



HAL
open science

Rôle antitumoral de l'orexine A et des ligands biaisés dans les cancers digestifs : Impact sur le trafic intracellulaire d'OX1R

Stéphanie Dayot

► **To cite this version:**

Stéphanie Dayot. Rôle antitumoral de l'orexine A et des ligands biaisés dans les cancers digestifs : Impact sur le trafic intracellulaire d'OX1R. Biologie cellulaire. Université Sorbonne Paris Cité, 2018. Français. NNT : 2018USPCC301 . tel-02883523

HAL Id: tel-02883523

<https://theses.hal.science/tel-02883523>

Submitted on 29 Jun 2020

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

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

Thèse de doctorat

de l'Université Sorbonne Paris Cité

Préparée à l'Université Paris Diderot

Ecole doctorale 562 Bio Sorbonne Paris Cité

INSERM U1149 CRI/Equipe Paradis-Couvineau

Rôle antitumoral de l'orexine A et des ligands biaisés dans les cancers digestifs

Impact sur le trafic intracellulaire d'OX1R

Par Stéphanie Dayot

Thèse de doctorat de Biologie Cellulaire et Moléculaire

Dirigée par Alain Couvineau

Présentée et soutenue publiquement à la faculté de médecine Xavier Bichat, Université Paris
Diderot, Paris, France, le vendredi 16 Novembre 2018 à 14h

Président du jury : Lévy Philippe, Professeur, Université Paris Diderot

Rapporteurs : Fouassier Laura, Docteur, Sorbonne universités

Rapporteurs : Iturrioz Xavier, Docteur, Collège de France

Examineur : Jarry Anne, Docteur, Université de Nantes

Directeur de thèse : Couvineau Alain, Docteur, Université Paris Diderot



*« On n'a pas le droit de se décourager :
Quand le vin est tiré, il faut le boire. »
George Sand*

A mon papa,

Remerciements

*Je souhaite, tout d'abord, remercier l'ensemble des membres de mon jury pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse. Je remercie tout particulièrement le **Professeur Philippe Lévy** d'avoir accepté de présider mon jury de thèse et je remercie très chaleureusement les **Docteurs Anne Jarry, Laura Fouassier** et **Xavier Iturrioz** pour leurs remarques et l'attention qu'ils ont porté à mon travail de thèse ainsi que pour leur participation à mon jury de thèse.*

*Mes travaux de thèse ont été effectués à l'Université Paris Diderot, au sein du Centre de Recherche sur l'inflammation (CRI) dans l'équipe intitulée "De l'inflammation au cancer dans les maladies digestives », dirigée par le **Professeur Valérie Paradis** et le **Docteur Alain Couvineau**. Je leur suis reconnaissante de m'avoir accueillie au sein de l'équipe et je remercie plus particulièrement **Alain Couvineau** pour son encadrement et ses conseils scientifiques. Je voudrais également le remercier de m'avoir donné l'opportunité de présenter mes travaux de thèse lors de différents congrès nationaux et internationaux et ainsi de m'avoir permis de prendre confiance en moi à l'oral. Les débriefings de ces journées autour d'un verre ont toujours été très agréable et nous ont permis d'apprendre à nous connaître sous des jours différents.*

*Je tiens à remercier également **Thierry Voisin**. Merci pour tes nombreuses questions scientifiques qui m'ont toujours poussé à aller chercher plus loin. Avec toi l'histoire des orexines ainsi que celle de certaines techniques deviennent vivantes grâce à ton sens de la pédagogie. Ces quatre années dans l'équipe ont également été rythmées par nos échanges sur nos multiples centres d'intérêt. Heureuse d'avoir contribué aux choix du nom de tes tortues Franklin et Séraphine.*

*Je voudrais remercier **Pascal Nicole** avec qui j'ai partagé le bureau pendant ces trois années, pour son compagnonnage dans le monde de la culture cellulaire et de la radioactivité. Merci d'avoir été là pour m'aider à relier ma thèse un peu dans l'urgence.*

*Je remercie très chaleureusement **Valérie Gratio** (Valou) pour tout! J'ai appris énormément de choses à tes côtés, l'élaboration de protocole avec la connaissance de l'importance de chaque étape, l'anticipation des expériences, la rigueur technique et scientifique... Je ne pourrais jamais tout citer. Je te suis reconnaissante d'avoir toujours été là pour m'écouter, me botter les fesses quand il le fallait (il a fallu le faire plus d'une fois !!) ou me remonter le moral. Tu as été une personne déterminante vis-à-vis des décisions que j'ai prises au cours de ces quatre ans à Bichat. Je te remercie également pour tout ce que tu as fait pour que ce manuscrit voit le jour. Ton grand âge y est sûrement pour quelque chose (oups, j'étais obligée). Merci pour toutes ces conversations qui m'ont fait grandir et qui m'ont amenée à voir les choses différemment et avec plus de recul.*

Je voudrais également remercier des anciens de l'équipe qui sont maintenant devenus des amis. Merci à tous de toujours être partant pour un verre avec le nain de jardin... ou plus, pour décompresser les

soirs après le travail! (Ce qui n'est pas toujours la meilleure idée...) Merci à **Elise** (pour ta relecture des remerciements et pour la pose du DIU), à **Nassima** (pour toutes ces discussions dans le bureau et comme tu dirais « DTC les remerciements »), DE **Paulin** ou Paupau (pour le surnom dont tu m'as affublé et pour la fameuse règle du « de », tu es fière de moi hein !), à **Stéphanie** (pour ton aide sur l'introduction et pour avoir un aussi beau prénom !) et plus particulièrement à toi, **Gwendoline** (Gwendo). Merci pour tout ! Merci d'avoir été là, lors des dernières semaines d'écriture du manuscrit, de m'avoir soutenue pendant tous ces longs week-end à Bichat car soyons honnêtes ce manuscrit n'aurait pas été envoyé à temps sans ton aide. Merci également pour ces deux ans que tu as passés au sein du laboratoire, durant lesquels tu as toujours été une amie sur qui je pouvais compter pour les soucis liés au travail ou plus personnel. Merci également de me suivre dans l'ensemble de mes idées qu'elles soient bonnes ou moins bonnes lors de toutes nos virées ensemble (1h de marche avec un sac de piscine). Je suis heureuse d'avoir pu faire ta connaissance et de pouvoir te compter parmi mes meilleures amies et juste pour le fun « ça c'est sûr ce n'est pas le récepteur OX1 ».

Je remercie également le groupe de Beaujon et plus particulièrement, **Samira** et **Jérôme** avec qui nous avons eu la bonne idée de commencer cette aventure de thèse en même temps. Bon courage à vous, c'était sympa d'avoir des compères partageant la même expérience que moi au sein de l'équipe.

Je remercie également les trois étudiants **Ivan**, **Lorenzo** et **Laurine**, que j'ai encadré pendant ma thèse. Ce fut un plaisir de travailler avec vous, j'espère que vous garderez un bon souvenir de votre premier stage. En tout cas, je suis contente de vous avoir connu et je vous souhaite le meilleur pour la suite.

Je voudrais remercier deux personnes du CRI qui ont beaucoup d'importance pour moi, **Grégory** (Greg ou Gregounet) et **Nathalie**. Ce fut un réel plaisir de partager tous ces trajets du matin et/ou du soir avec vous ainsi que toutes les discussions qui en découlaient. Merci Greg pour toutes tes blagues (drôles... ou pas !!), même si je répète en boucle « tu me fatigues », tu sais que je t'apprécie beaucoup et franchement Bichat sans toi, ça n'aurait pas été la même chose.

Je remercie également **Samira Benadda** et **Loredana Saveanu** pour votre aide précieuse, technique et scientifique, lors de l'établissement de mon troisième projet de thèse.

Je voudrais remercier également tout le personnel de l'animalerie, pour toutes les connaissances que vous m'avez apporté sur l'expérimentation animale et plus particulièrement **Yannis** que j'ai embêté dès mes premiers jours à Bichat et surtout pour cette fameuse chute qui nous permet encore de rire trois ans après.

Je remercie aussi toute l'équipe administrative, notamment **Franck**, **Milène** et **Pascale** qui me suivent depuis mon arrivée à Bichat entre la mise en place de mon contrat d'assistante ingénieure et le contrat de thèse. Je les remercie pour le temps qu'ils ont consacré à répondre à toutes mes questions. Je remercie l'ensemble du personnel du CRI qui ont fait que chaque jour soit différent et enrichissant.

*Je remercie également tous mes amis de m'avoir soutenue pendant ces trois ans et d'être présents dans les événements importants de ma vie. Merci à **Elsa** (Patate), **Marie, Marie-Axelle** (Maxou) et **Nolwenn**. Vous êtes des filles exceptionnelles et je suis très heureuse de vous avoir dans ma vie. Merci également à **Antoine, Charlène** (Merci beaucoup pour ta relecture), **Elodie, François, Gautier, Gwenola, Jérémy, Justine, Layla, les filles de Vitré, Mélissa, Pauline, Véronique** et **tous les +1**. Je ne peux citer tout le monde mais sachez que vous jouez tous un rôle dans ma vie et je suis très heureuse que vous en fassiez partie.*

*Je voudrais dire quelques mots sur les mariages et la naissance qui ont rythmé ma dernière année de thèse. Donc félicitations à vous, **Marylise et Lucas, Nassima et Sarandi** et **Nolwenn et Thibault** pour vos mariages, je vous souhaite à tous beaucoup de bonheur. Et félicitations à vous **Gwenola et Sylvain** pour la naissance de votre petit **Lucas**.*

*Je voudrais également remercier toute ma famille que ce soit **mon frère** et **ma belle-sœur, mes nièces, ma grand-mère, mes oncles** et **tantes** et **mes cousins** de m'avoir toujours soutenue dans mes décisions et pour m'avoir rendue visite sur Paris, c'est toujours un plaisir de vous voir.*

*Je voudrais terminer cette partie en remerciant la personne la plus importante à mes yeux, **ma mère**. Merci maman d'avoir toujours été là pour moi, de m'avoir fait devenir la personne que je suis aujourd'hui. Je n'aurais jamais pu en être là, à écrire ces quelques mots, si tu n'avais pas cru en moi et si tu ne m'avais pas encouragée dans mes choix. Je suis très fière de t'avoir comme maman, tu es un modèle pour moi, tu as une force de caractère que j'aimerais avoir, tu as su être présente pour moi malgré des événements difficiles à vivre. Alors pour tout cela je te remercie.*

*Tout simplement merci à tous,
Stéphanie (ou un de mes nombreux surnoms
Steph, Stouffy, Stephou, Stu, Patate ou Pioupioutte)*

Rôle antitumoral de l'orexine A et des ligands biaisés dans les cancers digestifs

Impact sur le trafic intracellulaire d'OX1R

Les orexines sont des neuropeptides hypothalamiques qui possèdent deux isoformes, A et B (OxA et OxB, respectivement). Elles vont interagir avec deux sous-types de récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), OX1R et OX2R. Une fois activés, ces deux récepteurs induisent la mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire *via* la protéine Gq. Au sein de l'équipe où j'ai effectué ma thèse, il a été clairement montré que le système orexines/OX1R avait des propriétés anti-tumorales dans certains cancers dont le cancer du côlon. Il a été montré que l'OxA mais aussi l'OxB induisait une apoptose mitochondriale *via* OX1R. Ces résultats signifient que le système orexines/OX1R représente une cible potentielle dans le traitement du cancer du côlon.

Mon premier objectif de thèse a été d'étudier le rôle des orexines et en particulier de l'OxA sur l'adénocarcinome canalaire du pancréas (PDAC) chez l'Homme. Ces travaux m'ont permis de montrer qu'OX1R était exprimé dans 96 % des PDAC testés. De plus, j'ai montré qu'OX1R était exprimé précocement dans les lésions pré-cancéreuses (PanIN). J'ai démontré que la lignée cellulaire humaine de PDAC, la lignée AsPC-1 exprimait OX1R et que l'OxA était capable d'induire une apoptose mitochondriale comparable à celle observée dans les cancers du côlon. Enfin contre toute attente, j'ai montré que l'almorexant, un antagoniste de type DORA (Dual Orexin Receptor Antagonist) avait des propriétés antitumorales identique à l'OxA, l'agoniste naturel d'OX1R. Les résultats inattendus de l'almorexant vis-à-vis de ses propriétés anti-tumorales m'ont interpellée et ont ainsi déterminé l'axe de mon deuxième objectif. J'ai donc voulu savoir si cet effet était uniquement lié au PDAC ou s'il était plus largement dans d'autres cancers. Pour cela j'ai étudié l'effet de l'almorexant dans des lignées cellulaires dérivées d'adénocarcinomes coliques humains, les lignées HT-29 et LoVo. De plus, en collaboration avec le groupe de B. Robert nous avons développé, par une stratégie de « phage display », un anticorps agoniste dont j'ai montré qu'il mimait les effets de l'OxA sur les mêmes lignées cellulaires. Mon troisième objectif a été d'étudier les phénomènes d'internalisation d'OX1R sous l'action d'OxA et son devenir intracellulaire par des approches de microscopie confocale et d'analyse d'images. En effet, à ce jour peu, pour ne pas dire rien n'est connu. Plusieurs marqueurs de vésicules associées à l'internalisation des protéines ont été utilisés. Bien entendu, à la vue des effets inattendus, de l'almorexant, il me paraissait important d'étudier son impact sur ces phénomènes de régulation.

Pour conclure, le récepteur OX1 est une cible potentielle pour le traitement thérapeutique des adénocarcinomes humains du côlon et du pancréas. De plus, la mise en évidence que l'almorexant et l'anticorps C2 miment les effets proapoptotiques et antitumoraux de l'OxA, représente une très bonne alternative au peptide naturel dont les inconvénients en terme de stabilité et d'administration peuvent représenter un frein dans son utilisation thérapeutique éventuelle. De plus, l'expression membranaire du récepteur OX1 au sein de la cellule et son devenir sont différentes en fonction du ligand. Ces données ont donc un intérêt d'un point de vue thérapeutique car l'almorexant comme l'anticorps C2 permettent au récepteur OX1 de rester exprimé à la surface cellulaire et ainsi d'être disponible pour son activité proapoptotique.

Mots clés : Orexine A, OX1R, Cancer du pancréas, Cancer du côlon, RCPG, Almorexant, internalisation, apoptose, antitumoral, antagoniste

Antitumoral effect of orexin A and biased ligands in digestive cancers

Impact on intracellular trafficking of OX1R

Orexins are hypothalamic neuropeptides, which have two isoforms, A and B (OxA and OxB, respectively). They interact with two G protein-coupled receptor (GPCR) subtypes, OX1R and OX2R. Once activated, these two receptors induce the mobilization of intracellular Ca^{2+} via the Gq protein. In the team, where I began my PhD, it was clearly shown that the orexins/OX1R system had anti-tumor properties in some cancers including colon cancer (Voisin et al., 2011). It showed that OxA but also OxB induce mitochondrial apoptosis via OX1R. These results mean that the orexins/OX1R system represents a potential target in the treatment of colon cancer.

My first objective was to study the role of orexins and in particular OxA on pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) in human. This work showed that OX1R expressed in 96 % of PDACs tested. In addition, I have shown that OX1R expressed early in pre-cancerous lesions (PanIN). I have demonstrated that the PDAC-derived human cell line, the AsPC-1 line, expressed OX1R, and that OxA was able to induce mitochondrial apoptosis comparable to that observed in colon cancers (Voisin et al. 2011). Finally, surprisingly, my results show that almorexant, a DORA antagonist, has antitumor properties identical to OxA, the natural agonist of OX1R. The unexpected results of the almorexant with regard to its anti-tumor properties challenged me and thus determined the axis of my second objective. Therefore, I wanted to know if this effect only related to the PDAC or if it was more widely effective in other cancers in particular colon cancer. For this, I studied the effect of almorexant in cell lines derived from human colon adenocarcinoma, lines HT-29 and LoVo. In addition, in collaboration with B. Robert's group (CRCM, INSERM U1194, Montpellier) we have developed, by a "phage display" strategy, an agonist antibody that mimicked the effects of OxA on the same cancer cells. My third objective was to study the phenomena of OX1R internalization under the action of OxA and its intracellular traffick by confocal microscopy and images analysis approaches. Indeed, so far, little or nothing known. Several vesicle markers associated with the internalization of proteins used. Of course, in view of the almorexant unexpected effects, it seemed important for me to study its impact on the regulation.

To conclude, the OX1 receptor is a potential target for the therapeutic treatment of human adenocarcinoma of the colon and pancreas. In addition, the demonstration that almorexant and the C2 antibody mimic the proapoptotic and antitumor effects of OxA represents a very good alternative to the natural peptide whose disadvantages in terms of stability and administration may represent a brake in its possible therapeutic use. In addition, the membrane expression of the OX1 receptor within the cell and its fate is different depending on the ligand. These data are therefore of interest for a therapeutic point of view because the almorexant as the antibody C2 allow the OX1 receptor to stay expressed on the cell surface and thus to be available for its proapoptotic activity.

Keywords: Orexin A, OX1R, pancreas cancer, colon cancer, GPCR, Almorexant, internalization, apoptosis, antitumoral, antagonist

Table des matières

REMERCIEMENTS	3
TABLE DES MATIERES	8
TABLE DES FIGURES	13
TABLE DES ABREVIATIONS	14
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	16
I. LES CANCERS DIGESTIFS : CANCERS DU COLON ET DU PANCREAS	17
A. Généralités sur les cancers	17
1. Les caractéristiques des cellules cancéreuses	17
a. Maintien de la prolifération	17
b. Inhibition de l'activité des suppresseurs de tumeur	19
c. Résistance à la mort cellulaire	20
d. Immortalité réplivative	20
e. Angiogenèse	21
f. Invasión et métastases	22
2. Le microenvironnement tumoral	23
B. Le cancer du côlon	26
1. Classification	26
2. Tumorigénèse	27
3. Incidence	29
4. Dépistage	30
5. Symptômes et diagnostic	30
a. Les analyses biologiques	31
b. La tomodensitométrie thoraco-abdomino-pelvienne	31
c. L'imagerie par résonance magnétique (IRM)	31
6. Traitements	31
a. La chirurgie	32
b. La chimiothérapie	32
c. Les thérapies ciblées	33
d. Les effets secondaires de ces traitements	34
C. Le cancer du pancréas	35
1. Classification	35
2. Tumorigénèse	36
3. Incidence	37
4. Symptômes et diagnostic	38
a. Les signes cliniques	38
b. Les marqueurs tumoraux sériques	38
c. Une échographie abdominale	39

d.	Une tomодensitométrie thoraco-abdomino-pelvienne	39
e.	Une imagerie par résonance magnétique (IRM)	39
f.	L'écho-endoscopie avec biopsies	39
g.	Biopsie d'une métastase	39
5.	Traitements	40
a.	La chirurgie	40
b.	Le traitement endoscopique	41
c.	La chimiothérapie	41
d.	La radiothérapie	42
e.	Les effets secondaires	42
II.	LES RECEPTEURS COUPLES AUX PROTEINES G	44
A.	<i>Structure des RCPG</i>	44
1.	Classe A : « rhodopsin-like » récepteurs	45
2.	Classe B : « secretin-like » récepteurs	45
3.	Classe C : « metabotrope-glutamate/pheromone » récepteurs	46
4.	Autres classes D, E, F	46
B.	<i>Structure moléculaire des RCPG</i>	47
C.	<i>Transduction du signal par les protéines G</i>	49
1.	Les protéines G	49
2.	Couplage des protéines G aux récepteurs	50
3.	Activation des protéines G	50
4.	Effecteurs des protéines G	51
D.	<i>Régulation de l'expression membranaire des récepteurs couplés aux protéines G</i>	52
1.	Désensibilisation	52
2.	Mécanismes de l'internalisation dépendante des β -arrestines	54
a.	Interaction des β -arrestines avec la clathrine et AP-2	54
b.	Différentes voies d'endocytose	55
c.	Régulation des β -arrestines	55
3.	Devenir des RCPG après l'internalisation	56
a.	Vers les voies de dégradation	56
b.	Vers les voies de recyclage	57
c.	Tri cellulaire : marqueurs et acteurs	58
III.	LES OREXINES : DES NEUROPEPTIDES HYPOTHALAMIQUES	59
A.	<i>Découvertes des orexines/hypocrétines</i>	59
B.	<i>Les récepteurs aux orexines</i>	62
C.	<i>Pharmacologie des récepteurs aux orexines</i>	64
1.	Molécules antagonistes des récepteurs aux orexines	65
a.	Antagonistes d'un seul des deux types de récepteurs aux orexines	65
b.	Antagonistes des deux récepteurs aux orexines	65
2.	Molécules agonistes des récepteurs aux orexines	66

<i>D. Rôle physiologique au niveau du système nerveux central</i>	67
1. Régulation du sommeil.....	68
a. Orexines et cycle veille/sommeil.....	68
b. Orexines et état d'éveil	69
c. Orexines et narcolepsie.....	70
2. Rôle des orexines dans la régulation de la prise alimentaire, l'obésité et l'homéostasie énergétique.....	71
3. Relation du système orexine avec le système de récompense	73
<i>E. Rôles des orexines dans les tissus périphériques</i>	75
1. Les tissus adipeux.....	75
2. Le pancréas	76
3. Le système reproducteur mâle	77
4. Le tractus gastrointestinal.....	78
5. Le système cardiovasculaire.....	79
<i>F. Cascade de signalisation des récepteurs aux orexines</i>	80
IV. RECEPTEURS COUPLES AUX PROTEINES G NEUROPEPTIDERGIQUES ET CANCERS	82
V. CANCERS ET OREXINES	83
<i>A. Cancers du côlon</i>	83
1. Effets biologiques.....	83
2. Mécanismes	84
<i>B. Cancers du pancréas</i>	86
<i>C. Cancers de la prostate</i>	86
<i>D. Cancers du cerveau</i>	87
<i>E. Cancers du tissu nerveux</i>	87
<i>F. Cancers gastriques</i>	87
<i>G. Cancers gynécologiques</i>	87
1. Cancers de l'endomètre	87
2. Cancers du col de l'utérus	88
3. Cancers du sein	88
4. Cancers des ovaires.....	88
<i>H. Cancer de la glande surrénale</i>	88
1. Le cortex surrénal.....	88
2. La médullosurrénale.....	89
<i>I. Cancers du foie</i>	89
<i>J. Cancers des cellules hématopoïétiques</i>	89
OBJECTIFS DE LA THESE	91
RESULTATS EXPERIMENTAUX	92

PARTIE I : DEMONSTRATION <i>IN VITRO</i>, <i>IN VIVO</i> ET <i>EX VIVO</i> DE L'EFFET ANTITUMORAL DE L'OREXINE A/HYPOCRETINE 1 ET DE L'ALMOREXANT DANS L'ADENOCARCINOME CANALAIRE DU PANCREAS.....	93
I. PREAMBULE.....	94
PARTIE II : L'ALMOREXANT ET L'ANTICORPS « C2 » MIMENT LES PROPRIETES ANTITUMORALES DE L'OREXINE A DANS L'ADENOCARCINOME HUMAIN DU COLON	96
I. INTRODUCTION.....	97
II. MATERIEL ET METHODES.....	98
A. <i>Culture de lignées cellulaires</i>	98
B. <i>Mobilisation du calcium intracellulaire</i>	98
C. <i>Croissance cellulaire</i>	99
D. <i>Quantification des cellules apoptotiques par marquage à l'annexine V</i>	99
E. <i>Détection des caspases 3 et 7 activées</i>	99
F. <i>Effet anti-tumoral chez la souris nude xénogreffée</i>	99
III. RESULTATS.....	100
A. <i>Effets de l'almorexant in vitro et in vivo</i>	100
B. <i>Effets du C2 in vitro et in vivo</i>	102
IV. DISCUSSION	105
PARTIE III : LE ROLE ANTITUMORAL DE L'OX1R, L'ALMOREXANT ET L'ANTICORPS C2 : IMPACT SUR L'INTERNALISATION D'OX1R	107
I. INTRODUCTION.....	108
II. MATERIEL ET METHODES.....	109
A. <i>Culture de lignées cellulaires</i>	109
B. <i>Traitement cellulaire</i>	109
C. <i>Microscopie</i>	109
III. RESULTATS.....	110
A. <i>Effet de l'orexine A sur la régulation de l'expression membranaire du récepteur OX1</i>	110
B. <i>Effet de l'almorexant sur la régulation de l'expression membranaire du récepteur OX1</i> ...	111
C. <i>Effet de l'anticorps C2 sur la régulation de l'expression membranaire du récepteur OX1</i> ..	112
D. <i>Comparaison des résultats en fonction de l'effet maximum de l'orexine A</i>	113
IV. DISCUSSION	114
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	117
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	126

I. PUBLICATIONS	126
II. ENCADREMENTS	126
III. PRESENTATIONS EN CONGRES.....	126
AUTRES PUBLICATIONS.....	128
PARTIE IV : L'EXPRESSION ECTOPIQUE D'OX1R DANS LA RECTOCOLITE HEMORRAGIQUE INDUIT UN EFFET ANTI-INFLAMMATOIRE DE L'OREXINE-A	129
I. PREAMBULE	130
PARTIE V : LES PROPRIETES ANTITUMORALES DES NEUROPEPTIDES HYPOTHALAMIQUES OREXINES/HYPOCRETINES : UN ROLE THERAPEUTIQUE INATTENDU	132
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	133

Table des Figures

- Figure 1 : Schéma des voies de signalisation impliquées dans les cellules cancéreuses**
- Figure 2 : Schéma du microenvironnement tumoral**
- Figure 3 : Schéma des différents stades d'évolution du cancer du côlon**
- Figure 4 : Voies moléculaires impliquées dans la carcinogenèse colorectale**
- Figure 5 : Les différentes phases conduisant à la néoplasie intraépithéliale pancréatique**
- Figure 6 : Ensemble des gènes altérés dans le cancer du pancréas.**
- Figure 7 : Structure schématique générale des récepteurs couplés aux protéines G**
- Figure 8 : Les différentes classes A à C de récepteurs couplés aux protéines G**
- Figure 9 : Structure cristallographiée de la rhodopsine**
- Figure 10 : Structure cristallographiée du récepteur β -2 adrénergique avec le lysosyme T4**
- Figure 11 : Cycle d'activation des protéines G**
- Figure 12 : Modèle de l'internalisation d'un récepteur couplé aux protéines G**
- Figure 13 : Les principales Rab GTPase impliquées dans la régulation des RCPG**
- Figure 14 : Structure des orexines A et B**
- Figure 15 : Représentation structurale du récepteur aux orexines de type 1**
- Figure 16 : Structure cristallographiée d'OX2R en présence du Suvorexant**
- Figure 17 : Différents antagonistes des récepteurs aux orexines et leurs effets biologiques**
- Figure 18 : Entrée et sortie des neurones à orexine**
- Figure 19 : Les cycles du sommeil**
- Figure 20 : Effets des orexines dans les tissus périphériques**
- Figure 21 : Résumé schématique de certaines des relations des cascades de signalisation du récepteur OX1 humain dans les Cellules Ovariennes de Hamster chinois (CHO)**
- Figure 22 : Effets biologiques des orexines dans les cellules cancéreuses**
- Figure 23 : Motifs ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motifs) et ITSM pour (immunoreceptor tyrosine-based switch motif)**
- Figure 24 : Mécanisme de l'apoptose induit par OX1R**

Table des abréviations

5-FU : fluorouracile	EGFR : récepteurs du facteur de croissance épidermique
AC : adénylate cyclase	ER : réticulum endoplasmique
ACE : antigène carcino-embryonnaire	ERK-1/ERK-2 : extracellular signal-regulated kinases
ADN : acide désoxyribonucléique	ESCRT : endosomal sorting complex required for transport
ADNc : acides désoxyribonucléiques complémentaires	FDA : Food and Drug Administration
AgRP : agouti-related protein	FOLFIRI : irinotécan + LV5FU2
AMPc : adénosine monophosphate cyclique	FOLFOX : LV5FU2 + oxaliplatine ou Eloxatine®
ANSM : agence nationale de santé et du médicament	GABA : acide gamma-aminobutyrique
Apaf-1 : apoptotic peptidase activating factor 1	GASP : GPCR-associated sorting protein
APC : polyposes adénomateuses	GDP : guanosine diphosphate
Akt : protéine kinase B (PKB)	GEF : facteur d'échange du nucléotide guanine
ARN : acides ribonucléiques	GHRH : growth hormone releasing hormone
ARNm : acides ribonucléiques messagers	GIP : gastric inhibitory polypeptide
AsPC-1 : lignée cellulaire d'adénocarcinome humain du pancréas	GLP-1R / GLP-2R : glucagon like peptide 1/2
ATCC : american type culture collection	GMP : guanosine monophosphate
ATU : autorisation temporaire d'utilisation	GPAv : substance grise périaqueducule ventrale
ATV : aire tegmentale ventrale	GTP : guanosine triphosphate
β 2AR : récepteur β 2-adrénérique	GTPase : guanosine triphosphatase
BiFC : bimolecular fluorescence complementation	GRK : G protein coupled receptor kinases
BRET : bioluminescence resonance energy transfer	H8 : huitième hélice cytoplasmique
CAPOX (XELOX) : oxaliplatine ou Eloxatine® + capécitabine ou Xéroda®	Hcrt1/Hcrt2 : hypocréatine 1/2
cAR 1-4 : récepteurs à l'AMPc	HCT116 : cellules d'adénocarcinome humain du côlon
CHO : cellules ovariennes d'hamster chinois	HEK 293 : cellules embryonnaires humaines de rein
CIMP : phénotype méthylateur des dinucléotides CpG	HL : hypothalamus latéral
CIN : instabilité chromosomique	HNPCC : cancer colorectal héréditaire sans polypose
CMH : complexes majeurs d'histocompatibilité	HPLC : chromatographie en phase liquide à haute performance
CpG : cytosine-phosphate-guanine	Hrs : hepatocyte-growth factor-regulated tyrosine kinase substrate
cPLA2 : phospholipase A2 cytosolique	HT-29 : human tumor 29 (lignée cellulaire d'adénocarcinome colique humain)
CRC : cellules souches cancéreuses	ICV : intracérébroventriculaire
CRI : centre de recherche sur l'inflammation	IL10, 12, 6, 8, 1 β : interleukines 10, 12, 6, 8, 1 β
CRH : récepteurs de la corticotropine	INSERM : institut national de la santé et de la recherche médicale
CT : calcitonine	IP3 : inositol 1,4,5 triphosphate
Da : daltons	IRAP : insulin regulated aminopeptidase
DAG : diacylglycerol	IRCM : Institut de Recherche sur le Cancer de Montpellier
DAI : disease activity index	ITIM : immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif
DRD2 : récepteur à la dopamine D2	ITSM : immunoreceptor tyrosine-based switch motif
DMEM : dulbecco's medium eagle modified	IRM : imagerie par résonance magnétique
DMN : noyau moteur dorsal	KO : knockout
DMSO : diméthylsulfoxyde	
DORA : dual orexin receptor antagonist	
DSS : dextran sulfate sodium	
Dynlt1 : dynéine Tctex-type 1	
EC50 : concentration requise pour induire 50% de la réponse maximale	
ECC-1 : lignée cellulaire du cancer de l'endomètre	
EEa1 : early endosome antigen 1	
EGF : facteur de croissance épidermique	

LAMP1 : lysosomal-associated membrane protein 1	PDZ : post synaptic density 95/disc large/zonula occludens-1
LC : locus cœruleus	PE : phycoérythrine
LCR : leucine rich repeats containing GPCR	PEO1 : lignée cellulaire de cancer des ovaires
LCS : liquide cérébro-spinal	PIP2 : phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
LKB1 : kinase hépatique B1	PKA : protéine kinase A
LoVo : lignée cellulaire d'adénocarcinome colique humain	PKC : protéine kinase C
LV5FU2 : acide folinique + 5-fluoro-uracile ou 5-FU	PLC : phospholipase C
MAPK : mitogen-activated protein kinases	POMC : pro-opiomelanocortine
MAT : macrophages associés aux tumeurs	PpOx : prépro-orexine
MCP1 : monocyte chemoattractant protein 1	pRB : protéine du rétinoblastome
MDSC : cellules suppressives myéloïdes	PTH : récepteur de l'hormone parathyroïdienne
MEC : matrice extracellulaire	RACE-PCR : amplification rapide d'extrémités d'ADNc par PCR
MEF : mouse embryonic fibroblasts	RB : protéine du rétinoblastome
MET : microenvironnement tumoral	RCH : rectocolite hémorragique
MFE-280 : lignée cellulaire de cancer de l'endomètre de haut grade	RCPG : récepteurs couplés aux protéines G
MICI : maladie de Crohn et rectocolite hémorragique	REM : rapid eye movement
MMR : mismatch repair (perte d'expression des gènes de réparation de mésappariement)	RTG : réseau trans-golgien
MSI : instabilité des microsatellites	RT-PCR : transcription inverse et réactions de polymérisation en chaîne
MVB : multi vesicular body	Sem : écart-type à la moyenne
NCX, NCKX : échangeurs de sodium (Na ⁺)/calcium (potassium (K ⁺)) réversibles	SHP-2 : phosphotyrosine phosphatase à domaine SH2
NEDD4 : ubiquitin ligase neural precursor development downregulated protein 4	SNX1 : sorting nexin-1
NGF : facteur de croissance des nerfs	SORA : single orexin receptor antagonist
NT : cellules tueuses naturelles	Src : tyrosine kinases
NTM : noyau tubéromammilaire	SST : somatostatine
NKT : cellules T tueuses naturelles	STAT5 : transducteur de signal et activateur de la transcription 5
NPY : neuropeptide Y	Stx6 : anticorps anti-synthaxine 6
NRD : noyaux du raphé dorsal	SVF : sérum de veau fœtal
NSC : noyau supra-chiasmatique	TGF : facteur de croissance transformant alpha
NSCC : récepteurs des canaux calciques non sélectifs	TH1 : lymphocytes T auxiliaires 1
NTS : neurotensine	ThyPase : thymidine-phosphorylase
OxA/OxB : orexine A/B	TIPMP : Tumeurs Intra Papillaires et Mucineuses du Pancréas
OX1R/OX2R : récepteur aux orexines de type 1 ou 2	TM : domaines transmembranaires
PACAP : pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide	TNE : tumeurs neuro-endocrines
PAF : polypose adénomateuse familiale	TNF- α : facteur de nécrose tumorale α
PanIN : néoplasie intraépithéliale pancréatique	TRP : récepteurs à potentiel transitoire
PAR1 : proteinase activated receptor 1	TS : thymidylate synthase
PBS : phosphate buffered saline	UIM : ubiquitin interacting motif
PDAC : pancreatic ductal adenocarcinoma	USP33 : ubiquitin-specific-protease 33
PDGF : facteur de croissance dérivé des plaquettes	VEGF : vascular endothelial growth factor
PDX : patient-derived xenograft (xénogreffe dérivée de la tumeur du patient)	VGCC : canaux calciques dépendants du voltage
	VIP : vasoactive intestinal polypeptide
	YFP : yellow fluorescent protein

Introduction bibliographique

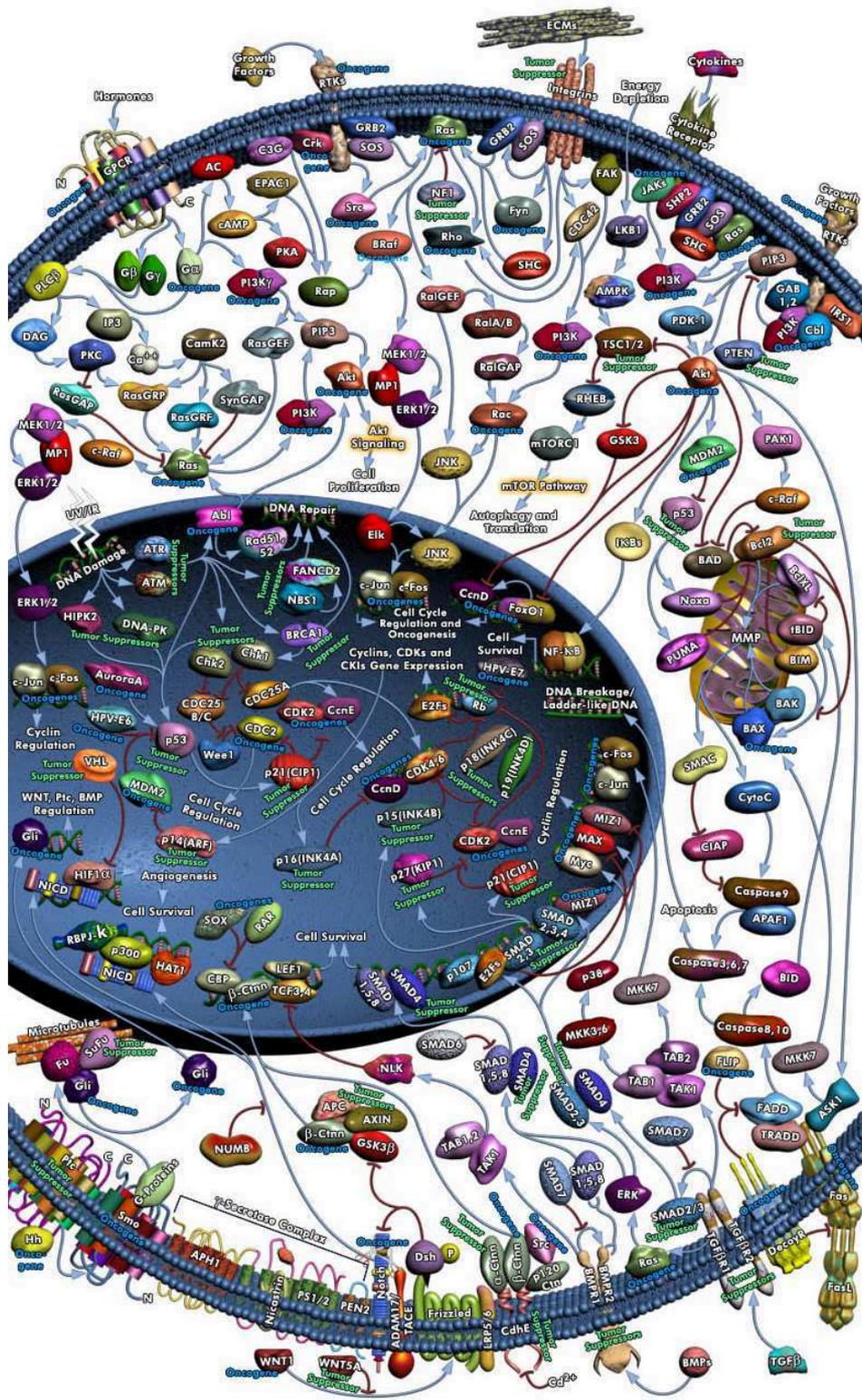


Figure 1 : Schéma des voies de signalisation impliquées dans les cellules cancéreuses

D'après "© 2009 QIAGEN, all rights reserved"

I. Les cancers digestifs : cancers du côlon et du pancréas

Cette première partie de l'introduction générale, consacrée aux cancers digestifs incluant quelques généralités sur les cancers, ne représente pas un panorama complet et exhaustif de l'ensemble des connaissances dans ce domaine qui dépasserait très largement le cadre de cette thèse. En effet, l'ensemble des processus et des voies de signalisation conduisant à la formation tumorale est extrêmement complexe (Figure 1) et je me focaliserai uniquement sur les cancers digestifs et plus particulièrement sur les cancers du côlon et du pancréas.

A. Généralités sur les cancers

Les cellules saines peuvent évoluer progressivement vers un état néoplasique, elles acquièrent alors une succession de caractéristiques qui leur permettent de devenir tumorigènes et finalement malignes.

De plus, les tumeurs sont des tissus complexes composés de plusieurs types cellulaires distincts qui participent à des interactions hétérotypiques les unes avec les autres. Les cellules saines autour vont former le stroma qui sera associé à la tumeur. Ce stroma aura un rôle actif dans la tumorigénèse. L'ensemble de ces tissus constitue le microenvironnement tumoral. Six caractéristiques distinctives et complémentaires permettent la croissance tumorale et la diffusion métastatique (Hanahan & Weinberg, 2011).

1. Les caractéristiques des cellules cancéreuses

a. *Maintien de la prolifération*

Le trait fondamental des cellules cancéreuses est leur capacité à proliférer. En effet, les tissus sains contrôlent la production et la libération des signaux favorisant la croissance. Ces signaux vont commander l'entrée et la progression dans le cycle cellulaire, la division cellulaire, assurant ainsi l'homéostasie du nombre de cellules et donc le maintien d'une fonction tissulaire normale. Ces signaux sont véhiculés majoritairement par des facteurs de croissance qui se lient aux récepteurs présents à la surface cellulaire (Hanahan & Weinberg, 2011). Les cellules cancéreuses, quant à elles, acquièrent la capacité de maintenir la prolifération de plusieurs manières différentes. Voici quelques exemples en relation avec les facteurs de croissance :

- elles peuvent produire elles-mêmes des facteurs de croissance auxquels elles répondent grâce à l'expression de récepteurs apparentés, entraînant ainsi une stimulation proliférative autocrine,

- elles peuvent envoyer des signaux pour stimuler les cellules saines du stroma liées à la tumeur, qui fournissent ainsi des facteurs de croissance aux cellules cancéreuses,
- elles peuvent également élever les taux de protéines réceptrices exprimées à la membrane plasmique ; les cellules deviennent alors très réceptives, même si les récepteurs sont en faible quantité par rapport aux facteurs de croissance,
- elles peuvent subir des mutations somatiques qui vont permettre d'activer les voies de signalisation généralement déclenchées par les facteurs de croissance,
- elles peuvent aussi perturber les mécanismes d'inhibition rétroactifs qui permettront d'améliorer la signalisation proliférative (Hanahan & Weinberg, 2011).

Le cycle cellulaire joue un rôle important dans la régulation de la prolifération. Il comporte quatre phases successives. Les phases les plus importantes sont les phases S, lorsque la réplication de l'ADN se produit, et la phase M, lorsque la cellule se divise en deux cellules filles. La séparation des phases S et M est composée de deux phases d'intervalle appelées G1 et G2. G1 découle de la mitose et correspond au moment où la cellule est sensible aux signaux positifs et négatifs des réseaux de signalisation de croissance. G2 se situe après la phase S lorsque la cellule se prépare à entrer en mitose. G0 représente un état dans lequel les cellules se sont retirées de manière réversible du cycle de division cellulaire en réponse à une forte densité cellulaire ou à une carence en agent mitogène. Dans une variante, les cellules peuvent se retirer de manière irréversible du cycle cellulaire alors elles sont dans des états différenciés ou sénescents (Williams & Stoeber, 2012). La progression dans le cycle cellulaire est pilotée par la famille des sérine/thréonine kinases cyclines-dépendantes (CDK ; Cyclin-Dependent Kinases) et leurs partenaires régulateurs : les cyclines. Les complexes cycline D-CDK4, cycline D-CDK6 et cycline E-CDK2 entraînent la progression de G1 à travers le point de restriction, ce qui engage la cellule à terminer le cycle. La phase S est initiée par le complexe cycline A-CDK2 et le complexe cycline B-CDK1 régule la progression à travers G2 et l'entrée dans la mitose (Malumbres & Barbacid, 2009). La progression dans chaque phase du cycle cellulaire et la transition d'une phase à la suivante sont contrôlées par des mécanismes de détection, appelés points de contrôle, qui maintiennent le bon ordre des événements. Si les mécanismes de détection décèlent des événements de cycle cellulaire aberrants ou incomplets (dommages de l'ADN, par exemple), les voies de contrôle transmettent le signal aux effecteurs pouvant déclencher un arrêt du cycle cellulaire jusqu'à la résolution du problème. Les protéines effectrices incluent les inhibiteurs de CDK (CDKI ; Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors), qui peuvent arrêter de manière réversible la progression du cycle cellulaire (Malumbres & Barbacid, 2009).

La dérégulation du cycle cellulaire est à la base de la prolifération cellulaire incontrôlée qui caractérise le phénotype malin. L'inactivation des gènes suppresseurs de tumeur qui codent

pour les CDKI (par exemple, p15, p16 et p27) est également un événement fréquent dans divers types de tumeur. Cela inhibe les freins au niveau des points de contrôle pour la progression du cycle cellulaire et, l'abrogation ultérieure des mécanismes de contrôle conduit à l'acquisition d'une instabilité génomique qui entraîne l'évolution de la tumeur (Williams & Stoeber, 2012).

b. Inhibition de l'activité des suppresseurs de tumeur

En plus de leur capacité à induire et à maintenir des signaux de stimulation de la croissance cellulaire, les cellules cancéreuses doivent également contourner les voies qui régulent négativement la prolifération cellulaire. De nombreux gènes suppresseurs de tumeur ont été découverts, ils agissent de diverses manières. Les deux suppresseurs de tumeurs les plus représentatifs sont les protéines RB (RetinoBlastoma) et TP53. Ces deux suppresseurs fonctionnent comme des nœuds de contrôle centraux au sein de deux voies complémentaires régulatrices des cellules. Ces nœuds vont régir l'activité proliférative des cellules ou l'activation des programmes de sénescence et d'apoptose (Burkhardt & Sage, 2008).

La protéine RB intègre des signaux provenant de diverses sources extracellulaires et intracellulaires et est un point de contrôle pour l'entrée de la cellule en division. En son absence, la prolifération cellulaire est persistante. La protéine TP53 (Tumor Protein 53) peut interrompre la progression du cycle cellulaire, si leur Acide DésoxyriboNucléique (ADN) a subi trop de dommages, si les signaux ne favorisent pas la croissance ou si le glucose et l'oxygénation sont à des niveaux trop faibles. De plus, en présence de signaux d'alarme indiquant des dommages trop importants ou irréparables, TP53 peut déclencher l'apoptose. Bien que les deux modulateurs canoniques de la prolifération - les protéines TP53 et RB - aient une importance prépondérante dans la régulation de la prolifération cellulaire, divers éléments indiquent que chacun opère dans le cadre d'un réseau plus vaste (Hanahan & Weinberg, 2011).

Les contacts cellule à cellule présents dans des populations denses de cellules saines empêchent la prolifération cellulaire pour assurer l'homéostasie tissulaire normale. Il est important de noter que cette "inhibition de contact" est présente dans divers types de cellules cancéreuses. Un des mécanismes implique le produit du gène NF2 (NeuroFibromatosis type 2), longtemps impliqué en tant que suppresseur de tumeur, car sa perte déclenche une forme de neurofibromatose humaine. Merlin, la protéine cytoplasmique codée par le gène NF2, induit l'inhibition de contact *via* le couplage de molécules d'adhésion à des récepteurs tyrosine kinases transmembranaires (Curto & McClatchey, 2008). En agissant ainsi, Merlin renforce l'adhérence cellule à cellule. Un second mécanisme d'inhibition de contact concerne la protéine de polarité épithéliale LKB1 (Liver Kinase B1), qui organise la structure épithéliale et aide à maintenir l'intégrité des tissus. LKB1 peut, par exemple, passer outre les effets

mitogènes de l'oncogène Myc, lorsque celui-ci est contrôlé positivement dans des structures épithéliales quiescentes organisées. En revanche, lorsque l'expression de LKB1 est supprimée, l'intégrité épithéliale est déstabilisée et les cellules épithéliales deviennent sensibles à la transformation induite par Myc (Partanen *et al.*, 2009).

Les oncogènes sont des facteurs clés de la croissance tumorale. La dérégulation de l'oncogène Myc est fréquente dans les cancers humains. Les protéines MYC (c-MYC, N-MYC et L-MYC) sont des facteurs de transcription qui se lient aux séquences activatrices des promoteurs de gènes et peuvent activer ou réprimer la transcription, contrôlant ainsi divers aspects de la transformation cellulaire et de la croissance tumorale.

