acta Pharmacol Sin* **33**(3): 363-371.
- Terlouw, S. A., O. Tanriseven, F. G. Russel and R. Masereeuw (2000). "Metabolite anion carriers mediate the uptake of the anionic drug fluorescein in renal cortical mitochondria." *J Pharmacol Exp Ther* **292**(3): 968-973.
- Thoresen, M. (2011). "Hypothermia after perinatal asphyxia: selection for treatment and cooling protocol." *J Pediatr* **158**(2 Suppl): e45-49.
- Thoresen, M., J. Penrice, A. Lorek, E. B. Cady, M. Wylezinska, V. Kirkbride, C. E. Cooper, G. C. Brown, A. D. Edwards, J. S. Wyatt and et al. (1995). "Mild hypothermia after severe transient hypoxia-ischemia ameliorates delayed cerebral energy failure in the newborn piglet." *Pediatr Res* **37**(5): 667-670.
- Toma, I., J. J. Kang, A. Sipos, S. Vargas, E. Bansal, F. Hanner, E. Meer and J. Peti-Peterdi (2008). "Succinate receptor GPR91 provides a direct link between high glucose levels and renin release in murine and rabbit kidney." *J Clin Invest* **118**(7): 2526-2534.
- Trabold, O., S. Wagner, C. Wicke, H. Scheuenstuhl, M. Z. Hussain, N. Rosen, A. Seremetiev, H. D. Becker and T. K. Hunt (2003). "Lactate and oxygen constitute a fundamental regulatory mechanism in wound healing." *Wound Repair Regen* **11**(6): 504-509.
- Trollmann, R. and M. Gassmann (2009). "The role of hypoxia-inducible transcription factors in the hypoxic neonatal brain." *Brain Dev* **31**(7): 503-509.
- Vadakkadath Meethal, S., M. J. Gallego, R. J. Haasl, S. J. Petras, 3rd, J. Y. Sgro and C. S. Atwood (2006). "Identification of a gonadotropin-releasing hormone receptor orthologue in *Caenorhabditis elegans*." *BMC Evol Biol* **6**: 103.
- Vargas, S. L., I. Toma, J. J. Kang, E. J. Meer and J. Peti-Peterdi (2009). "Activation of the succinate receptor GPR91 in macula densa cells causes renin release." *J Am Soc Nephrol* **20**(5): 1002-1011.
- Varki, A., R. Cummings and J. Esko Chapter 8: N-Glycans. *Essential of Glycobiology*.