Les mutations RAS et BRAF régulent les voies pour initier et promouvoir le cancer. Les deux oncogènes activent les voies de la protéine kinase activée par les mitogènes (MAPK ; Mitogen-Activated Protein Kinases). RAS et BRAF peuvent également réguler directement les voies métaboliques dans les cellules cancéreuses (Nagarajan *et al.*, 2016).

c. Résistance à la mort cellulaire

Le concept que la mort cellulaire programmée par apoptose constitue une barrière naturelle au développement du cancer a été établi par diverses études. La meilleure compréhension des voies de signalisation a révélé que l'apoptose est déclenchée *via* divers stress physiologiques. Parmi ces stress induisant l'apoptose, nous trouvons les déséquilibres de signalisation subis par les cellules au cours de la tumorigenèse ou à la suite d'un traitement anticancéreux et les dommages à l'ADN associés à l'hyperprolifération. Pourtant, d'autres recherches ont révélé que l'apoptose est atténuée dans les tumeurs qui parviennent à atteindre des états de malignité de haut grade et à résister aux traitements chimiothérapeutiques. Bien que les conditions cellulaires qui déclenchent l'apoptose restent à dénombrer, plusieurs capteurs d'anomalies jouant un rôle clé dans le développement des tumeurs ont été identifiés (Lowe *et al.*, 2004; Adams & Cory, 2007). Les cellules tumorales vont développer diverses stratégies pour limiter ou contourner l'apoptose. La plus courante est la perte de la protéine TP53 qui peut induire l'apoptose. En parallèle, les tumeurs peuvent augmenter l'expression des régulateurs anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-x_L) ou des signaux de survie (Igf 1/2), en régulant à la baisse les facteurs pro-apoptotiques (Bax, Bim, Puma) (Hanahan & Weinberg, 2011).

d. Immortalité répllicative

Il a été largement admis que les cellules cancéreuses avaient un potentiel de réplication illimité afin de générer des tumeurs macroscopiques. Cette capacité contraste fortement avec le comportement des cellules saines, qui ont un nombre limité et défini de cycles de croissance et de divisions cellulaires. Cette limitation a été associée à deux obstacles distincts à la

prolifération : la sénescence, une entrée irréversible dans un état non prolifératif mais viable, et l'apoptose, qui implique la mort cellulaire. En de rares occasions, des cellules émergent d'une population en apoptose et présentent un potentiel de réplication illimité. Cette transition a été appelée immortalisation, un trait que la plupart des lignées cellulaires établies possèdent en raison de leur capacité à proliférer en culture, sans preuve de sénescence ou d'apoptose. Les télomères qui protègent les extrémités des chromosomes sont impliqués de manière centrale dans la capacité de prolifération illimitée (Shay & Wright, 2000; Blasco, 2005). Les télomères raccourcissent progressivement dans les cellules non immortalisées, perdant ainsi la capacité de protéger les extrémités des chromosomes. Par conséquent, la longueur de l'ADN télomérique détermine le nombre de générations successives de cellule. Une fois que les télomères ont perdu leur fonction protectrice, les cellules entrent en apoptose. En ce qui concerne la télomérase, l'ADN polymérase qui ajoute des segments répétitifs de télomères aux extrémités de l'ADN télomérique, elle est sous-réglée dans les cellules non immortalisées (Flores *et al.*, 2006). Cependant, cette dernière est exprimée à des niveaux fonctionnellement significatifs dans la grande majorité des cellules immortalisées, y compris dans les cellules cancéreuses humaines. En rallongeant l'ADN télomérique, la télomérase est capable de contrer l'érosion progressive des télomères qui se produirait normalement. La présence d'une activité télomérase, dans les cellules immortalisées, est corrélée à une résistance à l'induction de la sénescence et de l'apoptose. À l'inverse, la suppression de l'activité de la télomérase entraîne un raccourcissement des télomères et une activation de l'une ou l'autre de ces barrières prolifératives. Les deux barrières à la prolifération, c'est-à-dire la sénescence et l'apoptose ont été définies en tant que défenses anticancéreuses cruciales intégrées dans nos cellules et déployées pour empêcher la croissance de clones de cellules préneoplasiques et néoplasiques (Hanahan & Weinberg, 2011).

e. Angiogenèse

Comme dans le cas des tissus sains, les tissus tumoraux ont besoin de nutriments et d'oxygène, ainsi que d'évacuer les déchets métaboliques et le dioxyde de carbone. La néovascularisation associée à la tumeur répond à ces besoins. Chez l'adulte, dans le cadre de processus physiologiques tels que la cicatrisation et le cycle de reproduction chez la femme, l'angiogenèse est activée, mais de manière transitoire. En revanche, lors de la progression tumorale, l'angiogénèse est presque toujours activée, ce qui entraîne la formation continue de nouveaux vaisseaux quiescents qui aident à maintenir les excroissances néoplasiques (Hanahan & Folkman, 1996). La néovascularisation tumorale est caractérisée par une germination capillaire précoce, des ramifications alvéolaires excessives, des vaisseaux distordus et des niveaux anormaux de prolifération et d'apoptose des cellules endothéliales (Nagy *et al.*, 2010). Des analyses histologiques de lésions non invasives

précancéreuses, y compris des dysplasies et des carcinomes *in situ* survenant dans divers organes, ont révélé le déclenchement précoce de l'angiogénèse (Raica *et al.*, 2009).

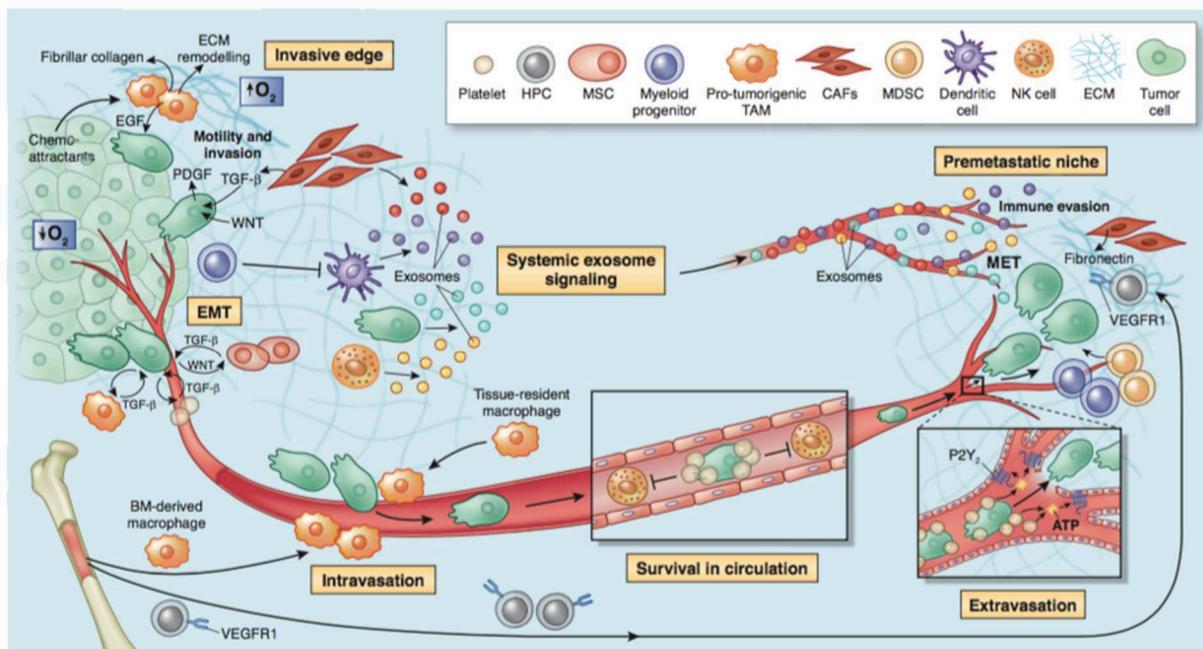
Le gène VEGF-A (Vascular Endothelial Growth Factor-A) code pour des ligands impliqués dans l'organisation lors de la croissance des nouveaux vaisseaux sanguins au cours des développements embryonnaire et postnatal, puis dans la survie homéostatique des cellules endothéliales. La signalisation s'effectue *via* trois récepteurs tyrosine kinases (VEGFR-1–3). L'expression du gène du VEGF peut être régulée à la fois par l'hypoxie et par la signalisation oncogène (Ferrara, 2009, Mac Gabhann et Popel, 2008, Carmeliet, 2005).

f. Invasion et métastases

Les carcinomes provenant des tissus épithéliaux progressent vers des degrés de malignité supérieurs, se traduisant par une invasion locale et des métastases distantes. Les cellules cancéreuses associées développent généralement des altérations morphologiques et d'adhésion aux autres cellules et à la matrice extracellulaire (MEC). L'altération la mieux caractérisée consiste en la perte par les cellules de carcinome de la E-cadhérine, une molécule clé de l'adhésion cellule à cellule. L'expression accrue de la E-cadhérine est bien établie en tant qu'antagoniste de l'invasion et de la formation de métastase, alors que la réduction de son expression est connue pour potentialiser ces phénotypes. La régulation à la baisse fréquemment observée et l'inactivation mutationnelle occasionnelle de la E-cadhérine dans les carcinomes humains ont fortement soutenu son rôle de suppresseur clé de ces capacités (Cavallaro & Christofori, 2004). Inversement, les molécules d'adhésion normalement associées aux migrations cellulaires qui se produisent pendant l'embryogenèse et l'inflammation sont souvent régulées à la hausse. Par exemple, la N-cadhérine, qui est normalement exprimée dans les neurones en migration et les cellules mésenchymateuses au cours de l'organogenèse, est régulée positivement dans de nombreuses cellules de carcinome invasif (Cavallaro & Christofori, 2004).

Les cellules cancéreuses disséminées lors d'étape de migration ont besoin de trouver une niche c'est-à-dire un microenvironnement compatible avec leur survie au sein de l'organe cible. Les tumeurs primaires peuvent sécréter des facteurs pro-inflammatoires comme la protéine S100-A8/9, le TNF α (Tumor Necrosis Factor α) qui participent au développement de niches métastatiques dans l'organe cible (Hubert & Abastado, 2014).

Les cellules souches mésenchymateuses humaines dérivées de moelle osseuse, associées aux cellules de carcinome humain faiblement métastatiques, entraînent une augmentation considérable de la puissance métastatique des cellules cancéreuses. Les cellules cancéreuses stimulent la sécrétion de *novo* de la chimiokine CCL5 (également appelée RANTES) à partir de cellules souches mésenchymateuses, qui agit ensuite de manière paracrine sur les cellules cancéreuses pour améliorer leur motilité, leur invasion et ainsi la



Quail and Joyce, *Nature Medicine* 2013

Figure 2 : Schéma du microenvironnement tumoral

L'impact du microenvironnement tumoral sur l'initiation, la progression et la résistance aux médicaments. Dans le microenvironnement tumoral, les cellules tumorales malignes et les cellules non malignes interagissent activement les unes avec les autres et rendent ainsi le microenvironnement favorable à la croissance tumorale. D'après Quail et Joyce, 2013.

formation de métastases. Cette capacité métastatique accrue est réversible et dépend de la signalisation de CCL5 par son récepteur CCR5. Collectivement, ces données démontrent que le microenvironnement tumoral facilite la diffusion métastatique en provoquant des changements réversibles dans le phénotype des cellules cancéreuses (Karnoub *et al.*, 2007). De plus, les macrophages à la périphérie de la tumeur peuvent favoriser l'invasion locale en fournissant des enzymes dégradant la matrice telles que les métalloprotéinases et les protéases à cystéine comme les cathepsines (Joyce & Pollard, 2009; Kessenbrock *et al.*, 2010). Il a été montré que les macrophages favorisant l'invasion sont activés par l'IL-4 produite par les cellules cancéreuses (Gocheva *et al.*, 2010). Et dans un modèle expérimental de cancer du sein métastatique, les macrophages associés à la tumeur (TAM) fournissent un facteur de croissance épidermique (EGF ; Epidermal Growth Factor) aux cellules cancéreuses du sein, tandis que les cellules cancéreuses stimulent réciproquement les macrophages avec le CSF-1 (Colony Stimulating Factor 1). Leurs interactions concertées facilitent le passage dans le système circulatoire et la dissémination métastatique des cellules cancéreuses (Qian & Pollard, 2010).

2. Le microenvironnement tumoral

Le microenvironnement tumoral (MET) est l'environnement cellulaire dans lequel la tumeur se développe (Figure 2). En dehors des cellules tumorales, le MET comprend les vaisseaux sanguins environnants, la matrice extracellulaire (MEC), d'autres cellules non malignes et également des molécules de signalisation (Quail & Joyce, 2013; Klemm & Joyce, 2015). En utilisant des marqueurs spécifiques de différents types cellulaires, des études ont identifié différents types de cellules normales dans le MET : les cellules stromales, les fibroblastes, les cellules immunitaires, les macrophages, ainsi que des péricytes et parfois des adipocytes. De plus un des composants majeurs du MET est la matrice extra-cellulaire (MEC).

Les interactions entre les cellules immunitaires infiltrant la tumeur et les cellules tumorales ont suscité un grand intérêt en raison du double rôle des cellules immunitaires et des facteurs produits. Il est communément admis que les réponses immunitaires ralentissent ou inhibent le développement des tumeurs. Cependant, des preuves récentes ont également suggéré que les cellules immunitaires dans le MET interagissent intimement avec les cellules transformées pour promouvoir l'oncogenèse (Zamarron & Chen, 2011; Gajewski *et al.*, 2013). Les changements successifs survenant au niveau de la tumeur au cours de la progression tumorale ressemblent à une inflammation chronique. Des études ont montré que les tissus avec une inflammation chronique présentent généralement une incidence élevée de cancer (Grivennikov *et al.*, 2010). De plus, les tumeurs établies ont souvent un microenvironnement immunosuppresseur capable de bloquer l'immunité antitumorale.

Au sein des cellules de la lignée lymphoïde, de nombreuses populations différentes de lymphocytes T ont été observées au sein du MET, en particulier au niveau de la marge tumorale invasive et dans les organes lymphoïdes drainants (Restifo *et al.*, 2012). Parmi ceux-ci, les lymphocytes T à mémoire CD8⁺ et les lymphocytes T auxiliaires 1 (Th1) CD4⁺ fonctionnent comme les principales cellules immunitaires effectrices antitumorales. Parmi les nombreux facteurs sécrétés par les lymphocytes T Th1 et CD8⁺, la cytokine IFN- γ (interféron- γ) est la cytokine la plus importante prévenant et supprimant le développement des cancers. Cependant, tous les lymphocytes T ne sont pas des effecteurs antitumoraux. Les rôles joués par les cellules CD4⁺ Th2, les cellules Th17, les Tregs (T-regulateurs), les lymphocytes T régulateurs CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ dans le développement et la survie des tumeurs restent inexplorés, avec des résultats contradictoires observés tant chez l'animal que dans l'analyse clinique (Frey *et al.*, 2010; Fridman *et al.*, 2012; von Boehmer & Daniel, 2013). Les lymphocytes B infiltrés dans le MET peuvent favoriser la progression de la pathologie en sécrétant des cytokines pro-tumorigènes. Des lymphocytes cytotoxiques innés, des cellules tueuses naturelles (NK) et des cellules T tueuses naturelles (NKT) sont également présents dans les MET et leur présence est liée à un bon pronostic dans de nombreux cancers (Tachibana *et al.*, 2005; Balkwill *et al.*, 2012).

Le récepteur PD-1 est préférentiellement exprimé sur le lymphocyte Treg, une cellule immunitaire qui contribue au microenvironnement tumoral immunosuppresseur, ainsi que sur les lymphocytes B activés et les cellules NK. La protéine PD-L1 s'exprime sur divers types de cellules, notamment les cellules placentaires, l'endothélium vasculaire, les cellules des îlots pancréatiques, les cellules musculaires, hépatocytaires, épithéliales et mésenchymateuses, ainsi que sur les lymphocytes B, les lymphocytes T, les cellules dendritiques, les macrophages et les mastocytes. La libération d'IFN- γ induit une régulation positive de PD-L1 par la muqueuse, qui va protéger ces cellules contre les attaques auto-immunes lors d'inflammation ou d'infections chroniques. PD-L1 régulée à la hausse sur ces cellules se lie à PD-1 sur les lymphocytes T, contribuant ainsi à l'inactivation des lymphocytes T. Les cellules tumorales ont mis en place ce mécanisme de régulation PD-1/PD-L1, conçu pour protéger la muqueuse normale des attaques auto-immunes. En revanche, les cellules cancéreuses surexpriment PD-L1 ce qui facilite la croissance tumorale. La surexpression de PD-L1 n'est pas le facteur oncogène de la tumeur, mais plutôt une protection de la tumeur vis-à-vis de son microenvironnement immunitaire (Patel & Kurzrock, 2015).

Parmi les cellules de la lignée myéloïde présentes dans le MET, les cellules suppressives myéloïdes (MDSC ; Myeloid-Derived Suppressor Cells), les mastocytes et la plupart des macrophages associés aux tumeurs (MAT) favorisent le développement des tumeurs (Balkwill *et al.*, 2012). Les MDSC sont des précurseurs immunosuppresseurs des cellules dendritiques,

des macrophages et des granulocytes. Ils maintiennent une homéostasie tissulaire normale en réponse à diverses infections et blessures systémiques. Il a été démontré chez plusieurs modèles animaux que ces MDSC infiltrés dans le MET peuvent favoriser la vascularisation de la tumeur et perturber les principaux mécanismes de la surveillance immunitaire en interférant avec la présentation de l'antigène par les cellules dendritiques, l'activation des lymphocytes T et la cytotoxicité des cellules NK. De plus, les mastocytes sont recrutés dans les tumeurs, où ils libèrent des facteurs qui favorisent la prolifération des cellules endothéliales pour favoriser l'angiogenèse tumorale. Les macrophages associés à une tumeur (MAT) dans le MET, présentent fréquemment un phénotype M2, qui favorise l'angiogenèse et l'invasion tumorales. Les cytokines IL6, TNF- α , IL-1 β et IL-23 sécrétées par les MAT de type M2 sont généralement reconnues comme favorisant les tumeurs (Wang *et al.*, 2010; Ruffell & Coussens, 2015), alors que, les macrophages de phénotype M1 sont pro-inflammatoires et antitumorogènes.

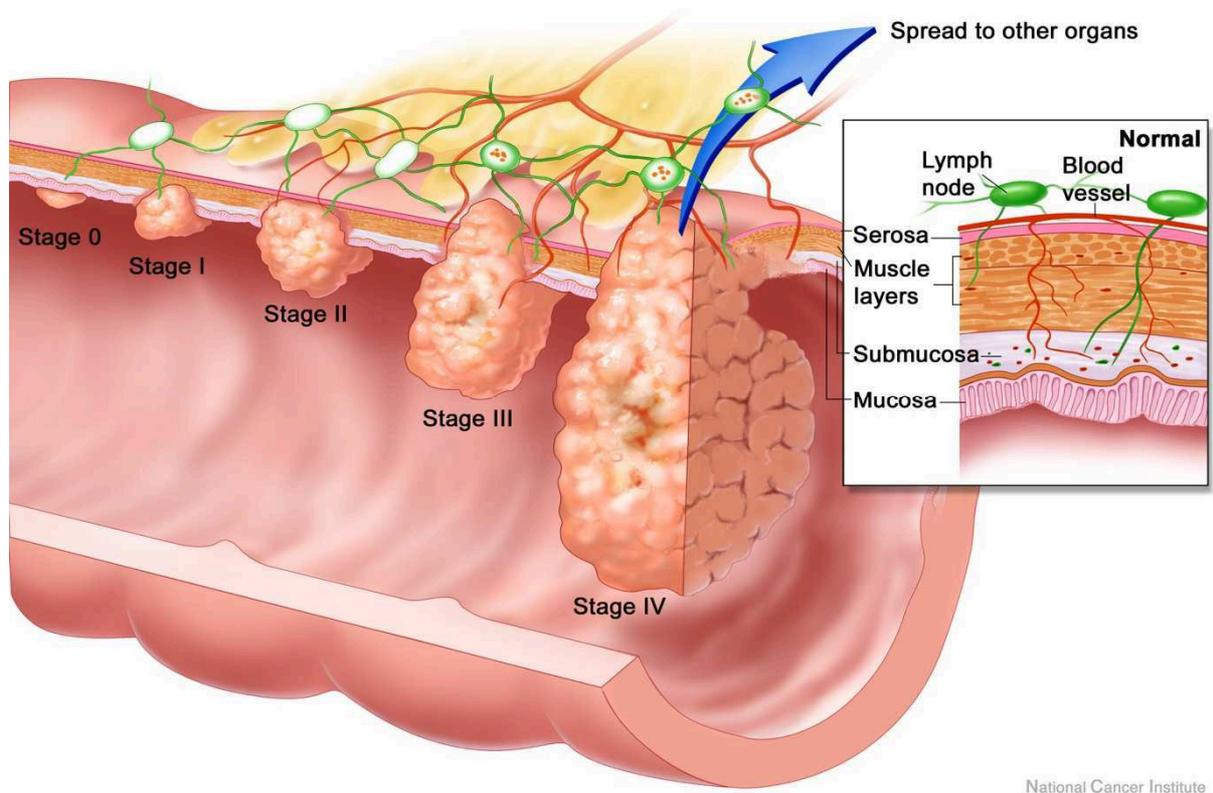
De plus en plus de preuves appuient l'idée que le développement de la tumeur dépend fortement des interactions cellulaires avec le MET (Fidler, 2003; Hanahan & Coussens, 2012). La majorité des tumeurs répond au traitement initial. Cependant, la récurrence de la maladie est fréquente. On croit que les cellules souches cancéreuses ou une partie des cellules cancéreuses sont protégées des thérapies actuelles par des signaux provenant des niches, ce qui mène éventuellement à la sélection de modifications génétiques secondaires et à la croissance de cellules malignes à résistance pharmacologique (Swartz *et al.*, 2012; Valent *et al.*, 2012). Ce mécanisme est essentiel pendant la chimiothérapie et contribue à la récurrence de la maladie.

Le système vasculaire dans le microenvironnement tumoral est également connu pour favoriser la formation et la progression de la tumeur (Hui & Chen, 2015).

Il est de plus en plus clair que les exosomes, vésicules membranaires d'origine endocytaire produites par la plupart des cellules, ont des fonctions spécialisées dans la signalisation intercellulaire. Le rôle des exosomes en tant que médiateurs entre les cellules cancéreuses et le MET a fait l'objet d'une attention croissante. Des études récentes ont démontré que ces petites vésicules contribuent à la progression tumorale et à la résistance au traitement.

Bien qu'il puisse exister une hétérogénéité dans la composition du MET, des études ont révélé des caractéristiques communes à différents types de MET contribuant à la chimiorésistance des cellules cancéreuses. Le ciblage du MET peut également être mis en œuvre par différentes stratégies thérapeutiques, telles que le ciblage du milieu hypoxique et des composants du MET.

L'hypoxie, rare dans les tissus normaux, est une cible potentielle pour de nouveaux agents anticancéreux. HIF-1 α (Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha), qui est essentiel pour les réponses



National Cancer Institute

Figure 3 : Schéma des différents stades d'évolution du cancer du côlon

Schéma tiré du National Cancer Institute

hypoxiques cellulaires et systémiques, s'est révélé être une cible moléculaire importante dans le microenvironnement tumoral (Benito *et al.*, 2013)

B. Le cancer du côlon

Les similitudes entre les cancers du côlon et du rectum permettent de les regrouper sous le nom de cancers colorectaux.

Le cancer colorectal est le troisième cancer le plus fréquent en France après celui de la prostate et du sein. Il est également la deuxième cause de mortalité par cancer après le cancer du poumon.

Le cancer colorectal se développe le plus souvent à partir d'une tumeur bénigne non cancéreuse d'origine épithéliale que l'on appelle polype adénomateux ou adénome. Anomalies fréquentes et majoritairement asymptomatiques, elles peuvent toutefois évoluer vers une forme cancéreuse, l'adénocarcinome. Le risque que l'adénome évolue en cancer augmente en fonction de la taille. En moyenne, un cancer apparaît 9 ans après la survenue d'un adénome. Il est donc important de dépister les polypes et de les retirer le plus rapidement possible.

Les tumeurs colorectales touchent pour 40% d'entre-elles le rectum et pour 60% le côlon. Ces tumeurs se développent majoritairement sur la dernière partie du côlon : le sigmoïde.

1. Classification

Il existe deux types histologiques d'adénocarcinomes colorectaux : les adénocarcinomes lieberkühniens qui ressemblent aux glandes de Lieberkühn de la muqueuse colique et les adénocarcinomes mucineux. Les adénocarcinomes lieberkühniens sont les plus fréquents et représentent environ 85% des cancers colorectaux.

Suivant le degré d'envahissement en profondeur de ces tumeurs, on peut distinguer :

- le cancer *in situ*, quand la tumeur est peu évoluée et reste localisée au niveau de la muqueuse colorectale ne dépassant pas la musculaire muqueuse. Il s'agit du stade TIS de la 8^{ème} édition de la classification TNM (Amin *et al.*, 2017),
- le cancer invasif quand la tumeur est plus évoluée et dépasse la musculaire muqueuse. On distingue alors plusieurs degrés d'envahissement en profondeur selon cette classification TNM : T1 lorsque la tumeur envahit la sous-muqueuse, T2 la musculaire, T3 la sous-séreuse, T4 le péritoine viscéral ou les organes de voisinage (Figure 3).

En absence de traitement, la tumeur continue de progresser et peut alors se disséminer vers les ganglions lymphatiques et à terme vers des organes à distance. On parle alors de cancer

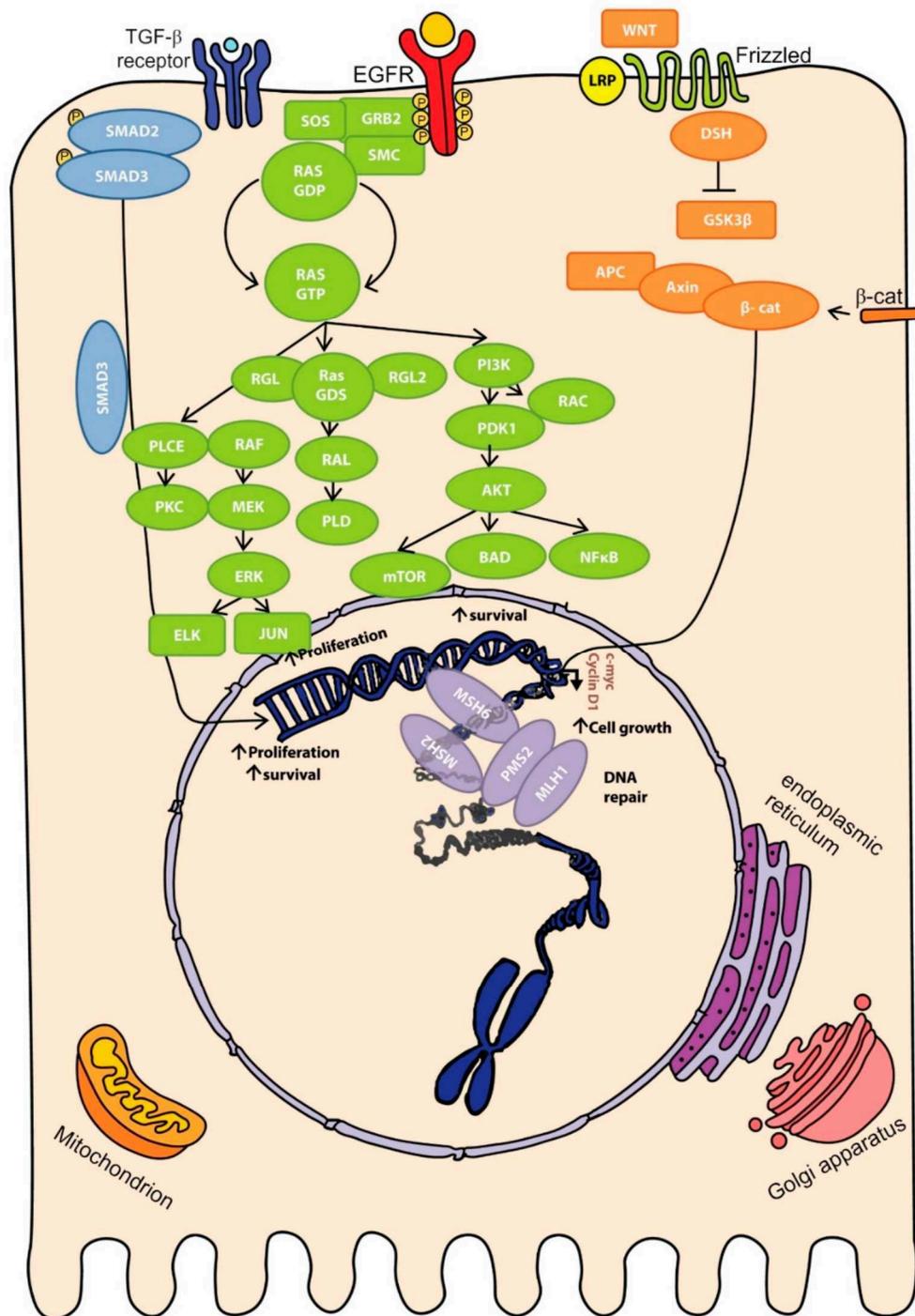


Figure 4 : Voies moléculaires impliquées dans la carcinogénèse colorectale

Les mutations affectant les protéines impliquées dans les voies WNT (orange), MAPK / PI3K (vert), SMAD / TGF- (bleu) ou réparation de l'ADN (violet) peuvent accentuer la prolifération et la survie des cellules, induisant ainsi une croissance tumorale et initiant une carcinogénèse. Les flèches indiquent l'activation de la protéine tandis que les flèches se terminant par « T » représentent l'inhibition de la protéine. D'après Marmol, 2017.

métastatique. Tous stades confondus, la survie à 5 ans du cancer du côlon est d'environ 60% (Uhry *et al.*, 2013).

En tenant compte du degré d'envahissement tumoral en profondeur dans la paroi (stade T de la 8^{ème} classification TNM), ganglionnaire (stade N) et métastatique (stade M), on définit 4 stades ayant une signification pronostique. Le stade I correspond aux tumeurs T1 ou T2 sans métastase ganglionnaire.

Le stade II correspond aux tumeurs T3 ou T4 sans métastase ganglionnaire ou à distance.

Le stade III correspond aux tumeurs T1, T2, T3 ou T4 avec métastases ganglionnaires mais sans métastase à distance.

Et le stade IV correspond aux tumeurs de tout stade T et N avec une ou plusieurs métastases à distance.

2. Tumorigénèse

L'apparition d'un cancer colorectal comme la plupart des cancers suit une séquence d'inactivation/activation de plusieurs gènes. Ces mutations peuvent apparaître dans les oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeur et les gènes liés aux mécanismes de réparation de l'ADN (Fearon & Vogelstein, 1990). Selon l'origine de la mutation, les carcinomes colorectaux peuvent être classés comme sporadiques, héréditaires ou familiaux (Figure 4).

Les cancers dérivés de mutations ponctuelles sont appelés cancers sporadiques et représentent 70% de tous les cancers colorectaux. La pathogénèse moléculaire du cancer sporadique est hétérogène car les mutations peuvent cibler différents gènes (Fearon & Vogelstein, 1990). Cependant, environ 70% des cas de cancer colorectal sporadique suivent une succession spécifique de mutations qui sont ensuite traduites en une séquence morphologique spécifique, commençant par la formation d'un adénome et se terminant par le carcinome invasif. La première mutation se produit dans le gène APC (Adenomatous Polyposis Coli), un gène suppresseur de tumeur, qui déclenche la formation d'adénomes non malins, également appelés polypes. Environ 15% de ces adénomes devraient évoluer en carcinomes après dix ans. Dans ce cas-là, cette mutation APC est suivie de mutations dans les gènes KRAS, TP53 et, enfin, DCC (Deleted Colorectal Cancer) (Fearon & Vogelstein, 1990; Mármol *et al.*, 2017). Les cancers héréditaires ne représentent que 5% des cas de cancer du côlon. Classiquement, on distingue les cancers colorectaux héréditaires associés à une polypose colique de ceux qui ne le sont pas.

Le premier groupe inclus principalement les cancers colorectaux qui se développent dans le cadre de la polypose adénomateuse familiale (PAF). La PAF est responsable de 1 % des cancers colorectaux. Elle se caractérise par la formation d'innombrables polypes adénomateux dans le côlon et le rectum. De transmission autosomique dominante, elle est due à une mutation constitutionnelle du gène APC : ainsi, chez un patient ayant une PAF, chaque cellule colique a déjà, de façon innée, inactivé une copie de ce gène suppresseur de tumeur. L'inactivation des deux copies, étape clef de la cancérogénèse colique, est donc plus rapide (Lynch & de la Chapelle, 2003).

Le deuxième groupe correspond aux cancers colorectaux héréditaires non associés à une polypose et se développant dans le cadre d'une prédisposition génétique de type HNPCC (hereditary non-polyposis colorectal cancer) ou syndrome de Lynch. Ce syndrome est causé par des mutations héréditaires dans l'un des allèles codant pour les protéines de réparation de l'ADN : MSH2, MLH1, MLH6, PMS1 et PMS2. Ce syndrome est responsable de 2 à 3% des cancers colorectaux (Lynch & de la Chapelle, 2003; Umar *et al.*, 2004).

Dans 25 % des cas il existe une histoire familiale de cancer colorectal, mais seuls 5 % de ces patients sont porteurs d'une mutation germinale de ces gènes impliquées dans les cancers colorectaux héréditaires connue (Stoffel & Kastrinos, 2014). Cependant, même en l'absence de mutation identifiée, avoir un antécédent familial de cancer colorectal au premier degré multiplie par 2 le risque moyen de développer ce cancer au cours de sa vie.

Ainsi, on se rend compte que l'instabilité génomique est une caractéristique importante du processus de tumorigénèse du cancer colorectal. Les mécanismes pathogènes conduisant à cette instabilité peuvent être répartis en trois voies différentes, à savoir l'instabilité chromosomique (CIN), l'instabilité des microsatellites (MSI) et le phénotype méthylateur des dinucléotides CpG (Cytosine-phosphate-Guanine) (CIMP).

La voie CIN, est considérée comme la voie classique car elle est en cause dans 80 à 85% des cas de cancer du côlon et du rectum (Grady & Carethers, 2008). Elle se caractérise par des déséquilibres dans le nombre de chromosomes. Les mécanismes sous-jacents à la voie CIN comprennent des altérations de la ségrégation chromosomique, du dysfonctionnement des télomères et de la réponse aux dommages à l'ADN, qui affectent les gènes critiques impliqués dans le maintien de fonctions cellulaires correctes. Les mutations APC entraînent la translocation de la β -caténine vers le noyau et la transcription des gènes impliqués dans la tumorigénèse et l'invasion, alors que les mutations des gènes KRAS et PI3K entraînent une activation constante des MAP kinases, augmentant ainsi la prolifération cellulaire. Enfin, les

mutations de type « perte de fonction » du gène TP53, le principal point de contrôle du cycle cellulaire, provoquent une entrée incontrôlée dans le cycle cellulaire (Pino & Chung, 2010).

La voie d'instabilité des microsatellites est causée par des mutations entraînant la perte des mécanismes de réparation de l'ADN. La capacité de réparer de courtes chaînes d'ADN ou des répétitions en tandem (répétitions de deux à cinq paires de bases) est diminuée dans les tumeurs présentant une instabilité microsatellitaire. Par conséquent, les mutations ont tendance à s'accumuler dans ces régions. Ces mutations peuvent affecter les régions non codantes comme les régions codantes. Les tumeurs se développent lorsque les cadres de lecture des microsatellites codant pour des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeur sont altérés. La perte d'expression des gènes de réparation de mésappariement (MMR) peut être provoquée par des événements spontanés (hyperméthylation de promoteur) ou des mutations germinales. Les gènes mutés dans les tumeurs présentant une instabilité des microsatellites sont MLH1, MSH2, MSH6, PMS1 et PMS2. Ce sont les gènes touchés par le syndrome de Lynch lorsque la mutation est germinale (Boland & Goel, 2010). En général, les tumeurs MSI ont un meilleur pronostic que les tumeurs sporadiques (Stoffel & Kastrinos, 2014).

L'instabilité épigénétique, responsable du phénotype « méthylateur » des dinucléotides CpG (CIMP), est une autre caractéristique commune des cancers du côlon. La principale caractéristique des tumeurs CIMP est l'hyperméthylation des promoteurs d'oncogènes, ce qui conduit à l'inactivation génétique et à la perte d'expression des protéines. Les modifications génétiques et épigénétiques ne sont pas exclusives les unes des autres dans le cancer colorectal, et toutes deux coopèrent à son développement. Un exemple de l'effet combiné de ces modifications dans le processus de développement du cancer colorectal est la présence de mutations BRAF, qui est un proto-oncogène, ainsi que l'instabilité des microsatellites dans de nombreuses tumeurs CIMP (Weisenberger *et al.*, 2006).

3. Incidence

En 2017, en France, on estime à 44 872 le nombre de nouveaux cancers colorectaux touchant 24 035 hommes et 20 837 femmes. Cependant, on note une diminution du taux d'incidence d'environ 0,3% entre 2005 et 2012.

Le cancer colorectal est diagnostiqué en moyenne vers 71 ans chez les hommes et 75 ans chez les femmes et le plus souvent à un stade avancé. Cependant, quel que soit le sexe, un cancer sur 5 semble être diagnostiqué à un stade local limité. Dans ces cas-là, le pronostic est meilleur.

La mortalité, quant à elle, diminue depuis les années 80 grâce à l'amélioration des tests de dépistage ainsi que des techniques de résections des lésions précancéreuses.

4. Dépistage

Les pouvoirs publics proposent un programme de dépistage pour le cancer colorectal depuis 2009. Ces tests de dépistage sont proposés par le médecin traitant à toutes les personnes âgées de 50 à 74 ans en l'absence de symptôme ou de facteur de risque. Si le résultat du test est normal, celui-ci devra être effectué à nouveau deux ans plus tard.

Ce test de dépistage consiste à mettre en évidence du sang occulte dans les selles. Ce test permet de cibler dans la population générale asymptomatique, les patients les plus susceptibles d'avoir un cancer colorectal ou un adénome et devant avoir une coloscopie. En revanche, en cas de facteurs de risques importants, tels qu'une histoire personnelle ou familiale de cancer colorectal ou de maladie inflammatoire chronique de l'intestin, le risque de trouver une lésion ou un polype est plus important. L'examen conseillé alors est la coloscopie en première intention.

Cet examen permettra d'observer la muqueuse colorectale grâce à une caméra (un coloscope) et ainsi de détecter les lésions pré-néoplasiques que sont les polypes et de les réséquer, mais aussi de diagnostiquer les lésions cancéreuses et d'effectuer une biopsie.

5. Symptômes et diagnostic

Le cancer colorectal reste longtemps asymptomatique. Lorsque les symptômes apparaissent, la maladie est déjà évoluée. Les principaux symptômes sont : des douleurs abdominales, les troubles du transit intestinal, la présence de sang dans les selles, une anémie, un amaigrissement inexplicable. L'ensemble de ses signes va être recueilli lors d'un examen clinique et va permettre d'évaluer l'état général du patient.

Concernant le cancer du rectum, celui-ci peut être diagnostiqué par un toucher rectal si la tumeur est à moins de 8 cm de la marge anale. Le toucher rectal va également permettre d'évaluer la taille d'une tumeur rectale et sa distance par rapport au sphincter.

Tout patient symptomatique devra avoir une coloscopie. Cet examen permettra de détecter la tumeur, de définir sa localisation et de réaliser des biopsies afin d'obtenir le diagnostic histologique du cancer.

Une fois le diagnostic de cancer posé par l'examen anatomopathologique, des examens complémentaires doivent être effectués pour établir un bilan d'extension de la maladie tumorale. Ils permettent d'établir le degré d'envahissement local, ganglionnaire et à distance. Plusieurs examens sont possibles : analyses biologiques, tomodensitométrie thoraco-abdomino-pelvienne et IRM (imagerie par résonance magnétique) hépatique ou pelvienne.

a. Les analyses biologiques

On peut doser dans le sang l'antigène carcino-embryonnaire (ACE). Cette protéine est présente dans l'organisme à l'état physiologique, cependant, elle peut être produite en excès par certaines cellules cancéreuses. Ce dosage est surtout utilisé pour l'évaluation initiale des cancers métastatiques (“[Consensus conference. Prevention, diagnosis and treatment of colon cancer],” 1998). L'élévation de l'ACE n'est pas spécifique du cancer colorectal et cela doit être pris en compte dans l'interprétation.

L'absence d'expression des protéines MLH1, MSH2, MSH6 et PMS2 est recherchée par immunohistochimie et l'instabilité des microsatellites (dénommé phénotype moléculaire MSI pour *Micro Satellite Instability*) par biologie moléculaire. Ces analyses sont effectuées sur les biopsies obtenues lors de la coloscopie ou sur la pièce opératoire de colectomie.

Dans le cadre des cancers avancés, il faut connaître le statut mutationnel des proto-oncogènes KRAS, NRAS et BRAF car cela entre dans la décision thérapeutique. Il faut donc réaliser 10 à 15 biopsies sur la lésion lors de la coloscopie pour réaliser ces études.

b. La tomodensitométrie thoraco-abdomino-pelvienne

C'est un scanner spécifique et cet examen est indispensable pour définir le stade local, ganglionnaire et métastatique de la tumeur avant toute décision thérapeutique.

c. L'imagerie par résonance magnétique (IRM)

L'IRM pelvienne permet d'explorer l'extension locale d'un cancer du rectum. En cas de suspicion de métastases au niveau du foie, une IRM hépatique peut également être effectué (Balthazar *et al.*, 1988).

6. Traitements

La prise en charge thérapeutique dépend de la localisation de la tumeur, de son degré d'envahissement en profondeur au niveau de la paroi, de l'atteinte ou non des ganglions lymphatiques et de la présence ou non de métastases à distance. Le traitement est toujours discuté en réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP).

a. La chirurgie

La prise en charge chirurgicale du cancer colorectal est le traitement de référence.

Lors de cette intervention, la zone cancéreuse doit être retirée avec une marge de sécurité distale et proximale de 5 cm autour de la tumeur.

Différents types de chirurgie existent selon la localisation de la tumeur (Bipat *et al.*, 2005a) :

- l'hémi-colectomie qui consiste à retirer la moitié du côlon droit ou gauche (en fonction de la zone où se situe la tumeur) ainsi que la moitié adjacente du côlon transverse,
- la sigmoïdectomie quand la tumeur se situe sur la partie terminale du côlon,
- la proctectomie si la tumeur est localisée au niveau du rectum.

En cas de métastases à distance, notamment hépatiques ou pulmonaires, la prise en charge chirurgicale dépend du nombre et de la localisation de ces métastases. Dans des cas très précis, celles-ci peuvent être réséquées chirurgicalement. La prise en charge chirurgicale de la tumeur primitive et des métastases se fait souvent en plusieurs temps opératoires et doit être encadrée par la chimiothérapie.

b. La chimiothérapie

La chimiothérapie peut être adjuvante, c'est-à-dire faire suite à la chirurgie afin de diminuer le risque de récurrence tumorale. Elle est néoadjuvante, lorsqu'elle est réalisée avant la chirurgie si les métastases hépatiques et/ou pulmonaire sont résécables d'emblée ou potentiellement résécables après réponse à la chimiothérapie. Elle est palliative dans le cas où les métastases ne seront pas résécables.

Plusieurs molécules pharmacologiques sont actives sur les cellules adénocarcinomeuses colorectales. Les principales molécules utilisées sont les suivantes :

- 5-FU ou 5-fluoro-uracile associé à l'acide folinique (protocole LV5FU2)
- Capécitabine (ou Xéroda®)
- Oxaliplatine ou Eloxatine®
- Irinotécan ou Campto®

Elles peuvent être combinées en différents protocoles selon les indications. Par exemple, le protocole FOLFOX est l'association du LV5FU2 et de l'oxaliplatine (Ychou *et al.*, 2003, 2009).

Chacune des molécules citées précédemment a une action antitumorale spécifique :

- le 5-FU ou 5-fluorouracile exerce plusieurs effets anti-métaboliques : il bloque la méthylation de l'uracile en thymine, provoquant ainsi une inhibition de la synthèse de l'ADN freinant sa réplication et donc bloquant la prolifération cellulaire. Il est également phosphorylé, « triphosphaté » et incorporé à la place de l'uracile dans les ARN. Cela

entraîne des erreurs de lecture du code génétique lors de la synthèse des protéines et conduit à la production de coenzymes inefficaces et de ribosomes immatures,

- l'acide folinique : le lévofolinate de calcium (forme active de l'acide folinique) augmente l'activité inhibitrice de la thymidylate synthase (TS), une enzyme clef impliquée dans la biosynthèse de la pyrimidine et stabilise le complexe 5-FU-TS. Il potentialise donc l'effet antitumoral du 5-FU,
- l'oxaliplatine : les dérivés hydratés dus à la biotransformation de l'oxaliplatine interagissent avec l'ADN pour former des ponts intra et interbrins entraînant une interruption de la synthèse de l'ADN. Cette interruption est la cause des activités cytotoxique et antitumorale,
- la capécitabine : le carbamate de fluoropyrimidine non cytotoxique se comporte comme un précurseur de la fraction cytotoxique du 5-FU. L'enzyme impliquée dans la conversion finale en 5-FU, la thymidine-phosphorylase (ThyPase) est localisée dans les tissus tumoraux mais également dans les tissus sains, où habituellement elle est exprimée à des taux plus faibles. Cette molécule a la particularité d'être administrée par voie orale et non intraveineuse comme les autres molécules citées plus haut.

c. Les thérapies ciblées

Les thérapies ciblées sont administrées en association avec les molécules de chimiothérapie dans le cadre des cancers colorectaux métastatiques. Cette association améliore la réponse au traitement. Plusieurs molécules existent aujourd'hui. Les plus utilisées sont des anticorps monoclonaux, qui vont cibler des récepteurs spécifiques de la tumeur et sont fabriquées par des industries pharmaceutiques, par exemple :

- le bévacicumab (Avastin®) : il s'agit d'un anticorps anti-VEGF. Il va limiter l'apport sanguin vers la tumeur en bloquant l'action du facteur VEGF qui favorise la vascularisation de la tumeur (VEGF). Ce médicament va donc inhiber les facteurs de croissances vasculaires endothéliaux et ainsi empêcher la formation de nouveaux vaisseaux (Cremolini *et al.*, 2015),
- le cétuximab (Erbix®) : il s'agit d'un anticorps spécifique aux récepteurs du facteur de croissance épidermique (EGFR). Ce récepteur se situe dans la membrane plasmique et est impliqué dans la prolifération cellulaire. Au sein des cellules cancéreuses, il a été montré une surexpression de ce récepteur entraînant une augmentation de la prolifération. Par conséquent, le cétuximab va bloquer ce récepteur et ainsi empêcher la prolifération de la tumeur. Malheureusement, en cas de mutation du gène KRAS, un pro-oncogène, les cellules sont résistantes au traitement (Li *et al.*, 2015),

- le panitumumab (Vectibix®) : il s'agit d'un autre anticorps qui bloque également les récepteurs du facteur de croissance épidermique (Price *et al.*, 2014).

d. Les effets secondaires de ces traitements

Dans le cadre de la prise en charge chirurgicale, il est parfois nécessaire de réaliser une colostomie. C'est le cas des cancers révélés par une occlusion digestive. Il s'agit d'une suture entre le colon, située en amont de la tumeur, et la paroi abdominale. Sa présence est le plus souvent temporaire et un rétablissement de la continuité colique se fait dans un second temps.

Les principales complications immédiates de la prise en charge chirurgicale des cancers colorectaux sont les douleurs abdominales et la diarrhée. La prise en charge de ces effets secondaires est symptomatique et fait appel aux anti-diarrhéiques et aux antalgiques. Ils sont très souvent transitoires. Parfois, la chirurgie colorectale se complique d'une infection du site opératoire. La prise en charge dépend du degré de gravité et va de l'antibiothérapie à la reprise chirurgicale. Les complications à distance de la chirurgie sont principalement les troubles du transit (diarrhée, constipation, incontinence fécale, etc.). Elles dépendent du segment réséqué et de la longueur de la résection. Ces effets indésirables ont tendance à s'estomper dans le temps. Leur prise en charge est symptomatique.

La chimiothérapie a de nombreux effets secondaires. Certains sont communs à toutes les molécules, tels que la nausée, les vomissements, la diarrhée, l'anémie, la neutropénie ou la thrombopénie. Pour améliorer la tolérance à la chimiothérapie, certains médicaments sont donnés de façon préventive (antiémétique, anti-diarrhéique). Chaque molécule de chimiothérapie a des effets secondaires qui lui sont spécifiques. Le 5 FU est très pourvoyeur de mucite (inflammation de la muqueuse buccale). La capécitabine donne un syndrome « mains-pieds » (rougeur, gonflement, sécheresse, ampoules au niveau de la paume des mains et de la plante des pieds). L'oxaliplatine donne une neuropathie au froid aux niveaux des extrémités (fourmillements dans les mains et les pieds). L'irinotécan a pour principal effet secondaire la diarrhée. Ces symptômes sont à connaître. En effet, une prise en charge spécifique de chacune de ces complications est importante pour la bonne réalisation du traitement.

De même, chaque molécule de thérapie ciblée a ces effets secondaires spécifiques. Les anti-VEGF donnent une hypertension artérielle et une protéinurie. Les anti-EGFR ont surtout des effets secondaires cutanés.

C. Le cancer du pancréas

Le cancer du pancréas occupe le deuxième rang des cancers digestifs en France par sa fréquence. L'adénocarcinome canalaire pancréatique (Pancreatic Ductal AdenoCarcinoma ; PDAC), représente 90% des tumeurs du pancréas. Il se développe au dépens des cellules exocrines du pancréas.

1. Classification

Suivant la taille de la tumeur pancréatique on peut distinguer quatre catégories T selon la 8^{ème} édition de la classification TNM :

- T1 : tumeur inférieure ou égale à 2 cm
- T2 : tumeur de plus de 2 cm et inférieure ou égale à 4 cm
- T3 : tumeurs de plus de 4 cm
- T4 : tumeurs envahissant l'axe cœliaque, l'artère mésentérique supérieure et/ou l'artère hépatique commune

La catégorie N distingue le degré d'envahissement ganglionnaire :

- N0 : pas de métastase ganglionnaire régionale
- N1 : 1 à 3 ganglions régionaux métastatiques
- N2 : à partir de 4 ganglions régionaux métastatiques

La catégorie M distingue les tumeurs sans métastase à distance (M0) et avec (M1).

Ainsi quatre stades sont définis :

- Le stade I : tumeur T1 ou T2 sans envahissement ganglionnaire régional et sans métastase à distance
- Le stade II : tumeur T3 sans envahissement ganglionnaire régional et sans métastase à distance ou tumeur T1/T2/3 avec envahissement ganglionnaire régional N1 mais sans métastase à distance
- Stade III : tumeur T4 avec ou sans envahissement ganglionnaire régional mais sans métastase à distance, ou tumeur T1/T2/T3 avec envahissement ganglionnaire régional N2 mais sans métastase à distance
- Le stade IV : tumeur avec métastases à distance

(Kamarajah *et al.*, 2017).

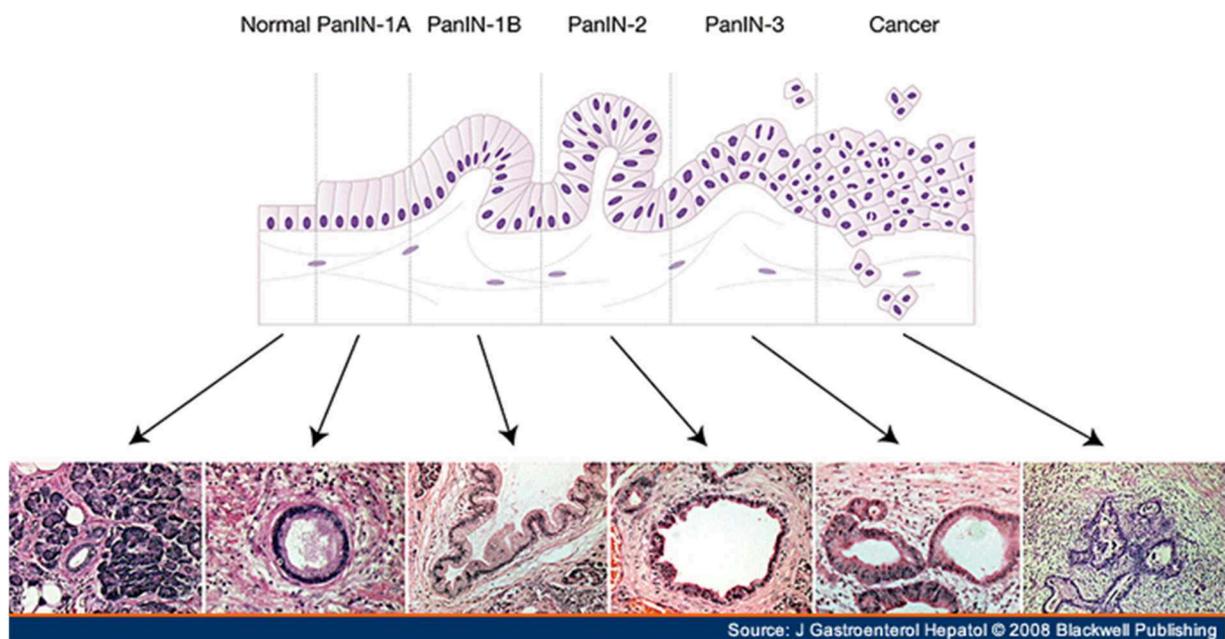


Figure 5 : Les différentes phases conduisant à la néoplasie intraépithéliale pancréatique

D'après le journal Gastroentérologie et hépatologie de 2008.

2. Tumorigénèse

Les cancers du pancréas se développent à partir de lésions préneoplasiques. Il existe 3 types de lésion précancéreuse pancréatique : le cystadénome mucineux, les lésions de TIPMP (Tumeurs intracanalaires papillaires et mucineuses du pancréas) et les lésions de PanIN (néoplasie intraépithéliale pancréatique).

Plus particulière, les PanIN sont des lésions microscopiques dans les canaux pancréatiques les plus petits (moins de 5 mm). Les PanIN peuvent être papillaires ou plates et sont constituées de cellules colonnaires à cubiques avec des quantités variables de mucines. Les PanINs sont classées en quatre groupes : PanIN-1A, PanIN-1B (PanINs de bas grade), PanIN-2 (PanIN de grade intermédiaire) et PanIN-3 (PanIN de haut grade), reflétant une augmentation progressive du grade histologique aboutissant à une néoplasie invasive (Figure 5). Les lésions de PanIN de bas grade peuvent être plates (1A) ou papillaires (1B), mais elles se caractérisent par l'absence d'anomalie nucléaire et la conservation de la polarité nucléaire. Sur le plan architectural, les lésions PanIN-2 sont légèrement plus complexes que les lésions PanIN-1 et présentent davantage de changements nucléaires, notamment une perte de polarité, un encombrement, une variation de la taille (pléomorphisme), une hyperchromasie et une pseudostratification nucléaire. En revanche, les lésions de PanIN-3, également appelées « carcinomes *in situ* », montrent une perte de polarité généralisée, des anomalies nucléaires et des mitoses fréquentes. Cependant, en tant que lésion pré-invasive, la PanIN-3 est toujours contenue par la membrane basale. Les PanINs sont les lésions précurseurs les plus fréquentes de cancer du pancréas. Le PDAC provient donc principalement de PanIN (Iovanna *et al.*, 2012).

Les mutations les plus fréquentes des adénocarcinomes canaux pancréatiques (PDAC) concernent les gènes KRAS, CDKN2A, TP53 et SMAD4 (Jones *et al.*, 2008). Le premier gène, KRAS, est muté dans la plupart des cancers du pancréas et est activé par des mutations ponctuelles sur le codon 12 (Xu *et al.*, 2005). Les mutations activées de KRAS suppriment l'activité régulée de la GTPase de la protéine KRAS, entraînant une activation de la cascade de signalisation MAPK. Le gène CDKN2A code pour deux protéines suppressives de tumeurs, P16^{INK4A} et P14^{ARF}. Il est également inactivé dans la plupart des cas de PDAC, par plusieurs mécanismes différents tels que la délétion homozygote, la mutation inactivante dans un allèle accompagné de la perte de l'autre allèle ou l'hyperméthylation du promoteur dans plus de 95% des cas. La protéine P16^{INK4A} régule le cycle cellulaire au point de contrôle G1/S en inhibant le complexe cycline D/CDK4/6, ce qui inhibe la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome (pRB). P14^{ARF} inhibe mdm2, régulateur négatif de TP53, favorisant ainsi les fonctions de TP53. En effet, la plupart des mutations dans CDKN2A inactivent les deux

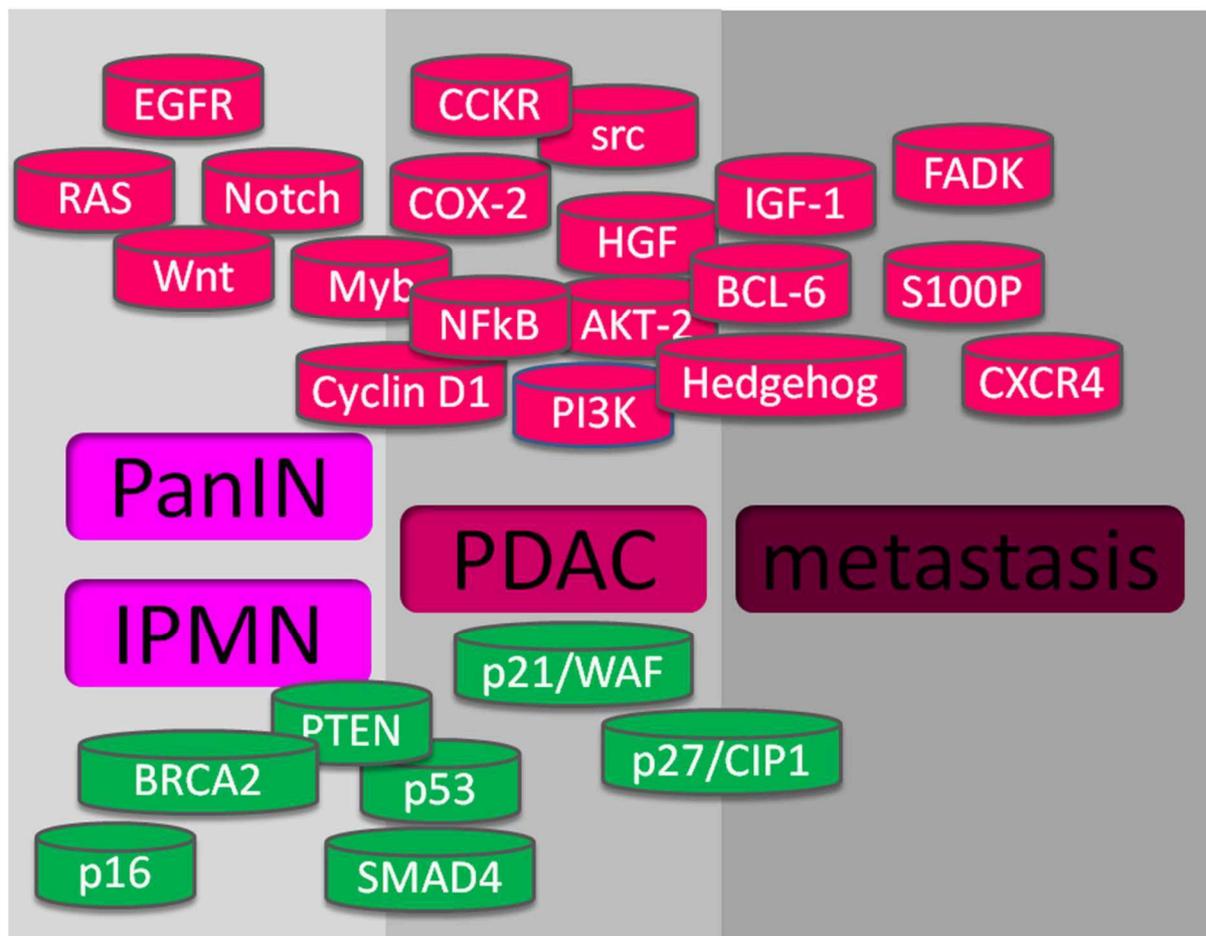


Figure 6 : Ensemble des gènes altérés dans le cancer du pancréas.

En haut, en rouge, on montre les altérations géniques avec gain de fonction, et dans la partie inférieure, en vert, sont montrés les gènes mutés avec perte de fonction, qui favorisent les lésions précancéreuses PanIN et IPMN (Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm), PDAC et métastases. D'après Iovanna, 2012.

protéines P16^{INK4A} et P14^{ARF}. De plus, des preuves suggèrent que P14^{ARF} possède également plusieurs fonctions en tant que suppresseur de la progression du PDAC (Muniz *et al.*, 2011). Le gène TP53 est inactivé dans environ 75% ou plus des cas de cancers du pancréas (Jones *et al.*, 2008). Le TP53 est un facteur de transcription induit par le stress qui exerce cet effet protecteur en induisant un arrêt du cycle cellulaire ou une apoptose dans les cellules endommagées. La perte de fonction de la protéine TP53 permet la survie et la division cellulaires en présence de dommages de l'ADN, ce qui facilite l'accumulation d'autres anomalies génétiques (Vogelstein & Kinzler, 2004). Contrairement à la plupart des gènes suppresseurs de tumeur, qui sont principalement inactivés par délétion ou par des mutations non-sens du cadre de lecture et des sites d'épissage, l'inactivation du gène TP53 se produit généralement à cause de mutations faux-sens d'un allèle, accompagnées d'une perte de l'autre allèle (Redston *et al.*, 1994).

La voie de signalisation des Smad concerne les facteurs de croissance de la famille du Transforming Growth Factor β (TGF β). SMAD4 est inactivé dans environ 55% des cancers du pancréas, principalement par délétion homozygote (Hahn *et al.*, 1996). SMAD4 est un médiateur clé des signaux du TGF- β ; la liaison du TGF- β à son récepteur déclenche la phosphorylation de SMAD2/3 pour former un complexe avec SMAD4 et d'autres facteurs stimulant la transcription de gènes qui régulent normalement la croissance cellulaire. La perte de la fonction SMAD4 supprime la voie du TGF- β dépendante de SMAD4 et donne lieu à une prolifération cellulaire non régulée (Siegel, 1999).

Les mutations les plus fréquentes sont trouvées au niveau des gènes KRAS, CDKN2A, SMAD4 et TP53 (Figure 6). Des voies de signalisation sont également impliquées : KRAS, TGF β , JNK, Intégrin, Wnt / Notch, Hedgehog, voies des petites GTPases qui contrôlent, de la transition entre les phases G1/S, l'apoptose, les dommages à l'ADN, l'invasion et l'adhésion des cellules hémophiles. Ces gènes sont altérés dans la plupart des cancers du pancréas (Saiki & Horii, 2014).

3. Incidence

En 2017, en France, 14 220 nouveaux cas de cancer du pancréas ont été diagnostiqués. Le cancer du pancréas semble toucher un peu plus les hommes que les femmes avec un rapport homme/femme de 1,48. Le taux d'incidence est en constante augmentation et de façon plus marquée chez les femmes. Le risque de développement d'un cancer du pancréas avant l'âge de 50 ans est faible, moins de 5% des cas mais augmente par la suite avec un pic d'incidence entre 65 et 75 ans. Ce cancer est très souvent diagnostiqué à un stade avancé, ce qui est dû à une absence de signe clinique au stade précoce (Bouvier *et al.*, 2017).

Le taux de mortalité est similaire à l'incidence. Il devrait être la deuxième cause de mortalité par cancer en Europe en 2030 (Ferlay *et al.*, 2016). De plus, le pronostic de ce cancer est un des plus sombres avec un taux de survie global à 5 ans, tous stades confondus, de 7 à 8% (Cowppli-Bony *et al.*, 2017).

4. Symptômes et diagnostic

Les premiers stades du développement du cancer du pancréas s'effectuent la plupart du temps sans entraîner de symptôme. Par conséquent, on diagnostique souvent le cancer du pancréas à un stade avancé.

a. Les signes cliniques

Les premiers signes cliniques sont l'état général du patient. En effet, une anorexie et un amaigrissement progressif peuvent être observés. Si la tumeur comprime le canal cholédoque, responsable de l'évacuation de la bile du foie vers l'intestin, la bile sera refluee dans la circulation sanguine (Modolell *et al.*, 1999). Les signes cliniques seront alors un jaunissement des yeux et de la peau, appelé ictère cutanéomuqueux, des urines foncées et des selles décolorées. Ces signes s'observent en cas de tumeur localisée dans la tête du pancréas.

La tumeur, suivant sa localisation et sa grosseur, peut provoquer des douleurs abdominales qui sont classiquement épigastriques avec irradiation dorsale. On dit qu'elles sont transfixiantes (Modolell *et al.*, 1999).

Des symptômes moins fréquents peuvent révéler la maladie tels qu'une pancréatite aiguë, une phlébite ou une embolie pulmonaire, des vomissements si la tumeur comprime le duodénum, ou une diarrhée chronique en cas d'insuffisance pancréatique exocrine.

b. Les marqueurs tumoraux sériques

Un des rares marqueurs sériques de ce type de tumeur est l'antigène carbohydrete 19-9 (CA 19-9) mais il reste un marqueur très peu fiable, bien que détecté chez 80% des patients symptomatiques (Huang *et al.*, 2001). En effet, sa valeur prédictive positive est insuffisante pour le diagnostic et le dépistage de l'adénocarcinome pancréatique.

Il apporte une information pronostique dans deux circonstances :

- au diagnostic, il prédit si la tumeur est résécable ou non et son caractère métastatique,
- pour le suivi thérapeutique, s'il n'est plus détecté après chirurgie, cela est synonyme de bon pronostic et sa diminution sous traitement est synonyme d'un contrôle tumoral satisfaisant.

Le dosage de CA 19-9 doit toujours être couplé à un examen par imagerie (Chiorean *et al.*, 2016).

D'autres marqueurs sanguins sont en cours d'exploration comme la thrombospondine 2, l'ADN tumoral circulant, les cellules tumorales circulantes et les vésicules extracellulaires circulantes mais ces derniers n'ont pas été validés à ce jour et ne peuvent donc pas être recommandés.

c. Une échographie abdominale

Le diagnostic peut être évoqué sur échographie abdominale. Cet examen peut permettre de mettre en évidence une masse pancréatique d'allure tumorale. Cependant, le pancréas est souvent mal vu en échographie en raison de l'interposition des anses digestives. Par contre, c'est un examen très utile en cas de compression de la voie principale (cholédoque) par une tumeur de la tête du pancréas car il permet de mettre en évidence de façon rapide et non irradiante, une dilatation de l'arbre biliaire en amont de la masse.

d. Une tomодensitométrie thoraco-abdomino-pelvienne

Cet examen va permettre de confirmer la présence d'une masse pancréatique d'allure tumorale et de définir sa localisation et sa taille. Il permet de définir les rapports de la tumeur avec les structures adjacentes, notamment les vaisseaux et le degré d'envahissement ganglionnaire et métastatique. Il permet de juger de la résécabilité de la lésion (Raman *et al.*, 2015).

e. Une imagerie par résonance magnétique (IRM)

Cet examen est indispensable avant toute chirurgie pancréatique afin de s'assurer de l'absence de métastase hépatique (Bipat *et al.*, 2005b).

f. L'écho-endoscopie avec biopsies

Cet examen est réalisé pour les tumeurs pancréatiques localisées. Il permet d'apporter des informations complémentaires sur l'envahissement locorégional de la tumeur. Il a pour principal intérêt de permettre la réalisation de biopsies pour confirmer le diagnostic d'adénocarcinome pancréatique. La confirmation histologique du cancer est indispensable pour les cancers « borderline », c'est-à-dire opérables après traitement néoadjuvant et pour les cancers localement avancés avant une chimiothérapie palliative. Dans le cas d'une tumeur opérable d'emblée, cet examen n'est pas indispensable. La preuve histologique sera obtenue sur la pièce opératoire. Cependant, en cas de doute au moment du diagnostic, il peut être indiqué (De Angelis *et al.*, 2013).

g. Biopsie d'une métastase

Lorsque la tumeur est métastatique, il est souvent plus simple d'obtenir la preuve histologique du cancer par une biopsie transcutanée d'une métastase. Le site métastatique principal des adénocarcinomes pancréatiques est le foie. Il est donc souvent pratiqué une ponction de

biopsie hépatique (PBH). Cet examen ne nécessite pas d'anesthésie générale et se fait sous repérage échographique. Il est donc moins invasif que l'échoendoscopie.

5. Traitements

Le traitement du cancer du pancréas est adapté au patient (âge, antécédents médicaux, état général du patient et profil de la tumeur). La chirurgie est le seul traitement curatif du cancer du pancréas. Elle n'est possible qu'en cas de tumeur localisée au pancréas donc diagnostiquée à un stade précoce. Dans les autres cas, la chimiothérapie avec ou sans radiothérapie associée est recommandée.

a. *La chirurgie*

La chirurgie consiste à retirer la tumeur avec un curage ganglionnaire adapté. Le type de chirurgie va dépendre de la localisation de la tumeur. Elle n'est possible que dans 10 à 20% des cancers du pancréas exocrines. Pour savoir si l'opération est envisageable, il faut évaluer :

- les caractéristiques propres de la tumeur, c'est-à-dire, sa taille, sa localisation dans le pancréas et par rapport aux structures adjacentes (vaisseaux sanguins, organes de voisinage), la présence de métastases ou non. La chirurgie est possible en cas de tumeur opérable d'emblée (tumeur sans contact artériel et avec un contact veineux minime) et en cas de tumeur « borderline » après chimiothérapie néoadjuvante (tumeur avec un contact inférieur à 180° sur l'artère mésentérique supérieure et/ou le tronc cœliaque). En cas de tumeur localement avancée ou métastatique la chirurgie n'est pas indiquée,
- les caractéristiques propres au patient, telles que son âge, son état général, ses fonctions cardiaque, rénale et pulmonaire. En cas de risques opératoires trop importants du fait des comorbidités du patient, l'intervention chirurgicale n'est pas possible.

La chirurgie peut être pratiquée soit par laparotomie (incision abdominale), soit par coelioscopie (incision minime permettant d'introduire des instruments chirurgicaux miniaturisés). Deux procédures sont proposées selon la localisation de la tumeur :

- la spléno-pancréatectomie gauche qui consiste à retirer le corps et la queue du pancréas ainsi que la rate (Malleo *et al.*, 2018),
- la duodéno-pancréatectomie céphalique qui est réalisée lorsque la tumeur est située dans la tête du pancréas. Cette opération consiste en l'ablation de la partie droite du pancréas, du canal cholédoque ainsi que des parties jouxtant l'estomac et le duodénum (Delpero *et al.*, 2014).

Par ailleurs, un curage ganglionnaire y est systématiquement associé. Pour limiter le risque de récurrence, un traitement adjuvant par chimiothérapie est prescrit.

b. Le traitement endoscopique

Si la chirurgie n'est pas envisageable, d'autres interventions peuvent réduire les symptômes liés à la tumeur. Par exemple, si le canal cholédoque est sténosé par la tumeur, une endoprothèse dans la voie biliaire principale peut être mise en place au cours d'une cholangiopancréatographie rétrograde endoscopique (CPRE). Ce traitement permet de réduire l'ictère. Les endoprothèses sont des dispositifs creux, en métal ou en plastique qui permettent l'écoulement de la bile dans le duodénum.

c. La chimiothérapie

La chimiothérapie est systématique dans le cas du cancer du pancréas avec ou sans chirurgie. Si la tumeur a été réséquée d'emblée, la chimiothérapie adjuvante dure 6 mois. Le traitement de référence est le FOLFIRINOX si l'état général du patient le permet ou, si le patient est non éligible à cette chimiothérapie, la gemcitabine, le 5FU ou la gemcitabine associée à la capécitabine. Ce traitement permet de diminuer le risque de récurrence. Elle permet d'éliminer les cellules cancéreuses résiduelles.

Si la tumeur est « borderline », opérable après traitement néoadjuvant, la chimiothérapie recommandée est le FOLFIRINOX. Le patient recevra une chimiothérapie adjuvante après la chirurgie.

Si la tumeur est non opérable c'est-à-dire localement avancée ou métastatique, la chimiothérapie va tenter de contrôler le développement de la tumeur et les symptômes. Parfois, la réponse au traitement est telle que la chirurgie peut être reconsidérée dans le cas des tumeurs localement avancées. La chimiothérapie sera alors considérée comme une chimiothérapie d'induction. Différents types de chimiothérapies de première ligne sont alors possibles selon l'état général du patient et ses comorbidités :

- FOLFIRINOX : 5-FU + Acide folinique (LV5FU2) + Irinotécan (ou Campto®) + Oxaliplatine (Eloxatine®)
- Gemcitabine (Gemzar®) + nab-paclitaxel (ou Abraxane®)
- Gemcitabine + paclitaxel
- Gemcitabine
- GEMOX : gemcitabine + oxaliplatine
- Gemcitabine + capécitabine (Xéloda®)

Chaque protocole a des modalités d'administration différentes.

Chacune de ces molécules a un mode d'action différent :

- la gemcitabine : anti-métabolique spécifique de la phase S du cycle cellulaire, phase de synthèse de l'ADN,
- l'irinotécan : un agent antinéoplasique qui agit en inhibant spécifiquement l'ADN topo-isomérase I. L'irinotécan est métabolisé en un métabolite actif, le SN-38, qui est plus actif sur la topo-isomérase I purifiée. L'inhibition de l'ADN topo-isomérase I par l'irinotécan ou le SN-38 induit des lésions simple-brin de l'ADN. Ces lésions vont bloquer la fourche de réplication de l'ADN et être responsables de l'activité cytotoxique,
- le paclitaxel : un agent anti-microtubules. Il stimule l'assemblage des dimères de tubuline en microtubules et stabilise les microtubules en empêchant leur dépolymérisation. Cette stabilité inhibe la réorganisation dynamique normale du réseau de microtubules, un phénomène essentiel aux fonctions vitales des cellules au cours de l'interphase et de la mitose. De plus, le paclitaxel induit la formation anormale de groupements ou de faisceaux de microtubules pendant toute la durée du cycle cellulaire et la constitution de multiples asters de microtubules pendant la mitose,
- le nab-paclitaxel : est synthétisé à partir du paclitaxel en présence d'albumine humaine. Il a été initialement développé pour diminuer la toxicité de l'agent véhiculant le paclitaxel et augmenter ainsi sa pénétration dans les tissus tumoraux.

d. La radiothérapie

La radiothérapie associée à une chimiothérapie orale (capécitabine, Xélo[®]), appelée radiochimiothérapie, peut être proposée en cas de cancer du pancréas localisé. La radiothérapie consiste à irradier la tumeur avec des rayons de haute énergie (Jiang *et al.*, 2014). Ce type de traitement est indiqué en cas de tumeur localement avancée mais ne pouvant pas être opérée ou en cas de tumeur « borderline », après la chimiothérapie néoadjuvante et avant la chirurgie pancréatique. Elle n'est pas systématique et son indication doit être discutée au sein d'une RCP.

Cette radiochimiothérapie dure 6 semaines. Le traitement est fractionné sur des durées de 15 minutes tous les jours, cinq jours par semaine.

En cas de cancer du pancréas métastatique, la radiothérapie pancréatique n'est pas indiquée. Cependant, elle peut être utilisée à visée antalgique sur des métastases osseuses douloureuses par exemple.

e. Les effets secondaires

Les principales complications immédiates de la prise en charge chirurgicale des cancers du pancréas sont la gastroparésie, c'est-à-dire l'incapacité à reprendre une alimentation normale

plusieurs jours après la chirurgie avec un besoin prolongé d'une sonde naso-gastrique en aspiration, les fistules pancréatiques et les complications infectieuses du site opératoire.

Les principales complications à distance de la chirurgie pancréatique sont le diabète, l'insuffisance pancréatique exocrine et les troubles digestifs et notamment la diarrhée.

La chimiothérapie a de nombreux effets secondaires. Certains sont communs à toutes les molécules et ont été décrits plus haut.

De plus, chaque molécule de chimiothérapie a des effets secondaires qui lui sont spécifiques. La gemcitabine donne très fréquemment un syndrome pseudo-grippal (fébricule, myalgies). Le nab-paclitaxel provoque une alopécie (perte des cheveux) et une neuropathie périphérique. Les effets secondaires classiques du 5-FU, de l'oxaliplatine et du FOLFIRI ont été détaillés précédemment.

La radiothérapie pancréatique peut provoquer des nausées, des vomissements, une diarrhée, une asthénie et des complications dermatologiques en regard de la zone irradiée.

Mais n'oublions pas, qu'à 5 ans, tous stades confondus et traitements effectués, la survie est de 7 à 8%. Et que celle-ci n'a guère augmentée depuis 10 ans (6 à 7% entre 1989 et 2010).

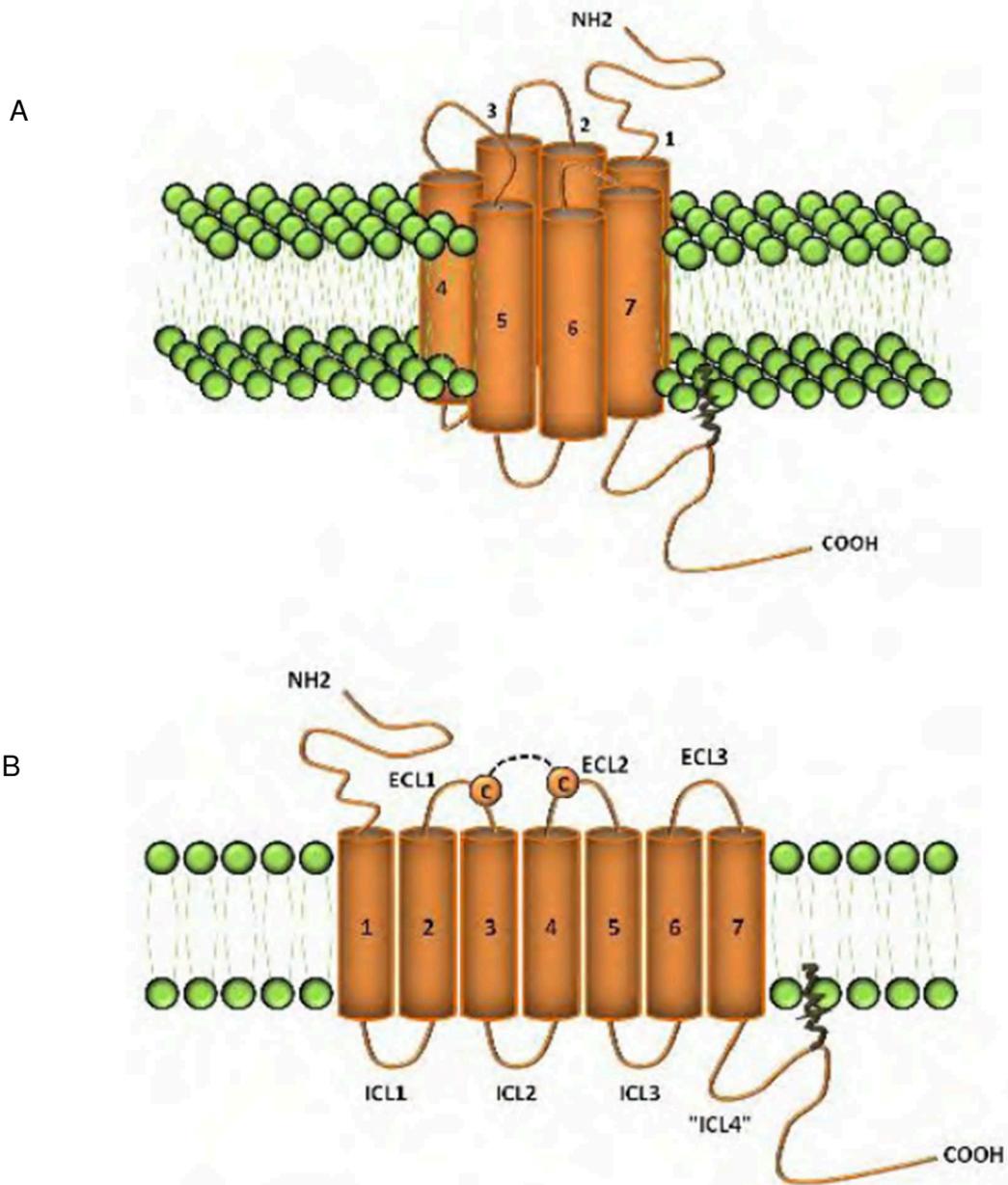


Figure 7 : Structure schématique générale des récepteurs couplés aux protéines G

A) Les RCPG sont caractérisés par 7 domaines transmembranaires qui sont reliés entre eux par trois boucles extracellulaires (ECL1 à 3) et trois boucles intracellulaires (ICL1 à 3). Ils possèdent également un pont disulfure entre ECL1 et ECL3. De plus, l'extrémité N-terminale est extracellulaire alors que l'extrémité C-terminale est intracellulaire. Un ancrage lipidique dans la membrane peut se former au niveau de l'extrémité C-terminale, créant ainsi une 4ème boucle intracellulaire.

B) Les 7 hélices transmembranaires forment une poche, site de liaison du ligand

II. Les récepteurs couplés aux protéines G

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) constituent la plus grande famille de protéines chez les mammifères. En effet, dans le génome humain environ 900 gènes codent pour des RCPG dont 500 codent pour des récepteurs gustatifs et olfactifs et 400 pour des récepteurs pouvant se lier à des ligands endogènes. Ces récepteurs sont impliqués dans une très grande diversité de processus physiologiques et cellulaires comprenant : la réponse immunitaire, la vision, la communication neuronale et le comportement. Ils reçoivent également de nombreux stimuli extracellulaires sous forme de lumière, de petites molécules, de peptides, de lipides et de protéines. Ils transmettent ainsi le signal à travers la membrane plasmique et activent un certain nombre de voies de signalisation intracellulaires. Ces RCPG sont également associés à de graves maladies et représentent de très bonnes cibles thérapeutiques, avec près de 40% des médicaments commercialisés dirigés contre eux (Keri & Barth, 2018). De plus, les RCPG sont impliqués dans de nombreux cancers. En effet, les RCPG contrôlent de nombreuses caractéristiques de la tumorigenèse, notamment les fonctions médiées par les cellules immunitaires, la prolifération, l'invasion et la survie cellulaire. Parmi celles-ci, citons les mutations ponctuelles, la surexpression génique, l'inhibition de l'expression des RCPG par méthylation du promoteur et la variation du nombre de copies de gènes (Bar-Shavit *et al.*, 2016).

A. Structure des RCPG

L'ensemble des RCPG partagent une architecture commune. Elle est caractérisée par sept hélices alpha transmembranaires composées chacune par 25 à 35 acides aminés. Ces hélices alpha sont reliées entre elles par trois boucles cytoplasmiques et trois boucles extracellulaires. La présence possible d'une cystéine est observée sur les boucles extracellulaires 1 et 2, pouvant former un pont disulfure. L'extrémité carboxy-terminale, située après la courte hélice 8 qui suit directement le domaine transmembranaire 7, possède un site possible de palmitoylation (Figure 7) créant ainsi une « pseudo boucle intracellulaire 4 ». Ce site de modification post-traductionnelle évoque un ancrage lipidique dans la membrane, créant ainsi une quatrième boucle intracellulaire. Ces récepteurs sont regroupés en familles. Diverses classifications ont été effectuées, elles sont basées sur des critères variés tels que la séquence, le mode de liaison du ligand, la structure, la phylogénie ou encore la composition en acides aminés. La classification établie par Kolakowski est à l'heure actuelle la plus répandue. Elle détermine sept classes de A à G et elle est basée sur la recherche d'analogies entre les RCPG connus des vertébrés ou d'invertébrés (Kolakowski, 1994). Chaque famille de RCPG correspond à une lettre. La classe A regroupe les RCPG dont le modèle est la

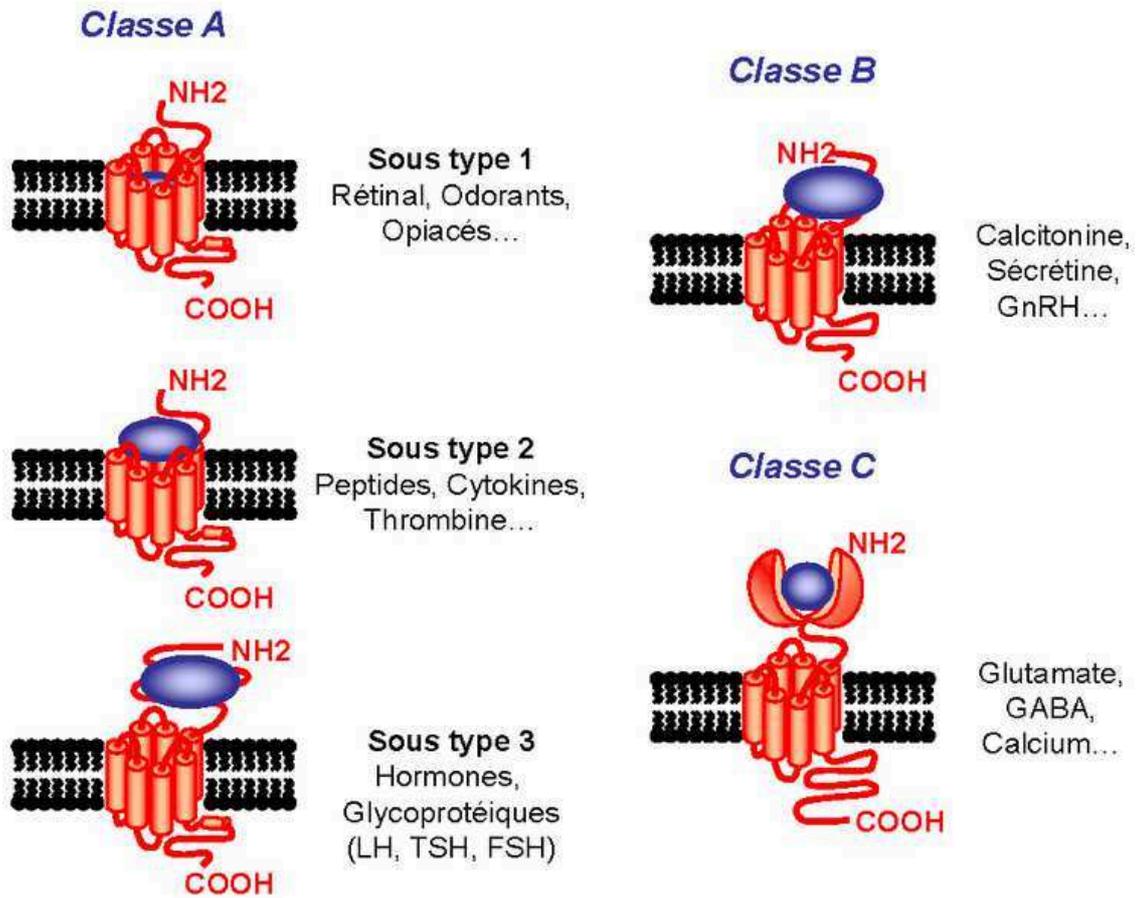


Figure 8 : Les différentes classes A à C de récepteurs couplés aux protéines G

Le site de liaison du ligand est représenté en bleu. Selon les récepteurs considérés, il est différemment positionné. D'après Maurel Damien.

rhodospine, ceux de la classe B ont comme modèle la sécrétine, les RCPG de la classe C sont de type « metabotrope-glutamate/phéromone », ceux de la classe D sont de type « fungal pheromone », les RCPG de la classe E ont comme modèle « l'AMP cyclique » et ceux de la classe la F sont de type « frizzled/smoothened » (Figure 8).

1. Classe A : « rhodopsin-like » récepteurs

La classe A est, la famille la plus décrite. Elle regroupe le plus grand nombre de récepteurs avec plus de 80% des RCPG connus. Les récepteurs β 2-adrénergiques et la rhodopsine sont les premiers RCPG de cette famille à avoir été cristallisés. Ces RCPG se lient plus particulièrement aux hormones, aux polypeptides de petite et grande tailles, des amines biogènes (exemple : la sérotonine), des photons ou encore des molécules apparentées aux lipides. Certains RCPG de cette famille ont été surnommés récepteurs sensoriels car plus de la moitié pourrait reconnaître des stimuli olfactifs, gustatifs ou la lumière. Cette classe comprend trois sous-groupes :

- A.a comprend les récepteurs des petites molécules,
- A.b comprend les récepteurs aux neuropeptides,
- A.c correspond aux RCPG contenant des répétitions riches en leucines ou LGR (leucine rich repeats containing GPCR). Cette sous-classe comprend les récepteurs aux hormones glycoprotéines.

Les particularités structurales des RCPG de cette famille sont la présence d'une extrémité N-terminale assez courte, de séquences consensus telles que le motif E/DRY à l'extrémité cytoplasmique du domaine transmembranaire 3 et le motif NPXXY qui se situe dans le domaine transmembranaire 7 (Rovati *et al.*, 2007). Le motif E/DRY a été étudié pour son rôle dans l'activation des RCPG de classe A. Ce motif est très conservé dans son ensemble, excepté la tyrosine qui ne semble pas primordiale pour la fonction du motif. La présence d'un aspartate dans le domaine transmembranaire 2 semble jouer un rôle important dans la reconnaissance du ligand et le couplage à la protéine G (Ceresa & Limbird, 1994). Le site de liaison des récepteurs est formé majoritairement par les domaines transmembranaires. Il existe cependant des exceptions notamment les récepteurs du sous-groupe c de la classe A. A cette classe appartiennent les récepteurs aux orexines, sujet d'étude de cette thèse.

2. Classe B : « secretin-like » récepteurs

Les RCPG de la classe B n'ont qu'une faible homologie avec ceux de la classe A car ils ne possèdent que 12% d'homologie de séquence. En effet, il existe des différences importantes

entre ces deux classes, les motifs « signature » présents au niveau des RCPG de classe A ne sont pas présents chez les RCPG de classe B. Les récepteurs appartenant à cette classe sont, par exemple, le récepteur du glucagon, du GIP (Gastric Inhibitory Polypeptide), du GLP-1R et GLP-2R (Glucagon Like Peptide 1/2), le récepteur de l'hormone parathyroïdienne (PTH), le récepteur à la calcitonine (CT), le récepteur de la GHRH (Growth Hormone Releasing Hormone), les récepteurs du VIP (Vasoactive Intestinal Peptide) et du PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide). Cette classe de RCPG va se lier avec des hormones et des neuropeptides.

La différence structurale essentielle entre les RCPG de la classe A et de la classe B est la taille de l'extrémité N-terminale, elle est beaucoup plus longue pour les RCPG de la classe B, elle peut, en effet, atteindre jusqu'à 300 acides aminés. Cette extrémité contient six cystéines. La formation des ponts disulfure entre ces cystéines va entraîner la structuration de l'extrémité N-terminale en motif « sushi » et ainsi jouer un rôle dans la reconnaissance du ligand.

3. Classe C : « metabotrope-glutamate/pheromone » récepteurs

La classe C représente les récepteurs métabotropiques du glutamate, les récepteurs au calcium, les récepteurs du goût et les récepteurs aux phéromones. Leur particularité structurale est la longueur de l'extrémité N-terminale, qui peut contenir jusqu'à 500 acides aminés. Cette extrémité se replie sur elle-même en formant deux lobes qui vont constituer le site de liaison de l'agoniste. Pour cette classe de récepteurs, de nombreux ligands allostériques vont moduler l'activité du récepteur en se fixant sur des sites différents du site orthostérique. Une autre particularité est la présence de la courte boucle intracellulaire en troisième position, cette particularité est très conservée au sein de la classe C (Pin *et al.*, 2003).

L'activation des RCPG de la classe C s'effectue par un phénomène de dimérisation entre deux récepteurs identiques ou différents. Cette dimérisation est cruciale dans le phénomène d'activation (Pin *et al.*, 2003).

4. Autres classes D, E, F

La classe D est principalement composée de récepteurs aux phéromones exprimés dans l'organe voméronasal (organe situé sur la partie inférieure du nez) (Nakagawa *et al.*, 2005).

La classe E est caractérisée par les quatre récepteurs à l'AMPc (cAR 1-4) et d'autres récepteurs « cAMP receptor-like » observés chez *Dictyostelium discoideum* (moisissure).

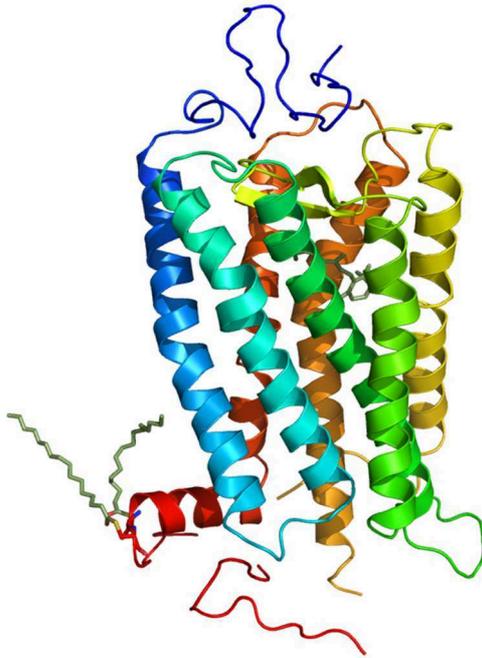


Figure 9 : Structure cristallographiée de la rhodopsine

D'après Palczewski 2000.

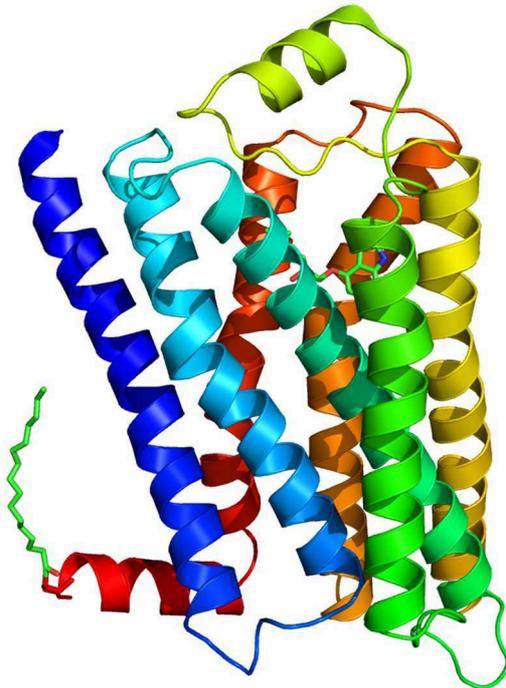


Figure 10 : Structure cristallographiée du récepteur β -2 adrénergique avec le lysosyme T4

D'après Jähnichen S.

Actuellement, aucun équivalent de ces RCPG n'a été retrouvé chez les vertébrés, c'est donc une famille minoritaire (Prabhu & Eichinger, 2006).