- Vassilatis, D. K., J. G. Hohmann, H. Zeng, F. Li, J. E. Ranchalis, M. T. Mortrud, A. Brown, S. S. Rodriguez, J. R. Weller, A. C. Wright, J. E. Bergmann and G. A. Gaitanaris (2003). "The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(8): 4903-4908.
- Vazquez-Tello, A., L. Fan, X. Hou, J. S. Joyal, J. A. Mancini, C. Quiniou, R. I. Clyman, F. Gobeil, Jr., D. R. Varma and S. Chemtob (2004). "Intracellular-specific colocalization of prostaglandin E2 synthases and cyclooxygenases in the brain." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **287**(5): R1155-1163.
- Ventura, C., M. Maioli, G. Pintus, A. M. Posadino and B. Tadolini (1998). "Nuclear opioid receptors activate opioid peptide gene transcription in isolated myocardial nuclei." *J Biol Chem* **273**(22): 13383-13386.
- Voronov, E., D. S. Shouval, Y. Krelin, E. Cagnano, D. Benharroch, Y. Iwakura, C. A. Dinarello and R. N. Apte (2003). "IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(5): 2645-2650.
- Wang, Q., M. van Hoecke, X. N. Tang, H. Lee, Z. Zheng, R. A. Swanson and M. A. Yenari (2009). "Pyruvate protects against experimental stroke via an anti-inflammatory mechanism." *Neurobiol Dis* **36**(1): 223-231.
- Wang, S., J. K. Park and E. J. Duh (2012). "Novel targets against retinal angiogenesis in diabetic retinopathy." *Curr Diab Rep* **12**(4): 355-363.
- Wang, X., J. Matteson, Y. An, B. Moyer, J. S. Yoo, S. Bannykh, I. A. Wilson, J. R. Riordan and W. E. Balch (2004). "COPII-dependent export of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from the ER uses a di-acidic exit code." *J Cell Biol* **167**(1): 65-74.
- Wang, Z. and W. H. Newman (2003). "Smooth muscle cell migration stimulated by interleukin 6 is associated with cytoskeletal reorganization." *J Surg Res* **111**(2): 261-266.
- Warne, T., M. J. Serrano-Vega, J. G. Baker, R. Moukhametzianov, P. C. Edwards, R. Henderson, A. G. Leslie, C. G. Tate and G. F. Schertler (2008). "Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor." *Nature* **454**(7203): 486-491.
- Waters, C. M., B. Saatian, N. A. Moughal, Y. Zhao, G. Tigyi, V. Natarajan, S. Pyne and N. J. Pyne (2006). "Integrin signalling regulates the nuclear localization and function of the lysophosphatidic acid receptor-1 (LPA1) in mammalian cells." *Biochem J* **398**(1): 55-62.
- Watson, P. H., L. J. Fraher, G. N. Hendy, U. I. Chung, M. Kisiel, B. V. Natale and A. B. Hodsman (2000). "Nuclear localization of the type 1 PTH/PTHrP receptor in rat tissues." *J Bone Miner Res* **15**(6): 1033-1044.
- Watson, P. H., L. J. Fraher, B. V. Natale, M. Kisiel, G. N. Hendy and A. B. Hodsman (2000). "Nuclear localization of the type 1 parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor in MC3T3-E1 cells: association with serum-induced cell proliferation." *Bone* **26**(3): 221-225.
- Wenzel-Seifert, K. and R. Seifert (2003). "Critical role of N-terminal N-glycosylation for proper folding of the human formyl peptide receptor." *Biochem Biophys Res Commun* **301**(3): 693-698.

- White, J. H., A. Wise, M. J. Main, A. Green, N. J. Fraser, G. H. Disney, A. A. Barnes, P. Emson, S. M. Foord and F. H. Marshall (1998). "Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor." *Nature* **396**(6712): 679-682.
- Wittenberger, T., H. C. Schaller and S. Hellebrand (2001). "An expressed sequence tag (EST) data mining strategy succeeding in the discovery of new G-protein coupled receptors." *J Mol Biol* **307**(3): 799-813.
- Xin, X., M. Majumder, G. V. Girish, V. Mohindra, T. Maruyama and P. K. Lala (2012). "Targeting COX-2 and EP4 to control tumor growth, angiogenesis, lymphangiogenesis and metastasis to the lungs and lymph nodes in a breast cancer model." *Lab Invest* **92**(8): 1115-1128.
- Yanni, S. E., J. M. Barnett, M. L. Clark and J. S. Penn (2009). "The role of PGE2 receptor EP4 in pathologic ocular angiogenesis." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **50**(11): 5479-5486.
- Yanni, S. E., M. L. Clark, R. Yang, D. P. Bingaman and J. S. Penn (2010). "The effects of nepafenac and amfenac on retinal angiogenesis." *Brain Res Bull* **81**(2-3): 310-319.
- Yao, J. S., W. Zhai, W. L. Young and G. Y. Yang (2006). "Interleukin-6 triggers human cerebral endothelial cells proliferation and migration: the role for KDR and MMP-9." *Biochem Biophys Res Commun* **342**(4): 1396-1404.
- Yi, X. P., A. M. Gerdes and F. Li (2002). "Myocyte redistribution of GRK2 and GRK5 in hypertensive, heart-failure-prone rats." *Hypertension* **39**(6): 1058-1063.
- Yi, X. P., J. Zhou, J. Baker, X. Wang, A. M. Gerdes and F. Li (2005). "Myocardial expression and redistribution of GRKs in hypertensive hypertrophy and failure." *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* **282**(1): 13-23.
- Zerangue, N., B. Schwappach, Y. N. Jan and L. Y. Jan (1999). "A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels." *Neuron* **22**(3): 537-548.
- Zhang, J. H., V. A. Barr, Y. Mo, A. M. Rojkova, S. Liu and W. F. Simonds (2001). "Nuclear localization of G protein beta 5 and regulator of G protein signaling 7 in neurons and brain." *J Biol Chem* **276**(13): 10284-10289.
- Zhang, Y. and Y. Daaka (2011). "PGE2 promotes angiogenesis through EP4 and PKA Cgamma pathway." *Blood* **118**(19): 5355-5364.
- Zheng, H., E. A. Pearsall, D. P. Hurst, Y. Zhang, J. Chu, Y. Zhou, P. H. Reggio, H. H. Loh and P. Y. Law (2012). "Palmitoylation and membrane cholesterol stabilize mu-opioid receptor homodimerization and G protein coupling." *BMC Cell Biol* **13**: 6.
- Zhou, J., H. G. Shin, J. Yi, W. Shen, C. P. Williams and K. T. Murray (2002). "Phosphorylation and putative ER retention signals are required for protein kinase A-mediated potentiation of cardiac sodium current." *Circ Res* **91**(6): 540-546.
- Zhu, H., H. Wang and M. Ascoli (1995). "The lutropin/choriogonadotropin receptor is palmitoylated at intracellular cysteine residues." *Mol Endocrinol* **9**(2): 141-150.
- Zhu, T., F. Gobeil, A. Vazquez-Tello, M. Leduc, L. Rihakova, M. Bossolasco, G. Bkaily, K. Peri, D. R. Varma, R. Orvoine and S. Chemtob (2006). "Intracrine signaling through lipid mediators and their cognate nuclear G-protein-coupled receptors: a paradigm based on PGE2, PAF, and LPA1 receptors." *Can J Physiol Pharmacol* **84**(3-4): 377-391.