La classe F regroupe les récepteurs homologues aux protéines « frizzled » et « smoothed ». Ces RCPG jouent un rôle dans le développement embryonnaire ainsi que dans le contrôle de la prolifération et de la polarité cellulaire. Les récepteurs « frizzled » vont se lier avec Wnt, qui a comme coactivateur transcriptionnel la β -caténine, alors que les récepteurs « smoothed » vont activer le signal Hedgehog. Structurellement, ces récepteurs possèdent des boucles intracellulaires très courtes et la longueur de leur extrémité C-terminale varie d'une vingtaine à plus de 200 acides aminés chez l'Homme. Leur homologie de séquence avec la classe B est faible mais significative (Malbon, 2004)

B. Structure moléculaire des RCPG

Jusqu'en 2007, le seul RCPG dont la structure tridimensionnelle avait été résolue, était la rhodopsine (Palczewski *et al.*, 2000) (Figure 9). En effet, la grande plasticité/flexibilité structurale des RCPG leur permet de détecter divers stimuli et de se coupler à différentes voies de signalisation. Les RCPG sont pléiotropes vis-à-vis des protéines de la cascade de signalisation cellulaire qu'ils activent dans une cellule et, par conséquent, il existe plus d'une conformation pour un même récepteur. Cependant, cette flexibilité structurale va compliquer la caractérisation de la structure, les protéines doivent être stables sur le plan structural pour être cristallisées. De plus, ces récepteurs sont fortement enchassés dans la membrane plasmique nécessitant lors des étapes de purification, l'utilisation de détergent pouvant être délétère pour leur stabilité/fonctionnalité. Des études se sont concentrées sur la modification et la stabilisation des récepteurs afin de faciliter leur détermination structurale et une meilleure compréhension du rôle des RCPG (Keri & Barth, 2018). En 2007, grâce aux travaux de longue haleine de Kobilka, les conditions nécessaires à la purification, la solubilisation et la stabilisation de ces RCPG ont été mises au point et ont permis la cristallisation du récepteur β 2-adrénérique en présence d'un antagoniste inverse (Figure 10). Aujourd'hui, plus de 50 RCPG ont été cristallisés grâce à différentes techniques (Pándy-Szekeres *et al.*, 2018).

Les progrès techniques qui ont conduit à cette avancée spectaculaire sont les suivants (Jacobson & Costanzi, 2012) :

- le récepteur va être fusionné avec le lysozyme T4, qui permet la formation de cristaux en augmentant la surface hydrophile du récepteur solubilisé à l'aide de détergents. Le lysozyme T4 sera généralement inséré au niveau de la boucle intracellulaire 3 entre les domaines transmembranaires 6 et 7 (Rosenbaum *et al.*, 2007) mais peut aussi être

fusionné avec l'extrémité N-terminale, pour faciliter la co-cristallisation d'un complexe protéine-récepteur (Rasmussen *et al.*, 2011),

- la stabilisation de la structure peut également être obtenue grâce à des mutations ponctuelles et dirigées, soit dans les régions liant les ligands, soit dans les régions plus distantes (Warne *et al.*, 2008),
- les anticorps peuvent également être utilisés pour stabiliser les récepteurs (Rosenbaum *et al.*, 2007). En effet, des anticorps de lamas dépourvus de chaînes légères et renommés nanocorps sont utilisés. Pour générer des nanocorps spécifiques du récepteur étudié, un lama est immunisé avec ce récepteur lié à un agoniste purifié. Ce récepteur est reconstitué dans des vésicules phospholipidiques en présence des nanocorps pour qu'il soit stabilisé (Rasmussen *et al.*, 2011),
- le développement d'agonistes spécialisés peut également permettre de stabiliser la structure. Ce sont soit des agonistes covalents (Rosenbaum *et al.*, 2011), c'est-à-dire qui vont se fixer au niveau du récepteur avec une liaison covalente, soit des agonistes sélectifs sur le plan conformationnel, c'est-à-dire capable de stabiliser les récepteurs dans une configuration spécifique de l'état actif (Xu *et al.*, 2011),
- une matrice mimant une membrane plasmique est réalisée, c'est la phase cubique lipidique. Elle forme une bicouche lipidique aqueuse permettant de comprendre les mécanismes fonctionnels et les interactions lipides-protéines des structures protéiques membranaires (Cherezov, 2011).

Suite à ces approches méthodologiques, les RCPG ont pu être stabilisés et ainsi leur structure définie et étudiée. Toutes les structures cristallographiées ont confirmé l'architecture générale à 7 domaines transmembranaires (TM), avec une huitième hélice cytoplasmique (H8) immédiatement après le TM7 et parallèle à la surface de la membrane plasmique. Une grande similarité entre les régions TM a été observée, avec un noyau structural commun de 97 résidus fournissant une bonne base pour la modélisation par homologie. Des différences plus importantes sont observées dans le site de liaison du ligand et dans le domaine extracellulaire, qui est par exemple très compact chez la rhodopsine pour protéger le ligand rétinien hydrophobe de la phase aqueuse. Dans les autres structures de RCPG révélées jusqu'ici, le domaine extracellulaire montre une conformation plus ouverte pour servir de sorte d'entonnoir d'entrée pour les ligands diffusibles et solubles dans l'eau. Dans le domaine cytoplasmique, de petites variations de la longueur et de la structure secondaire des boucles de connexion entre les domaines TM contribuent à la sélectivité des protéines G. À partir d'études structurales et fonctionnelles, il est maintenant évident qu'un grand nombre des résidus conservés jouent un rôle double, souvent de concert avec des molécules d'eau : ils contraignent le domaine TM7 dans sa conformation inactive et sont les principaux déterminants des changements structuraux d'activation des récepteurs. Les résidus les plus

importants à cet égard sont l'arginine et la tyrosine, des motifs E/DRY et NPXXY. Les deux résidus représentent des micro-interrupteurs, qui dans leurs états « off » et « on » stabilisent respectivement la conformation inactive et active des RCPG. Le motif E/DRY fait partie d'un réseau de liaisons hydrogène reliant les domaines TM3 et TM6 censé stabiliser l'état inactif de la rhodopsine, des adrénorécepteurs et peut-être d'autres RCPG de classe A. Le motif NPXXY au niveau des domaines TM7 et H8 fournit deux contraintes. L'asparagine fait partie d'un réseau de liaison hydrogène reliant TM1, TM2 et TM7, tandis que la tyrosine (Y) contraint le domaine TM7 avec l'H8 à former le microdomaine TM7 – H8. De plus, les RCPG contiennent le motif CWXP conservé dans le domaine TM6 avec un repliement dû à une proline. D'autres résidus sont également hautement conservés tels que les prolines, qui induisent des torsions dans les domaines TM, ainsi qu'un pont disulfure entre la cystéine du domaine TM3 et la cystéine de la boucle extracellulaire 2 reliant les domaines TM4 et TM5 (Hofmann *et al.*, 2009)

C. Transduction du signal par les protéines G

Une fois activés, les RCPG subissent des changements structuraux au niveau de leurs domaines transmembranaires qui vont permettre l'activation de la protéine G. C'est cette protéine G qui induira la transduction du signal intracellulaire et donc conditionnera les effets biologiques. Certains RCPG peuvent être couplés à une seule protéine G, d'autres récepteurs le sont avec plusieurs protéines G différentes.

1. Les protéines G

Les protéines G sont des protéines hétérotrimériques constituées de sous-unités α , β et γ . Lors de son activation par le récepteur, elle se dissocie en deux parties indépendantes, la sous-unité α et le complexe $\beta\gamma$ qui vont chacun interagir avec des protéines effectrices intracellulaires afin de moduler leurs fonctions (Robishaw & Berlot, 2004). Des études de clonage par homologie ont permis d'identifier 35 gènes codant pour de nombreuses sous unités α , β et γ différentes, soit 16 codant pour les α , 5 pour les β et 14 pour les γ (Milligan & Kostenis, 2006). Concernant les sous-unités alpha, il existe quatre sous-groupes qui sont basés sur la similarité de leur séquence primaire : $G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_{q/11}$ et $G\alpha_{12/13}$. Je me suis focalisée sur la protéine $G\alpha_q$ qui est la sous-unité de la protéine G majoritairement liée au récepteur aux orexines de type 1. $G\alpha_q$ est une protéine de 359 acides aminés comprenant deux domaines : un domaine hélicoïdal et un domaine GTPasique. Le domaine GTPasique est responsable de l'hydrolyse du GTP en GDP ainsi que de la liaison aux sous-unités $\beta\gamma$ lors de son état inactif. Ce domaine est conservé chez tous les membres de la superfamille des protéines G. Le domaine GTPasique contient trois boucles flexibles qui changent de

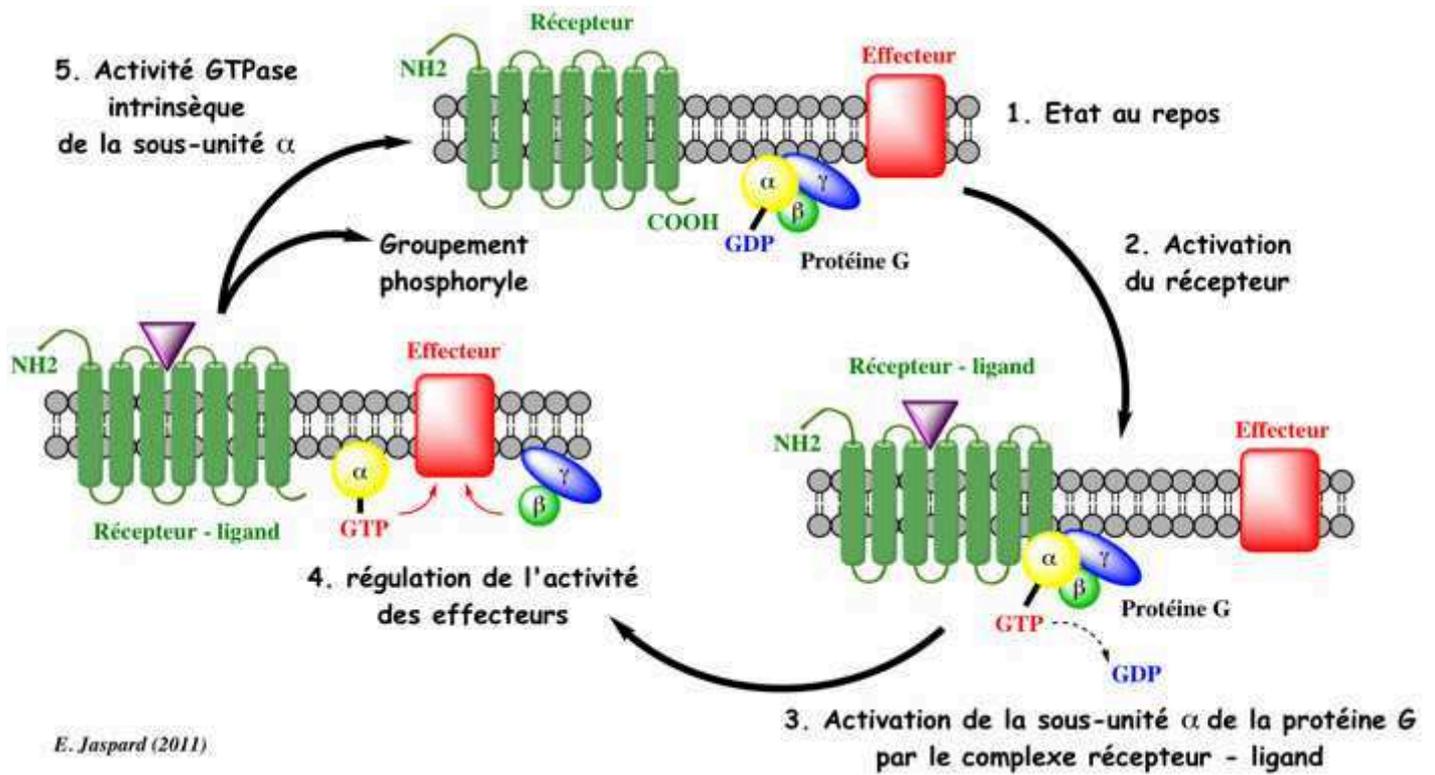


Figure 11 : Cycle d'activation des protéines G

A l'état basal la protéine G est hétérotrimérique et peut être précouplé à un RCPG. L'activation d'un RCPG par un agoniste va induire un changement conformationnel de la protéine G. Celui-ci permet l'échange de GDP en GTP et conduit à l'activation de la protéine G. La protéine G liée au GTP se dissocie en deux parties, la sous-unité α liée au GTP et le complexe $\beta\gamma$. Ces deux parties vont agir sur des effecteurs cellulaires différents. L'hydrolyse du GTP lié à la sous-unité α déclenche le retour à l'état basal de la protéine G. D'après Jaspard, 2011.

conformation lorsqu'elles sont liées au GTP. Le domaine hélicoïdal contient six hélices α , qui encapsulent les nucléotides dans le noyau protéique en formant un couvercle sur la poche de liaison aux nucléotides (Kamato *et al.*, 2015).

Les sous-unités β sont similaires entre elles alors que les sous-unités γ présentent de nombreuses variations. La grande diversité de ces 3 sous-unités va permettre de nombreuses possibilités d'assemblage permettant cette étonnante variété de réponses biologiques liées au RCPG.

2. Couplage des protéines G aux récepteurs

Pour savoir quelle protéine G est couplée à un RCPG donné, diverses techniques ont été utilisées. Les résultats montrent qu'un RCPG peut interagir avec plusieurs protéines G et non une seule. Cependant, il semblerait que seulement 11% des RCPG soient capables d'activer plusieurs types de protéines G avec diverses efficacités, les autres RCPG seraient sélectifs pour un seul type de protéine G (Wong, 2003).

De nombreuses études se sont intéressées à la spécificité de couplage des protéines G aux récepteurs. En plus d'avoir une disponibilité des différentes protéines G au sein des cellules en fonction du récepteur, des régions du RCPG lui-même ont été déterminées comme étant impliquées dans le couplage et l'activation des protéines G. Les régions caractérisées sont la deuxième et la troisième boucle intracellulaires ainsi que la partie C terminale. La liaison du ligand induit un déplacement majeur du 6^{ème} segment transmembranaire du récepteur, exposant une fente hydrophobe dans laquelle l'hélice en position C-terminale de la protéine $G\alpha$ est capable de s'insérer. Cette interaction a, à son tour, modifié la structure tridimensionnelle de la protéine G, menant éventuellement à son activation (Lin, 2013).

3. Activation des protéines G

Les protéines G hétérotrimériques se situent à proximité de la membrane plasmique, elles sont préformées et déjà couplées au récepteur. Par conséquent, le changement conformationnel des RCPG induite par la liaison du ligand engendrerait le changement conformationnel de la protéine G et ainsi son activation (Figure 11). Il existe plusieurs sites d'interaction des protéines G avec les RCPG. Le mieux caractérisé est un site appartenant à la sous-unité $G\alpha$, dans son extrémité C-terminale (Galés & Bouvier, 2007; Oldham & Hamm, 2008).

Une fois l'activation des protéines G, des changements conformationnels apparaissent ainsi que l'échange de GDP en GTP. Dans le cycle classique des protéines G, le RCPG lié aux agonistes fonctionne comme un facteur d'échange du nucléotide guanine (GEF) pour catalyser la libération rapide du GDP à partir du domaine Ras-like GTPase de $G\alpha$. Le remplacement

rapide par le GTP produit une réorganisation localisée dans les régions nécessaires à l'activation et à l'association avec les effecteurs. La libération du GDP lié à la sous-unité α à son état basal, est suivie par la liaison du GTP à celle-ci, entraînant sa séparation du dimère $\beta\gamma$ (Litosch 2016). La sous-unité $G\alpha$ liée au GTP va hydrolyser le GTP pour activer ses effecteurs. La sous-unité $G\alpha$ va donc se retrouver dans son état inactif reliée à son GDP. Cette étape permettra la reconstitution du complexe trimérique. Quant au dimère $\beta\gamma$, il pourra activer d'autres effecteurs (Litosch, 2016).

4. Effecteurs des protéines G

La sous-unité $G\alpha$ et le dimère $\beta\gamma$ peuvent activer des effecteurs intracellulaires spécifiques.

La sous-unité $G\alpha$ a différents effecteurs, tels que :

- l'adénylate cyclase (AC). Elle va permettre de synthétiser de l'AMPc à partir d'ATP. Cette réaction va utiliser du magnésium et va provoquer la libération de pyrophosphate. L'AMPc sera alors un activateur de la protéine kinase A (PKA). L'AC est activée spécifiquement par la protéine $G\alpha_s$ lié au GTP alors qu'elle est inhibée par $G\alpha_i$ -GTP,
- la phospholipase C (PLC). Cet effecteur sera activé par $G\alpha_q$ et aboutira à la synthèse du diacylglycérol (DAG) qui restera au niveau de la membrane plasmique et d'inositol 1,4,5 triphosphate (IP_3) qui sera libéré dans le cytoplasme à partir du phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP_2) membranaire. L' IP_3 va interagir avec les canaux calciques afin de libérer le calcium retenu dans les réservoirs du réticulum endoplasmique. L'élévation de la concentration en calcium cytoplasmique peut activer un certain nombre de voies dépendantes du calcium. Le DAG va, quant à lui, activer la protéine kinase C (PKC) membranaire. La PKC va catalyser, en présence de calcium, la phosphorylation d'un grand nombre de substrats intervenant dans la différenciation cellulaire, la mitose, l'exocytose et d'autres processus cellulaires (Litosch, 2016),
- les autres types d'effecteurs : la phosphodiesterase, les phospholipases D et A2, la GMP cyclase et certains canaux ioniques (calciques et potassiques).

Le dimère $\beta\gamma$ ne subit pas de modification conformationnelle après sa dissociation de la sous-unité $G\alpha$. Le dimère est capable d'activer de nombreux effecteurs. Il a une action directe sur les canaux potassiques, permettant ainsi leur ouverture. Ce complexe va également activer la phospholipase A2 et certaines phospholipases β . Il va pouvoir également activer certains types d'AC mais aussi, la PI3Kinase et donc activer la voie des MAPKinases par des mécanismes utilisant Src, proto-oncogène codant pour des tyrosines kinases. Ce dimère va également jouer un rôle dans la désensibilisation (Clapham & Neer, 1997; Luttrell *et al.*, 1997).

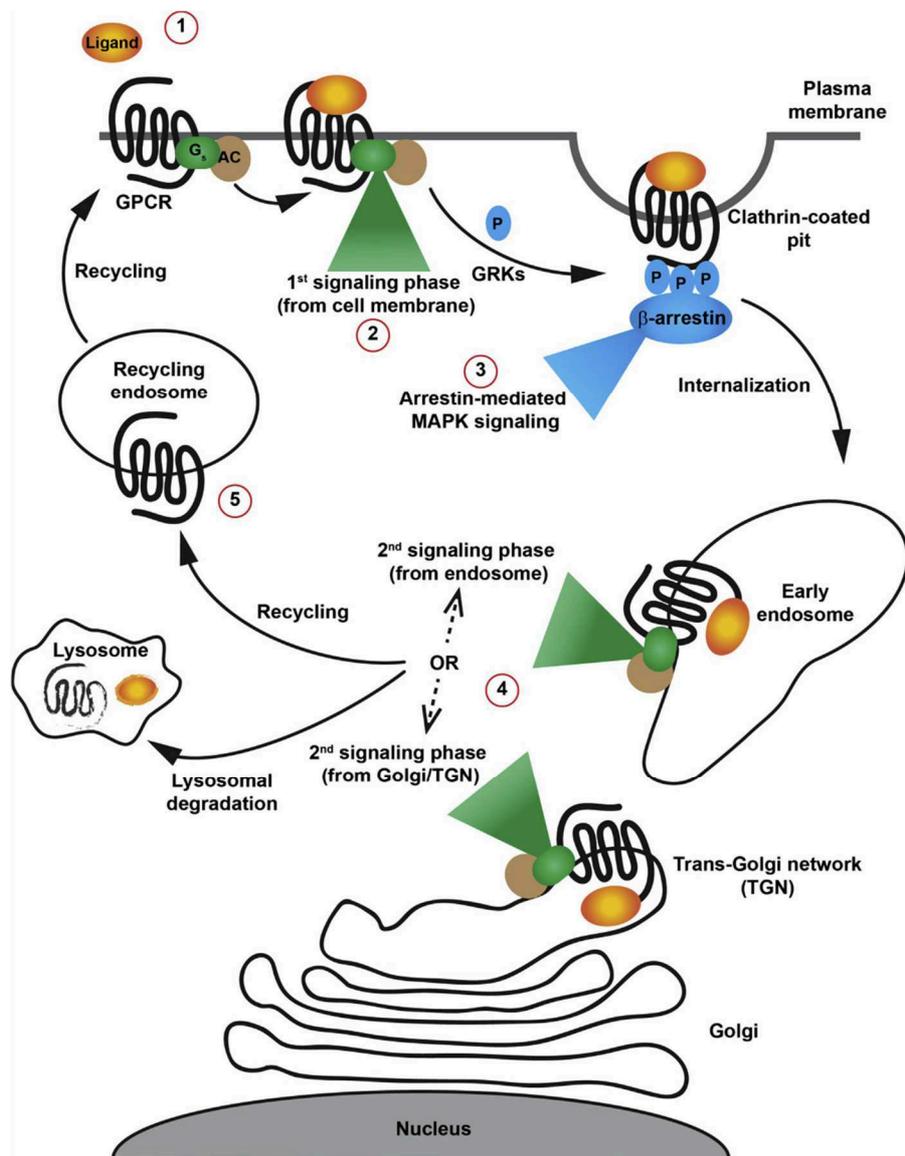


Figure 12 : Modèle de l'internalisation d'un récepteur couplé aux protéines

G

La liaison d'un ligand à un RCPG (1) induit une première phase de la signalisation dépendante de la protéine G au niveau de la membrane plasmique, c'est la désensibilisation (2). Ceci est suivi par la phosphorylation de GRK et le recrutement de la β -arrestine, ce qui entraîne une désensibilisation rapide. Dans le même temps, la β -arrestine favorise la signalisation MAPK (3). La β -arrestine induit également une internalisation du récepteur *via* l'endocytose médiée par la clathrine. Le récepteur internalisé peut induire une deuxième phase de signalisation dépendante de la protéine G à partir des endosomes précoces ou du réseau *trans* Golgien (RTG) (4). Cette seconde phase de signalisation s'est avérée biologiquement pertinente pour un nombre croissant de RCPG. Ensuite, le récepteur est soit dégradé dans les lysosomes soit recyclé dans la membrane plasmique (5) où il pourra à nouveau être activé.

Les sous-unités de protéines G, G α et G β , sont associées à la c-Src dans les conditions basales. Le blocage de la sous-unité G β abolit la phosphorylation de c-Src et l'activation de ERK1/ERK2 (Gentili *et al.*, 2006). Les protéines G peuvent stimuler de nombreux effecteurs intracellulaires qui seront eux-mêmes impliqués vis à vis d'autres protéines. Par conséquent, ceci permet d'expliquer l'implication des RCPG dans de nombreuses voies physiologiques et physiopathologiques. Bien évidemment, je ne décrirai pas ici, l'ensemble des voies de signalisation déclenchées par des RCPG et je ne me suis attachée qu'aux voies identifiées impliquant les récepteurs aux orexines.

D. Régulation de l'expression membranaire des récepteurs couplés aux protéines G

Les RCPG sont le plus souvent internalisés après activation par leur ligand. L'internalisation d'un RCPG consiste en l'endocytose de celui-ci. L'endocytose est un processus fondamental dans la vie de la cellule. Elle consiste à internaliser des portions de la membrane plasmique contenant des protéines membranaires vers des compartiments intracellulaires appelés endosomes. L'endocytose peut être induite, elle dépend alors de la liaison du ligand comme c'est le cas pour les RCPG ou être constitutive, pour les récepteurs jouant un rôle dans l'approvisionnement de la cellule en nutriments. Cette internalisation constitutive contribue à l'homéostasie cellulaire mais sert également de réserve interne en récepteurs. Mais celle-ci est relativement lente, en effet, un récepteur peut rester à la surface cellulaire en l'absence d'agoniste pendant plus d'une heure. La première étape de l'internalisation des RCPG est la désensibilisation qui est suivie par l'internalisation. La voie majeure d'internalisation est la voie dépendante des clathrines, mais il existe une autre voie d'endocytose, c'est la voie des cavéoles. Dans ce manuscrit, je ne détaillerai que la voie des clathrines pour plus de clarté. Après l'internalisation, les RCPG seront soit recyclés à la membrane soit dégradés. Le devenir du récepteur dépendra de la fonction de celui-ci ainsi que de la fonction de son ligand. Le trafic des RCPG a des fonctions critiques dans la terminaison et la propagation du signal, ainsi que dans la « resensibilisation » des récepteurs (Figure 12). Les taux d'internalisation, de recyclage et de tri lysosomal des RCPG diffèrent largement d'un récepteur à l'autre, suggérant que différents mécanismes contrôlent le trafic des récepteurs.

1. Désensibilisation

La désensibilisation joue un rôle important dans la régulation des effets biologiques des récepteurs en contrôlant finement la durée de la stimulation cellulaire induite par un RCPG. De plus, cette étape conduit à un état de basse affinité des RCPGs pour leur ligand. En effet,

l'administration prolongée ou répétée de médicaments peut entraîner une diminution importante de leur efficacité. Deux types de désensibilisation sont possibles :

- la désensibilisation homologue qui consiste en la perte de réponse d'un RCPG, suite à son activation par un agoniste. Le RCPG subirait uniquement des changements adaptatifs,
- la désensibilisation hétérologue qui consiste en la perte de réponse d'un RCPG *via* l'activation d'autres récepteurs. Celle-ci peut entraîner des modifications des composants des voies de transduction associées au RCPG.

La première étape de la désensibilisation est la phosphorylation de thréonines et de sérines localisées au niveau des boucles intracellulaires et de l'extrémité C-terminale des RCPG (Bouvier *et al.*, 1988). Deux grandes classes de protéines régulent la phosphorylation des RCPG pour la désensibilisation homologue : les GRK (G protein coupled receptor kinases) et d'autres protéines kinases dépendantes des seconds messagers, telles que PKA et PKC. Les kinases PKA et PKC sont stimulées suite à l'augmentation intracellulaire de seconds messagers induits par les RCPG, tels que l'AMPc, le calcium ou le DAG et participent également à la phosphorylation de protéines intervenant en aval dans les voies de transduction dépendantes du RCPG considéré (Bouvier *et al.*, 1988; Hausdorff *et al.*, 1989).

Les GRK sont au nombre de sept et ont été classées en trois sous-groupes selon leur distribution tissulaire et leur sélectivité. On retrouve, d'abord, GRK1 et GRK7 qui sont les GRK de la rhodopsine et du récepteur « cone-opsin ». Ensuite, nous avons GRK2 et GRK3 qui sont exprimées de manière ubiquitaire et puis nous avons GRK4 exprimée principalement dans les testicules mais aussi dans le cerveau et les reins. GRK5 et GRK6 sont également exprimées de manière ubiquitaire. La majorité des RCPG sont régulées par GRK2, GRK3, GRK5 et GRK6. Toutes les GRKs possèdent un domaine catalytique central très bien conservé et des domaines N-terminal et C-terminal variables. Le domaine N-terminal contient des sites de liaison à d'autres protéines et détermine la localisation intracellulaire de la GRK et donc sa spécificité pour un RCPG. Elles montrent toutes un domaine RGS-like qui va jouer un rôle dans leur localisation près de la membrane plasmique (Premont *et al.*, 1995; Pitcher *et al.*, 1998; Premont & Gainetdinov, 2007; Rajagopal & Shenoy, 2018).

Les sites de phosphorylations des GRKs se situent principalement au niveau de la troisième boucle intracellulaire et de l'extrémité C-terminale. Ces sites du récepteur peuvent varier suivant le RCPG (Hausdorff *et al.*, 1989). Ces sites vont permettre le recrutement de protéines cytosoliques, les β -arrestines ou vont permettre le découplage des protéines G en se liant avec une haute affinité au RCPG phosphorylé par les GRK. Il existe 2 types de β -arrestines β 1 et β 2, ce sont des protéines régulatrices qui vont jouer un rôle central dans l'internalisation et le trafic intracellulaire des RCPG (Lohse *et al.*, 1990).

2. Mécanismes de l'internalisation dépendante des β -arrestines

Suite à l'étape de désensibilisation par les GRK, la liaison des β -arrestines va permettre le découplage de la protéine G et l'engagement du récepteur dans les voies d'endocytose. Les β -arrestines sont phosphorylées sur une sérine pour la β -arrestine 1 et sur une thréonine pour la β -arrestine 2. Ces phosphorylations entraînent une faible affinité des β -arrestines pour la clathrine. Par conséquent, lors de l'activation du récepteur, les β -arrestines sont recrutées à la membrane où elles seront déphosphorylées (Moore *et al.*, 2007).

Les β -arrestines vont ensuite recruter la clathrine et l'adaptateur AP-2 et rassembler les récepteurs au niveau des puits recouverts de clathrine. Pour créer une vésicule d'endocytose, ces puits de clathrine contenant les récepteurs s'invaginent vers l'intérieur de la cellule et la vésicule se referme grâce à une petite GTPase, la dynamine. Cette protéine va également assurer la scission de la vésicule d'endocytose de la membrane plasmique. Grâce au cytosquelette de la cellule et en particulier aux microtubules, la vésicule va pouvoir rejoindre le réseau vésiculaire où son contenu sera trié (Volovyk *et al.*, 2006; Wolfe & Trejo, 2007).

a. *Interaction des β -arrestines avec la clathrine et AP-2*

La voie d'endocytose avec la clathrine est une des voies d'endocytose les mieux connues. La clathrine est une protéine hétérotrimérique stable possédant trois chaînes lourdes et trois chaînes légères régulatrices. Elle forme une structure en triskèle et l'ensemble de ces structures associées vont former une structure polyédrale. Cette protéine est incapable d'interagir avec des lipides de la membrane plasmique par elle-même et va donc dépendre d'adaptateurs. Ces adaptateurs vont recruter la clathrine au niveau de zone à haut potentiel endocytique et ainsi stimuler l'assemblage du manteau de clathrine. Un de ces adaptateurs est le complexe AP-2 (adapter protein-2). L'interaction entre la β -arrestine 2 et la clathrine est contrôlée par des interactions intramoléculaires entre les extrémités N-terminale et C-terminale des β -arrestines (Wolfe & Trejo, 2007; Kern *et al.*, 2009).

Le complexe adaptateur AP-2 est un membre de la famille AP, c'est une protéine hétérotrimérique. Les deux sous-unités adaptives α et β 2 forment le noyau du complexe ainsi que les domaines appendices, elles sont connectées entre-elles par des liens flexibles. Les deux autres sous-unités σ 2 et μ 2 sont intégrées à l'intérieur du cœur d'AP-2. AP-2 va permettre la liaison entre la clathrine et la membrane plasmique (Rodemer & Haucke, 2008). Cet adaptateur va aider à déformer la membrane, à réguler l'assemblage de la clathrine et va participer à différentes étapes de maturation et de fission des puits recouverts de clathrine. La β -arrestine 2 interagit avec la β 2-adaptine du complexe AP-2 *via* deux résidus arginine au niveau de son extrémité C-terminale. La purification de cette extrémité a montré que

l'interaction entre la β 2-adaptine et la β -arrestine était directe et indépendante de la clathrine (Rodemer & Haucke, 2008).

Par conséquent, l'interaction des β -arrestines avec AP-2 et la clathrine est nécessaire pour l'internalisation des RCPG. Cette interaction va également permettre de diriger les RCPG vers les puits recouverts de clathrine. Deux théories sont émises concernant le mécanisme d'endocytose. La première hypothèse dit que les récepteurs phosphorylés recrutent la clathrine, les différents adaptateurs et génèrent ainsi une vésicule d'endocytose recouverte de clathrine. La seconde hypothèse, quant à elle, propose que les récepteurs phosphorylés soient dirigés vers des puits recouverts de clathrine déjà préexistants (Laporte *et al.*, 1999, 2000; Moore *et al.*, 2007).

b. Différentes voies d'endocytose

Tout d'abord, deux groupes distincts ont été mis en place pour décrire les voies d'endocytose dépendantes des β -arrestines, les récepteurs de classe A et ceux de classe B (classification différente de celle des RCPG) (Oakley *et al.*, 2000). Ces deux groupes sont basés sur des critères de liaison des β -arrestines au récepteur, après activation de celui-ci par son agoniste. Les récepteurs de classe A se lient plus facilement à la β -arrestine 2 qu'à la β -arrestine 1 alors que les récepteurs de classe B se lient avec la même affinité avec les deux types de β -arrestines. Les récepteurs de classe A vont par contre se dissocier des β -arrestines assez rapidement et à proximité de la membrane plasmique. Les récepteurs de classe B vont, quant à eux, rester associés aux β -arrestines pendant des temps longs et vont colocaliser avec les endosomes (Anborgh *et al.*, 2000). L'extrémité des RCPG semble jouer un rôle très important pour déterminer à quelle classe ils appartiennent. La phosphorylation par GRK2 de cette extrémité va conduire à un profil de récepteur de classe A, alors que la phosphorylation induite par GRK5 ou GRK6 va conduire à un profil de récepteur de classe B. Des études semblent montrer que la stabilité de l'interaction entre les RCPG et les β -arrestines jouent un rôle clé dans le devenir du récepteur. En effet, les récepteurs de classe A présentent une interaction transitoire avec les β -arrestines, les RCPG semblent être recyclés rapidement à la membrane plasmique. En ce qui concerne, les récepteurs de classe B, leur forte association avec les β -arrestines semble les conduire vers des voies de recyclage lent et/ou de dégradation (Xu *et al.*, 2007). Cependant, d'autres études montrent que le groupe auquel appartient le RCPG va également dépendre de la nature du ligand. Par conséquent, cette classification est à considérer avec prudence.

c. Régulation des β -arrestines

Les β -arrestines subissent des modifications post-traductionnelles, telles que l'ubiquitylation, c'est à dire subissant la fixation d'ubiquitine sur une lysine. En effet, lors de la stimulation des

RCPG par leurs ligands agonistes, les β -arrestines sont ubiquitinylées. Cette modification post-traductionnelle joue un rôle dans la stabilité de l'interaction entre les β -arrestines et les RCPG. En effet, l'interaction transitoire (classe A) est due à une ubiquitinylation transitoire alors qu'elle est soutenue pour les récepteurs de classe B chez qui l'interaction est persistante (Shenoy & Lefkowitz, 2003; Perroy *et al.*, 2004).

L'ubiquitinylation des β -arrestines s'effectue sur des lysines. Cette ubiquitinylation est contrôlée par deux enzymes. L'ubiquitine ligase E3 va permettre de réguler l'ubiquitinylation des β -arrestines, et l'ubiquitin-specific-protease 33 (USP33) va permettre la désubiquitinylation des β -arrestines (Shenoy & Lefkowitz, 2003).

3. Devenir des RCPG après l'internalisation

Les RCPG internalisés vont rejoindre diverses structures vésiculaires qui ont différentes fonctions cellulaires telles que l'endocytose, le recyclage de protéines membranaires, la dégradation protéique, l'exocytose et la polarisation cellulaire. Ce réseau est extrêmement régulé et organisé. La première étape des RCPG internalisés est l'endosome précoce, où le tri entre les RCPG à recycler et ceux à dégrader sera effectué. Cependant, il est probable que tous les RCPG d'une même population ne suivent pas qu'une seule voie de recyclage ou de dégradation. Une minorité de ces récepteurs peut être orientée vers une autre voie.

a. Vers les voies de dégradation

Les RCPG qui ne sont pas rapidement phosphorylés, sont dirigés vers des endosomes particuliers appelé MVB (Multi Vesicular Body) qui constituent un centre de tri des RCPG. Les protéines solubles ubiquitinylées (complexe RCPG et β -arrestines) seront transportées vers les lysosomes *via* un ensemble de protéines présentes au niveau de la membrane des endosomes et dans le cytoplasme, c'est le complexe ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) constitué de trois unités ESCRT-I, ESCRT-II et ESCRT-III (Hurley & Emr, 2006).

Le tri va débuter grâce à un premier complexe protéique présent au niveau des endosomes précoces mais ne faisant pas partie du complexe ESCRT. Ce premier complexe a été nommé ESCRT-0, il est constitué de la protéine Hrs (hepatocyte-growth factor-regulated tyrosine kinase substrate). Cette protéine recrute la clathrine au niveau de microdomaines pour former des mailles de clathrine au niveau des membranes des endosomes là où se situent les protéines dédiées à la dégradation. Hrs a un domaine d'interaction avec l'ubiquitine, le motif UIM (Ubiquitin Interacting Motif) qui va permettre de transporter les protéines solubles ubiquitinylées jusqu'au complexe ESCRT des MVB (Raiborg *et al.*, 2001b, 2001a; Williams & Urbé, 2007). Les protéines solubles ubiquitinylées seront désubiquitinylées avant leur arrivée

dans les MVB. Les récepteurs sont donc ubiquitinylés par une enzyme de la famille des ubiquitin ligase NEDD4 (ubiquitin ligase NEural precursor Development Downregulated protein 4) sur des résidus lysine présents au niveau de l'extrémité C-terminale. Cette ubiquitinylation s'effectue à la membrane et elle sert de signal de tri pour guider le récepteur aux lysosomes *via* les MVB (Nabhan *et al.*, 2010).

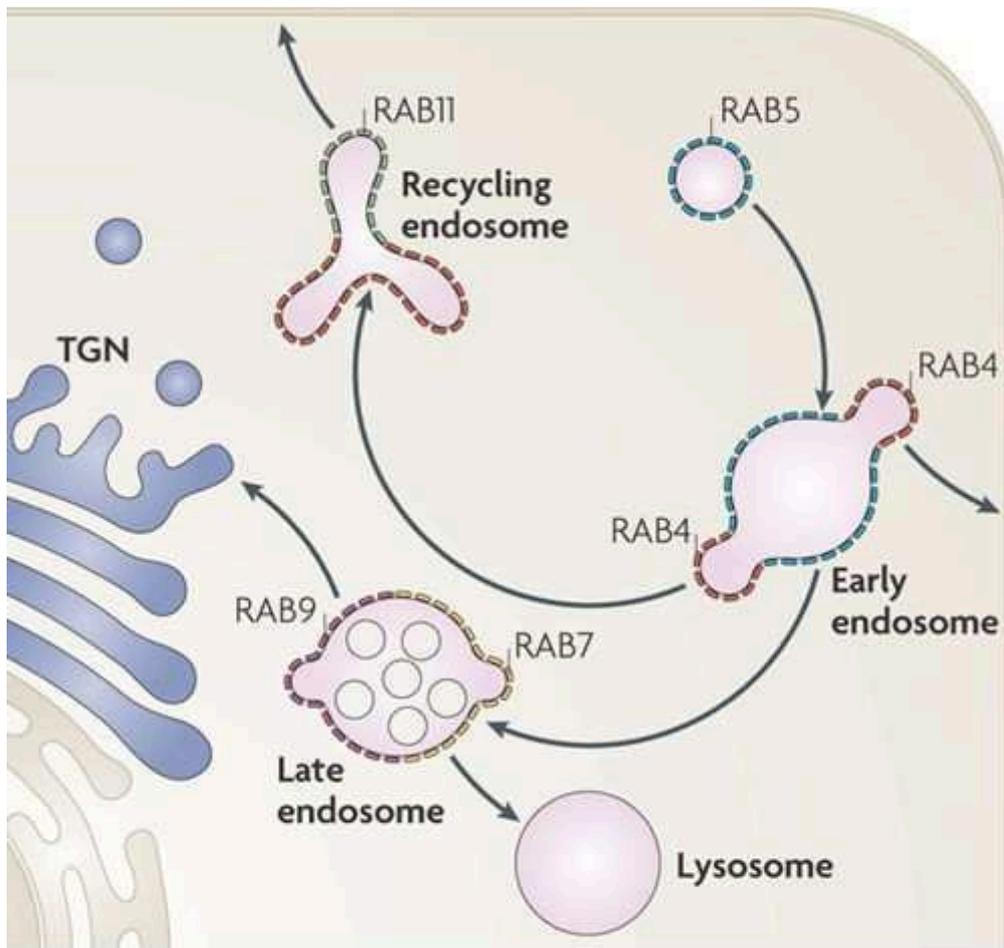
Il semblerait qu'il existe d'autres protéines, autres que le complexe ESCRT, impliquées dans l'adressage de ces récepteurs aux lysosomes *via* une interaction directe avec la protéine GASP (G-protein couple receptor Associated Sorting Protein). Cette protéine interagit avec le récepteur au niveau de son extrémité C-terminale. Les protéines GASP forment une famille constituée de dix membres, seules GASP-1 et GASP-2 ont été retrouvées associées aux RCPG. GASP-1 joue un rôle de médiation dans la régulation après activation des récepteurs. En effet, elle est impliquée dans la régulation de la dégradation de plusieurs RCPG (récepteur de la dopamine D2) mais également impliquée avec des RCPG étant rapidement recyclés à la membrane (récepteur λ aux opïodes) (Hanyaloglu & von Zastrow, 2008a) .

La protéine SNX-1 (Sorting Nexin-1) est impliquée dans la régulation du trafic membranaire et est localisée sur les endosomes précoces. Elle interagit directement avec un type de RCPG particulier, les récepteurs PAR1 (Proteinase Activated Receptors 1). Ces récepteurs sont envoyés dans les voies de dégradation lysosomales mais indépendamment du complexe ESCRT. L'adressage de PAR1 aux lysosomes est dû à SNX-1 et ne nécessite pas l'ubiquitinylation du récepteur. Cette protéine peut se lier également à d'autres récepteurs au niveau de l'extrémité C-terminale tels que les récepteurs P2Y (récepteur couplé à la protéine G purinergique) (Wang *et al.*, 2002).

b. Vers les voies de recyclage

Le passage des protéines solubles des endosomes vers la membrane plasmique est un processus effectué par défaut, le recyclage des RCPG a lieu *via* une interaction entre un partenaire cytoplasmique et la partie distale de l'extrémité C-terminale du récepteur. Les récepteurs de classe A comportent une « séquence de recyclage » et ils sont donc rapidement recyclés alors que ceux de la classe B sont recyclés lentement (Gage *et al.*, 2001, 2005).

De nombreuses séquences de recyclage ont été identifiées sur les RCPG, elles sont très sensibles aux mutations qui peuvent affecter la structure et la position de ce domaine d'interaction. Une de ces séquences est associée à un ligand domaine PDZ (post synaptic density 95/disc large/zonula occludens-1). Ces domaines jouent un rôle clé dans la formation et la fonction des complexes de transduction du signal (Hanyaloglu & von Zastrow, 2008a).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figure 13 : Les principales Rab GTPase impliquées dans la régulation des RCPG

Les endosomes précoces contiennent des domaines enrichis en Rab 5 (bleu) et Rab 4 (rouge), qui sont impliqués dans la fusion des endosomes et le recyclage endocytique respectivement. Les endosomes de recyclage sont riches en Rab 4 alors que les endosomes de recyclage lent sont riches en Rab 11 (vert). Les endosomes tardifs contiennent des domaines riches en Rab 7 (jaune) et Rab 9 (violet) qui régulent le trafic vers les lysosomes et vers l'appareil de Golgi respectivement. D'après Nature reviews.

c. *Tri cellulaire : marqueurs et acteurs*

La famille des Rab GTPases possède 60 membres et elle fait partie de la famille des petites protéines G Ras-like (Zerial & McBride, 2001). Les Rab GTPases vont contrôler, par exemple, l'endocytose, le trafic intracellulaire, la fusion des endosomes et l'exocytose. Ces protéines vont subir des modifications post-transcriptionnelles leur permettant d'être associées aux membranes, elles posséderont deux groupements geranyl en C-terminal. Ces protéines Rab se situent à tous les niveaux du réseau vésiculaire intracellulaire : appareil de Golgi, vésicules et granules sécrétoires, endosomes tardifs, lysosomes, endosomes précoces, phagosomes, mitochondries et jonctions serrées. Elles vont également jouer un rôle dans le bourgeonnement des vésicules, la mobilité vésiculaire, l'attachement et la fusion des vésicules entre-elles et aussi dans le démantèlement des manteaux de clathrine (Stenmark, 2009) (Figure 13). Les protéines Rab les plus étudiées dans le trafic des RCPG sont Rab4, Rab5, Rab7 et Rab11. Elles vont intervenir dans la régulation de l'endocytose et du tri entre les endosomes précoces, tardifs, de recyclage et les lysosomes (Seachrist & Ferguson, 2003).

Tout d'abord, Rab5, localisé au niveau de la membrane plasmique, des vésicules recouvertes de clathrine et des endosomes précoces, va permettre l'internalisation de marqueurs endocytiques et favoriser l'apparition de grosses structures endosomales. Elle contrôle donc une étape commune du tri des RCPG. Rab5 aurait également un rôle dans la resensibilisation (Seachrist *et al.*, 2000; Seachrist & Ferguson, 2003).

Ensuite, Rab4 et Rab11 jouent un rôle dans les voies de recyclage, elles sont présentes au niveau des endosomes précoces et de recyclage. Les protéines Rab4 contrôlent le recyclage rapide des protéines solubles vers la membrane plasmique (Seachrist *et al.*, 2000). En revanche, les RCPG recyclés lentement vont être dirigés vers des endosomes périnucléaires puis ensuite vers la membrane. Les protéines Rab11 sont présentes au niveau des endosomes périnucléaires, des endosomes précoces et aussi au niveau du réseau *trans*-golgien (RTG). Rab11 contrôle le recyclage lent et le trafic au niveau du RTG. Il permet le tri des protéines à un stade tardif du transport et est impliqué dans la spécificité de l'adressage des protéines vers la voie lysosomale ou vers des domaines spécialisés de la membrane plasmique. Le RTG est aussi particulièrement important car il fait le lien entre les voies d'exocytose et d'endocytose (Seachrist & Ferguson, 2003)

Pour finir, Rab7 est principalement exprimé au niveau des endosomes tardifs et des lysosomes. La protéine Rab7 va réguler le trafic vésiculaire de l'endosome tardif vers les lysosomes et inversement (Bucci *et al.*, 2000).

Ces protéines sont donc des marqueurs du tri vésiculaire.

III. Les orexines : des neuropeptides hypothalamiques

Plus de 7000 peptides naturels ont été identifiés chez l'Homme, où ils jouent souvent un rôle crucial dans sa physiologie. Ils ont des rôles d'hormones, de neurotransmetteurs, de facteurs de croissance, de ligands des canaux ioniques ou anti-infectieux. Les peptides sont des molécules de signalisation sélectives et efficaces qui se lient à des récepteurs de surface cellulaire spécifiques, tels que les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) ou les canaux ioniques, où ils déclenchent des effets intracellulaires. Compte tenu de leur profil pharmacologique et de leurs propriétés intrinsèques, les peptides représentent un excellent point de départ pour la conception de nouveaux traitements. Les peptides d'origine naturelle ne sont souvent pas directement adaptés à une utilisation en tant que produits thérapeutiques appropriés, car ils présentent des faiblesses intrinsèques, notamment des stabilités chimique et physique médiocres, et une demi-vie plasmatique circulatoire courte (Fosgerau & Hoffmann, 2015).

A. Découvertes des orexines/hypocrétines

Gautvik *et al.* en 1996, ont émis l'hypothèse qu'un ensemble d'acides ribonucléiques messagers (ARNm) associé spécifiquement à un noyau hypothalamique codait pour des protéines associées aux fonctions de ce noyau. Ils ont alors effectué une hybridation soustractive entre les séquences d'ADNc amplifiées provenant de l'hypothalamus et les séquences d'ADNc amplifiées provenant du cervelet ou de l'hippocampe, ce qui a ainsi permis de générer une banque de clones d'acides désoxyribonucléiques complémentaires (ADNc) représentant les ARNm dont l'expression prévaut dans l'hypothalamus de rat. Cette analyse a, tout d'abord, montré que l'hypothalamus se spécialise dans la fabrication de molécules de signalisation intercellulaires puisque 40% des clones d'ADNc codent pour des neurotransmetteurs peptidiques. Les neurotransmetteurs peptidiques les plus représentés au sein de l'hypothalamus sont l'oxytocine, la vasopressine, la POMC (pro-opiomelanocortine) ainsi que certains nouveaux ADNc tels que le clone 35 (Gautvik *et al.*, 1996).

Par la suite, des études d'hybridation *in situ* sur des coupes frontales de cerveaux de rats ont montré qu'un seul clone d'ADNc correspondait à l'hypothèse de départ. En effet, seuls les ARNm du clone 35 sont exprimés bilatéralement dans un seul noyau de l'aire paraventriculaire de l'hypothalamus. Les données préliminaires de la séquence nucléotidique suggèrent que les ARNm du clone 35 codent pour une nouvelle petite protéine sécrétée, le précurseur d'un neurotransmetteur, la prépro-hypocrétine. Cette prépro-hypocrétine possède 130 acides aminés ainsi que quatre sites pour la maturation protéolytique. Sur les quatre maturations possibles seulement deux sont actives. La prépro-hypocrétine est donc le précurseur de deux

peptides présumés, l'hypocrétine 1 (Hcrt1) composée de 33 acides aminés et l'hypocrétine 2 (Hcrt 2) composée de 28 acides aminés. Sur les 20 acides aminés consécutifs en position C-terminale, 14 sont identiques entre l'Hcrt1 et l'Hcrt2 et qui se terminent toutes deux par un résidu glycine, résidu typique des peptides sécrétés. Ces résidus glycine sont des substrats pour les peptidylglycine α -amidating monooxygénases laissant ainsi un amide en C-terminal sur le peptide mature. La partie N-terminale de l'Hcrt 1 n'a pas encore été déterminée. Ces peptides présentent des séquences d'acides aminés homologues avec une famille d'hormones connues, les sécrétines. Le nom « hypocrétine » a été choisi pour indiquer les membres hypothalamiques de la famille des sécrétines. Or, leur action n'a aucune similitude avec celle des sécrétines. Ce terme n'est donc pas du tout en adéquation avec leur rôle comme nous le verrons plus loin. (de Lecea *et al.*, 1998).

Parallèlement en 1998, le groupe de Sakurai identifie les mêmes peptides qu'ils nomment orexines. Il les nomme ainsi car l'ARNm précurseur de ces peptides est exprimé abondamment et spécifiquement dans l'hypothalamus latéral, une région impliquée dans la régulation centrale du comportement alimentaire et de l'homéostasie énergétique. En effet, en grecs « orexis » signifie appétit. Cependant, le rôle orexigène des orexines est encore très controversé. Dans le même temps, le groupe de De lecea, s'est intéressé aux récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) « orphelins », c'est-à-dire les RCPG n'ayant pas de ligands connus. Pour cette étude, il a généré plus de 50 lignées cellulaires HEK 293 recombinantes (cellules embryonnaires humaines de rein) exprimant l'ADNc codant pour des RCPG orphelins. Il a effectué, sur ces modèles, une recherche de ligands endogènes en étudiant certains facteurs d'activation des protéines G hétéro-trimériques. Pour cela, il a mis en contact les cellules recombinantes avec des fractions d'extraits tissulaires hypothalamiques de rat obtenues par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). Certaines fractions obtenues par HPLC ont provoqué une augmentation du Ca^{2+} cytoplasmique dans la lignée exprimant un RCPG orphelin nommé HFGAN72. L'ensemble de ces expérimentations suivi d'une analyse par spectrométrie de masse et d'un séquençage selon la dégradation d'Edman a permis d'identifier et d'isoler les deux ligands d'HFGAN72. Les ligands ont été nommés orexine A (OxA) et orexine B (OxB), le récepteur HFGAN72 a, quant à lui, été renommé le récepteur aux orexines de type 1 (OX1R) (Sakurai *et al.*, 1998). Les hypocrétines ou orexines sont des neuropeptides récemment découverts, leur nom n'est pas totalement adapté à leurs rôles physiologiques. Cependant, pour faciliter la compréhension au cours de ce manuscrit, seul le terme « orexine » sera utilisé.

L'orexine A est un peptide de 33 acides aminés de poids moléculaire 3 562 Daltons (Da) contenant deux ponts disulfure (Cys6 – Cys12, Cys7 – Cys14), un résidu pyroglutamoyl N-terminal et une extrémité C-terminale amidée (Sakurai *et al.*, 1998). L'orexine B est un

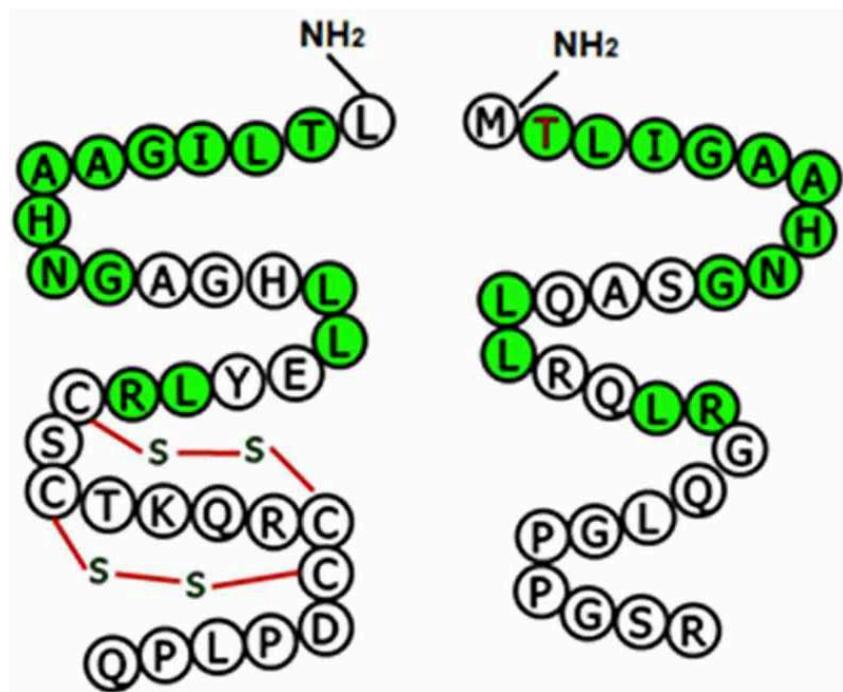


Figure 14 : Structure des orexines A et B

D'après Wang, 2018.

composé de 28 résidus de 2 937 Da et est amidée sur son extrémité C-terminale comme l'orexine A, mais est dépourvue des ponts disulfures (Sakurai *et al.*, 1998). Bien que les extrémités N-terminales des peptides soient différentes, les extrémités C-terminales sont presque identiques (11 acides aminés sur 15 sont identiques). Les conformations liées au récepteur ne sont pas connues, mais les structures RMN des deux peptides dans une solution aqueuse tamponnée ont été résolues (Lee *et al.*, 1999; Takai *et al.*, 2006; Karhu *et al.*, 2015). L'OxB comprend deux parties hélicoïdales (hélice I: Leu7 – Gly19 et hélice II: Ala23 – Met28) reliées par un segment de liaison (une charnière courte Asn20 – Ala22) (Lee *et al.*, 1999), tandis que l'OxA comporte trois sections hélicoïdales (hélice I: Leu16 – Ala23, hélice II: Asn25 – Thr32 et hélice III: Cys6 – Gln9) (Takai *et al.*, 2006). Les peptides ont été observés dans de multiples conformations : l'OxA est soit en conformation droite, soit courbée (Takai *et al.*, 2006), tandis que le modèle unique dérivé pour l'OxB montre une courbure opposée à celle de l'OxA (Lee *et al.*, 1999; Karhu *et al.*, 2015) (Figure 14).

Par la suite, une étude de mutagenèse par balayage où chaque acide aminé est muté en une alanine, méthode communément appelée « *Alascan* » ou en une leucine lorsque l'acide aminé est un résidu glycine, a été effectuée sur l'orexine B. Les vingt-huit mutants d'orexine B ont été synthétisés et analysés. Une diminution de l'affinité de liaison de l'orexine B pour OX1R et une diminution de la capacité à stimuler, soit la production d'IP₃ (inositol triphosphate), soit la libération de calcium intracellulaire ont été observées avec 12 mutants de l'orexine B. Les résidus importants sont principalement situés en partie C-terminale de la chaîne peptidique excepté pour deux d'entre-eux qui sont au milieu de la chaîne. De plus, il a été montré que la délétion des 5 premiers acides aminés n'impacte ni la liaison de l'orexine B à son récepteur, ni la production d'IP₃ (Nicole *et al.*, 2015). Des mutations des peptides, orexines A et B, ont montré que les résidus C-terminaux et l'amidation de l'extrémité C-terminale sont les facteurs les plus importants pour l'activation des récepteurs. L'extrémité N-terminale n'est pas aussi importante, car les deux peptides ont conservé une activité lorsqu'ils ont été tronqués en un fragment C-terminal de 19 résidus. Une troncature supplémentaire abaissait la réponse par rapport à la réponse maximale, mais des fragments aussi courts que 12 acides aminés conservaient encore une certaine activité (Darker *et al.*, 2001; Lang *et al.*, 2004; Karhu *et al.*, 2015).

Le polypeptide précurseur a été recherché. La première étape fut d'obtenir un fragment d'ADNc codant pour une partie de l'OxA par transcription inverse et réactions de polymérisation en chaîne (RT-PCR) des ARNm extraits du cerveau de rat. La seconde étape a permis grâce à la technique d'amplification rapide d'extrémités d'ADNc par PCR (RACE-PCR) d'obtenir un ADNc complet dont le séquençage a montré qu'il codait à la fois pour les orexines A et B. Le cadre ouvert de lecture commence par un ATG et code pour un polypeptide de 130 acides aminés, nommé prépro-orexine (PpOx), bien décrit chez le rat. Chez l'Homme,

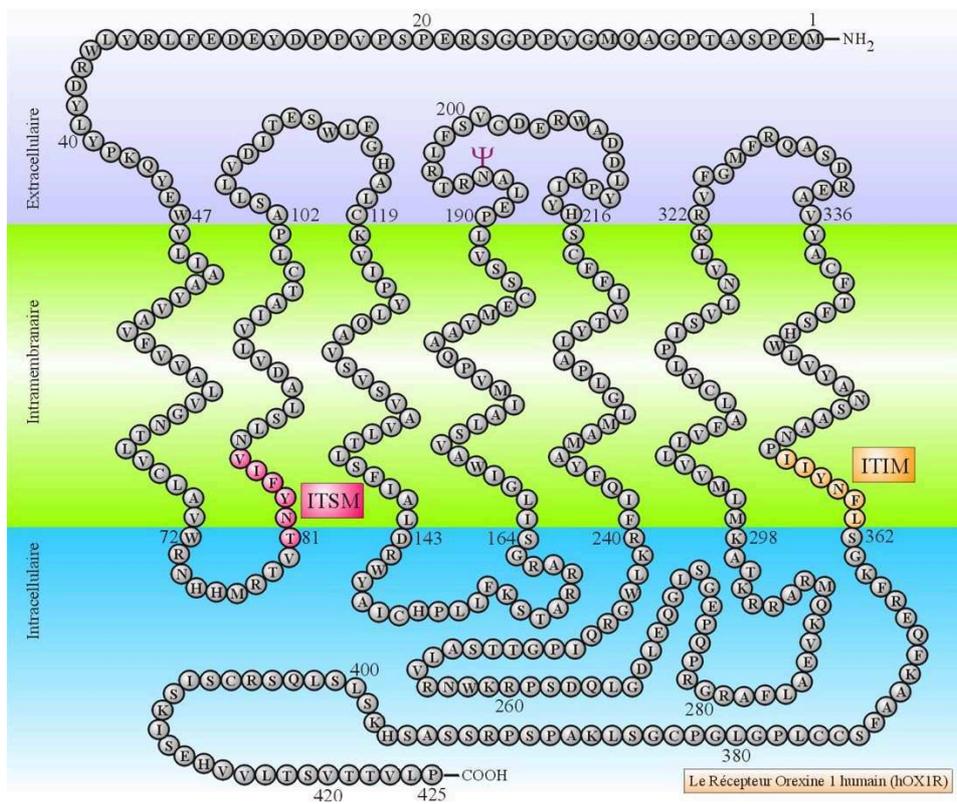


Figure 15 : Représentation structurale du récepteur aux orexines de type 1

D'après Voisin, 2003.

la PpOx possède 131 acides aminés. Les 33 premiers acides aminés, qui composent ce précurseur, sont caractéristiques d'une séquence signal de sécrétion. Le site de clivage du peptide signal est entre l'Ala³³ et la Gln³⁴ qui est donc le premier acide aminé de l'OxA, probablement cyclisé par transamidation en un résidu pyroglutamyl. Le dernier résidu du peptide mature est suivi par la Gly⁶⁷ qui sert probablement de donneur du groupement NH₂ pour l'amidation en C-terminal par une peptidylglycine monooxygénase et une peptidylaminoglycolate lyase. Cette glycine est suivie par deux résidus basiques Lys⁶⁸-Arg⁶⁹ qui constituent un site de reconnaissance pour une prohormone convertase. Le segment suivant correspond à la séquence de l'orexine B, dont le dernier acide aminé est la méthionine⁹⁶, qui est suivi d'une séquence Gly-Arg-Arg, suggérant l'amidation de la partie C-terminale de l'orexine B (Sakurai *et al.*, 1998). La cartographie d'hybride de radiation, qui repose sur la fréquence de cassures chromosomiques induites artificiellement, montre que le gène de la PpOx se situe sur le chromosome 17q21 chez l'Homme. De plus, il a été montré que l'ARNm codant pour la PpOx était détecté seulement dans les régions subthalamiques de l'hypothalamus (Sakurai *et al.*, 1998).

B. Les récepteurs aux orexines

A la suite de la découverte du récepteur aux orexines de type 1 (Figure 15), le récepteur aux orexines de type 2 (OX2R) a été découvert en effectuant une analyse de séquence par homologie avec OX1R *in silico*. Une séquence très proche de celle d'OX1R a été retrouvée, elle a été nommée OX2R. OX1R et OX2R possèdent 64% d'homologie de séquence (Sakurai *et al.*, 1998). Ce sont des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) de classe A qui possèdent 7 domaines transmembranaires. OX1R et OX2R sont hautement conservés entre les espèces.

Leurs interactions pharmacologiques avec les deux orexines ont été mesurées. Des cellules ovariennes d'hamster chinois (CHO) ont été transfectées avec l'ADNc codant pour un des récepteurs. Une compétition de liaison de l'affinité des orexines sur leurs récepteurs en présence d'orexine A marquée à l'Iode¹²⁵ a été effectuée. Grâce à cette compétition, la concentration d'orexine non marquée nécessaire pour déplacer 50% du radioligand (IC₅₀) a été déterminée (Sakurai *et al.*, 1998).

L'orexine B (OxB) possède un IC₅₀ de 420 nanomolaires (nM) sur OX1R et un IC₅₀ de 36 nM sur OX2R. En ce qui concerne l'orexine A, son IC₅₀ sur OX1R est de 20nM et celui sur OX2R est de 38 nM. On peut noter que les valeurs d'IC₅₀ obtenues pour OX2R sont similaires pour les deux isoformes d'orexine testées. Cependant, ces études sont sujettes à caution, en effet le traceur utilisé (consistant à modifier les peptides par un réactif de type Bolton-Hunter) avait une affinité beaucoup plus faible que le peptide natif avec OXR. Par conséquent, les premières

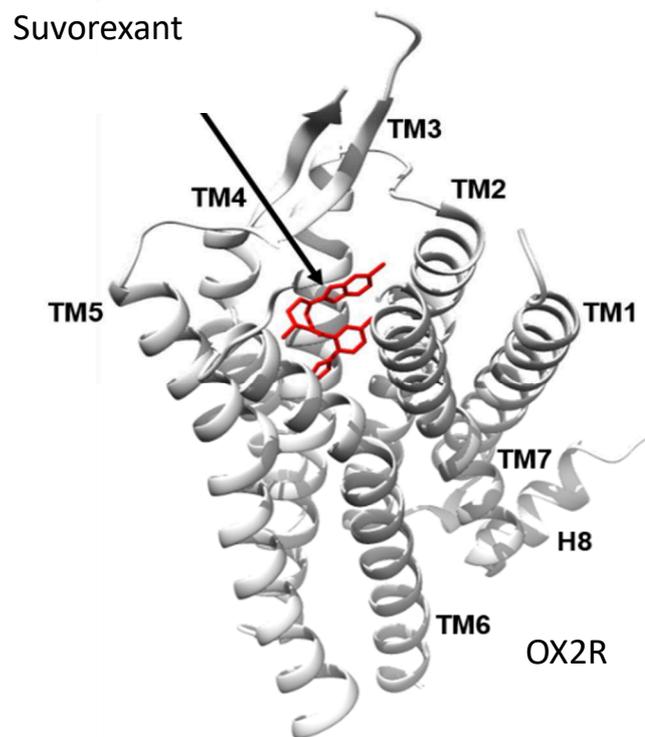


Figure 16 : Structure cristallographiée d'OX2R en présence du Suvorexant

D'après Yin, 2015.

valeurs obtenues sont probablement inexactes bien qu'elles soient encore utilisées comme référence aujourd'hui. Depuis, d'autres études ont montré que l'IC₅₀ de l'OxB est de 31,2 nM sur OX1R et que l'EC₅₀ de l'OxB est de 25 nM vis à vis d'OX1R (Nicole *et al.*, 2015), par l'utilisation d'un traceur où l'¹²⁵Iode est greffée sur les tyrosines par oxydation. Il a été montré qu'une telle réaction n'avait que très peu d'incidence sur l'affinité du peptide vis-à-vis du récepteur comparé au peptide natif. De plus, des analyses ont montré l'effet des orexines sur la mobilisation du calcium intracellulaire. En effet, cette mobilisation intracellulaire est due à l'activation des protéines G hétérotrimériques de classe Gq. Ces analyses ont permis de calculer la concentration d'orexine A requise pour induire la moitié de la réponse maximale de la mobilisation transitoire du calcium intracellulaire (EC₅₀). Pour OX1R, cet EC₅₀ de l'orexine A est de 30 nM alors que pour l'orexine B, il est de 2500 nM. Pour OX2R, l'EC₅₀ de l'orexine A est de 34 nM et celui de l'orexine B est de 60 nM. Par conséquent, OX2R est un récepteur non sélectif pour l'OxA et l'OxB alors qu'OX1R est plus sélectif pour l'OxA (Sakurai *et al.*, 1998).

La structure cristallographique d'OX2R chez l'Homme a été déterminée à une résolution de 2,5 Å en utilisant la cristallisation médiée par les lipides et l'ingénierie des protéines (voir plus haut section « RCPG ») (Figure 16). Celle-ci a été réalisée en présence d'un antagoniste aux OXR, le suvorexant. Il permet de stabiliser la structure et de bloquer le mouvement des hélices α transmembranaires nécessaires à l'activation du récepteur. Il se lie au récepteur au niveau de la poche orthostérique. La structure globale à sept domaines transmembranaires d'OX2R ressemble à d'autres structures de RCPG même si leur similarité de séquence est faible. En effet, cette similarité est de 23% avec le récepteur β 2-adrénergique et de 22% avec le récepteur à la neurotensine de type 1. Il a été remarqué que les résidus 190 à 212 d'OX2R situés à la surface extracellulaire correspondent à la seconde boucle extracellulaire (ECL2). Ces résidus forment une structure en épingle à cheveux β analogue à celle observée dans d'autres RCPG tels que, le récepteur à la neurotensine de type 1, les récepteurs aux opioïdes de types μ et le récepteur aux chimiokines CXCR de type 4. Cette structure permet l'activation et la liaison de l'orexine A à OX1R (Yin *et al.*, 2015).

Des études par mutagenèse dirigée effectuées sur OX1R ont montré que c'est la partie C terminale de l'OxB qui est ancrée dans le site orthostérique d'OX1R. Des substitutions indépendantes de 18 acides aminés en alanine d'OX1R ont été effectuées. Neuf de ces substitutions ont montré une diminution de l'affinité de l'OxB pour OX1R. Six de ces substitutions (P¹²³, Y¹²⁴, N³¹⁸, K³²¹, F³⁴⁰ et H³⁴⁴) peuvent suggérer une interaction entre OX1R et la partie C terminale de l'OxB, ce qui suggère que ces résidus sont impliqués dans l'interaction entre OX1R et l'OxB. En revanche, les trois autres substitutions sont impliquées dans le maintien de la structure du récepteur (Nicole *et al.*, 2015).

L'ensemble de ces données va permettre d'élargir la compréhension de la reconnaissance du ligand des RCPG peptidergiques et facilitera la modulation de la signalisation de l'orexine à des fins thérapeutiques

C. Pharmacologie des récepteurs aux orexines

Comme décrit précédemment, le système orexinergique régule le sommeil. Par conséquent, les OXR sont une cible attrayante pour le développement pharmaceutique de molécules à visée thérapeutique dans le traitement de l'insomnie.

La plupart des médicaments actuels contre l'insomnie interagissent avec le système GABA (acide gamma-aminobutyrique) et ses récepteurs. Le GABA diminue l'activité des neurones sur lequel il se fixe et il a de multiples fonctions dans le cerveau, entraînant un large éventail d'effets secondaires et d'événements indésirables. En outre, les profils pharmacocinétiques des médicaments classiques contre l'insomnie médiés par le système GABA sont particulièrement importants car les traitements à demi-vie longue peuvent entraîner une somnolence résiduelle et des effets « gueule de bois » le lendemain, tels que des troubles cognitifs, alors que les composés à demi-vie courte peuvent ne pas persister suffisamment longtemps dans l'organisme pour maintenir le sommeil (Wilson *et al.*, 2010). Parmi les effets indésirables résultant des effets globaux de la modulation du signal GABA, en plus des effets « gueule de bois » le lendemain, citons la sédation diurne, la confusion, l'amnésie antérograde et les chutes accrues (Rush *et al.*, 1998; Hindmarch *et al.*, 2006; Roehrs & Roth, 2012). De plus, la dépendance et la tolérance sont des problèmes potentiels liés à l'utilisation à long terme des benzodiazépines et des modulateurs des récepteurs GABA-A, car la fonction des récepteurs cérébraux au GABA peut changer en réponse au traitement (Wilson *et al.*, 2010; Winrow & Renger, 2014).

Un objectif principal du traitement de l'insomnie est d'améliorer le sommeil et en particulier, le maintien du sommeil sans effet secondaire. En raison du niveau remarquable de conservations génétique et fonctionnelle du système orexinergique chez les mammifères, le développement de médicaments est facilité. La compréhension du cycle veille/sommeil gouverné par les orexines, fournit un bon modèle pour tester de nouvelles molécules pour le traitement de l'insomnie. De plus, la caractérisation d'OX1R et d'OX2R en tant que RCPG (Sakurai *et al.*, 1998) a facilité le développement de médicaments susceptibles d'atténuer leur activation et ses conséquences dans le cerveau (Winrow & Renger, 2014)

1. Molécules antagonistes des récepteurs aux orexines

a. *Antagonistes d'un seul des deux types de récepteurs aux orexines*

L'identification de nouveaux médicaments pour l'insomnie s'est appuyée sur des essais *in vitro* et des criblages précliniques *in vivo* de banques de molécules afin d'identifier les composés qui agissent sélectivement sur les récepteurs aux orexines. Les premières petites molécules identifiées lors du criblage n'inhibaient qu'un des deux récepteurs aux orexines (Single Orexin Receptor Antagonist ; SORA). Certains d'eux comme le SB-334867 (une urée hétérocyclique développée par GSK se liant à OX1R) et JNJ-10397049 (un antagoniste d'OX2R développé par Johnson & Johnson) ont été utilisés comme sondes spécifiques des récepteurs. En inhibant l'activité d'un seul des récepteurs chez des modèles animaux, il a été possible d'observer comment l'absence du signal envoyé par ce récepteur affectait le cycle veille/sommeil. De cette manière, les études utilisant des SORA et/ou des knockouts du gène codant pour l'un des récepteurs ou les gènes codant pour les deux types de récepteurs chez le rat ont montré que l'excitation était principalement régie par la signalisation d'OX2R alors que le basculement entre les états de vigilance et les stades du sommeil était principalement affecté par les deux récepteurs (Gotter *et al.*, 2012). Cependant, il existe des complications potentielles lors de l'utilisation de ces SORA. Par exemple, comme la sélectivité de SB-334867 pour OX1R est d'environ 50 fois plus élevée que pour OX2R (Haynes *et al.*, 2000), à des doses plus élevées, le SB-334867 risque de bloquer les deux récepteurs des orexines, compliquant l'interprétation des résultats dans les études à forte dose. Il convient donc d'interpréter avec prudence les données relatives aux rôles fonctionnels de chacun des récepteurs individuels sur la base de ces seules études (Winrow & Renger, 2014).

b. *Antagonistes des deux récepteurs aux orexines*

Des données provenant de knockout du gène codant pour les orexines dans les modèles murins ont indiqué que la perte du peptide prépro-orexine (précurseur des neuropeptides orexinergiques) (Chemelli *et al.*, 1999) ou des neurones orexinergiques (Hara *et al.*, 2001) conduit à un cycle de sommeil plus robuste que la perte de fonction de l'un des deux récepteurs uniquement. Par conséquent, le développement d'antagonistes des récepteurs aux orexines pour le traitement de l'insomnie s'est concentré sur l'inhibition des deux sous-types de récepteurs par l'utilisation d'antagonistes des deux récepteurs (Dual Orexin Receptor Antagonist, DORA). Un certain nombre de DORA a émergé et plusieurs d'entre-eux sont en cours de développement clinique en tant que traitements de l'insomnie (Winrow & Renger, 2014).

Les premiers développements de DORA qui sont les plus discutés dans la littérature concernent le SB-649868 (un pipéridine amide) développé par GSK, l'almorexant (une

Nom des drogues	Sélectivité	Effets biologiques
Suvorexant (MK-4305)	OX1R OX2R	Approuvé par la FDA / Traitement de l'insomnie primaire
Almorexant	OX1R OX2R	Traitement de l'insomnie primaire / Etude clinique stoppée - problème de tolérance
SB-649868	OX1R OX2R	Améliore le sommeil / Résultats toxicologiques précliniques
Filorexant (MK-6096)	OX1R OX2R	Traitement de l'insomnie primaire, prophylaxie de la migraine, neuropathie diabétique douloureuse, problèmes de dépression
GSK-1059865	OX1R	Diminue stress et panique/l'anxiété et pourrait constituer une option pour le traitement de divers troubles psychiatriques associés au stress
JNJ-10397049	OX2R	Promouvoit le sommeil
SB-408124	OX1R	Diminue stress et panique/l'anxiété et pourrait constituer une option pour le traitement de divers troubles psychiatriques associés au stress/Promouvoit le sommeil
SB-334867	OX1R	Diminue stress et panique/l'anxiété et pourrait constituer une option pour le traitement de divers troubles psychiatriques associés au stress/Promouvoir le sommeil
HTL6641	OX1R OX2R	Temps de demi-vie plus court que le suvorexant, diminution des effets secondaires
LSN2424100	OX2R	Effets antidépresseurs
Lemborexant (E-2006)	OX1R OX2R	Phase II essai clinique / traitement de l'insomnie
ACT-462206	OX1R OX2R	A passé la phase I des essais sur l'humain/promouvoit le sommeil
ACT-335827	OX1R	Effets anxiolytiques
IPSU	OX1R OX2R	Activité locomotrice étudiée/agit sur le sommeil
TASP0428980	OX1R OX2R	Améliore l'architecture du sommeil
MK-1064	OX2R	Effets sur le sommeil similaire au suvorexant
MK-3697	OX2R	Structure plus stable que le MK-1064 mais même effet sur le sommeil
TCS OX2 29	OX2R	Favorise le sommeil, diminue la fréquence cardiaque et la pression sanguine
Seltorexant (JNJ-42847922)	OX2R	Propriétés favorables au sommeil/En cours d'évaluation clinique pour le traitement du trouble dépressif majeur

Figure 17 : Différents antagonistes des récepteurs aux orexines et leurs effets biologiques

D'après Graybill et Weissig, 2017

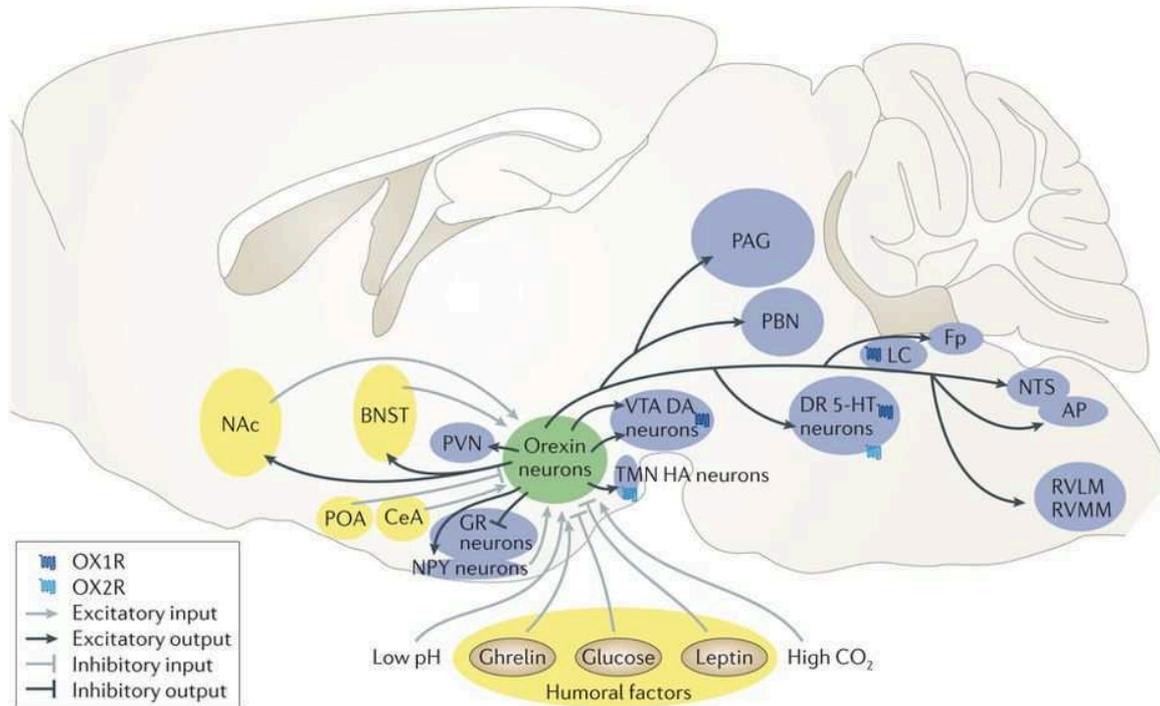
tétrahydroisoquinolone) développé par Actelion, le suvorexant (MK-4305 ; un diazépane) et le filorexant MK-6096 (pipéridine carboxamide), tous deux développés par Merck (Coleman & Renger, 2010).

Le tableau (Figure 17) résume l'ensemble des connaissances les plus récentes dans le domaine de la biologie des orexines, de leur biologie structurale et des antagonistes des OXR (Boss & Roch, 2015). Il est clair que les antagonistes ont surtout été développés pour lutter contre les problèmes d'insomnie.

Pour conclure, la Food and Drug Administration (FDA) a approuvé une molécule, le suvorexant (commercialisé sous le nom de Belsomra[®]) en août 2014, un DORA utilisé pour le traitement de l'insomnie. Plusieurs autres composés, comme par exemple l'almorexant, le SB-649868, le filorexant, le lemborexant, le ACT-462206, le Seltorexant, le MK-1064 ou le MK-3697 étaient ou sont encore en cours de développement clinique mais la plupart a été stoppée lors des différentes phases d'essai. Aucun rapport sur les investigations cliniques des SORA spécifique d'OX1R n'a été publié à ce jour. Dans le domaine du cycle du sommeil et des troubles du sommeil, les questions concernent le profil pharmacocinétique des composés, notamment vis-à-vis des altérations du temps de demi-vie de la molécule et les effets ressentis le lendemain, ainsi que l'impact du double antagonisme par rapport au blocage sélectif des récepteurs OX2 pour favoriser le sommeil (Boss & Roch, 2015).

2. Molécules agonistes des récepteurs aux orexines

L'utilisation d'agonistes des OXR pourrait se révéler utile pour le traitement de la narcolepsie. Les approches actuelles pour traiter la narcolepsie impliquent l'utilisation de psychostimulants pour lutter contre la somnolence diurne et des antidépresseurs pour éviter la cataplexie. Cependant, ces traitements présentent un risque significatif d'effets secondaires tels que l'insomnie ou le retour des symptômes et un certain risque d'abus. Jusqu'à présent, peu ou pas d'agoniste d'OXR n'a été rapporté dans la littérature. Une étude a utilisé un agoniste d'OX2R l'YNT-185 (Irukayama-Tomobe *et al.*, 2017), mais pour l'instant aucun essai clinique n'a été entrepris. L'identification d'agonistes des OX1R semble être difficile par rapport aux antagonistes, ce qui dans le domaine des RCPG est un phénomène récurrent. Cela pourrait être dû au fait qu'une molécule agoniste aurait besoin d'interagir avec plusieurs régions importantes du récepteur afin d'induire ses effets cellulaires, alors qu'un antagoniste qui n'induit pas, en principe, d'effet fonctionnel, doit empêcher la liaison de l'agoniste endogène et ainsi son développement apparaît plus facile en particulier dans le cas spécifique des OXR. Malheureusement, seulement quelques agonistes d'OX2R et aucun pour OX1R ont été



Nature Reviews | Neuroscience

Figure 18 : Entrée et sortie des neurones à orexine

Les zones d'entrée sont affichées en jaune, les zones de sortie en bleu. Les neurones orexinergiques répondent à des signaux, véhiculés par des projections du noyau accumbens (NAc) et des structures limbiques, telles que le noyau de lit de la strie terminale (BNST) et le noyau central de l'amygdale (CeA). Les neurones orexinergiques interagissent également avec les facteurs qui reflètent l'état métabolique du corps, tels que la ghréline, le glucose et la leptine, et leur activité est également affectée par les niveaux de CO₂ et le pH. Les neurones orexinergiques envoient des projections excitatrices à différentes régions impliquées dans la régulation de l'alimentation, y compris le NAc, le noyau du tractus solitaire (NTS), le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (PVN), les neurones neuropeptidiques Y (NPY) et les neurones du glucorécepteur (GR) dans l'hypothalamus ventral médian. Les neurones orexinergiques se connectent également aux régions régulatrices autonomes pour augmenter le flux sympathique en réponse à des signaux importants. Les connexions entre les neurones NAc, orexinergiques et la zone tegmentale ventrale (VTA) pourraient jouer un rôle dans le système de récompense. La perception des indices qui prédisent la récompense pourrait être transmise par la connexion entre les neurones NAc et orexinergiques, qui envoient des signaux excitateurs aux neurones dopaminergiques (DA) dans la VTA. Les neurones orexinergiques augmentent également l'excitation, pour soutenir un comportement motivé, par des connexions entre ces cellules et les centres monoaminergiques, y compris les noyaux du raphé dorsal (DR), le locus coeruleus (LC) et le noyau tubéro-mammaire (TMN). Notez que les termes « excitateur » et « inhibiteur » n'indiquent pas nécessairement des connexions excitatrices et inhibitrices directes. 5-HT, 5-hydroxytryptamine (également appelée sérotonine); AP, zone postrema; Fp, folium-p; HA, histamine; OX1R, récepteur de l'orexine de type 1; OX2R, récepteur de l'orexine de type 2; PAG, peraqueductal gris; PBN, noyau parabrachial; POA, zone préoptique; RVLM, médullaire ventrolatérale rostrale; RVMM, médullaire ventromédiale rostrale. D'après Sakurai, 2014.

développés bien que l'intérêt pour de telles molécules aurait un impact significatif en terme pharmacologique (Boss & Roch, 2015).

D. Rôle physiologique au niveau du système nerveux central

L'hypothalamus est une petite région du système nerveux central des mammifères. L'hypothalamus est situé sur la face ventrale de l'encéphale, sous le thalamus et est relié à une autre glande du cerveau, l'hypophyse *via* la tige pituitaire. En effet, l'hypothalamus est relié à pratiquement toutes les autres zones du cerveau et reçoit des messages nerveux provenant de ces différentes régions. Il est intégré au système limbique et sa densité de neurones est la plus grande de tout le cerveau. Il est en charge du système nerveux autonome et du système endocrinien. Il a un rôle clé au sein de l'organisme. En effet, il contrôle et régule la faim, le sommeil, la reproduction, l'agressivité et la satiété, maintient la température corporelle et participe également à la gestion des émotions.

L'hypothalamus est divisé en trois régions : périventriculaire, médiale et latérale. Il est constitué d'un ensemble de noyaux distincts qui assurent diverses fonctions (Figure 18).

La région périventriculaire est située le long des parois du 3^{ème} ventricule et est composée d'un mélange complexe de neurones. Un premier groupe de neurones forme le noyau suprachiasmatique (NSC). Ces cellules jouent un rôle dans la synchronisation des rythmes circadiens. Un deuxième groupe de cellules contrôle le système nerveux végétatif et régule les effets de l'innervation sympathique et parasympathique des organes viscéraux. Dans le troisième groupe, les axones des neurones sécréteurs descendent vers la tige pituitaire.

La région médiale est impliquée dans la neurosécrétion *via* l'hypophyse postérieure de vasopressine ou d'ocytocine. Elle contrôle également la sécrétion de dopamine et de β -endorphines par l'antéhypophyse. Cette région joue un rôle dans la régulation des fonctions autonomes (pression artérielle, fréquence cardiaque, respiration...), des rythmes circadiens, de la faim et des comportements agressif et anxieux mais aussi dans la thermosensibilité.

La région latérale, quant à elle, participe à la régulation de la sensation de faim, de soif et à l'activité locomotrice.

Les neurones orexinergiques, présents au sein de l'hypothalamus latéral (HL), ont des connexions étendues dans le système nerveux central (SNC) avec des projections excitatrices particulièrement denses vers les centres monoaminergiques tels que le locus coeruleus

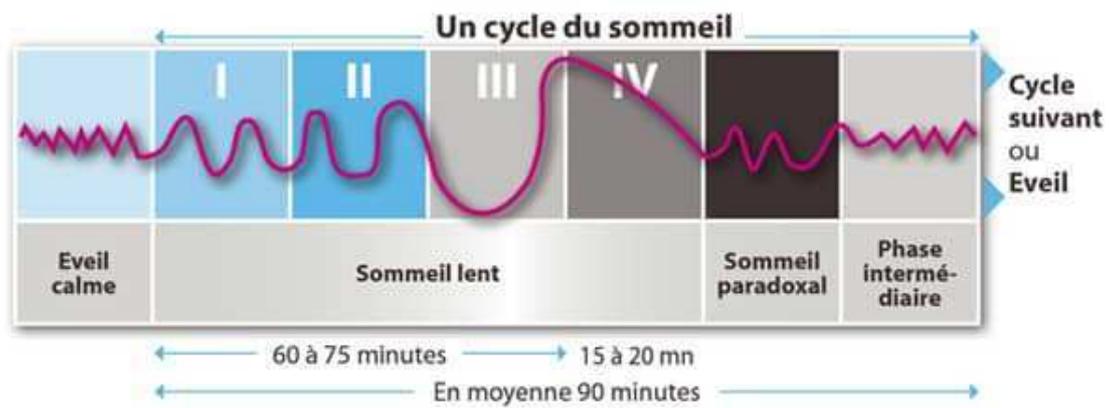


Figure 19 : Les cycles du sommeil

D'après le site sommeil.org

noradrénergique, le noyau tubomammillaire histaminergique, le noyau raphé sérotoninergique et l'aire tegmentale ventrale dopaminergique.

1. Régulation du sommeil

Pour comprendre l'impact des orexines sur le sommeil, un court résumé sur l'organisation du sommeil est nécessaire pour visualiser l'ensemble des interactions. Le sommeil est hiérarchisé par deux états de vigilance, le sommeil lent et le sommeil paradoxal (Figure 19). Le sommeil paradoxal correspond à une phase avec une activité cérébrale intense où l'on observe des mouvements rapides des yeux (REM) alors que les muscles corporels sont complètement atones. C'est la phase durant laquelle les rêves sont les plus longs et élaborés. Le sommeil lent est, quant à lui, divisé en trois phases : l'endormissement, le sommeil lent léger et le sommeil lent profond. Pendant ces trois phases, l'activité cérébrale diminue et les muscles se détendent, l'activité oculaire, quant à elle, se réduit. De plus, pour simplifier, il existe deux types de régulation du sommeil, la régulation homéostatique et la régulation circadienne. La régulation homéostatique correspond à l'équilibre interne, en cas de privation de sommeil, notre propension à nous endormir va augmenter et inversement. La régulation circadienne est sous le contrôle de notre horloge biologique interne.

a. Orexines et cycle veille/sommeil

La large distribution des orexines et de leurs récepteurs dans le SNC a suggéré des fonctions régulatrices pour ces peptides, y compris une implication dans les mécanismes du sommeil et de l'excitation. L'étude de Fujiki en 2001, a montré par une technique de microdialyse les variations du taux d'orexine A dans le liquide cérébro-spinal (LCS) de rat. Il a notamment montré que l'orexine A était constamment détectable dans le LCS durant 24 h. Les taux d'orexine A étaient élevés durant la période d'activité des rats alors qu'ils diminuaient de 40 % pendant la phase de repos. Cette étude en conclut un lien important entre la régulation circadienne du sommeil et le système orexinergique (Fujiki *et al.*, 2001). Estabrooke a émis l'hypothèse que les neurones orexinergiques devaient être relativement actifs pendant l'éveil et inactifs pendant le sommeil (Estabrooke *et al.*, 2001). En effet, les neurones orexinergiques innervent fortement de nombreux noyaux aminergiques qui favorisent l'éveil et qui inhibent le sommeil paradoxal (Chemelli *et al.*, 1999; Date *et al.*, 1999; Peyron *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2014). Des rats ont été maintenus sur un cycle lumière/obscurité de 12 heures. Pour déterminer le profil d'activité de leurs neurones orexinergiques, leur comportement sommeil-éveil a été enregistré. L'immunohistochimie double étiquette a permis de mesurer l'expression de c-Fos dans les neurones orexinergiques. La protéine c-Fos est utilisée comme un marqueur de l'activité neuronale (Date *et al.*, 1999). Ils ont observé une expression de c-Fos plus élevée

dans les noyaux des neurones orexinergiques pendant la période nocturne. D'autres animaux ont été logés dans l'obscurité constante, une activation était observée pendant la nuit subjective. Par conséquent, ces résultats suggèrent que l'activation des neurones orexinergiques peut contribuer à la promotion ou au maintien de l'éveil. Inversement, l'inactivité relative des neurones orexinergiques peut permettre l'expression du sommeil (Estabrooke *et al.*, 2001). L'équipe de Taheri a démontré une variation diurne de l'immunoréactivité de l'orexine A dans l'hypothalamus antérieure (région préoptique) et dans la région du pont (ou protubérance) (Taheri *et al.*, 2000). Des études antérieures avaient indiqué qu'il existe une connexion neuronale réciproque entre l'hypothalamus latéral et la région hypothalamique antérieure et que cette connexion est impliquée dans la régulation du sommeil (Chemelli *et al.*, 1999; Peyron *et al.*, 2000). L'hypothalamus antérieur est intimement impliqué dans le sommeil et les rythmes circadiens. Le noyau suprachiasmatique (NSC), un domaine important dans la régulation des rythmes circadiens, montre une immunoréactivité c-fos accrue en réponse aux orexines. L'immunoréactivité de l'Orexine A a diminué de 50 % dans l'hypothalamus antérieur de 9 h à 21 h, tandis que dans le pont, elle a augmenté de plus de 30 % de 21 h à 1 h. L'ARNm de la prépro-orexine a également présenté une variation diurne. Ceci suggère en outre que les orexines sont impliquées dans la régulation du cycle sommeil/éveil (Taheri *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2014).

L'ensemble de ces résultats suggère que le système orexinergique permet le maintien et la consolidation de l'état d'éveil. Une diminution de l'activité de ce système entrainerait une entrée dans la phase de sommeil profond (Li *et al.*, 2014).

b. Orexines et état d'éveil

Comme le suggère l'ensemble des précédentes expérimentations, le système orexinergique maintient l'état d'éveil. La question qui se pose maintenant est de savoir si l'activité des neurones orexinergiques est permissive ou instructive vis à vis de l'éveil. Des études *in vivo* ont cherché à montrer l'effet optogénétique de la photo-stimulation des neurones orexinergiques sur l'état comportemental des souris. Ils ont observé une augmentation de la transition des différentes phases de sommeil vers l'éveil lors de la photo-stimulation des neurones orexinergiques. Lorsque la photo-stimulation avait une fréquence lumineuse comprise entre 5 et 30 Hertz, on observait une diminution de la latence à l'éveil (Adamantidis *et al.*, 2007).

De plus, les neurones monoaminergiques jouent un rôle dans le cycle veille/sommeil (Saper *et al.*, 2010). En effet, ils excitent le néocortex mais inhibent les centres du sommeil et ainsi ils favorisent l'éveil. Ces neurones monoaminergiques sont présents dans le noyau tubéromammillaire (NTM), le locus cœruleus (LC), les noyaux du raphé dorsal (NRD) et dans la substance grise périaqueducule ventrale (GPAv) où ils reçoivent de nombreuses projections

des neurones orexinergiques (Saper *et al.*, 2005). Le LC exprime principalement les récepteurs OX1, le TMN principalement OX2R et les NRD expriment les deux récepteurs OX1 et OX2. Le groupe de Mieda (2011) a montré que les effets d'une injection intracérébroventriculaire d'OxA sur l'éveil et le sommeil (NREM) sont significativement atténués chez les deux types de souris knockout (KO pour OX1R ou OX2R) par rapport aux souris de type sauvage ; l'effet est cependant sensiblement plus important chez les souris OX2R-KO que chez les souris OX1R-KO. Ces résultats suggèrent que même si le récepteur OX2 joue un rôle central dans l'éveil, le récepteur OX1 favorise également l'éveil (Mieda *et al.*, 2011). Cependant, les deux récepteurs semblent être impliqués de manière similaire dans la suppression du sommeil paradoxal. Des observations suggèrent que le système orexine stabilise l'état d'éveil en le stimulant (Saper *et al.*, 2010). En effet, des études électrophysiologiques *in vitro* ont montré que l'orexine active le TMN histaminergique (Huang *et al.*, 2001), le LC noradrénergique (Hagan *et al.*, 1999) et le DRN 5-hydroxytryptaminergiques (Liu *et al.*, 2002). De plus, des expériences *in vivo* ont révélé l'implication des récepteurs OX1 dans le LC (Bourgin 2000) et la signalisation des récepteurs OX2 dans le TMN (Mochizuki *et al.*, 2011), dans l'excitation induite par l'orexine. Il est à noter que des études récentes ont montré que la transition sommeil/éveil chez la souris n'est pas dépendante du système histaminergique (Carter *et al.*, 2009) et que les modèles de souris déficientes en récepteurs à l'histamine H1 et en récepteurs OX1 affichent un sommeil normal (Hondo *et al.*, 2010).

c. *Orexines et narcolepsie*

La narcolepsie est une maladie caractérisée par une somnolence diurne excessive et des cataplexies ou une perte du tonus musculaire déclenchées par des émotions. L'enregistrement polygraphique du sommeil a montré que les patients narcoleptiques s'endorment directement en sommeil paradoxal alors que les sujets sains s'endorment en sommeil lent. Deux types de narcolepsie ont été différenciés, la narcolepsie de type 1 et la narcolepsie de type 2. Plusieurs groupes ont montré une association entre une déficience en orexine et la narcolepsie (Chemelli *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 1999; Peyron *et al.*, 2000; Thannickal *et al.*, 2000). Cette association a été observée dans un premier temps chez les animaux par des approches génétiques directes et indirectes. Dans le modèle canin de narcolepsie autosomique récessive, des mutations dans le gène codant pour OX2R ont été observées. Les mutations sautent des exons et conduisent à la formation d'une protéine réceptrice tronquée donc non fonctionnelle chez des Labradors et des Dobermans narcoleptiques (Lin *et al.*, 1999). Dans le modèle de souris KO pour la PpOx, les symptômes caractérisant la narcolepsie tels que les phases de somnolence excessive et les pertes de tonus musculaire ont été observés en absence d'orexine (Chemelli *et al.*, 1999). Chez l'Homme, OxA et OxB sont issus du même

gène. La plupart des cas de narcolepsie humaine n'est pas liée à des mutations des orexines ou des OXR, mais associée à des taux d'OxA dans le liquide céphalorachidien (LCR) faibles ou indétectables (Peyron *et al.*, 2000; Thannickal *et al.*, 2000). Il est également à noter une corrélation entre la narcolepsie et la présence de l'allèle HLA-DQB1 0602, ce qui a conduit au premier test de diagnostic spécifique et sensible de cette pathologie (Mignot *et al.*, 2002). Les orexines sont impliquées dans la narcolepsie de type 2. Des études *post-mortem* sur cerveaux humains ont confirmé des déficiences en OxA et OxB dans le cerveau de patients narcoleptiques (Peyron *et al.*, 2000; Thannickal *et al.*, 2000). De plus, une disparition des cellules neuronales orexinergiques a été observée dans l'hypothalamus latéral dans les cas de narcolepsie sporadique (Peyron *et al.*, 2000; Thannickal *et al.*, 2000). Il n'existe pas d'éléments suggérant une possible maladie auto-immune et il n'existe pas encore de données publiées examinant les auto-anticorps spécifiques du système orexinergique. La localisation hypothalamique des neurones orexinergiques, leurs projections étendues dans le SNC et leurs différents rôles font que ces nouveaux peptides sont des composants majeurs intéressants les neurosciences. Une transmission anormale des orexines est également observée dans les troubles neurologiques associés à la somnolence diurne et/ou aux anomalies hypothalamiques. Par conséquent, le développement de substances pharmacologiques régulant ce système orexine peut avoir de multiples applications thérapeutiques.