Annexe 1: Autres documents

Le 29 janvier 2009



Centre de
Recherche du
CHU Sainte-Justine

*Le centre hospitalier
universitaire mère-enfant*

Pour l'amour des enfants

Université 
de Montréal

Docteur Sylvain Chemtob
Néonatalogie
2^e, bloc 7 (2711)
CHU Ste-Justine

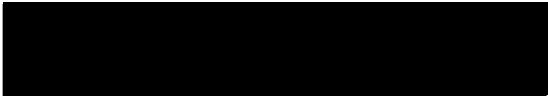
OBJET : GPR91 et succinate: nouveaux médiateurs de l'angiogénèse cérébrale et implications dans la revascularisation post-ischémique.

Docteur,

Suite à la réunion du Comité institutionnel de bonnes pratiques animales en recherche tenue le 8 octobre 2008 votre nouvelle demande a été évaluée et approuvée suite aux modifications apportées. Veuillez prendre note que votre demande a été codifiée **sous le R08-59/Catégorie C.**

Par conséquent, vous êtes autorisé par la Direction du Centre de recherche à poursuivre votre projet pour l'année en cours.

Nous désirons également vous souligner l'importance de toujours indiquer le bon numéro se référant au protocole en titre, dans toute correspondance. Nous demeurons à votre disposition pour toute information complémentaire. Agréez, l'expression de nos sentiments les meilleurs.


Lucie Martinelli, Agent de gestion
Secrétariat du CIBPAR/A933
/lm

p.j.: Certificat de bons soins aux animaux
c.c. : Dr Xin Hou

**COMITÉ INSTITUTIONNEL DE BONNES PRATIQUES ANIMALES EN RECHERCHE
CERTIFICAT DE BONS SOINS AUX ANIMAUX**

**INSTITUTIONAL COMMITTEE FOR ANIMAL CARE IN RESEARCH
CERTIFICATION OF ANIMAL CARE**

CHERCHEUR PRINCIPAL/PRINCIPAL INVESTIGATOR: *DR SYLVAIO CHEMTOB*

SERVICE/DEPT.: *NÉONATOLOGIE* **CHU SAINTE-JUSTINE (Centre de recherche)**

TITRE DE LA DEMANDE DE SUBVENTION/TITLE OF GRANT APPLICATION:

LRP and succinate: novel mediators of brain neovascularization.