2. Rôle des orexines dans la régulation de la prise alimentaire, l'obésité et l'homéostasie énergétique

L'aire hypothalamique latérale a été décrite comme étant impliquée dans la régulation du comportement alimentaire et de l'homéostasie énergétique. Les neurones orexinergiques sont localisés dans la région latérale de l'hypothalamus. Cette localisation peut suggérer une implication de ces neuropeptides dans la régulation du comportement alimentaire. Pour répondre à cette hypothèse, le groupe de Sakurai a évalué l'effet de l'administration d'orexine A dans le ventricule latéral du cerveau de rats mâles. L'équipe a constaté que l'administration centrale d'orexine stimule la prise alimentaire et d'autres études ont montré que l'administration d'un antagoniste aux OXR ou d'un anticorps dirigés contre ces récepteurs diminue la prise alimentaire (Sakurai *et al.*, 1998; Haynes *et al.*, 2000). De plus, il a été noté que les mammifères réagissent à la diminution de la disponibilité alimentaire en devenant plus éveillés et actifs. Des études ont cherché à connaître les voies centrales régulant l'excitation et les programmes moteurs instinctifs (tels que la recherche de nourriture). Des souris transgéniques, ayant subi l'ablation des neurones orexinergiques, ne semblent pas augmenter, leur vigilance et leur activité, en période de jeûne. Par conséquent, ces résultats

indiquent que les neurones orexinergiques fournissent un lien crucial entre l'équilibre énergétique et l'excitation (Yamanaka *et al.*, 2003).

Les neurones orexinergiques régulent les signaux d'équilibre énergétique, y compris les hormones (leptine, insuline et ghréline) et les nutriments (acides gras, acides aminés et glucose) (Xu *et al.*, 2013). Les orexines, la leptine, l'insuline, la ghréline, le neuropeptide Y (NPY) et le glucose jouent des rôles compliqués dans le pancréas, innervés par les nerfs sympathiques et jouent un rôle essentiel dans la modulation de l'homéostasie énergétique (Karnani *et al.*, 2011). La leptine est produite dans le tissu adipeux et l'estomac et est connue pour limiter l'apport énergétique et soutenir la dépense énergétique. Elle agit ainsi comme un régulateur de rétroaction négative de l'adiposité dans le cerveau. La ghréline est un peptide acylé sécrété à la fois par l'hypothalamus et la muqueuse gastrique qui stimule la prise alimentaire et est impliquée dans l'initiation du repas (Xu *et al.*, 2013). Les neurones orexinergiques et l'expression de l'orexine sont inhibés par la leptine, le glucose et l'alimentation, mais ils sont stimulés par la ghréline à travers le NPY et l'agouti-related protein (AgRP) (Yamanaka *et al.*, 2003). La relation entre l'orexine et la leptine a été démontrée au niveau anatomique (Louis *et al.*, 2010; Leininger *et al.*, 2011). Des neurones MCH-GABA⁺ ont été identifiés qui expriment des récepteurs de la leptine dans l'hypothalamus latéral et établissent des contacts synaptiques denses avec les neurones orexinogènes. La signalisation d'OX2R, mais pas celle d'OX1R, protège fortement les rongeurs contre la résistance à l'insuline et contre l'obésité induite par le régime alimentaire, de manière dépendante de la leptine, en augmentant la dépense énergétique et en réduisant la consommation alimentaire (Funato *et al.*, 2009). Il a été démontré que le récepteur OX1, quant à lui, agit sur la motivation et le comportement alimentaire basé sur la récompense chez la souris (Sharf *et al.*, 2010b). Par conséquent, le système orexinergique, intégré avec d'autres systèmes tels que les systèmes de la leptine et de la ghréline, contrôle l'homéostasie énergétique.

En revanche, l'impact d'injections intrapéritonéales d'orexine A a été étudié chez les souris saines. La prise alimentaire, le métabolisme énergétique, la prise de poids ainsi que l'adiposité ont été évalués chez ces souris. De plus, la modulation de l'expression de certains neuropeptides ainsi que de leurs récepteurs a été explorée. L'étude a montré que l'augmentation de la concentration en orexine A périphérique induite par les injections intrapéritonéales est détectée par l'hypothalamus et affecte l'expression de plusieurs récepteurs et neurotransmetteurs, mais n'entraîne aucun effet important sur l'apport et la dépense énergétiques, probablement en raison de la courte demi-vie de l'orexine A dans le plasma (30 min) (Blais *et al.*, 2017).

Cependant, une réduction faible mais significative de la masse grasse viscérale et de l'adiposité est observée (Blais *et al.*, 2017). Ces résultats sont appuyés par des travaux

antérieurs qui ont montré que, sur les adipocytes humains isolés des tissus adipeux sous-cutanés comparés aux intra-abdominaux, l'OxA avait différentes actions sur l'expression des gènes clés impliqués dans l'adipogenèse et le métabolisme adipocytaire. Ces travaux pourraient expliquer pourquoi l'OxA est capable de réduire l'adipogenèse dans les adipocytes intra-abdominaux mais pas dans les adipocytes sous-cutanés (Digby *et al.*, 2006).

L'équipe de Schuld a, quant à elle, montré que l'incidence de l'obésité chez les individus narcoleptiques était deux fois plus élevée que dans la population générale (Schuld *et al.*, 2000). Les individus narcoleptiques ont un nombre réduit de neurones orexinergiques. En outre, les individus narcoleptiques ont un risque d'obésité supérieur à celui des patients souffrant d'hypersomnies idiopathiques, ce qui suggère une autre cause à l'obésité que la seule somnolence excessive ou une diminution de l'activité. Une étude réalisée chez des rats Sprague-Dawley a montré que les rats ayant une activité élevée présentent une expression plus élevée de l'ARNm codant pour la PpOx. Ils présentent également une dépense énergétique basale plus élevée et une plus grande résistance à l'obésité (Perez-Leighton *et al.*, 2013). De plus, l'administration répétée d'orexines a empêché l'apparition d'une obésité liée à l'alimentation chez ces rats. En accord avec l'idée que le système orexinergique est associé à l'activité motrice, l'administration centrale d'orexines augmente significativement l'activité motrice chez les animaux (Hagan *et al.*, 1999; Nakamura *et al.*, 2000), alors que les souris déficientes en orexines présentent une activité motrice réduite par rapport aux souris de type sauvage (Hara *et al.*, 2001). Par conséquent, la stimulation de l'activité motrice induite par les orexines pourrait contribuer en partie à l'effet « anti-obésité » des orexines.

3. Relation du système orexine avec le système de récompense

L'hypothalamus latéral (HL) est connu pour avoir un rôle important dans le système de récompense. L'addiction est un comportement compulsif et répété envers une substance addictive (telle que la drogue, l'alcool, la nourriture...). Les sous-régions cérébrales impliquées dans l'addiction semblent différentes selon la substance addictive. Par exemple, l'addiction à la cocaïne est liée à l'aire tegmentale ventrale (ATV) alors que l'addiction à la morphine est liée principalement à l'HL. L'addiction à la nicotine est liée, quant à elle, au cortex insulaire et à l'HL et l'addiction à l'alcool est liée uniquement à l'HL. Le rôle de l'orexine dans les comportements addictifs et la recherche de récompenses a été largement étudié.

Les études de Boutrel et de Harris en 2005 ont montré qu'une injection intracérébroventriculaire (ICV) d'orexine A dans l'ATV a rétabli le comportement de recherche de cocaïne chez les rongeurs qui avait été rendus dépendants (Boutrel *et al.*, 2005; Harris *et al.*, 2005). L'orexine semble jouer un rôle dans la sensibilisation et la motivation à rechercher des drogues, en particulier lorsqu'elles sont déclenchées par des stimuli externes (Mahler *et*

al., 2012; Sakurai, 2014). Cette fonction semble être médiée par OX1R, bien que l'injection d'un antagoniste SB-334867 spécifique d'OX1R n'ait pas affecté l'expression de la sensibilisation à la cocaïne et aux amphétamines chez les animaux testés immédiatement après l'addiction (Borgland *et al.*, 2006). L'antagoniste l'almorexant lui, a bloqué la sensibilisation après une période d'abstinence suivie d'une période de sensibilisation aux amphétamines (Quarta *et al.*, 2010; Winrow *et al.*, 2010). Fait important, ni les orexines, ni les antagonistes de ces récepteurs n'affectent l'auto-administration de drogues addictives telles que la cocaïne chez les rongeurs (España *et al.*, 2011), ce qui suggère que l'orexine ne semble pas être impliquée dans les propriétés de renforcement ou de sensibilisation à la cocaïne (Mahler *et al.*, 2012). De plus, l'administration d'orexine A par injection ICV rétablit le comportement de recherche de cocaïne préalablement éteint. Mais il a également été montré que l'administration d'un antagoniste des récepteurs de la corticotropine (CRH) ou d'un agoniste des récepteurs $\alpha 2$ clonidine α , respectivement, réduit et bloque cet effet, suggérant que le rôle de l'orexine dans le comportement de recherche de récompense est médié par la CRH et les systèmes noradrénergiques (Boutrel *et al.*, 2005).

Les orexines sont également impliquées dans la dépendance aux opiacés tels que la morphine. Les souris KO pour la PpOx ou les souris sauvages ayant reçu le SB-334867 ont présenté une réduction de la réponse au sevrage de la morphine (Georgescu *et al.*, 2003; Sharf *et al.*, 2010a, 2010b). De plus, l'injection intrapéritonéale du SB-334867 a réduit l'expression des comportements de récompense induits par la morphine chez les rats et les souris (Harris *et al.*, 2005; Sharf *et al.*, 2010a). De même les souris KO pour la PpOx n'ont pas montré de comportement de récompense lié à la morphine ni de suractivité locomotrice (Narita *et al.*, 2006). Les orexines semblent donc jouer un rôle dans la recherche de drogues induite par des stimuli mais elles peuvent également moduler les propriétés gratifiantes ou de récompenses des opiacés eux-mêmes.

Les orexines jouent également un rôle dans la dépendance à la nicotine. L'expression de Fos (marqueur de l'activation neuronale) a été augmentée dans les neurones à orexine chez le rat après l'administration aiguë de nicotine ou lors du retrait de nicotine (Pasumarthi *et al.*, 2006; Plaza-Zabala *et al.*, 2012). Chez les souris KO pour les orexines, la réponse du sevrage à la nicotine a été atténuée. Chez les souris sauvages, l'administration intrapéritonéale du SB-334867 l'a également atténuée mais pas l'administration de l'antagoniste TCSOX229 spécifique à OX2R (Plaza-Zabala *et al.*, 2012). De plus, l'administration systémique de l'almorexant et du SB-334867 et la perfusion locale de SB-334867 dans le cortex insulaire ont réduit l'auto-administration de nicotine (Hollander *et al.*, 2008; LeSage *et al.*, 2010). Les orexines sont impliquées à la fois dans le renforcement primaire et dans le comportement lors du retrait de la nicotine.

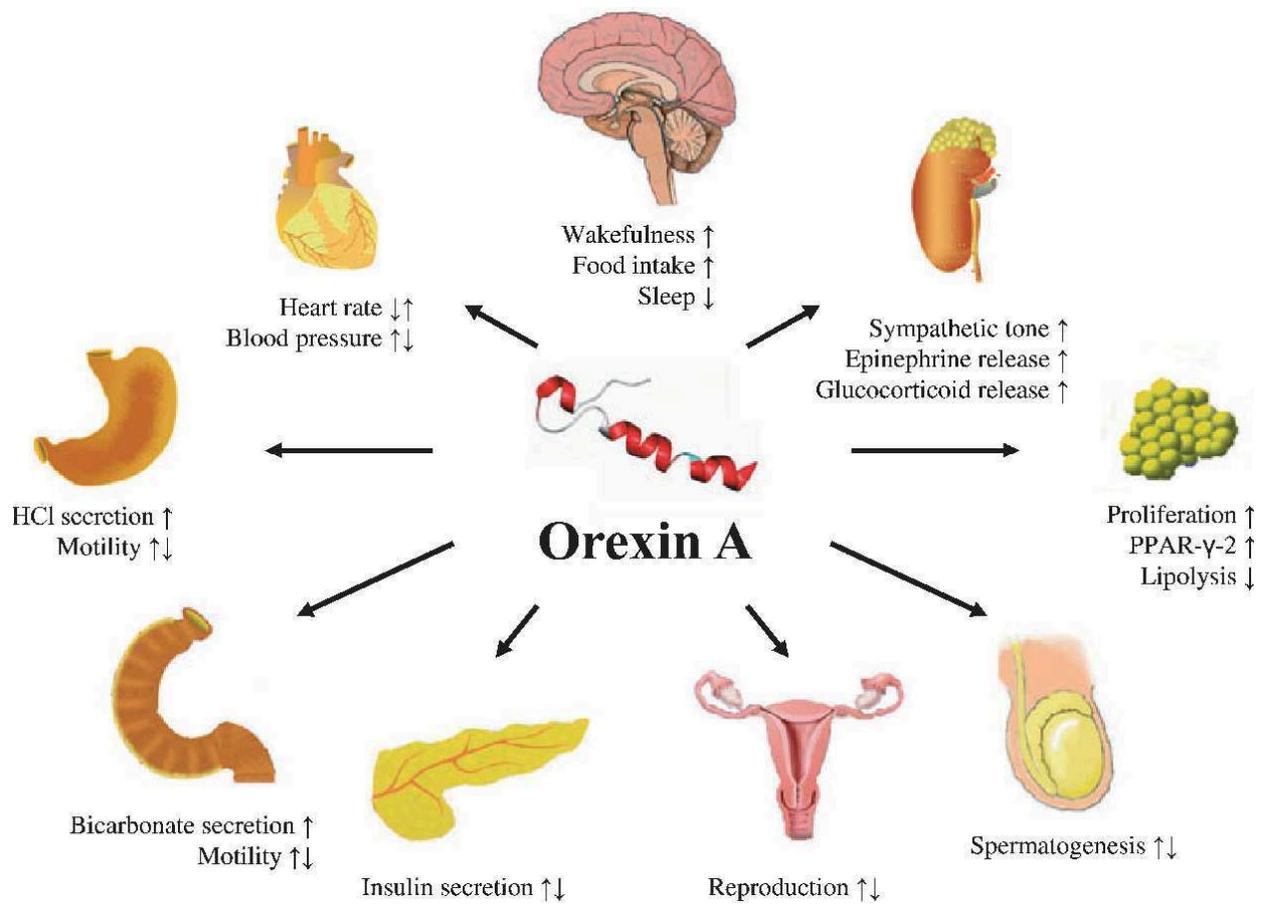


Figure 20 : Effets des orexines dans les tissus périphériques

D'après Heinonen, 2008

De nombreuses études ont suggéré un rôle des orexines dans la consommation d'alcool et son addiction (Moorman & Aston-Jones, 2009). L'équipe de Lawrence a montré qu'une consommation chronique d'éthanol augmentait l'ARNm codant pour l'orexine A dans le HL, région impliquée dans le comportement de récompense lié à l'éthanol (Lawrence *et al.*, 2006). L'antagoniste JNJ-10397049 spécifique d'OX2R a diminué l'acquisition, l'expression et le rétablissement du comportement de récompense induit par l'éthanol chez la souris. En revanche, le SB-334867 et l'antagoniste SB-408142 spécifique d'OX1R n'ont eu que très peu d'effet sur ces comportements (Shoblock *et al.*, 2011). Cela suggère qu'OX2R est impliqué dans la régulation de la récompense liée à l'éthanol médiée par l'orexine. De plus, les injections sous-cutanées du JNJ-10397049 ont diminué l'auto-administration d'éthanol chez les rats (Shoblock *et al.*, 2011). En revanche, l'administration systémique de SB-334867 a réduit l'auto-administration d'éthanol grâce à des stimuli olfactifs ou lumineux (Jupp *et al.*, 2011; Shoblock *et al.*, 2011). La recherche d'éthanol ou le comportement de récompense induit par la consommation d'éthanol a augmenté le nombre de neurones orexigènes positifs pour Fos dans l'hypothalamus (Dayas *et al.*, 2008). Ces résultats suggèrent que la signalisation orexinergique *via* les deux récepteurs OX1 et OX2 est impliquée dans la régulation de la consommation d'éthanol et dans la dépendance. De plus, l'implication d'OX1R serait requise pour la recherche d'éthanol induite par le comportement de récompense (Mahler *et al.*, 2012; Sakurai, 2014).

Plus récemment, des études se sont intéressées à l'impact des traitements utilisés par les personnes narcoleptiques sur leur système de récompense. Les patients narcoleptiques traités avec des amphétamines ne deviennent pas dépendants à ces molécules. Il semblerait que leurs circuits de récompense soient anormaux (Chieffi *et al.*, 2017).

E. Rôles des orexines dans les tissus périphériques

Le rôle des orexines dans les tissus périphériques est encore conjonctural. Plusieurs tissus périphériques contiennent des orexines et expriment leurs récepteurs. Le système orexinergique étant impliqué dans la régulation de la prise alimentaire, certains tissus tels que les tissus adipeux blanc et brun et le pancréas ont donc été étudiés plus en détail (Figure 20).

1. Les tissus adipeux

Le tissu adipeux blanc sert principalement au stockage d'énergie et à la production de cytokines. Les deux isoformes d'OXR semblent être présentes dans les adipocytes. La majorité des études ont montré que les adipocytes chez les rongeurs (Skrzypski *et al.*, 2012; Shen *et al.*, 2013) et chez les porcs (Wojciechowicz *et al.*, 2016) expriment les OXR. Chez

l'Homme, OX1R et OX2R ont été identifiés dans les adipocytes isolés de tissus adipeux sous-cutanés et omentaux (Digby *et al.*, 2006), d'autres ont constaté qu'OX1R mais pas OX2R était présent dans les préadipocytes (Pino *et al.*, 2017). En revanche, les adipocytes matures isolés des régions sous-cutanées abdominales, sous cutanées et profondes du cou n'expriment pas les OXR (Pino *et al.*, 2017). Cependant, lors de l'étude de Digby, le tissu adipeux utilisé provient de patients subissant une chirurgie (Digby *et al.*, 2006) alors que dans l'étude de Pino, ils proviennent de patients hétérogènes (Pino *et al.*, 2017). De plus, l'ARNm codant pour la PpOx est absent du tissu adipeux humain (Digby *et al.*, 2006). Dans l'ensemble, les orexines peuvent stimuler ou inhiber la prolifération et la différenciation des préadipocytes d'une manière dépendante de l'espèce. Par exemple, chez les rongeurs, l'orexine A stimule la croissance des préadipocytes et les protège de l'apoptose alors que l'orexine B inhibe leur prolifération cellulaire (Skrzypski *et al.*, 2012). En revanche, les orexines induisent une prolifération et une différenciation des préadipocytes isolés chez le porc (Wojciechowicz *et al.*, 2016). Chez l'Homme, cependant, l'orexine A ne stimule pas la différenciation des préadipocytes (Pino *et al.*, 2017; Skrzypski *et al.*, 2018).

Le tissu adipeux brun, quant à lui, est impliqué dans la thermogénèse adaptative. Initialement, il était admis que la présence du tissu adipeux brun était limitée au nouveau-né, mais, des études récentes ont montré que le tissu adipeux brun est également présent chez l'adulte et que sa quantité est corrélée avec l'indice de masse corporelle (Cypess *et al.*, 2009). L'orexine A module la formation et les fonctions du tissu adipeux brun chez les rongeurs, en favorisant la dépense énergétique, la balance énergétique négative et la protection contre l'obésité (Sellayah *et al.*, 2011; Sellayah & Sikder, 2012). En revanche, des études ont montré que l'orexine A ne parvient pas à stimuler la différenciation des préadipocytes bruns, ainsi que l'expression des gènes thermogéniques dans les préadipocytes et les cellules graisseuses brunes différenciées d'origine humaine (Pino *et al.*, 2017; Skrzypski *et al.*, 2018)

2. Le pancréas

Le pancréas a une double fonction. Une fonction endocrine *via* les îlots de Langerhans, qui sécrètent l'insuline et le glucagon pour réguler la glycémie et une fonction exocrine *via* les cellules acineuses qui vont produire et transporter les enzymes nécessaires à la digestion des aliments.

En ce qui concerne la partie endocrine, les ARNm codant pour OX1R et OX2R sont présent dans les îlots pancréatiques, plus précisément, dans les cellules bêta du pancréas (Nowak *et al.*, 2005). Cependant, au niveau protéique, seul OX1R est exprimé (Nakabayashi *et al.*, 2003; Göncz *et al.*, 2008). Les mêmes résultats ont été observés dans les cellules alpha du pancréas (Nakabayashi *et al.*, 2003). Par conséquent, ces données indiquent que seul OX1R peut

contrôler les fonctions des cellules alpha et bêta du pancréas telles que les sécrétions d'insuline et de glucagon. Les sécrétions d'insuline et de glucagon sont régulées par le glucose (MacDonald *et al.*, 2005; Walker *et al.*, 2011). Cependant, d'après des études d'Ouedraogo et d'Arafat la sécrétion d'OxA à partir des îlots pancréatiques est indépendante du glucose (Ouedraogo *et al.*, 2003; Arafat *et al.*, 2014). En revanche, le groupe d'Arafat a démontré *in vivo* et *in vitro* que le glucagon régule la sécrétion d'OxA quels que soient les niveaux d'insuline et de glucose. Mais, il est important de noter que les îlots pancréatiques sont composés de plusieurs types de cellules endocrines en dehors des cellules α et β , telles que les delta, epsilon et PP à polypeptides pancréatiques. L'expression et la distribution des OXR dans ces cellules n'ont pas encore été étudiées (Skrzypski *et al.*, 2018). Quant au rôle des orexines sur la sécrétion d'insuline et de glucagon, les données sont controversées comme la plupart des effets périphériques des orexines. Cependant, la majorité des études démontrent que l'OxA stimule l'exocytose de l'insuline à partir des cellules bêta *in vitro* et *in vivo* chez différentes espèces : rats (Göncz *et al.*, 2008), souris (Park *et al.*, 2015) ainsi que dans les lignées cellulaires productrices d'insuline (Chen *et al.*, 2013; Skrzypski *et al.*, 2016). Ainsi, ces résultats appuient fortement la conclusion selon laquelle l'OxA appartient à la famille des sécrétagogues de l'insuline.

La partie exocrine du pancréas a, elle, été très peu étudiée. La seule information disponible est que les cellules AR4-2J, cellules tumorales acineuses pancréatiques de rat expriment OX2R et a montré que l'orexine en concentration élevée stimule la mobilisation du Ca^{2+} dans ces cellules mais le caractère cancéreux de cette lignée peut expliquer à lui seul l'expression de ce récepteur (Harris *et al.*, 2002).

3. Le système reproducteur mâle

L'ARNm codant pour les récepteurs OX1 et OX2 a été détecté dans différents sites de l'appareil reproducteur masculin chez l'Homme et le rat (Jöhren *et al.*, 2001; Karteris *et al.*, 2004; Barreiro *et al.*, 2005). Le testicule de rat est le tissu contenant le plus d'orexines après le cerveau (Jöhren *et al.*, 2001). L'orexine A *via* le récepteur OX1 semble stimuler la production de testostérone chez les rats (Barreiro *et al.*, 2004, 2005). Chez l'Homme, l'orexine A n'a pas été détectée dans le système reproducteur. En revanche, lorsque les membranes des cellules testiculaires mâles humaines ont été incubées en présence d'orexine A, les PLC ont été stimulées (Karteris *et al.*, 2004).

4. Le tractus gastro-intestinal

Une étude de Kirchgessner et Liu en 1999 a montré la présence d'ARNm codant pour la PpOx et les OXR dans l'intestin grêle total du rat. Il a également été montré que la PpOx, l'OxA, l'OxB et les OXR étaient exprimés dans le plexus myentérique et sous-muqueux et dans les cellules endocrines de la muqueuse iléale de souris, de rat, de porc et d'Homme (Kirchgessner & Liu, 1999; Näslund *et al.*, 2002; Nakabayashi *et al.*, 2003; Ehrström *et al.*, 2005a). Chez le porc, ils ont démontré que l'immunoréactivité de l'OxA était colocalisée avec la gastrine dans l'antra gastrique (Kirchgessner & Liu, 1999). Alors que des études ont montré que chez le rat, l'immunoréactivité de l'OxA était observée dans les fibres nerveuses des ganglions, les neurones myentériques et sous-muqueux, le muscle circulaire et la muqueuse (Näslund *et al.*, 2002). De plus, l'expression de la PpOx a été détectée dans l'estomac, l'iléon, le côlon et les cellules épithéliales colorectales. L'OX1R a été détecté dans les neurones sous-muqueux et myentériques de rat, ainsi que dans les fibres nerveuses entourant les cryptes des muqueuses et dans le muscle circulaire. Il a également été observé dans les cellules endocriniennes du corpus gastrique, alors que l'immunoréactivité d'OX2R n'était présente que sur les cellules entéroendocrines (Näslund *et al.*, 2002). Chez l'Homme, une immunoréactivité à l'OxA a été observée dans les cellules ganglionnaires du tronc sympathique thoracique et dans les cellules endocrines du tractus gastro-intestinal, en plus des plexus myentériques (Nakabayashi *et al.*, 2003). En conclusion, la distribution abondante des orexines et de leurs récepteurs dans plusieurs tissus du tractus gastro-intestinal suggère une pertinence biologique pour ces peptides. Cependant, beaucoup des anticorps utilisés dans les années 2000 n'étaient pas ou peu spécifiques, de nouvelles études sont donc nécessaires pour valider l'ensemble de ces données. En particulier, il a été montré que les récepteurs aux orexines n'étaient pas exprimés au niveau de l'épithélium colique sain chez l'Homme (Voisin *et al.*, 2011).

Néanmoins, les orexines sont donc impliquées dans la régulation de la motilité gastrique et intestinale. En effet, une microinjection d'orexine dans le noyau moteur dorsal (DMN) induit une augmentation de la motilité antrale chez le rat anesthésié. De plus, des études immunocytochimiques ont révélé une expression abondante d'OX1R dans le DMN (Krowicki *et al.*, 2002). L'administration intracisternale d'OxA a induit une relaxation de l'estomac proximal chez le rat (Kobashi *et al.*, 2002). Chez des volontaires humains, l'effet de la perfusion d'OxA sur la vidange gastrique a été étudié après une nuit à l'aide d'une omelette marquée au Technétium^{99m} (Ehrström *et al.*, 2005b). En accord avec les résultats de l'équipe de Kobashi, le taux de vidange gastrique était significativement plus lent pendant la perfusion d'OxA. En raison de la variabilité des résultats et des méthodologies utilisées, les effets des orexines sur la motilité intestinale sont encore controversés (Kobashi *et al.*, 2002).

Plusieurs groupes ont montré que les orexines jouent un rôle essentiel dans la régulation de la sécrétion des liquides gastriques *via* des mécanismes centraux. Les injections intracérébrales d'OxA provoquent une augmentation dose-dépendante de la sécrétion d'acide gastrique chez les rats conscients, tandis que l'administration intrapéritonéale n'a aucun effet (Takahashi *et al.*, 1999). La stimulation a également été bloquée par l'atropine ou par une vagotomie chirurgicale, suggérant un site d'action central. Comme seule l'OxA administrée par voie centrale, mais pas l'OxB, stimule la sécrétion acide, l'action est probablement médiée par OX1 (Takahashi *et al.*, 1999). Ces études indiquent que l'OxA, mais pas l'OxB, stimule la sécrétion d'acide gastrique dans l'estomac *via* la voie vagale.

5. Le système cardiovasculaire

L'influence de l'orexine sur le système nerveux autonome a été bien décrite pour le système cardiovasculaire. Des données montrent que l'orexine A exerce une influence directe sur la réactivité cardiovasculaire du système nerveux autonome c'est-à-dire, une augmentation de la pression sanguine et de la tachycardie (Xiao *et al.*, 2013). L'étude de Beig démontre une action des orexines plus périphérique. En effet, OX1R et OX2R sont exprimés dans les neurones sympathiques préganglionnaires. L'ensemble des orexines et des OXR est impliqué dans le contrôle des réactions autonomes au niveau des cellules sympathiques préganglionnaires (Beig *et al.*, 2015). Il a également été montré que les orexines ont un rôle significatif dans la réponse au stress chez les rats contrôlés et hypertendus, de même que l'ensemble des OXR est impliqué dans cette réaction (Martin *et al.*, 2016).

L'injection intracérébrale d'orexine A provoque une augmentation de l'activité sympathique, du rythme cardiaque et de la pression artérielle (Shirasaka *et al.*, 1999; Shahid *et al.*, 2011, 2012; Li *et al.*, 2018). D'après l'étude de Huang, qui a utilisé des antagonistes aux OXR, les effets cardiovasculaires seraient dus à l'impact des orexines sur OX2R (Huang *et al.*, 2010). Plus récemment, de nombreuses études sur des animaux hypertendus ont montré des taux d'ARNm d'OX1R et d'OX2R dans le noyau paraventriculaire plus élevés (Huber *et al.*, 2017) mais également plus de neurones orexinergiques dans l'hypothalamus (Clifford *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2015). Les orexines exercent donc un rôle important dans la régulation de la pression artérielle (Sieminski *et al.*, 2018).

En résumé, il n'y a pas d'effet majeur des orexines dans les tissus périphériques, les effets sont très limités. De plus, les outils utilisés pour la détection des récepteurs sont peu fiables. En effet, les anticorps utilisés pour détecter l'expression des récepteurs ont été identifiés pour certains comme peu spécifiques, en particulier pour les anticorps anti-OX2R qui reconnaissent également OX1R. De la même manière, l'utilisation d'anticorps pour détecter

la présence de peptides OxA et/ou OxB dans les tissus est également discutable, lié principalement au caractère peu immunogène de ces peptides, fortement conservés dans tout le règne animal. De plus, l'expression des ARNm codant pour les récepteurs n'est pas forcément synonyme d'expression protéique.

F. Cascade de signalisation des récepteurs aux orexines

Les récepteurs aux orexines sont des RCPG de classe A. Comme attendu, ils utilisent les protéines G hétérotrimériques comme principaux médiateurs de la transduction du signal. Les récepteurs OX1 et OX2 étant très proches dans leurs signalisations, des études ont permis de montrer qu'ils étaient couplés à trois membres de la famille des protéines G hétérotrimériques, à savoir Gq, Gi/o et Gs. Il existe peu de méthodes pour mesurer directement l'activation de la protéine G ou l'inhibition de la protéine G spécifique du sous-type (Kukkonen, 2004). Par conséquent, la pensée commune selon laquelle OX1R se couple exclusivement à Gq et qu'OX2R se couple à Gq et Gi/o est sujette à caution. Les méthodes utilisées pour évaluer le couplage des protéines G aux OXR n'ont été appliquées qu'à quelques cas. Par ailleurs, les conclusions sur l'importance de certaines protéines G dans les réponses liées aux OXR doivent être tempérées à cause des limites de ces méthodes. Néanmoins, l'importance de la voie Gq- phospholipase C (PLC) demeure très largement admise.

Les premières études sur OXR ont indiqué que leur activation déclenchait une élévation de calcium (Ca^{2+}) dans les cellules recombinantes et natives (Sakurai *et al.*, 1998). Cependant, ces premiers résultats correspondaient au Ca^{2+} extracellulaire (Lund *et al.*, 2000). Classiquement, l'activation de la PLC génère des inositols triphosphates (IP_3), qui se lient sur les récepteurs canaux spécifiques aux IP_3 sur le réticulum endoplasmique (ER) qui libèrent le Ca^{2+} dans le cytosol (Konieczny *et al.*, 2012). L'appauvrissement en Ca^{2+} dans l'ER envoie un signal à la membrane plasmique pour permettre à l'afflux de Ca^{2+} du milieu extracellulaire de remplir les réserves. L'afflux de Ca^{2+} peut également être régulé *via* d'autres canaux et transporteurs dans la signalisation des RCPG. Les canaux calciques dépendants du voltage (VGCC) sont activés directement par dépolarisation et peuvent être modulés par les seconds messagers. Les canaux calciques sollicités par les récepteurs incluent les canaux calciques non sélectifs (NSCC) de la famille des récepteurs à potentiel transitoire (TRP) avec une grande diversité de signaux d'activation (Kukkonen, 2011). L'afflux calcique peut également être généré par des échangeurs de sodium Na^+ /potassium (K^+)/calcium réversibles (NCX, NCKX) qui permettent de pomper du Ca^{2+} et du K^+ et de libérer du Na^+ (Lytton, 2007). Des études ont montré que la signalisation des orexines dépend en partie des NSCC. En effet, dans les cellules ovariennes d'hamster chinois (CHO) exprimant le récepteur humain OX1, la stimulation d'OX1R active un afflux de Ca^{2+} qui peut être visualisé sélectivement en utilisant

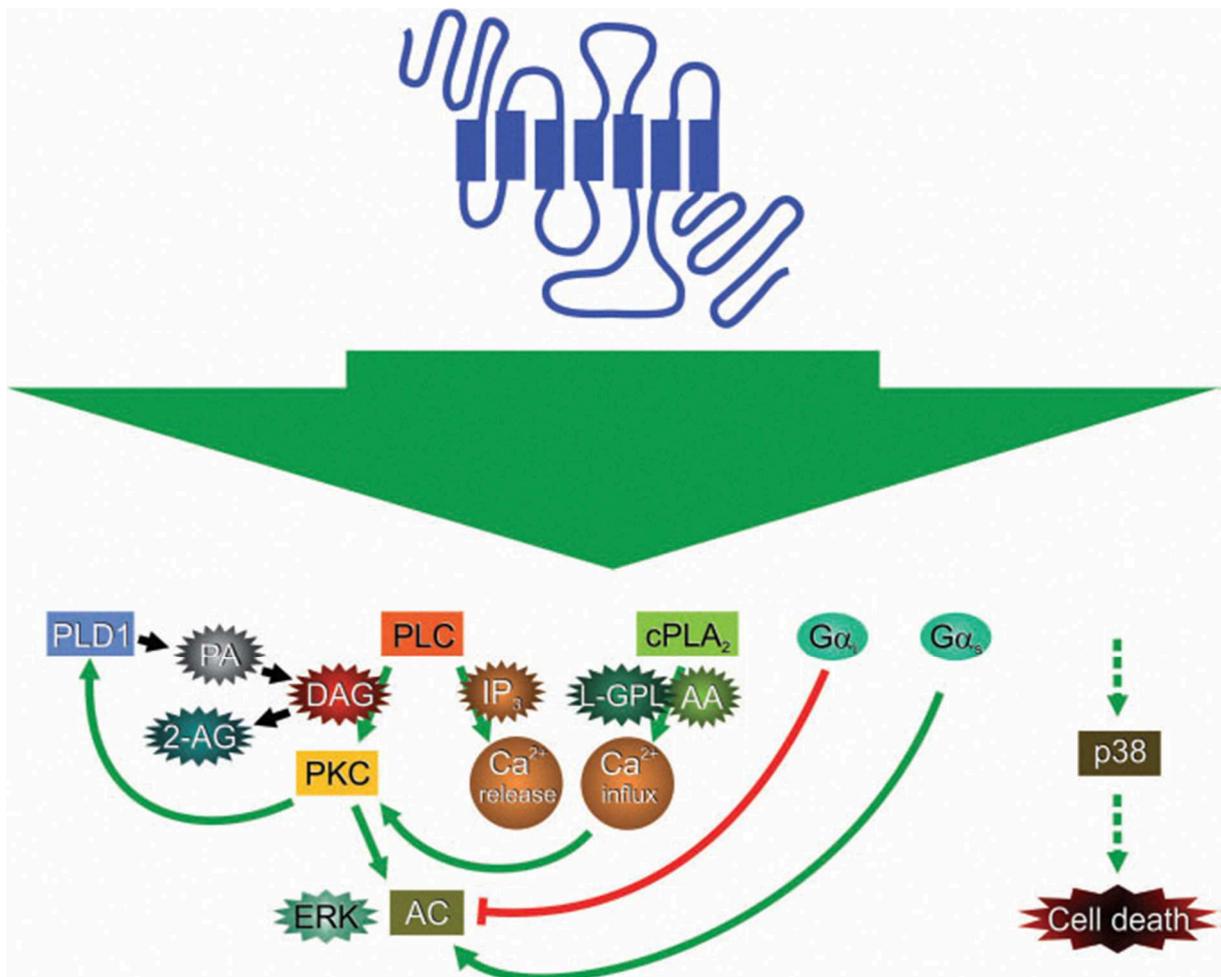


Figure 21 : Résumé schématique de certaines des relations des cascades de signalisation du récepteur OX1 humain dans les Cellules Ovariennes de Hamster chinois (CHO)

AC : Adénylate Cyclase ; cPLA₂ : Phospholipase cytosolique A₂ ; DAG : diacylglycérol ; ERK : Extracellular signal-regulated kinases ; IP₃ : Inositol triphosphate ; Ca²⁺ : Calcium ; PLD1 : phospholipase D1. D'après Leonard et Kukkonen 2014.

du manganèse (Mn^{2+}) comme substituant au Ca^{2+} (Lund *et al.*, 2000). Cet afflux de calcium peut être inhibé par des inhibiteurs des canaux TRP (Kukkonen & Akerman, 2001). De plus, cet afflux est lié à l'activité de la phospholipase A2 cytosolique (cPLA2) car en présence d'un inhibiteur de la cPLA2, l'afflux est bloqué (Turunen *et al.*, 2010). Dans les cellules embryonnaires de rein humain (HEK-293) exprimant les récepteurs aux orexines humaines, la phospholipase C (PLC) est activée, ce qui conduit à la libération et à l'afflux de Ca^{2+} (Magga *et al.*, 2006; Putula *et al.*, 2012)(Figure 21).

En résumé, la stimulation des flux calciques semble être une réponse centrale aux orexines mais plusieurs mécanismes sont probablement impliqués (libération de calcium dépendante de la PLC puis afflux intracellulaire médié par les NSCC, les VGCC ou éventuellement les NCX) (Kukkonen & Leonard, 2014).

Cette voie calcique se situe en amont de nombreuses autres voies de signalisation, telles que celles de la protéine kinase activée par un mitogène (MAPK), en particulier les kinases régulées par le signal extracellulaire (ERK), p38, l'adenylyl cyclase (AC) et la PLC. Des études ont montré que les orexines interagissent avec les OXR et induisent une activation transitoire de ERK 1/2 *via* la protéine Gq, de la PLC et de la PKC *via* Gs ou Gi, de l'AC, de la cascade AMP cyclique (AMPc) et de la protéine kinase A (PKA) *via* Gs. Elles peuvent également activer les voies p38 MAPK dépendant de Gi et Gs, l'AC et l'AMPc (Xu *et al.*, 2013; Kukkonen & Leonard, 2014). L'ensemble de ces voies est cependant très peu décrit en terme fonctionnel dans la littérature. En revanche, d'autres études ont montré que les kinases apparentées à la Src peuvent être activées par les dimères $\beta\gamma$ libres (Gentili *et al.*, 2006). Or, comme nous le verrons plus en détail dans la partie « Cancers et orexines », les OXR possèdent des séquences ITIM qui sont phosphorylées par la Src et qui permettent le recrutement et l'activation de la phosphotyrosine phosphatase SHP-2 (Voisin *et al.*, 2008).

De plus, les RCPG interagissent avec des protéines autres que les protéines G hétérotrimériques, en particulier la β -arrestine 1 (Evans *et al.*, 2001) et les chaînes légères de dynéine Tctex-type 1 (Dynlt1) qui régulent leur devenir après l'internalisation du récepteur (Duguay *et al.*, 2011).

IV. Récepteurs couplés aux protéines G neuropeptidergiques et cancers

Depuis plusieurs années des études se sont intéressées au RCPG dont les ligands sont des neuropeptides comme cibles potentielles dans la détection précoce et le traitement des cancers. En effet, les cellules cancéreuses surexpriment ou expriment de façon ectopique un grand nombre de RCPG. Par conséquent l'expression de ces récepteurs dans les cellules cancéreuses peut être utilisée en terme de marqueurs (Moody *et al.*, 2018). Les neuropeptides modulent l'activité neuronale dans le cerveau de façon paracrine, cependant, ils fonctionnent comme des facteurs de croissance autocrine dans les cancers (Moody *et al.*, 2015). Par exemple, les récepteurs de la neurotensine (NTS) interagissent avec Gq/11, ceux de la somatostatine (SST) avec Gi/0 et ceux du peptide vasoactif intestinal (VIP) avec Gs. NTS et VIP stimulent la croissance cellulaire des cellules du cancer à petites cellules du poumon alors que la SST va inhiber leur croissance (Moody *et al.*, 2015). Ces récepteurs neuropeptidergiques jouent un rôle important dans la prolifération, l'angiogénèse et les métastases cancéreuses (Moody *et al.*, 2018). Alors que les RCPG régulent de nombreux aspects de la tumorigénèse ainsi que de nombreuses voies de signalisation associées au cancer, seules quelques molécules visant à inhiber/activer les RCPG sont actuellement utilisées dans le traitement du cancer. Des analyses de nombreuses tumeurs humaines, à l'échelle du génome, ont révélé l'expression de nombreux RCPG dans de multiples cancers et pourraient constituer de nouvelles cibles thérapeutiques. Les traitements pharmacologiques ciblant les RCPG deviendront de plus en plus attractifs au fur et à mesure de l'émergence des données associant les RCPG au cancer. La compréhension de la machinerie moléculaire des RCPG dans le développement de tumeurs peut contribuer au développement de molécules spécifiques. En effet, les RCPG sont connus pour activer de multiples voies de signalisation initiées par la liaison du ligand. Il est donc souhaitable de concevoir des médicaments avec moins d'effets secondaires défavorables, en particulier en concevant un ligand biaisé qui aura une activité faible vis-à-vis d'une/des voies, mais une activité beaucoup plus forte vis-à-vis d'une voie directement impliquée dans son effet anti-tumoral. Le développement de telles molécules reste encore difficile et les mécanismes moléculaires qui leurs sont associés ne sont pas encore totalement compris. Il reste à déterminer si les modifications de la conformation du récepteur constituent la base de la signalisation par un agoniste biaisé (Bar-Shavit *et al.*, 2016).

System	Organ	Cell type	OXA	OXB
Digestive system	Colon	HCT-116	Induced autophagy (resistance to apoptosis), reduced cell viability, and promoted apoptosis; ¹¹ no significant effect ²	No significant effect ^{2,8}
		HT-29	Induced significant apoptosis ^{2,9} and inhibited cell growth ⁹	Induced significant apoptosis ^{2,9} and inhibited cell growth ⁹
		HT29-FU	Induced significant apoptosis ²	Induced significant apoptosis ²
		HT29-DR	Suppression of cell growth and induction of apoptosis ⁸	Suppression of cell growth and induction of apoptosis ⁸
		SW48	Induced significant apoptosis ²	Induced significant apoptosis ²
		SW620	Induced significant apoptosis ²	Induced significant apoptosis ²
		SW480	Induced significant apoptosis ²	Reduced cell production ⁸
		Caco-2	Induced significant apoptosis ²	Induced significant apoptosis ^{2,8}
		LoVo	Induced significant apoptosis ²	Reduced cell production ⁸
		Colo205	Induced significant apoptosis ²	Induced significant apoptosis ^{2,8}
		T84	Induced significant apoptosis ²	Induced significant apoptosis ²
		LS174T	Induced significant apoptosis ²	Induced significant apoptosis ²
		Xenograft LoVo tumor	Drastic reduction in tumor size ²	
	Xenograft HT29 tumor	Drastic reduction in tumor size ²		
	Xenograft HCT-116 tumor	No effect ²		
Stomach	BGC-823	Increased OX1R expression; 1.5-fold increase in cell proliferation and viability ¹²		
	SGC-7901	Stimulated cell proliferation and viability ¹³		
Liver	Hep3B	Increased glucose uptake ¹⁴		
Endocrine/ reproductive system	Prostate	LNCaP	Significantly decreased cell survival; ¹⁵ significantly reduced androgen receptor nuclear translocation in the presence of testosterone ¹⁵	
		DUI45	Increased cell growth in non-differentiated cells; ⁹ induced significant apoptosis in differentiated cells ⁹	Increased cell growth in non-differentiated cells; ⁹ induced significant apoptosis in differentiated cells ⁹
	Endometrium	ECC-1	No apoptosis effect ¹⁸	No apoptosis effect ¹⁸
		Ishikawa	No apoptosis effect ¹⁸	No apoptosis effect ¹⁸
		MFE-280	No apoptosis effect ¹⁸	No apoptosis effect ¹⁸
	Adrenal gland (cortex)	Clinical samples of adenomas	Increased basal cortisol levels; increased proliferation ⁷	No effect on basal cortisol levels; increased proliferation ⁷
		NCI-H295R	Increased cortisol secretion; ^{21,22} down-regulated OX2R mRNA; ²¹ increased OX1R mRNA; ²² enhanced cell proliferation ²²	
	Adrenal gland (medullary)	PC12	Decreased tyrosine hydroxylase ¹⁹	Decreased tyrosine hydroxylase ¹⁹
		Clinical samples of PC	Increased IP3, epinephrine and norepinephrine release ²⁰	Increased IP3, epinephrine, and norepinephrine release ²⁰
	Central nervous system	Brain	Rat glioma C6	Significantly decreased cell viability at a dose of 1 µM; IC ₅₀ of 4.7 nM ²³

Figure 22 : Effets biologiques des orexines dans les cellules cancéreuses

D'après Graybill et Weissig, 2017

V. Cancers et orexines

Lors de mon travail de thèse, je me suis intéressée plus particulièrement aux récepteurs des orexines, qui ont également pour ligands des neuropeptides.

Tout d'abord, la figure 22 fait un état des lieux des données récoltées dans la littérature sur les effets des orexines dans les cellules cancéreuses et de l'impact sur leur survie. Ces effets ont été plus particulièrement étudiés dans les cellules cancéreuses du système digestif, des systèmes reproducteurs, endocriniens et dans le cerveau (Graybill & Weissig, 2017).

A. Cancers du côlon

1. Effets biologiques

Des études sur les ARNm codant pour OX1R et sa mise en évidence par immunohistochimie montrent qu'OX1R est exprimé dans une grande majorité des lignées cellulaires cancéreuses du côlon telles que HT-29, SW48, SW640, SW480, Caco-2, LoVo, Colo205, T84, LS174T et également dans 38 échantillons cliniques de cancer du côlon (Voisin *et al.*, 2011). Parmi les lignées cellulaires cancéreuses du côlon testées, seule la lignée HCT-116 n'exprime pas OX1R (Rouet-Benzineb *et al.*, 2004; Voisin *et al.*, 2011). Étonnamment, il a été montré que le récepteur était également exprimé dans une lignée cellulaire cancéreuse du côlon, rendue résistante au traitement au 5-fluorouracile (5-FU), la lignée HT-29-FU et aussi dans dix métastases hépatiques provenant d'un cancer du côlon (Rouet-Benzineb *et al.*, 2004; Voisin *et al.*, 2011). Les cellules saines adjacentes à la tumeur n'expriment pas ce récepteur (Rouet-Benzineb *et al.*, 2004; Voisin *et al.*, 2011). Ce qui est particulièrement remarquable, c'est qu'en présence d'orexine A ou d'orexine B, les cellules exprimant OX1R meurent par apoptose. Ces résultats ont été aussi confirmés *in vivo*, sur des souris nude xénotreffées par HT-29, LoVo ou HCT-116, lesquelles sont traitées avec des injections intrapéritonéales pendant plus de 30 jours. La taille des tumeurs diminue fortement sur les tumeurs dérivées d'HT-29 et de LoVo aux doses effectives de 0,112, 1,12 et 11,2 $\mu\text{mol/kg}$ d'orexine A, mais aucune diminution n'a été observée sur HCT-116 (Rouet-Benzineb *et al.*, 2004; Voisin *et al.*, 2011).

Cependant, d'autres études ont montré que l'OxA diminuait la viabilité cellulaire et favorisait l'apoptose dans la lignée cellulaire cancéreuse du côlon HCT-116 (Wen *et al.*, 2016). En outre, l'autophagie, mécanisme cellulaire de résistance à la mort cellulaire, serait activé *via* la voie extracellulaire régulée par le signal (ERK) dans les cellules HCT-116 après traitement par l'OxA (Wen *et al.*, 2016).

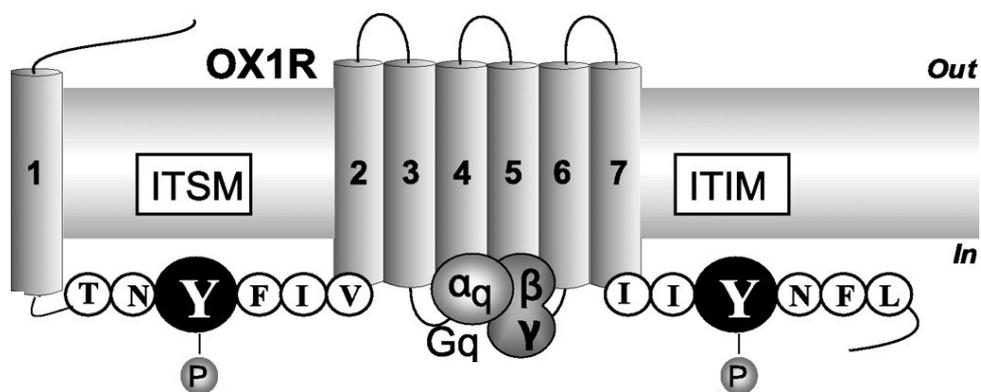


Figure 23 : Motifs ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motifs) et ITSM pour (immunoreceptor tyrosine-based switch motif)

D'après El firar, 2009.

2. Mécanismes

Comme il a été décrit précédemment, le récepteur OX1 est couplé à la protéine Gq dont l'activation induit une mobilisation transitoire du calcium intracellulaire (Voisin *et al.*, 2003). Plusieurs RCPG dans les cellules cancéreuses du côlon conduisent à la libération de calcium intracellulaire, ne déclenchent pas l'apoptose mais stimulent plutôt la prolifération cellulaire. C'est le cas des récepteurs muscariniques (Medina & Rivera, 2010), du récepteur à la neurotensine NT1 (Maoret *et al.*, 1999) et des récepteurs activés par des protéases (PAR 1/2/4) (Darmoul *et al.*, 2001, 2004; Gratio *et al.*, 2009). Inversement, il a été montré pour les récepteurs aux orexines que l'inhibition de l'augmentation intracellulaire d'IP₃, induisant une suppression de la mobilisation du calcium transitoire intracellulaire n'a aucun impact sur l'apoptose induite par OX1R (Voisin *et al.*, 2008). De plus, il a été montré que l'induction de l'apoptose par les orexines était une propriété intrinsèque d'OX1R. En effet, la transfection de l'ADNc codant pour le récepteur dans des cellules dépourvues d'OX1R endogène telles que les cellules ovariennes de hamster chinois CHO, montre que les orexines induisent l'apoptose *via* le récepteur recombinant (Rouet-Benzineb *et al.*, 2004; Ammoun *et al.*, 2006; El Firar *et al.*, 2009)

La séquence d'OX1R a donc été analysée pour identifier des motifs responsables de l'induction de l'apoptose. Deux motifs ont été identifiés comprenant des tyrosines phosphorylables dans la séquence d'OX1R (Voisin *et al.*, 2008; El Firar *et al.*, 2009).

Ce sont des motifs ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motifs) qui sont présents au niveau du domaine intracellulaire, le premier est situé entre la première boucle intracellulaire et la seconde hélice transmembranaire d'OX1R et le second relie la septième hélice transmembranaire à l'extrémité C-terminale du récepteur. Ces motifs sont définis par l'enchaînement (Thr/Ile/Val/Leu/Ser) -X-Tyr-XX- (Ile/Leu/Val). Ils sont caractéristiques des immunorécepteurs. Quand la séquence du motif possède une thréonine en première position, on peut également parler d'ITSM pour (Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Motif). Ce motif est présent entre la première boucle intracellulaire et la seconde hélice transmembranaire d'OX1R (El Firar *et al.*, 2009). Ces deux motifs seront phosphorylés sur leurs résidus tyrosines, et recruteront des protéines à domaine SH2 (Figure 23).

Lorsque les orexines activent OX1R, les motifs ITIM sont phosphorylés au niveau de leur tyrosines en position 83 et 358 (Voisin *et al.*, 2008; El Firar *et al.*, 2009). Cette phosphorylation nécessite le recrutement de la protéine Gq. En effet, l'orexine n'induit pas l'apoptose des cellules MEF (Mouse Embryonic Fibroblasts) transfectées avec l'ADNc codant pour OX1R (MEF-OX1R) déficientes en Gq. Mais l'orexine induit l'apoptose dans les cellules MEF-OX1R exprimant la protéine Gq (Voisin *et al.*, 2008). Lorsqu'OX1R est activé, la protéine Gq est dissociée en deux parties, la sous-unité α_q et le dimère $\beta\gamma$. Le dimère $\beta\gamma$ est connu pour activer

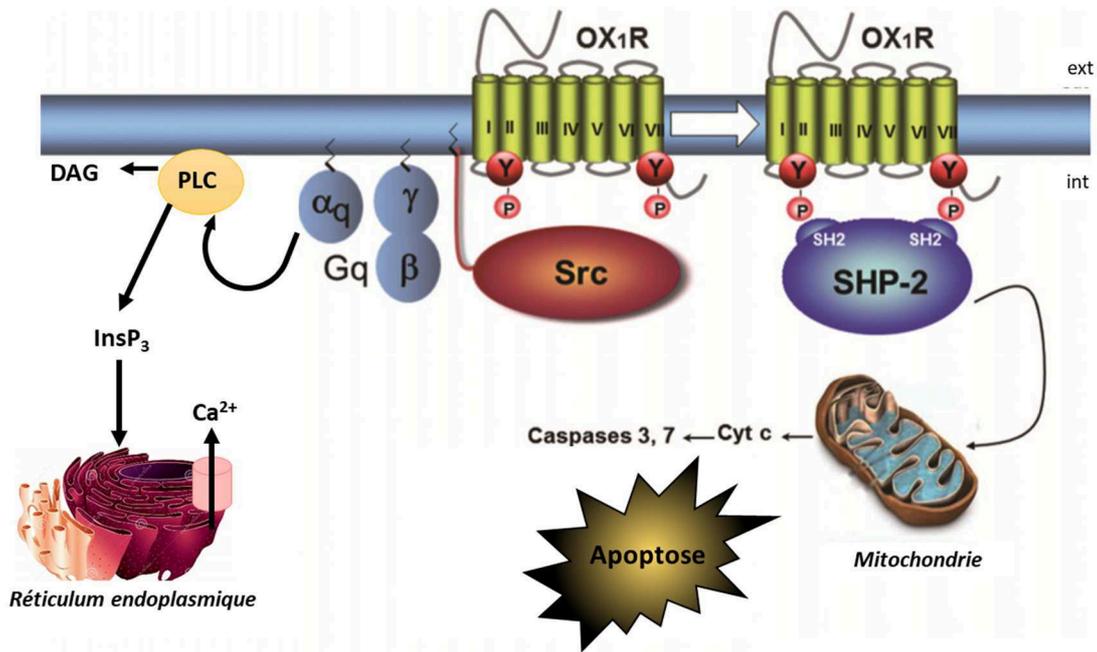


Figure 24 : Mécanisme de l'apoptose induit par OX1R

L'activation d'OX1R par les orexines favorise la dissociation de la protéine Gq en α_q et en dimère $\beta\gamma$. La voie classique entraînant l'activation de la phospholipase C par α_q n'est pas impliquée dans l'apoptose médiée par OX1R. Les dimères $\beta\gamma$ libérés stimulent la Src-tyrosine kinase, entraînant la phosphorylation des ITIM et ITSM d'OX1R. La phosphotyrosine phosphatase SHP-2 est ensuite recrutée et activée. SHP-2 activé est nécessaire pour l'apoptose mitochondriale médiée par le cytochrome c. PLC, phospholipase C; Cyt c, cytochrome c; DAG, diacylglycérol; SHP-2, phosphotyrosine phosphatase-2 contenant un domaine SH2. D'après Laburthe et Voisin, 2012.

des tyrosines kinases telles que Src (Gentili *et al.*, 2006). Ces kinases Src cytoplasmiques activées vont phosphoryler les tyrosines des séquences ITIM d'OX1R, cela a été démontré par les études utilisant un inhibiteur de Src : l'inhibiteur PP2 (Voisin *et al.*, 2008). La phosphorylation des deux motifs ITIM est cruciale ; la mutation d'une des deux tyrosines des sites ITIM abolie totalement l'apoptose induite par OX1R (El Firar *et al.*, 2009). Une fois la phosphorylation des tyrosines effectuée, le récepteur va recruter et activer une phosphotyrosine phosphatase SHP-2 (Voisin *et al.*, 2008; El Firar *et al.*, 2009). En effet, la phosphorylation des tyrosines présentes au niveau de ces motifs va permettre le recrutement de protéines à domaine SH2, telles que la SHP-2 (Lewis *et al.*, 2001; Shlapatska *et al.*, 2001). L'activation de SHP-2 représente un événement précoce dans l'initiation de l'apoptose et est obligatoire dans le processus d'apoptose induite par les orexines. Il faut bien noter que les ITIM fonctionnent en tandem dans les immunorécepteurs et que les phosphoprotéines phosphatases nécessitent que leurs deux domaines SH2 se lient aux ITIM adjacents séparés par un court peptide (Bruhns *et al.*, 2009). Dans la séquence primaire d'OX1R, les séquences ITIM sont éloignées l'une de l'autre. Un modèle structural d'OX1R a été développé montrant que la distance entre les deux tyrosines des séquences ITIM d'OX1R est compatible avec les sites de liaison SH2 de la protéine phosphatases SHP-2 (El Firar *et al.*, 2009). Après le recrutement et l'activation de la SHP-2, la voie de signalisation intracellulaire, qui semble être activée, passe par la MAP-Kinase (Mitogen-Activated Protein Kinase) P38 (Figure 24). En effet, l'utilisation de l'inhibiteur de P38, SB203580, montre que l'orexine n'induit plus l'apoptose dans les cellules CHO transfectées avec OX1R (Ammoun *et al.*, 2006). A la suite des observations faites sur la signalisation d'OX1R et par analogie au mécanisme d'apoptose dans les cellules immunitaires exprimant des ITIM, d'autres enzymes et/ou facteurs de transcription clés peuvent également être impliqués dans l'apoptose médiée par OX1R, par exemple, le transducteur de signal et activateur de la transcription 5 (STAT5), la kinase Akt et/ou ERK 1/2 (Akl *et al.*, 2007; Ramanjaneya *et al.*, 2008; Voisin *et al.*, 2008). A la suite de l'activation de la voie de signalisation d'OX1R, la libération du cytochrome C des mitochondries dans le cytosol est observée. Le cytochrome c cytosolique se lie à la protéine Apaf-1 (Apoptotic peptidase activating factor 1), entraînant une modification conformationnelle qui permet à plusieurs protéines Apaf-1 activées d'adopter une structure quaternaire en heptamère et de recruter ainsi des molécules de procaspase 9 inactives. Ce complexe appelé apoptosome, sert de plateforme d'activation à la procaspase 9 initiateur dans la voie intrinsèque de l'apoptose (Hu *et al.*, 2013). L'activation de la caspase 9 résulte du clivage autocatalytique de la procaspase 9 qui va permettre l'activation de la voie des caspases 3 et 7 (Rouet-Benzineb *et al.*, 2004).

B. Cancers du pancréas

Le rôle de l'OxA a été étudié dans l'adénocarcinome canalaire pancréatique (PDAC). Au sein de notre laboratoire, des analyses par immunohistochimie de l'expression du récepteur de l'orexine de type 1 (OX1R) ont été effectuées sur le pancréas humain normal, le PDAC et ses lésions intraépithéliales dysplasiques précurseurs, les PanINs.

L'OxA induit l'apoptose mitochondriale dans les lignées AsPC-1 *in vitro*, *in vivo* et *ex vivo*. L'ensemble de cette étude sera présenté dans la partie « Résultats » de ma thèse (Dayot *et al.*, 2018).

C. Cancers de la prostate

Des travaux ont montré que les récepteurs aux orexines étaient exprimés dans les cancers de la prostate chez l'homme (Alexandre *et al.*, 2014). Cependant, l'effet des orexines sur ces cancers reste contradictoire, principalement lié au fait que les modèles cellulaires utilisés lors de ces études expriment ou n'expriment pas les récepteurs aux orexines en fonction des laboratoires. En effet, pour Szyszka les lignées cellulaires de la prostate normale PrEC, PrsC, PrSmC et les lignées cellulaires de carcinome prostatique DU145, LNCaP et PC3 n'expriment pas les ARNm codant pour les OXR (Szyszka *et al.*, 2015). En revanche, Valiante a montré que LNCaP exprime les ARNm codant pour OX1R et que lors du traitement de ces cellules avec l'OxA, l'expression d'OX1R augmente alors que la croissance cellulaire diminue. De plus, il a montré que l'OxA avait un effet antagoniste sur la translocation des récepteurs aux androgènes chez LNCaP en présence de testostérone exogène (Valiante *et al.*, 2015). Or, la translocation des récepteurs aux androgènes peut promouvoir la progression d'une forme agressive de cancer, donc bloquer ce processus pourrait potentiellement compléter les traitements actuels du cancer. Des études récentes de notre groupe en collaboration avec D. Alexandre ont montré que la lignée DU-145 issue d'un carcinome prostatique indépendant des androgènes exprimait OX1R. L'analyse de cancers de la prostate de différents grades a montré que l'expression d'OX1R détectée par immunohistochimie augmentait avec la sévérité du grade (Alexandre *et al.*, 2014). Lorsque les cellules DU145 sont traitées avec de l'OxA ou de l'OxB, il y a une augmentation de la croissance cellulaire, alors que quand ces cellules subissent une différenciation neuroendocrine et qu'elles sont traitées avec de l'OxA, la voie apoptotique est déclenchée (Alexandre *et al.*, 2014). De plus, les études précliniques indiquent que les orexines sont capables d'inhiber la croissance de tumeurs issues de xénogreffes sous-cutanée de cellules DU-145 sur des souris nude.

D. **Cancers du cerveau**

Des études ont été menées sur un modèle expérimental tel que la lignée cellulaire C6 du rat, un cancer agressif du cerveau : le glioblastome multiforme. Ces dernières ont montré la présence des ARNm codant pour les OXR. Le traitement à 1 μ M d'OxA diminue significativement la viabilité cellulaire. Cependant, à des doses plus faibles correspondant au niveau physiologique, aucune diminution de la viabilité cellulaire n'a été observée (Biegańska *et al.*, 2012).

E. **Cancers du tissu nerveux**

Bader a montré qu'il n'y avait pas d'expression des ARNm codant pour OX1R dans la lignée cellulaire de neuroépithéliome SK-N-MC (Bader *et al.*, 2004). Or, Rouet-Benzineb a montré que ces mêmes cellules exprimaient OX1R et que le traitement par l'OxA ou l'OxB inhibait significativement la croissance cellulaire et induisait l'apoptose de cette lignée (Rouet-Benzineb *et al.*, 2004).

F. **Cancers gastriques**

L'expression des ARNm codant pour OX1R a été observée dans des lignées cellulaires des cancers gastriques, telles que BGC-823 et SGC-7901. Les ARNm codant pour OX2R ne sont, quant à eux, pas exprimés (Liu *et al.*, 2015; Wen *et al.*, 2015). Le traitement à l'OxA des cellules BGC-823 améliore la prolifération cellulaire et la survie *via* la voie de la protéine kinase B (ou Akt) (Wen *et al.*, 2015). Dans ces lignées cellulaires, il semblerait que le traitement à l'OxA entraînerait la surexpression d'OX1R. Des résultats similaires ont été observés chez SGC-7901. En effet, l'augmentation de la prolifération et de la viabilité cellulaires dépend de la voie ERK 1/2 lors du traitement à l'OxA (Liu *et al.*, 2015).

G. **Cancers gynécologiques**

1. Cancers de l'endomètre

Des analyses immunohistochimiques ont indiqué qu'OX1R était exprimé dans les cancers de l'endomètre mais pas OX2R. Cependant, OX2R est exprimé dans les tissus sains : ceci peut être dû à des modifications épigénétiques impliquées dans l'hyperméthylation lors de la progression du cancer. L'apoptose n'est pas déclenchée dans les lignées cellulaires du cancer de l'endomètre ECC-1, Ishikawa et MFE-280 lors du traitement à l'orexine A (Dehan *et al.*,

2013). Des études préliminaires effectuées au sein de notre laboratoire sur les lignées cellulaires de cancer de l'endomètre de haut grade (MFE-280) et de bas grade (Ishikawa) ont montré un effet de l'OxA sur la croissance cellulaire des cellules MFE-280. Une diminution de la viabilité cellulaire induite par OxA a été observée mais pas pour Ishikawa.

2. Cancers du col de l'utérus

Les analyses par immunohistochimie ont montré que OX1R et OX2R sont exprimés dans les cancers du col de l'utérus de différenciations faible, intermédiaire et élevée et dans les cas de cervicite (inflammation du col de l'utérus). OX2R est surexprimé dans 95% des échantillons cliniques de cancers mais dans seulement 50% des échantillons de cervicite. Aucun test supplémentaire n'a été effectué (Taximaimaiti *et al.*, 2016).

3. Cancers du sein

Des études préliminaires au sein du laboratoire ont été effectuées sur la lignée cellulaire du cancer du sein MDA-MB-231. Un immunomarquage d'OX1R très intense a été obtenu sur cette lignée cellulaire. Cependant, aucun effet biologique de l'OxA n'a été observé lors des expérimentations *in vitro*.

4. Cancers des ovaires

Au sein du laboratoire, des études préliminaires sur une lignée cellulaire de cancer des ovaires ont également été réalisées. La lignée cellulaire PEO1 a montré un immunomarquage intense d'OX1R. L'effet de l'OxA a donc été testé *in vitro* et une diminution de la viabilité cellulaire a été observée à 1µM.

H. **Cancer de la glande surrénale**

1. Le cortex surrénal

Le récepteur OX1R est exprimé dans le tissu sain du cortex surrénal mais pas OX2R. Les études de Wenzel sur des lignées cellulaires cancéreuses d'adénomes corticosurrénaux, NCI-H295R, ont montré une forte expression de l'ARNm codant pour OX2R. Après un traitement à l'OxA des cellules NCI-H295R, les niveaux de cortisol sont augmentés. De plus, les ARNm codant pour OX2R sont sous exprimés. Les ARNm codant pour OX1R sont

présents mais à un très faible taux (Wenzel *et al.*, 2009). En revanche, Chang a observé une expression des ARNm codant pour OX1R mais pas pour OX2R dans la lignée cellulaire NCI-H295R. De plus, leur expression est augmentée de manière significative lors des traitements à l'OxA (Chang *et al.*, 2014). Wenzel et Chang ont montré que l'OxA induisait la sécrétion de cortisol à partir de la lignée cellulaire NCI-H295R et induisaient également une augmentation de la prolifération cellulaire (Wenzel *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2014).

2. La médullosurrénale

Des études cliniques ont été réalisées sur des phéochromocytomes, tumeurs se développant à partir de la médullosurrénale et ont montré qu'OX2R est exprimé mais pas OX1R (Mazzocchi *et al.*, 2001; Blanco *et al.*, 2002). Les traitements à l'OxA et à l'OxB augmentent par trois la production d'IP₃ et augmentent la sécrétion d'épinéphrine et de noradrénaline (Mazzocchi *et al.*, 2001).

I. **Cancers du foie**

Des études par immunohistochimie et western blot ont montré la présence d'OX1R mais pas d'OX2R dans la lignée cellulaire cancéreuse de foie Hep3B. Ces données sont en concordance avec les résultats d'immunohistochimie observés sur des échantillons hépatocellulaires de patients, 28 tumeurs sur 41 expriment OX1R mais pas OX2R. De plus, il a été observé qu'en présence d'OxA, l'absorption dépendante de la concentration de glucose augmentait dans la lignée cellulaire Hep3B. Cette augmentation peut être promue par le passage du pyruvate dans le cycle de l'acide tricarboxylique et la phosphorylation oxydative au détriment de la glycolyse. Cependant aucun test n'a été effectué pour déterminer si l'OxA augmentait ou diminuait la viabilité cellulaire de cette lignée (Liu *et al.*, 2016).

Des études au sein de notre équipe ont montré que sur des modèles précliniques *in vivo*, l'OxA avait des effets antitumoraux.

J. **Cancers des cellules hématopoïétiques**

L'expression génétique a été étudiée sur des cellules hématopoïétiques CD34+ provenant de patients récemment diagnostiqués et non traités. L'expression d'OX1R et OX2R semble être supérieure de 1,8 à 2,2 fois à l'expression trouvée dans les tissus non cancéreux.

En résumé, l'effet des orexines a été majoritairement testé sur des lignées cellulaires lors d'expérimentations *in vitro*. Or, on sait pertinemment que ces modèles cellulaires sont

extrêmement sensibles aux conditions de culture incluant la composition du milieu de culture, le degré de confluence des cellules, le nombre de passages, etc... De ce fait, l'expression des récepteurs aux orexines et leur fonctionnalité au niveau de ces modèles peuvent être fortement impactées par ces conditions de culture, elles-mêmes fortement dépendantes des laboratoires dans lesquelles les études sont réalisés. De ce fait, des études sur des modèles *in vivo* et également sur des xénogreffes dérivées de patient (PDX) pourraient paraître bien plus pertinentes.

Objectifs de la thèse

Au sein de l'équipe où j'ai effectué ma thèse, il a été clairement montré que le système orexines/OX1R avait des propriétés anti-tumorales dans certains cancers dont le cancer du côlon (Voisin *et al.*, 2011). Il a été montré que l'OxA mais aussi l'OxB induisait une apoptose mitochondriale *via* OX1R. Ces résultats signifient que le système orexines/OX1R représente une cible potentielle dans le traitement du cancer du côlon.

C'est dans ce contexte que l'objectif de ma thèse s'est inscrit et a visé à définir :

- **Le rôle des orexines et en particulier de l'OxA sur l'adénocarcinome canalaire du pancréas (PDAC) chez l'Homme.** Ces travaux m'ont permis de montrer qu'OX1R était exprimé dans 96% des PDAC testés. De plus, j'ai montré qu'OX1R était exprimé précocement dans les lésions pré-cancéreuses (PanIN). J'ai démontré que la lignée cellulaire humaine dérivée d'un PDAC, la lignée AsPC-1 exprimait OX1R et que l'OxA était capable d'induire une apoptose mitochondriale comparable à celle observée dans les cancers du côlon (Voisin *et al.*, 2011). Enfin contre toute attente, j'ai montré que l'almorexant, un antagoniste de type DORA avait des propriétés antitumorales identique à l'OxA, l'agoniste naturel d'OX1R. Ces travaux ont fait l'objet d'un article en premier auteur (Dayot *et al.*, 2018).
- **Le rôle de l'almorexant au sein des adénocarcinomes coliques humains.** Pour cela j'ai utilisé des lignées cellulaires d'adénocarcinomes coliques humains, les lignées HT-29 et LoVo. De plus, en collaboration avec le groupe de B. Robert (CRCM, INSERM U1194, Montpellier), nous avons développé par une stratégie de « phage display », un anticorps agoniste mimant les effets de l'OxA sur les mêmes cellules cancéreuses. Ce travail fera l'objet d'une publication (article en préparation).
- **L'impact de l'orexine A sur la régulation de l'expression des récepteurs OX1 à la surface membranaire des cellules cancéreuses ou non.** J'ai donc étudié les phénomènes d'internalisation d'OX1R sous l'action d'OxA et son devenir intracellulaire par des approches de microscopie confocale et d'analyse d'images. Plusieurs marqueurs de vésicules associées à l'internalisation des protéines ont été utilisés. Bien entendu, à la vue des effets inattendus de l'almorexant, il me paraissait important d'étudier son impact sur ces phénomènes de régulation. Ce travail fera l'objet d'une publication (article en préparation).

Résultats expérimentaux

**Partie I : Démonstration *in vitro*, *in vivo* et *ex vivo* de
l'effet antitumoral de l'orexine A/hypocrétine 1 et de
l'almorexant dans l'adénocarcinome canalaire du
pancréas**

I. Préambule

Les orexines sont des neuropeptides hypothalamiques qui possèdent deux isoformes : A et B (OxA et OxB, respectivement). Elles vont interagir avec deux sous-types de récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), OX1R et OX2R. Une fois activés, ces deux récepteurs induisent la mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire *via* la protéine Gq. Notre équipe a démontré l'expression du récepteur OX1 dans des lignées cellulaires d'adénocarcinome humain du côlon ainsi que dans les tumeurs issues de patients alors qu'OX1R n'est pas exprimé dans le tissu sain. Le traitement de ces cellules cancéreuses par l'orexine (OxA ou OxB) entraîne une forte inhibition de la croissance cellulaire due à une entrée en apoptose mitochondriale *via* le recrutement de la protéine tyrosine phosphatase SHP2. Deux voies principales sont donc activées par OX1R, la voie canonique calcique ainsi que la voie de l'apoptose mitochondriale *via* la protéine SHP2.

L'adénocarcinome canalaire du pancréas (PDAC) est le deuxième cancer digestif en France. Les projections épidémiologiques montrent qu'il pourrait devenir la deuxième cause de mortalité par cancer en Europe d'ici à 2030. Le pronostic de survie de ce cancer est un des plus sombres. Dans ce contexte et vues nos précédentes observations, le système orexines/OX1R pourrait être une nouvelle cible thérapeutique pour ce type de cancer. Des études ont été menées *in vitro* et *ex vivo* sur des lignées cellulaires dérivées de PDAC et sur des coupes de tissu tumoral frais humain maintenues en culture ainsi qu'*in vivo* sur des souris nudes xénotreffées avec ces mêmes lignées cellulaires. Nous avons étudié le système orexine A/OX1R, c'est-à-dire son expression et ses effets au sein du tissu tumoral.

Comme mentionné dans l'introduction, l'orexine et ses récepteurs sont impliqués dans le cycle veille/sommeil. Par conséquent, les industries pharmaceutiques ont développé des molécules antagonistes d'OX1R et d'OX2R pour permettre de lutter contre les dérégulations du cycle veille/sommeil. Ces antagonistes inhibent la mobilisation du calcium intracellulaire. Ainsi, ces molécules vont nous permettre de disséquer au niveau pharmacologique la spécificité du système orexines/OX1R dans son effet antitumoral.

Nos études montrent qu'OX1R est exprimé au niveau de la lignée cellulaire de PDAC humain AsPC-1, ainsi que dans les tumeurs prélevées chez des patients. De plus, l'OxA est capable d'induire une apoptose mitochondriale dans cette lignée ainsi que sur des coupes tissulaires tumorales issues de patients maintenues en culture. De plus, l'OxA induit un effet antitumoral dans des modèles précliniques soit issus de la xénotrefe des cellules AsPC-1, soit de la xénotrefe de cellules issues de tumeurs prélevées chez les patients (Patient Derived Xenograft, PDX). Enfin contre toute attente, l'almorexant dont nous avons vérifié qu'il était bien antagoniste pour la voie canonique calcique, se comporte comme un agoniste de la voie

apoptotique *via* la protéine SHP2. Ces études démontrent que l'almorexant est donc un ligand biaisé du récepteur OX1R.

***In vitro*, *in vivo* and *ex vivo* demonstration of the antitumoral role of hypocretin-1/orexin-A and almorexant in pancreatic ductal adenocarcinoma**

Stéphanie Dayot^{1,*}, Daniela Speisky^{1,*}, Anne Couvelard^{1,2}, Pierre Bourgoin¹, Valérie Gratio¹, Jérôme Cros^{1,4}, Vinciane Rebours^{1,3}, Alain Sauvanet^{1,3}, Pierre Bedossa^{1,4}, Valérie Paradis^{1,4}, Philippe Ruzsiewicz^{1,3}, Alain Couvineau^{1,#} and Thierry Voisin^{1,#}

¹INSERM UMR1149 Centre de Recherche sur l'Inflammation (CRI), Université Paris-Diderot, Sorbonne Paris Cité, DHU UNITY, Faculté de Médecine Xavier Bichat, Huchard, 75018 Paris, France

²Département de Pathologie Beaujon-Bichat, AP-HP, Hôpital Bichat, Huchard, 75018 Paris, France

³Service de Pancréatologie-Gastroentérologie PMAD, Pôle des Maladies de l'Appareil Digestif, AP-HP, Hôpital Beaujon, 92118 Clichy, France

⁴Département de Pathologie Beaujon-Bichat, AP-HP, Hôpital Beaujon, 92118 Clichy, France

*These authors contributed equally to this work

#Shared last authors

Correspondence to: Thierry Voisin, **email:** thierry.voisin@inserm.fr

Alain Couvineau, **email:** alain.couvineau@inserm.fr

Keywords: pancreatic cancer; orexin receptor; GPCR; apoptosis; patient-derived xenograft

Received: July 29, 2017

Accepted: January 02, 2018

Published: January 09, 2018

Copyright: Dayot et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 3.0 (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is still the poorest prognostic tumor of the digestive system. We investigated the antitumoral role of orexin-A and almorexant in PDAC. We analyzed the orexin receptor type 1 (OX1R) expression by immunohistochemistry in human normal pancreas, PDAC and its precursor dysplastic intraepithelial lesions. We used PDAC-derived cell lines and fresh tissue slices to study the apoptotic role of hypocretin-1/orexin-A and almorexant *in vitro* and *ex vivo*. We analyzed *in vivo* the hypocretin-1/orexin-A and almorexant effect on tumor growth in mice xenografted with PDAC cell lines expressing, or not, OX1R. Ninety-six percent of PDAC expressed OX1R, while adjacent normal exocrine pancreas did not. OX1R was expressed in pre-cancerous lesions. *In vitro*, under hypocretin-1/orexin-A and almorexant, the OX1R-positive AsPC-1 cells underwent apoptosis, abolished by the tyrosine phosphatase SHP2 inhibitor, NSC-87877, whereas the OX1R-negative HPAF-II cell line did not. These effects were mediated by phosphorylation of OX1R and recruitment of SHP2. *Ex vivo*, caspase-3 positive tumor cells were significantly higher in fresh tumour slices treated 48h with hypocretin-1/orexin-A, as compared to control, whereas cellular proliferation, assessed by Ki-67 index, was not modified. *In vivo*, when AsPC-1 cells or patient-derived cells were xenografted in nude mice, hypocretin-1/orexin-A or almorexant, administrated both starting the day of cell line inoculation or after tumoral development, strongly slowed tumor growth. Hypocretin-1/orexin-A and almorexant induce, through OX1R, the inhibition of PDAC cellular growth by apoptosis. Hypocretins/orexins and almorexant might be powerful candidates for the treatment of PDAC.

INTRODUCTION

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is the eleventh most frequent cancer in the United States, accounting for 53,070 new cases per year, and it will stand as the second cause of cancer related-death by 2030 [1–4]. The low 5-year survival rate (about 7%) is due to highly invasive behavior with frequent non-resectability at initial diagnosis. Moreover this tumor is mainly drug-resistant to classic chemotherapeutic agents because of the association of a fibrotic, immunosuppressive, and hypoxic microenvironment with numerous tumor mutations that activate proto-oncogene expression, block tumor suppressor genes or interfere with apoptosis [5]. Thus far and despite intense efforts, optimal chemotherapeutic strategies have only slightly improved clinical outcome in patients with PDAC.

G-protein coupled receptors (GPCRs) belong to a large superfamily of cell surface signaling proteins involved in many pathophysiological processes [6]. Diverse GPCRs are overexpressed in tumor cells, and are involved in the initiation and/or progression of cancer by stimulating or inhibiting proliferation and/or apoptosis [7]. We have recently demonstrated the aberrant expression of the orexin receptor sub-type 1, OX1R, in primary colorectal tumors, whereas no expression could be found in normal colon [8].

Orexin-A and orexin-B [9], are two hypothalamic neuropeptides involved in the sleep/wake cycle and feeding behavior [10]. In this context, pharmaceutical industries have developed several orexin antagonists (Dual Orexin Receptors Antagonist or DORA) including almorexant and suvorexant in order to promote the sleep control. Recently, the U.S. Food & Drug Administration (FDA) approved the use of a reversible dual orexin receptor antagonist suvorexant, for the treatment of insomnia. Biological functions of orexins have been described in various peripheral tissues, but remain questionable [11–14]. The effects of orexins are mediated by two GPCR sub-types, OX1R and OX2R [9]. The activation of OX1R and OX2R by orexins led to the intracellular Ca^{2+} mobilization which was inhibited by orexin antagonists. In OX1R expressing cell lines, we have shown that OX1R triggers a robust mitochondrial apoptosis by an original mechanism [8, 15]. Activation of OX1R induces the tyrosine phosphorylation of 2 tyrosine-based motifs, ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif), of OX1R, which allow the recruitment of the phosphotyrosine phosphatase SHP-2 and the caspase-3 activation [16–18].

PDAC cells gain protection against the apoptotic mitochondrial pathway by overexpressing Bcl-family proteins (Bfl1, BCL-X_L, MCL-1) [19] or by blocking activation of caspases – e.g., by overexpressing caspase inhibitors (cIAP, XIAP1, survivin), epigenetic downregulation of pro-caspase gene expression or direct

caspase inhibition by cysteine nitrosylation [20, 21]. Novel strategies aim at the commitment of PDAC cells to undergo apoptosis efficiently in response to novel drugs. In this context, studying the role and expression of the proapoptotic orexin receptor OX1R in PDAC represents a promising approach. We showed that the receptor OX1R is not present in normal exocrine pancreas but is aberrantly expressed in almost all primary PDAC tested. We also investigated the ability of orexin-A to promote apoptosis: 1) *in vitro* studies by using PDAC cell lines as AsPC-1 cells; 2) *ex vivo* studies by using tissue culture derived from patients. We showed that orexin-A strongly reduced the development of tumors and reversed the growth of developed tumors in nude mice xenografted with human pancreas cancer cell line or patient-derived cells. Surprisingly, almorexant which is a Ca^{2+} pathway DORA antagonist, behaves as full apoptotic pathway agonist. These data indicate that OX1R, OxA and almorexant might be considered as novel candidates for PDAC therapy.

RESULTS

Aberrant OX1R expression in PDAC

Human PDAC in TMA

Seventy primary PDAC (70/73; 96%) expressed OX1R by immunohistochemistry, as shown in Figure 1A and 1B. OX1R expression was mainly cytoplasmic and membranous. Scores ranged from 90 to 300 (median: 188). Only three tumors did not show any immunoreactivity for OX1R (3/73; 4%). OX1R expression in PDAC was not correlated with patient age, gender, disease recurrence, disease-free survival, overall survival, tumor size, TNM stage, lymph node metastasis, or tumor differentiation (Table 1).

Human PanIN and normal pancreas

OX1R was expressed in 20/20 (100%) PanIN lesions. Its expression was higher in PanIN-3 as compared to PanIN-1/2 ($p < 0.005$; Figure 1C and 1D). In contrast, no OX1R immunodetection was observed in normal exocrine pancreas, including acinar and ductal cells; OX1R was restricted to islets in normal pancreas (Figure 1E and 1F).

OX1R expression in AsPC-1 cell line

As shown in Figure 2A, an amplified single specific 500 bp PCR product corresponding to OX1R transcript was detected in the AsPC-1 cell line. CHO cells expressing recombinant OX1R receptor were used as control. No OX1R transcript was detected in the SW 1990 and HPAF-II cancer cell lines. As shown in Figure 2A, no mRNA could be detected for the other orexin receptor subtype, OX2R, in any cell lines tested as compared to control recombinant CHO/OX2R cells.

These data are in full agreement with the immunostaining data for OX1R in AsPC-1 and HPAF-II cell lines included in cell-blocks: specific OX1R immunodetection was observed in AsPC-1 cell membranes whereas no OX1R expression could be seen in the HPAF-II cell line (Figure 2B)

Orexin-A effect *in vitro* cell line models

Orexin-A induced a drastic inhibition of cellular growth of AsPC-1 cells, associated with the induction of mitochondrial apoptosis, characterized by recruitment of the tyrosine phosphatase SHP-2 and followed by the activation of caspase-3. One μM orexin-A induced a strong increase of annexin-V positive AsPC-1 cells

($24.3\% \pm 1.4$) as compared to untreated cells ($3.8\% \pm 1.9$) (Figure 3A). In the presence of the specific SHP-2 inhibitor, NSC 87877, the orexin-A-induced apoptosis was totally abolished (Figure 3A), in agreement with the involvement of a SHP-2-dependent apoptosis signaling pathway. No significant difference was observed in the NSC 87877-treated AsPC-1 cells in the presence ($4.8\% \pm 0.5$) or absence of $1 \mu\text{M}$ orexin-A ($4.6\% \pm 0.9$). Moreover, $1 \mu\text{M}$ orexin-A induced the cleavage and activation of caspase-3, as seen by immunohistochemistry, whereas no activated caspase-3 was detected in untreated cells (Figure 3B). The quantification of the staining demonstrated that orexin-A induced a 4-fold increase in activated caspase-3 as compared to basal conditions (Figure 3C).

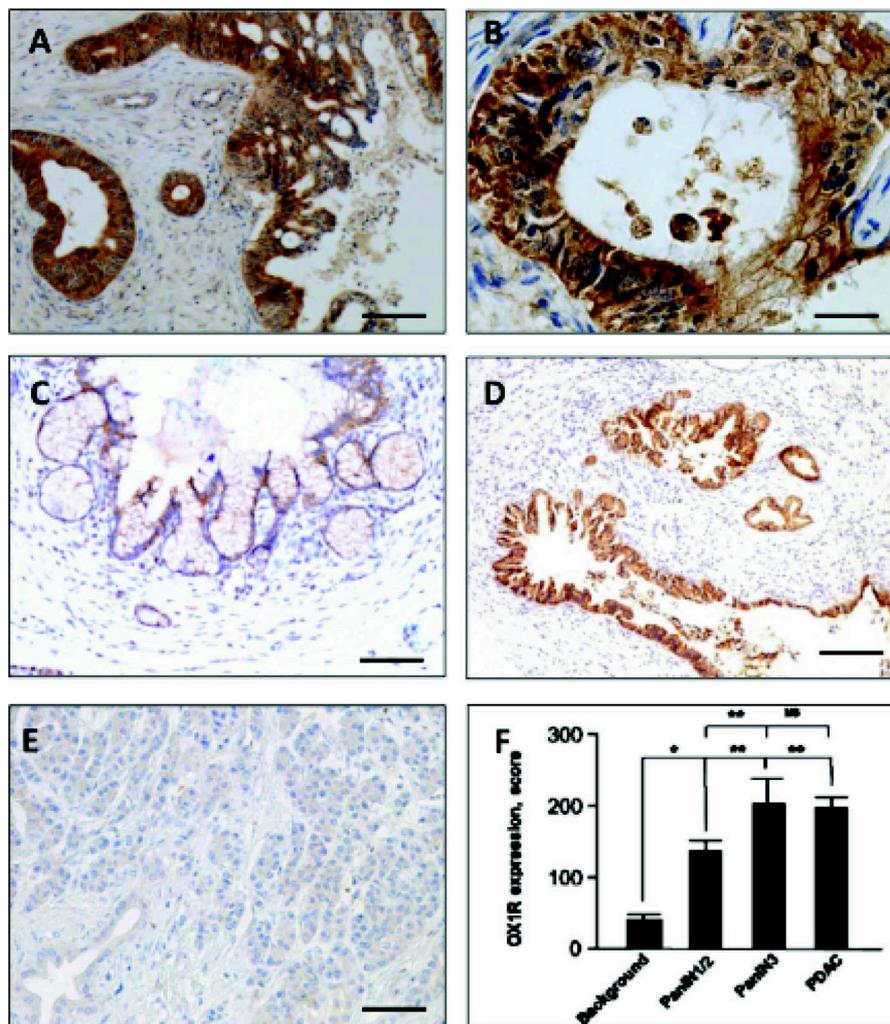


Figure 1: Immunohistochemical expression of the Orexin Receptor (OX1R) by PDAC (A and B), PanIN lesions (C and D) and normal pancreas (E) - OX1R is strongly expressed by tumor cells in PDAC, but is not detected in the surrounding stroma (A); at higher magnification, the staining is located to the membrane (arrows, B) and cytoplasm, and scored at 300 (intensity 3 on 100% of tumor cells, see “Materials and Methods”). OX1R was not detected in the normal duct and acinar cells. OX1R was faintly expressed in a PanIN-1/2 lesion (C) and strongly expressed in a PanIN-3 lesion (D). Bar = 200 μm for (A), 50 μm for (B), 120 μm for (C), 400 μm for (E). OX1R immunostaining is scored in panel (F). * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$ and ns, non-significant.

Table 1: Correlation of OX1R expression and main histopathological and clinical factors

	OX1R > median	OX1R < median	<i>p</i> value
T1 or T2	4	7	NS
T3	32	27	
NO	8	10	NS
N1	28	24	
Tumor size <30 mm	16	15	NS
Tumor size ≥30 mm	20	19	
Well-differentiated	19	17	NS
M or P differentiated	18	17	
Recurrence	29	24	NS
No recurrence	7	10	
Dead of disease	28	27	NS
Alive	8	7	

NO: no lymph node metastasis; N1: presence of lymph node metastasis; M or P: moderately or poorly.

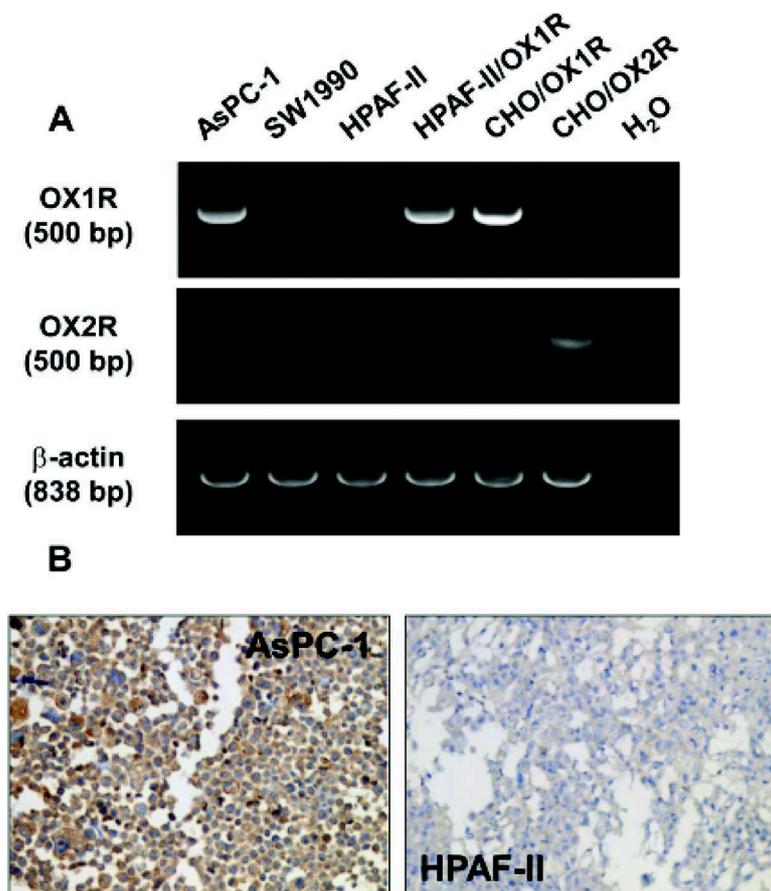


Figure 2: Expression of OX1R in PDCA cells – (A) shows RT-PCR analysis of OX1R (top panel) or OX2R (middle panel) mRNA from AsPC-1 cells, SW1990 cells, parental HPAF-II cell, HPAF-II cells expressing recombinant OX1R, CHO/OX1R cells, and CHO/OX2R cells. Controls are shown in the last lane (H₂O) in absence of DNA template. RT-PCR analysis of β-actin mRNA was used as control (bottom panel). (B) shows the immunostaining of OX1R in paraformaldehyde-fixed and paraffin-embedded section from pellets of AsPC-1 cells (left panel) and HPAF-II cells (right panel) cultured in standard medium in the presence of FCS.

In order to demonstrate the specific proapoptotic role of OX1R in PDAC, we expressed recombinant OX1R in HPAF-II cells, which do not express this receptor. In parental HPAF-II cells, treatment with 1 μ M orexin-A did not induce apoptosis (Figure 4A). Inversely, treatment of recombinant HPAF-II expressing OX1R cells with 1 μ M orexin-A resulted in the strong induction of cellular apoptosis as indicated by 17.8% \pm 2.4 annexin-V positive apoptotic cells (Figure 4A) compared to 2.1% \pm 0.4 in untransfected cells. In addition, NSC87877 totally abolished orexin-A-induced apoptosis in OX1R-expressing HPAF-II cells (Figure 4A), whereas this inhibitor had no effect on the parental cells. Similarly, orexin-A induced a strong caspase-3 activation in recombinant OX1R/HPAF-II cells while no activation was observed in the parental cells (Figure 4B). As previously demonstrated in colon cancer, orexin-A induced both OX1R phosphorylation and SHP2 recruitment by OX1R leading to apoptosis process [16]. After immunoprecipitation of SHP2/OX1R complex expressed in AsPC-1 cells, we observe that orexin-A promotes tyrosine phosphorylation of OX1R. However, in the presence of NSC87877 inhibitor, orexin-A was unable to stimulate tyrosine phosphorylation of receptor.

Inversely, in HPAF II cells which did not express OX1R, no tyrosine phosphorylation was observed in the presence of 1 μ M orexin-A (Figure 5).

These data strongly suggest that the mechanism involved in orexin-A-induced apoptosis in pancreatic cancer cells was similar in colon cancer cell lines as previously described [8, 16].