Le Comité institutionnel de bonnes pratiques animales en recherche, ayant reçu le protocole relatif à la demande de subvention à l'organisme : IRSC/CIHR pour le projet susmentionné, concernant le soin et le traitement des animaux, a examiné les méthodes d'expérimentation proposée. Le Comité atteste, conjointement avec le candidat, que les animaux utilisés aux fins de ces travaux seront traités conformément aux principes énoncés dans les publications intitulées "Utilisation des animaux de laboratoire/ Procédures standards" Fév. 91.

The Institutional Committee for Animal Care in Research, having received the IRSC/CIHR grant application to support the above-named project, on matters relating to animal care and treatment, examines the experimental procedures proposed. It certifies, with the applicant, that the care and treatment of animals used will be in accordance with the principles published in the Canadian Council on Animal Care's "Guide to the Care and Use of Experimental Animals" Feb. 91.

En outre, le Comité examine et approuve les points de la proposition qui ont trait au soin et au traitement des animaux, ainsi que les méthodes d'expérimentation proposées avant qu'elles ne soient entreprises par le candidat. Cette façon de procéder s'applique au cours de la période entière des travaux de recherche.

Furthermore, all matters arising from this proposal that relate to animal care and treatment, and all experimental procedures proposed for use with animals are reviewed and approved by the Committee before they are initiated or undertaken by the applicant. This review process is ongoing on a regular basis during the entire period that the research is being undertaken.

Candidat(e)/Applicant - Signature

8 OCT. 2008

Date d'approbation / Date of approval

Caroline Allen, Ph.D., Présidente du Comité institutionnel de bonnes pratiques animales en recherche / Chairperson of the Institutional Committee for Animal Care in Research

L'institution (CHU Sainte-Justine) atteste qu'elle veillera à l'observation de ces lignes directrices./The institution (Ste. Justine Hospital) certifies that it will monitor adherence to these guidelines.

CHU SAINTE-JUSTINE/Centre de recherche, 3175 Chemin Côte Ste-Catherine, Montréal, Québec H3T 1C5 - Tél./Tel.: (514) 345-4691 FAX: (514) 345-4801

CIBPAR/lm
2008

**COMITÉ INSTITUTIONNEL DE BONNES PRATIQUES ANIMALES EN RECHERCHE
CERTIFICAT DE BONS SOINS AUX ANIMAUX**

**INSTITUTIONAL COMMITTEE FOR ANIMAL CARE IN RESEARCH
CERTIFICATION OF ANIMAL CARE**

CHERCHEUR PRINCIPAL/PRINCIPAL INVESTIGATOR: Sylvain Chemtob

SERVICE/DEPT.: Néonatalogie

CHU SAINTE-JUSTINE (Centre de recherche)

**TITRE DE LA DEMANDE DE SUBVENTION/TITLE OF GRANT APPLICATION:
GPR91 et succinate: nouveaux médiateurs de l'angiogénèse cérébrale et implications dans
la revascularisation post-ischémique**

Le Comité institutionnel de bonnes pratiques animales en recherche, ayant reçu le protocole relatif à la demande de subvention à l'organisme : CIHR pour le projet susmentionné, concernant le soin et le traitement des animaux, a examiné les méthodes d'expérimentation proposée. Le Comité atteste, conjointement avec le candidat, que les animaux utilisés aux fins de ces travaux seront traités conformément aux principes énoncés dans les publications intitulées "Utilisation des animaux de laboratoire/ Procédures standards" Fév. 91.

The Institutional Committee for Animal Care in Research, having received the protocol relevant to **agency's**: CHIR grant application to support the above-named project, on matters relating to animal care and treatment, examines the experimental procedures proposed. It certifies, with the applicant, that the care and treatment of animals used will be in accordance with the principles published in the Canadian Council on Animal Care's "Guide to the Care and Use of Experimental Animals" Feb. 91.

En outre, le Comité examine et approuve les points de la proposition qui ont trait au soin et au traitement des animaux, ainsi que les méthodes d'expérimentation proposées avant qu'elles ne soient entreprises par le candidat. Cette façon de procéder s'applique au cours de la période entière des travaux de recherche.

Furthermore, all matters arising from this proposal that relate to animal care and treatment, and all experimental procedures proposed for use with animals are reviewed and approved by the Committee before they are initiated or undertaken by the applicant. This review process is ongoing on a regular basis during the entire period that the research is being undertaken.

Candidat(e)/Applicant - Signature

7 OCT. 2009

Date d'approbation / Date of approval

Caroline Alfieri, Présidente du Comité institutionnel de bonnes pratiques animales en recherche / Chairperson of the Institutional Committee for Animal Care in Research

L'institution (CHU Sainte-Justine) atteste qu'elle veillera à l'observation de ces lignes directrices./The institution (Ste. Justine Hospital) certifies that it will monitor adherence to these guidelines.

HÔPITAL SAINTE-JUSTINE/Centre de recherche, 3175 Chemin Côte Ste-Catherine, Montréal, Québec H3T 1C5 - Tél./Tel.: (514) 345-4691 FAX: (514) 345-4801

CIBPAR/Im
2008



Centre de
Recherche du
CHU Sainte-Justine

*Le centre hospitalier
universitaire mère-enfant*

Pour l'amour des enfants

Université 
de Montréal

Le 11 décembre 2009

Docteur Sylvain Chemtob
Néonatalogie
2^e, bloc 7 (2709)
CHU Ste-Justine

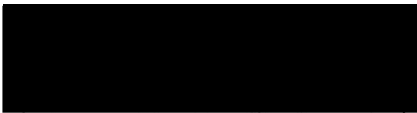
OBJET : Rôle du GPR91 dan la revascularisation post-ischémique

Docteur,

Suite à la réunion du Comité institutionnel de bonnes pratiques animales en recherche tenue le 7 octobre 2009 votre nouvelle demande a été évaluée et approuvée suite aux modifications apportées. Veuillez prendre note que votre demande a été codifiée **sous le ST09-52/Catégorie D.**

Par conséquent, vous êtes autorisé par la Direction du Centre de recherche à débiter votre projet pour l'année en cours.

Nous désirons également vous souligner l'importance de toujours indiquer le bon numéro se référant au protocole en titre dans toute correspondance. Nous demeurons à votre disposition pour toute information complémentaire. Agréez, l'expression de nos sentiments les meilleurs.


Lucie Martinelli, Agent de gestion à l'éthique
Secrétariat du CIBPAR/A933

p.j.: Certificat de bons soins aux animaux.
c.c. : M. David Hamel

From: **NPG**
Subject: Academic download privilege
Date: 6 August, 2013 4:44:03 AM EDT
To: David Hamel
Reply-To: [REDACTED]

Hide

Dear, David Hamel

We hope you found our service helpful. We are keen to maintain it and would be pleased if you would consider making a donation at <http://www.npg.org.uk/support/donation/general-donation.php> to help cover the Gallery's costs of supporting academic work.

Asset reference number: 77

Caption: John Hunter

Credit line: © National Portrait Gallery, London

Artist: John Jackson

Sitter: John Hunter

Project title: David Hamel's thesis

Name, address and other details of support organization or project publisher: Picture to be included in David Hamel's PhD thesis in Pharmacology at the Université de Montréal (Québec, Canada).

Date of publication/project launch: 2013

Licence title: Thesis

Licence description: This **Academic Licence** entitles you to reproduce this image within a thesis document submitted by you – a student at an educational establishment – and to store an electronic version of the research online as long as it is made available online at no cost to the end user. It confers no further rights, and is made on condition that you will caption this image with the name of the artist and the title of the portrait, and credit it: '© National Portrait Gallery, London', and that you will not pass it on for third-party use, crop, change or manipulate it or use it in any way which is unlawful or deceptive or which damages the good name or reputation of the National Portrait Gallery, the artist or the persons depicted in the image.

Regards

Rights & Images Department
National Portrait Gallery,
St Martin's Place, London WC2H 0HE, UK