Orexin-A effect in preclinical models

AsPC-1 xenografts

Daily intraperitoneal injection of orexin-A (1 μ mol/kg) at day 0 in mice xenografted with AsPC-1 cells and up to the mice sacrifices resulted in a significant decrease in tumor volume (48.8%), as compared to untreated mice (Figure 6A). In addition, treatment with orexin-A started after AsPC-1 tumors were developed, 14 days after cell inoculation. Orexin-A (1 μ mol/kg), rapidly and strongly reduced the volume of established tumors (Figure 6A). After animal sacrifice, tumors were resected and weighted. No differences were observed in the weight of tumors from orexin-A treated mice at day 0 and orexin-A treated mice at

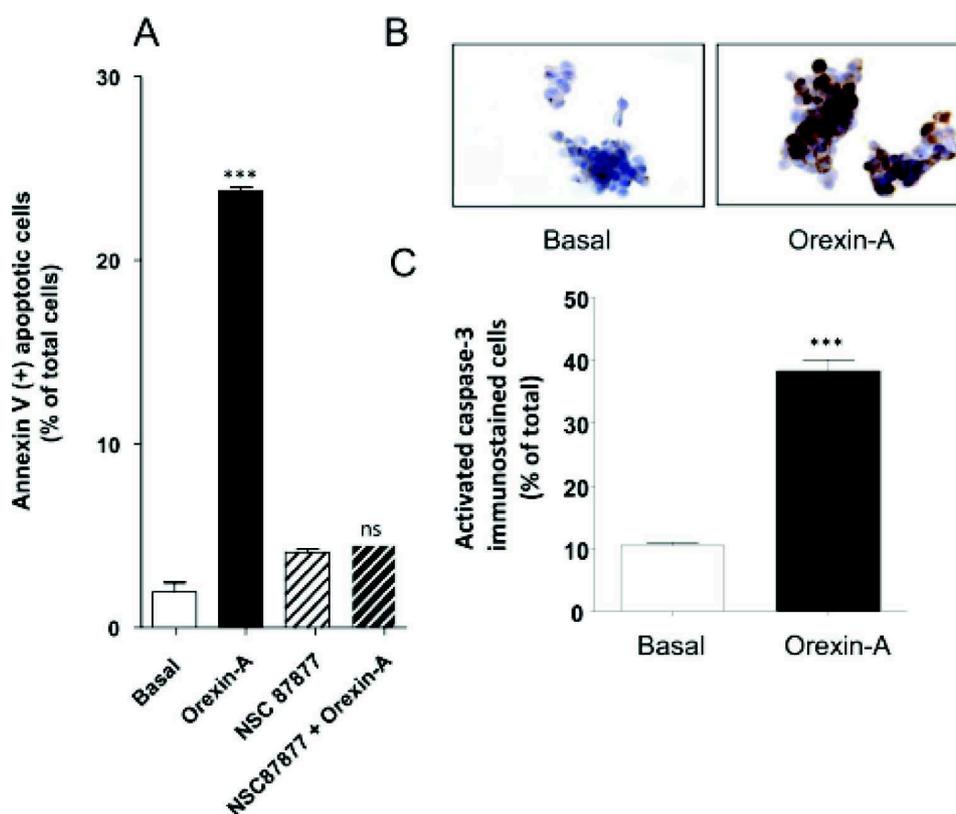


Figure 3: Effect of orexin-A on apoptosis in AsPC-1 cells - (A), SHP-2 protein tyrosine phosphatase inhibitor, NSC-87877, blocks orexin-induced apoptosis. AsPC-1 cells were challenged with (black bars) or without (white bars) 1 μ M orexin-A for 48 hr in the absence or presence of NSC-87877 (50 μ M). Apoptosis was measured by determination of annexin V-PE binding, and results are expressed as the percentage of apoptotic cells; (B) and (C). Indirect immunostaining of activated caspase-3 in AsPC-1 cells in the presence or absence of orexin-A. Paraformaldehyde-fixed AsPC-1 cells were challenged with (orexin-A) or without (basal) 1 μ M orexin-A for 48 hr. Activated caspase-3 immunostaining is shown in B and scored in C. Results are means \pm SE of three separate experiments. *** p < 0.001; ns, non-significant.

day 14 after cell inoculation (Figure 6A, insert). The effect of orexin-A on tumor volume was dose-dependent as a 30-day treatment with 0.01, 0.1, 1 and 10 μ moles orexin-A/kg decreased the tumor volumes by 34.4, 30.6, 46.7, and 52.8%, respectively (Figure 6B). These data correlated with tumor

weight (Figure 6B). Hematoxylin and eosin staining of resected tumors revealed the same glandular differentiation in both treated and non-treated tumors (Figure 6C, panels a and d). OX1R immunostaining level was not affected by orexin-A treatment, suggesting that OX1R expression is not

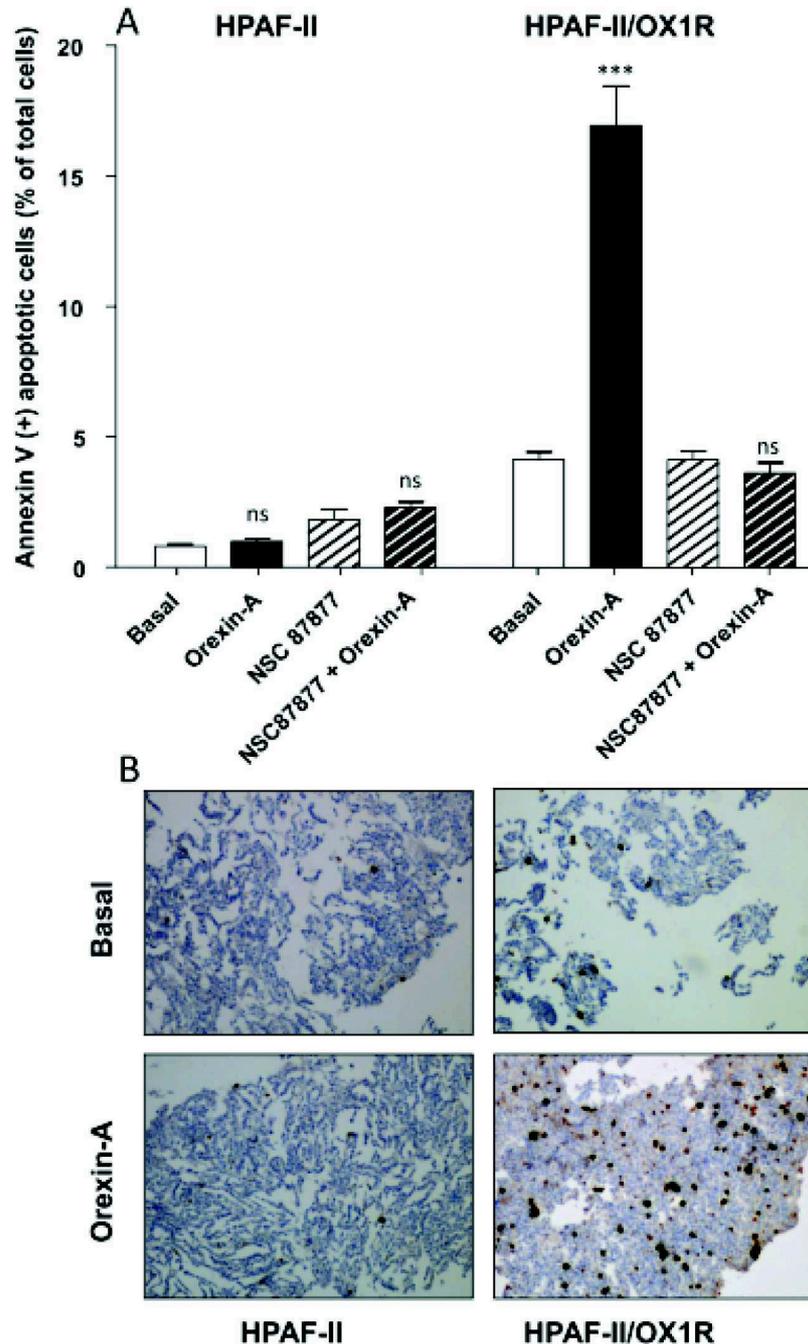


Figure 4: Effect of orexin-A on apoptosis in OX1R expressing recombinant OX1R/HPAF-II cells - (A), Parental HPAF-II and recombinant OX1R/HPAF-II cells were challenged with (black bars) or without (white bars) 1 μ M orexin-A for 48 hr in the absence or presence of the SHP-2 protein tyrosine phosphatase inhibitor, NSC-87877 (50 μ M). Apoptosis was measured by determination of annexin V-PE binding. Results are expressed as the percentage of apoptotic cells, and are the means \pm SE of three separate experiments. *** p < 0.001; ns, non-significant; (B), Paraformaldehyde-fixed HPAF-II cells and recombinant OX1R/HPAF-II cells were challenged with or without (Basal) 1 μ M orexin-A for 48 hr. Indirect immunostaining of activated caspase-3 in parental HPAF-II cells (left panels) and recombinant OX1R/HPAF-II cells (right panels) in the presence (bottom panels) or absence (top panels) of orexin-A is illustrated in B.

altered by chronic orexin-A treatment (Figure 6C, panels b and e). Furthermore, weak and intense staining of activated caspase-3 was observed in control (Figure 6C, panel c) and orexin-A treated (Figure 6C, panel f) mice, respectively.

Patient-derived xenografts

In an effort to develop more reliable preclinical models, we have established a subcutaneous patient-derived xenograft (PDX) model. We have isolated cancerous cells from a human PDAC freshly resected. PDX cells were verified by the expression of OX1R (data not shown) and xenografted in mice. Daily intraperitoneal injection of orexin-A (1 $\mu\text{mol/kg}$) at day 0 in mice xenografted with PDX cells and up to the mice sacrifices resulted in a significant decrease in tumor volume (80%), as compared to untreated mice (Figure 7). In addition, treatment with orexin-A started after PDX tumors were developed, 40 days after cell inoculation. Orexin-A (1 $\mu\text{mol/kg}$), rapidly and strongly reduced the volume of established tumors (Figure 7).

HPAF-II xenografts

As mentioned above, we demonstrated the specific inhibitory effect of OX1R on tumor growth in HPAF-II/OX1R xenografted in nude mice (Supplementary Figure 1). Daily treatment with 1 μmol orexin-A/kg of mice xenografted with parental HPAF-II cells was unable to promote tumor growth inhibition. When mice were xenografted with recombinant HPAF-II/OX1R this treatment induced 65% inhibition of tumor development. Xenografted nude mice treated with orexin-A after 14

days of tumor growth showed significant reduction in tumor volumes. Orexin-A treatment promoted a 3.5-fold caspase-3 expression by immunohistochemistry in tumors from recombinant HPAF-II/OX1R xenografted nude mice as compared to tumors from parental HPAF-II cells.

Orexin-A effect in tumor explant models

Significant OX1R immunostaining was observed in PDAC slices as compared to normal exocrine pancreas (score 227 vs 40; $p < 0.0001$) (Figure 8A). We observed, in slices treated by orexin-A, an increase of activated caspase-3 immunostaining in tumor cells as compared to the control slices without orexin-A treatment (Figure 8B and 8F and Table 2). Moreover, orexin-A treatment did not impact the cell proliferation (Figure 8C), neither ERK/MAPK and mTor signaling pathway (Figure 8D) nor surviving expression (Figure 8E). Taken all together, these results demonstrate that the OX1R/orexin-A pathway plays a crucial role in tumor growth inhibition.

The Ca^{2+} pathway orexin receptors antagonist, almorexant acts also as an anti-tumoral agent

The pharmacology of orexin/orexin receptors had widely developed in orexin-regulation of sleep background [22]. Recently, several orexin antagonists including almorexant and suvorexant had been described in order to control insomnia. In the present work, we have investigated the impact of almorexant and suvorexant, on their abilities to promote pro-apoptotic and anti-tumoral effects. As expected, suvorexant and almorexant totally blocked the intracellular Ca^{2+} signal pathway. Indeed, incubation

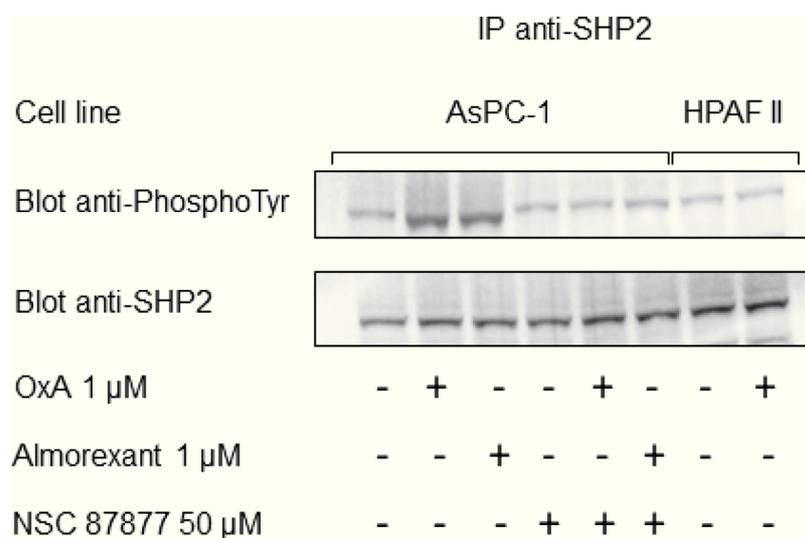


Figure 5: Orexin-A and almorexant promote tyrosine phosphorylation of SHP2/OX1R complex. AsPC-1 cells preincubated or not with the SHP2 inhibitor NSC-87877 (50 μM) were challenged for 5 min without or with 1 μM orexin-A or 1 μM almorexant. In parallel, HPAF-II cells were also challenged for 5 min without or with 1 μM orexin-A. After cell lysis, anti-SHP2 antibodies were used to obtain anti-SHP2 immunoprecipitates (IP) from 500 μg of lysate protein. Western blot analysis was then performed using the antibodies anti-PhosphoTyrosine and anti-SHP2.

of 1 μM OxA with HEK-OX1R cells which expressed recombinant OX1R led to a massive increase of cytosolic Ca^{2+} mobilization (Figure 9A). In contrast, when HEK-OX1R cells were incubated with 1 μM OxA and 10 μM suvorexant or almorexant, the Ca^{2+} mobilization was totally inhibited (Figure 9A). Surprisingly, 1 μM of suvorexant or almorexant inhibited the cellular growth of AsPC-1 cells

(Figure 9B). However, almorexant is more potent than suvorexant in the AsPC-1 cell growth inhibition. Moreover, 1 μM almorexant presents the similar effect than 1 μM orexin-A inducing $37 \pm 4\%$ and $36 \pm 4\%$ cell death, respectively (Figure 9B). based on these observations, only almorexant will be used in next experiments. Almorexant-induced cell growth inhibition was totally

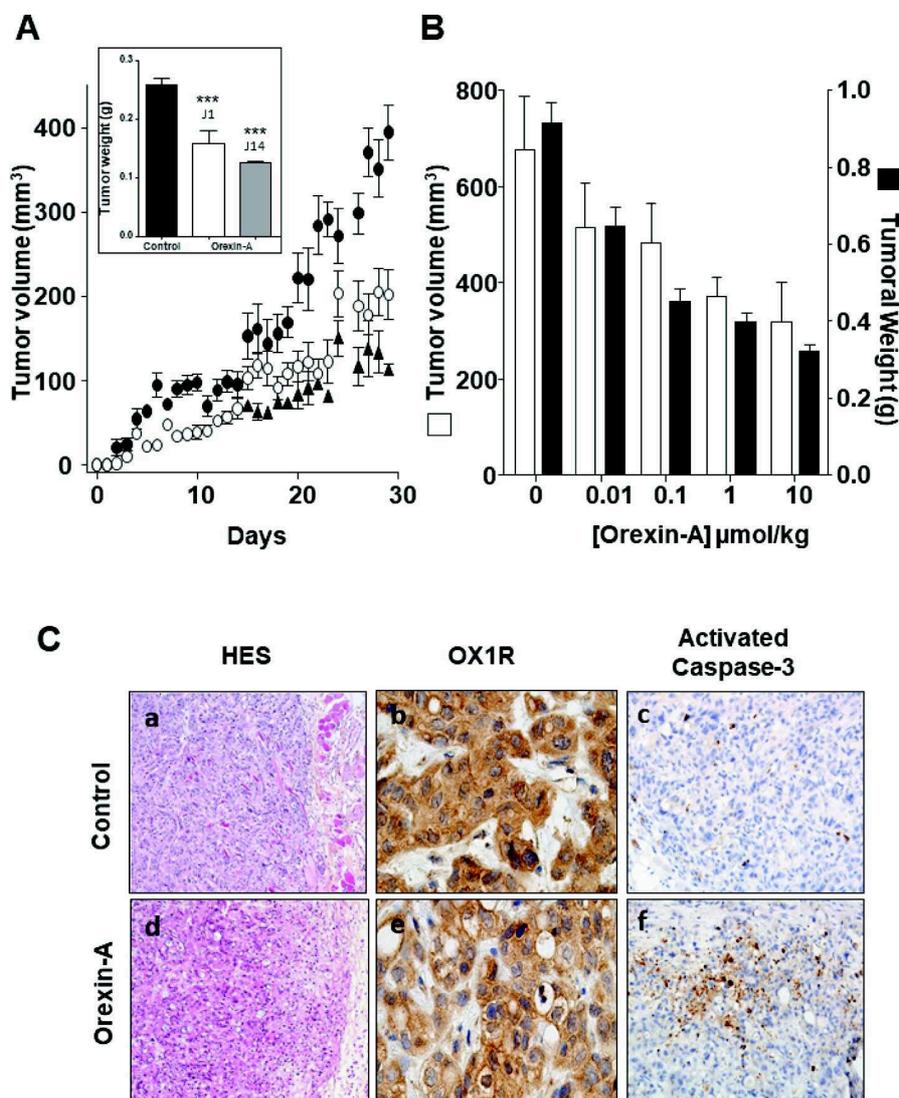


Figure 6: Effect of daily inoculation of orexin-A on the growth of tumors developed by xenografting human PDCA cells in nude mice - AsPC-1 cells were inoculated in the flank of nude mice at day 0. Mice were injected daily intraperitoneally with 100 μl of orexin-A solutions starting at day 0 (O) or day 14 (\blacktriangle) or with 100 μl of PBS (\bullet) for controls. (A) The daily treatment corresponded to 1 μmoles of orexin-A/Kg. Inset represents the tumor weight measured at the end of the experiment after the mice were sacrificed; (B) Mice received 0.01, 0.1, 1 or 10 μmoles of orexin-A/Kg. After 30 days of treatment, mice were sacrificed and tumor volume and weight were then recorded. The development of tumors was followed by caliper measurement. Data are the means \pm SE of 6 tumors in each group. $*p < 0.001$ versus control. Indirect immunostaining of activated caspase-3 in xenografted AsPC-1 tumors resected from nude mice (C) Paraformaldehyde-fixed xenografted AsPC-1 tumors from nude mice treated daily (panels d, e and f) by intraperitoneal injections with 1 μmoles /Kg orexin-A or not (panels a, b and c). After necropsy, tumors were resected. Formalin-fixed paraffin-embedded tumours were cut in 3 μm sections, which were either stained with hematoxylin-eosin or used for immunohistochemistry. Orexin-A induced tumoral cell death (panel d), as detected by Hemalum Eosin Safran (HES) staining, which correlated with apoptosis induction assessed by strong immunostaining of activated caspase-3 after 30 days of orexin-A treatment; (panel f). OX1R immunostaining localisation was similar under control and orexin-A treatment conditions.**

abolished by NSC-87877 cell pre-treatment (Figure 9B). This effect was associated to almorexant-induced apoptosis, as shown in Figure 8C almorexant stimulates caspase-3 activity in AsPC-1 cells similarly to orexin-A-induced caspase-3 activation (Figure 9C). As expected, cells pretreatment with NSC87877 inhibitor totally reversed this effect induced by almorexant and orexin-A (Figure 9C). Moreover, almorexant induced tyrosine phosphorylation of OX1R after immunoprecipitation of SHP2/OX1R complex in AsPC-1 cells. Almorexant-induced tyrosine phosphorylation of OX1R was totally inhibited in the presence of NSC87877 inhibitor (Figure 5). These data demonstrated that almorexant was able to induce apoptosis in pancreas cancer cells.

In this context, *in vivo* studies in preclinical model were investigated. Daily intraperitoneal injection of almorexant (1.8 $\mu\text{mol/kg}$) at day 0 in mice xenografted with AsPC-1 cells and up to the mice sacrifices resulted in a significant decrease in tumor volume (> 50%), as compared to untreated mice (Figure 10A). It should be noted that almorexant and orexin-A anti-tumoral effect were similar (Figure 6A and 10A). In addition, treatment with almorexant started after AsPC-1 tumors were developed, rapidly and strongly reduced the volume of established tumors (Figure 10A). OX1R expression

revealed by immunodetection was not affected by almorexant treatment (Figure 10B).

DISCUSSION

We reported that OX1R is aberrantly expressed in 96% of PDAC and 100% of PanIN, but not in normal acini and ducts adjacent to PDAC tissue although OX1R was expressed in islets. Orexin-A was able to promote apoptosis: 1) *in vitro*, in the PDAC cell line, AsPC-1; 2) *ex vivo*, in tissue culture derived from patients. Furthermore, orexins strongly reduce the development of tumors in nude mice xenografted with human PDAC cells derived from cell line or PDX.

It is well known that PDAC are highly malignant neoplasms characterized by their poor prognosis and weak response to treatments [23]. In this regard, the expression of OX1R in primary PDAC tumors represents an essential element for new therapies as demonstrated previously in colon cancer by our group. [24, 25]. Because apoptosis is a highly controlled process regulated by different cellular signaling events, proapoptotic drugs are currently considered as attractive candidates in anticancer targeted therapies [26, 27]. In the present work, we have demonstrated that the proapoptotic activity of OX1R

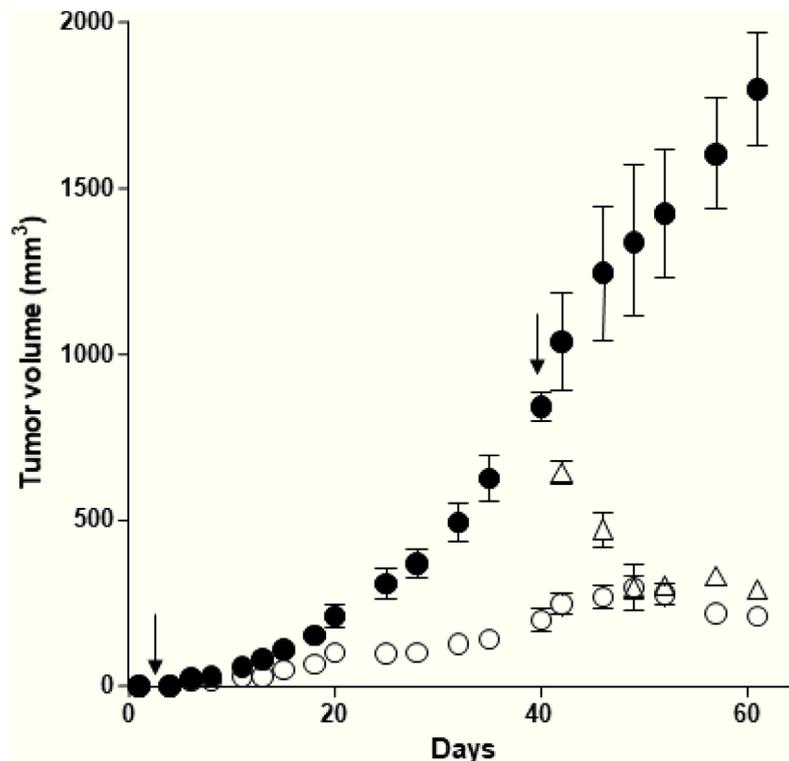


Figure 7: Effect of orexin-A inoculation on the growth of tumors developed by xenografting OX1R expressing pancreas cancer PDX cells in nude mice - PDX cells were inoculated (10^6 cells per xenograft) in the flank of nude mice at day 0. Mice were injected (2 times/week) intraperitoneally with 100 μl of 1 μmoles of orexin-A/Kg solutions starting at day 1 (○) or day 40 (Δ) or with 100 μl of PBS (●) for controls. The development of tumors was followed by caliper measurement. Data are the means \pm SE of 6 tumors in each group; * $p < 0.01$ versus control.**

correlates well with inhibition of cell growth in AsPC-1 pancreatic cell lines treated with orexin-A. The expression of recombinant OX1R in a given cell line (HPAF-II) is sufficient to promote orexin-mediated apoptosis, highlighting the intrinsic property of the orexin receptor [15, 17]. The proapoptotic properties of OX1R are mediated through recruitment of the tyrosine phosphatase SHP-2 [14, 16, 17]. In our work, in the presence of NSC-87877, a potent inhibitor of SHP-2, the proapoptotic action of orexin-A was significantly reversed, confirming

that SHP-2 activity is an essential step in OX1R-mediated apoptosis in PDAC.

Ex vivo experiments demonstrated that orexin-A was able to activate caspase-3 in cultured tumor tissue removed from several patients showing the potential impact in the clinical setting. In contrast, orexin-A has no effect on the expression of proliferation marker, Ki67, confirming that orexin has no anti-proliferative properties [15].

In vivo experiments showed that orexin-A slows AsPC-1 tumor growth in a dose-dependent manner between 0.01 and 10 μ Moles/kg. In addition, orexin-A was

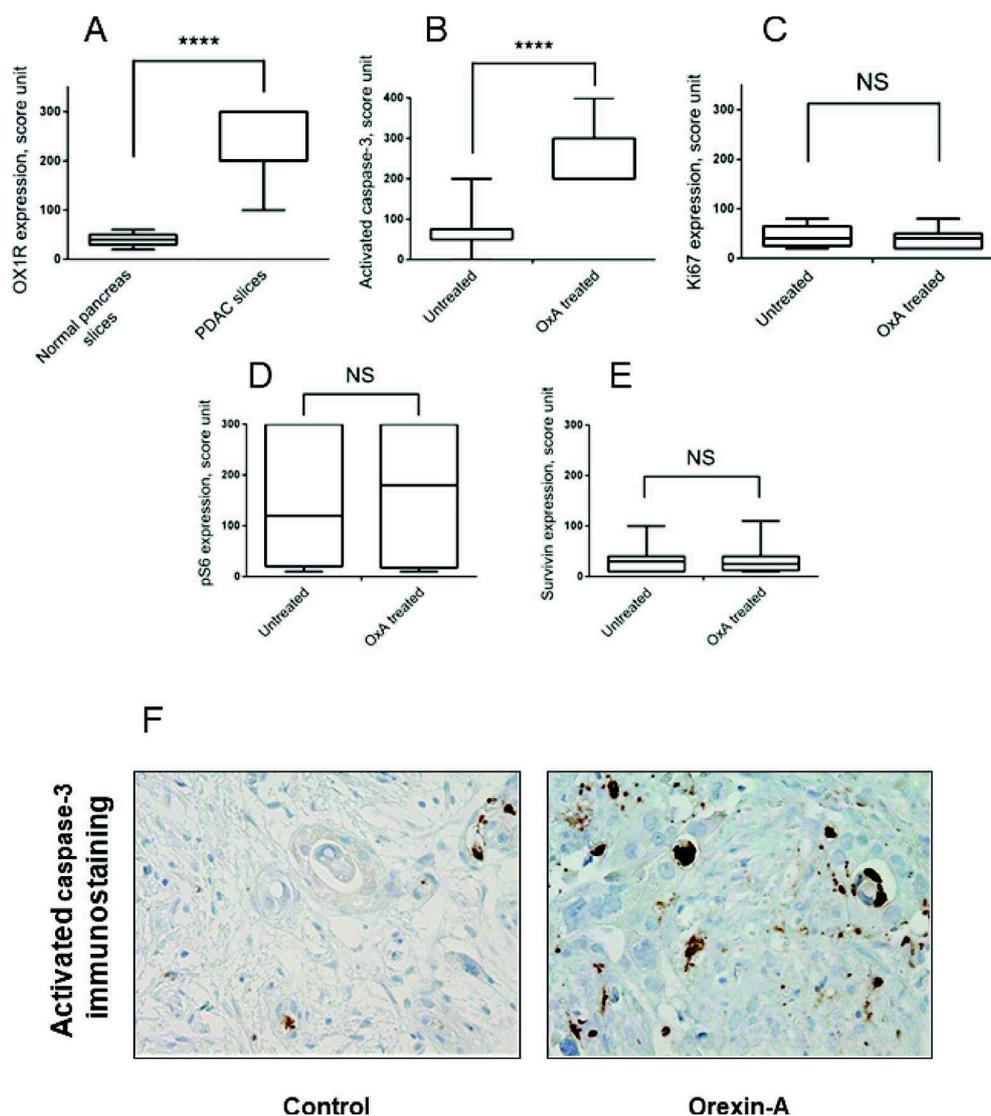


Figure 8: Effect of orexin-A on whole tumor tissue samples from patients with PDAC. Panel A shows the score of OX1R expression in PDAC slices as compared to normal pancreas slices analysed by IHC. $***p < 0.0001$ versus normal pancreas. The slice were treated for 24 hours with or without 1 μ M orexin-A in triplicates and fixed overnight in formalin and then embedded in paraffin. Serial 3 μ m thick sections were cut from the slices, stained by H&E or used for immunohistochemical staining to assess activated caspase-3 (B), Ki67 (C), pS6 (D) or surviving (E). Tissue quality was assessed by a pathologist (AC). If tissue integrity was not maintained over time (>20% necrosis induction), tissues were discarded. Graphs display protein expression scoring of the IHC analysis of samples from 11 PDAC patients treated *ex vivo* with orexin-A were represented in panels B, C, D and E. $***p < 0.001$ versus untreated, NS, no significant. Panel F represents a pancreatic ductal carcinoma after 24 h of slice culture with (orexin-A, panel right) or without 1 μ M orexin-A (control, left).

Table 2: OX1R expression and effect of orexin-A on whole tumor tissue samples from patients with PDAC

	Normal pancreas slices	PDAC slices	<i>p</i> value
OX1R expression	40 ± 5	227 ± 23	0.0001

	Untreated	OxA treated	<i>p</i> value
Activated caspase 3	67 ± 19	267 ± 24	0.0001
Ki67 expression	44 ± 8	40 ± 8	0.6912
pS6 expression	154 ± 53	165 ± 61	0.9115
Survivin expression	33 ± 9	35 ± 12	0.8964

OX1R expression, activated caspase-3, Ki67, pS6 and survivin immunostaining are scored. Results are the means ± SE of 11 independent patients.

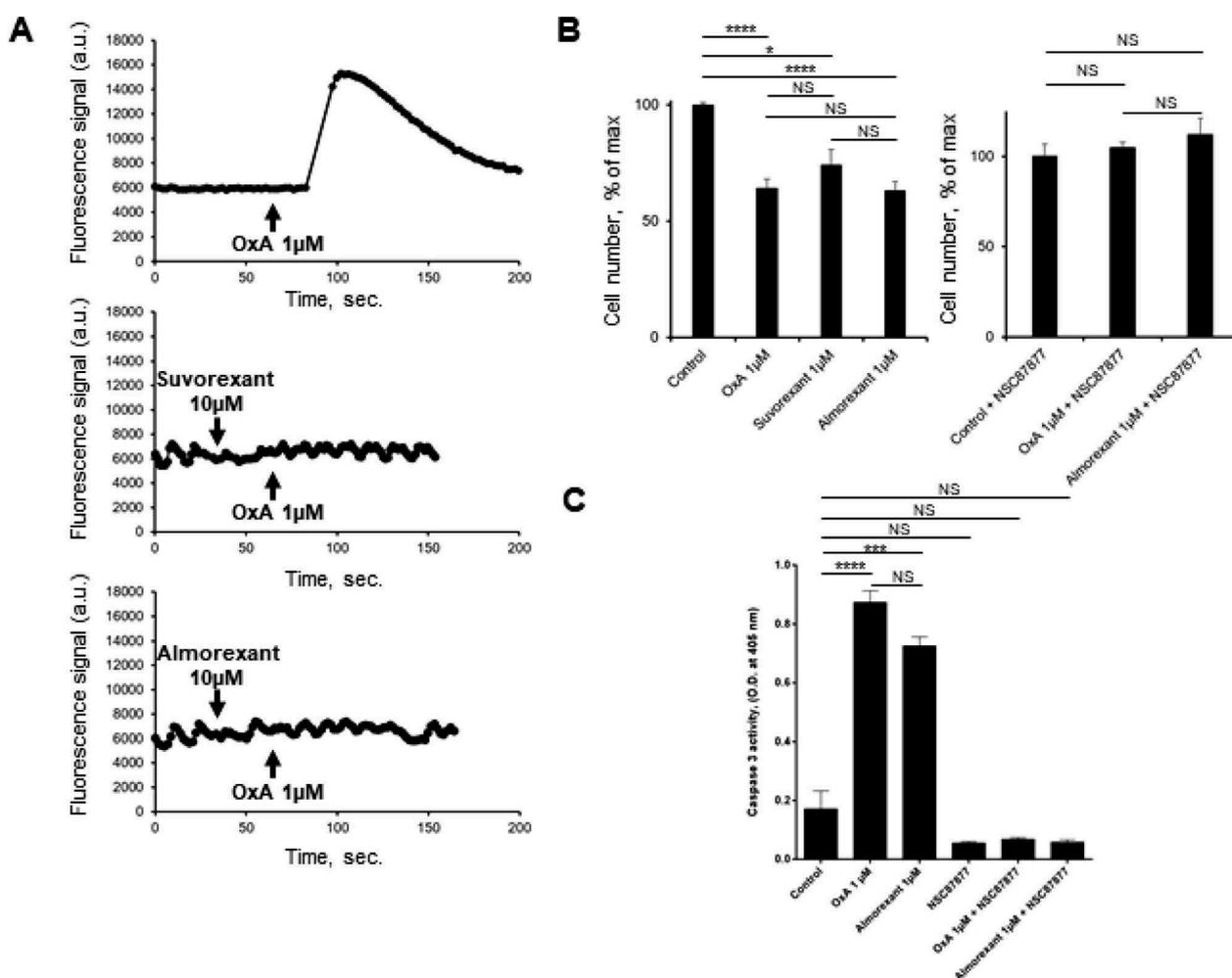


Figure 9: Effect of almorexant and suvorexant on intracellular Ca²⁺ release, cell growth and caspase-3 activity. (A) Intracellular Ca²⁺ production was detected in HEK-293 cells expressing recombinant native OX1R using FluoForte Calcium Assay Kit (Enzo Life Sciences, NY, USA). Cells were challenged with 1 µM of OxA (top panel) or 1 µM OxA after preincubation with 10 µM suvorexant (middle panel) or 10 µM almorexant (bottom panel). (B) AsPC-1 cells were incubated for 48 h with OxA or almorexant or suvorexant in the presence (right panel) or in the absence (left panel) of 50 µM NSC87877. (C) colorimetric Caspase-3 activity detection at 405 nm in AsPC-1 cells incubated with 1 µM OxA or 1 µM almorexant in the presence or in the absence of 50 µM NSC87877. **p* < 0.05, ****p* < 0.001, *****p* < 0.0001 and NS, no significant.

able to decrease tumor volume from tumors established 14 days prior (see Figure 6). Moreover, orexin-A slows PDX tumor growth and was able to decrease tumor volume from tumors established 40 days prior (see Figure 7). It is well known that the trafficking of various GPCRs differs depending on the time and concentration of exposure to ligands [27]. After a prolonged or repeated interaction with agonists, the total number of cell surface receptors can decrease by downregulation [28–30]. Nevertheless, OX1R expression in xenografted tumors was not altered by orexin treatment, suggesting that the receptor is not downregulated by the presence of its ligand.

Based on the success of the somatostatin receptor in targeting neuroendocrine tumors, novel tracers for peptide receptors such as analogs for prostate and breast cancers or for neo-angiogenesis labeling, are currently emerging [31]. Considering that OX1R is widely expressed in PDAC, has high affinity for orexins, and is not expressed in non-tumoral tissues, the development of isotopic orexin probes that could be used for the detection of precancerous PanIN lesions or micro-metastases by medical imaging should be tested in the future.

Actually, it is well known that a lot GPCR specific ligands were able to activate independently different signaling pathways [32]. These ligands also termed ligand-biased could stabilize different conformations of

GPCR leading to promote various signaling pathways [32, 33]. An increasing number of studies described several non-peptidic chemical OX1R antagonists belonging to SORA (Single Orexin Receptors antagonist) and DORA species [22]. These molecules had been developed to inhibit the canonic intracellular calcium mobilization pathway related to the regulation by orexins of sleep control [22]. Suvorexant is the first agent to be approved in this new class of medication [22] and gained US Food and Drug Administration (FDA). In the present paper, we demonstrated that DORA such as suvorexant and more specifically, almorexant which are, as expected, full calcium pathway antagonists but are surprisingly, full proapoptotic pathway agonists suggesting that these molecules belong to ligand-biased family. Structure-function relationship analysis by ala-scanning of orexin-B have demonstrated that some residues of the peptide were able to discriminate between calcium and proapoptotic pathways [34]. Similarly, almorexant which bind to OX1R with the same affinity than orexin-A could distinguish these two signaling pathways suggesting the existence of two independent molecular activation processes in OX1R receptor. These observations indicate that OX1R antagonists which are used in insomnia treatment could be used in PDAC therapy.

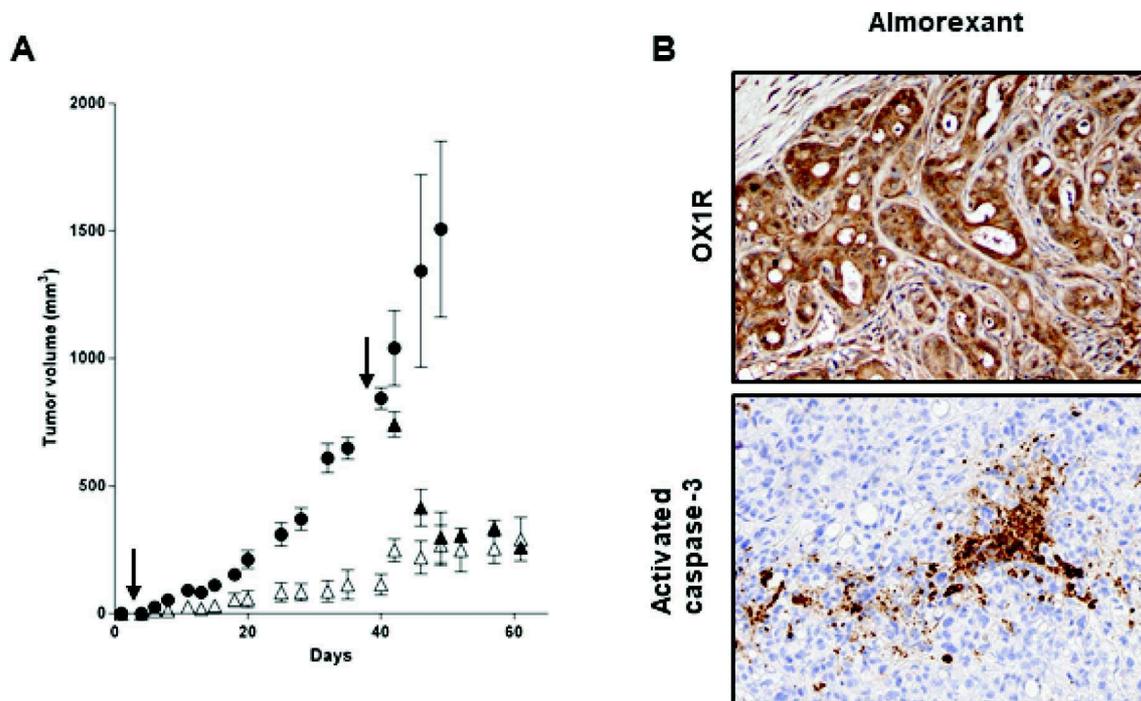


Figure 10: Effect of daily inoculation of almorexant on the growth of tumors developed by xenografting human PDCA cells in nude mice - (A) AsPC-1 cells were inoculated in the flank of nude mice at day 0. Mice were injected daily intraperitoneally with 100 μ l of almorexant (1.8 μ mol/kg) solutions starting at day 0 (Δ) or day 38 (\blacktriangle) or with 100 μ l of PBS (\bullet) for controls. After 60 days of treatment, mice were sacrificed and tumor were then fixed. The development of tumors was followed by caliper measurement. Data are the means \pm SE of 6 tumors in each group. *** $p < 0.001$ versus control. (B) Indirect immunostaining of OX1R (top) and activated caspase-3 (bottom) in xenografted AsPC-1 tumors resected from nude mice. After necropsy, tumors from nude mice treated by almorexant were resected and paraformaldehyde-fixed and then were cut and used for immunohistochemistry.

In conclusion, we have compellingly shown that OX1R is aberrantly expressed in PDAC, and that its activation by orexins and almorexant result in strong apoptosis and consequent cell growth inhibition *in vivo*, *ex vivo* and *in vitro* models. Based on our results, OX1R represents a new attractive and specific mediator of apoptosis against PDAC. The validation of orexin receptor as a target will lead to the development of new pharmacological molecules having a strong impact in the diagnosis and treatment of patients with PDAC. One of the possible paths of new therapeutical approaches could be the use of ligand-biased of OX1R such as almorexant.

MATERIALS AND METHODS

Human surgical samples with PDAC, PanIN lesions and normal pancreas

Seventy-three patients with PDAC treated with surgery (pancreato-duodenectomy $n = 61$; left pancreatectomy $n = 9$; total pancreatectomy $n = 3$) from April 1997 to December 2004 were selected from the files of the Department of Pathology, Beaujon Hospital, Clichy, France. Charts from patients were retrospectively reviewed for clinical and pathological data. No patients received chemotherapy or radiation therapy preoperatively. The following data were recorded: age, gender, recurrence, disease-free survival (DFS) and overall survival (OS), tumor size, TNM stage, lymph node metastasis, differentiation. The studied population included 38 men and 35 women. The median age at surgery was 60 years (range 34–76). The tumor stage was T1 in 3 patients, T2 in 8 patients and T3 in 59 patients. The median tumor size was 30 mm (range 10–100 mm). Lymph node metastases were present in 52 patients. Tumors were well- ($n = 36$), moderately- ($n = 22$) or poorly- ($n = 12$) differentiated. The median follow-up was 677 days (range 142–4294). Fifty-five patients (78,6%) died of the disease during the time of the study. Tissue microarray (TMA) blocks were produced from representative paraffin blocks from the 73 PDAC using a tissue arrayer (Manual Tissue Arrayer-MTA1, Beecher Instruments, WI, USA). We also selected 10 normal pancreas, taken at a distance from tumors, without any pancreatitis or fibrosis lesions but with precancerous lesions (pancreatic intraepithelial lesions, PanIN) of low grade (PanIN-1 or PanIN-2; $n = 16$) and high grade (PanIN-3; $n = 4$) grade of dysplasia. *For Ex Vivo* human PDAC slices cultures, the effects of orexin-A were tested on human freshly surgically resected PDAC ($n = 11$). After pathological evaluation a tumor sample was sliced using a Leica Tissue Slicer (VT1200 S, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Germany) into 300 μm -thick slices cultured in inserts already placed in 6-well plates with William's E medium, complemented with components including foetal calf serum, glucose, gentamicin and HEPES, under normoxic

conditions. The use of human material was approved by the Institutional Review Board (CEERB GHU Paris Nord N°IRB12-059 and 12-033).

Cell lines cultures

3 PDAC cell lines (AsPC-1, HPAF-II and SW 1990) from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) were grown according ATCC recommendations. The HPAF-II/OX1R, CHO/OX1R and CHO/OX2R cell lines, expressing recombinant human OX1R, were obtained as previously described [16]. The cell lines were incubated in the presence or absence of 1 μM orexin-A (GL Biochemicals, Shanghai, China) or suvorexant or almorexant (MedChemExpress, Sollentuna, Sweden).

Tumorigenicity assay in nude mice xenografts

AsPC-1, HPAF-II and HPAF-II/OX1R cells were inoculated subcutaneously into the flank of anesthetized mice as previously described [8]. In an effort to develop more reliable preclinical models, we have established a subcutaneous patient-derived xenograft (PDX) model. Tumoral cells isolated from a human pancreatic cancer were inoculated into the flank of mice. Tumor development was followed by caliper measurements in 2 dimensions (L and W), and the volume (V) of the tumor was calculated [35, 36]. Orexin-A or almorexant was administered by intraperitoneal injections, starting the day of cell lines subcutaneous inoculation or 14 days (AsPC-1 cells) or 40 days (PDX cells) after this date when tumours were established. Control mice received PBS. After necropsy, tumors were then resected, weighted and analyzed.

Immunohistochemical procedures

Immunohistochemistry was performed on formalin-fixed paraffin-embedded normal pancreas, PanIN lesions, tumor tissue (from human tissue-microarrays, human tissue slices and mice xenografts) and on cell lines in pellets fixed in formalin and embedded in cell blocks (Shandon Cytoblock; Thermo Scientific; USA), with an automated immunohistochemical stainer according to the manufacturer's guidelines (automate BOND, Leica Microsystems). Slides were immunolabeled with antibodies against OX1R (Life Technology, PA5-33837, polyclonal rabbit, 1/100), activated caspase-3 (Abgent, E87-77, polyclonal rabbit, 1/100) or Ki-67 (DAKO, clone MIB-1, monoclonal mouse, 1/100). OX1R evaluation was performed in human normal pancreas, PanIN lesions, PDAC TMA, PDAC slices, in xenografted tumors and in cell lines by calculating a score (0–300) obtained by multiplying the intensity (negative, 0; weak, 1; moderate, 2; and strong, 3) by the percentage of stained cells. Internal positive controls consisted of normal pancreatic islets while the HEK/hOX1R cell line served

as an external positive control. The evaluation of apoptosis was performed in PDAC slices, tumor cell lines and xenografted tumours by evaluation of the percentage of caspase-3 positive tumour cells. External positive controls consisted of normal lymph nodes. The evaluation of Ki-67 was performed in PDAC slices by evaluation of the percentage of Ki-67 positive tumor cells. External positive controls consisted of normal lymph nodes.

Immunoprecipitation of SHP2

AsPC-1 or HPAF-II cells were pretreated 24 h without or with 50 μ M SHP1/2 inhibitor NSC-87877. Semiconfluent cells were then treated with 1 μ M orexin-A or 1 μ M almoxerant in fresh culture medium at 37° C for 5 min. Cells were collected and lysed in 50 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 containing 0.25% Na deoxycholate, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40 and 1 mM EGTA. Proteins (500 μ g) were then incubated with 2 μ g of anti-SHP2 antibodies overnight at 4° C. Protein immunoprecipitation was performed according to the manufacturer's instructions using the Seize protein G immunoprecipitation kit (Pierce, Rockford, IL, USA). Then, immunoprecipitated proteins suspended in Laemmli buffer were loaded onto a 10% SDS-polyacrylamide gel, transferred to a nitrocellulose membrane, and immunoblotted with anti-PhosphoTyrosine (1:1000 dilution) or anti-SHP2 (1:1000 dilution) antibodies. Immunocomplexes were revealed with secondary peroxidase conjugated antibodies, using a chemiluminescent kit.

RT-PCR assays

RNA was extracted from cultured cells lines including AsPC-1, SW 1990, HPAF-II, HPAF-II/OX1R, CHO/OX1R and CHO/OX2R by using RNeasy® Mini Kit (Qiagen). PCR amplifications using OX1R sense primer (5'-CCTGTGCCTCCAGACTATGA-3') and OX1R antisense primer (5'-ACACTGCTGACATTCATGA-3'), OX2R sense primer (5'-TAGTTCCTCAGCTGCCTATC-3') and OX2R antisense primer (5'-CGTCCCTCATGTGGTGGTTCT-3') or β -actin sense primer (5'-ATCTGGCACCACACCTTCTACA ATGAGCTGCG-3') and β -actin antisense primer (5'-CGTCA TACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTGC-3') were carried out as previously described [15].

Quantification of apoptotic cells by annexin V labelling

AsPC-1, SW 1990, HPAF-II and HPAF-II/hOX1R cells (seeded at 5×10^4 cells/well) were grown as described above. The culture medium was then replaced every 24 hr with fresh medium with or without 1 μ M orexin-A or almoxerant in the presence or in the absence of the SHP-2 inhibitor, NSC-87877 (50 μ M) (Calbiochem, VWR International SAS, France). After 48 hr, apoptotic cells were determined using the Guava Nexin™ kit (Guava

Technologies, Hayward, CA, USA [15]. Results are expressed as the percentage of apoptotic phycoerythrin-labelled Annexin V (Annexin V-PE) positive cells and are the means of 3 independent analyses.

Caspase-3 activity detection

AsPC-1 cells were pretreated 24 h without or with 50 μ M SHP1/2 inhibitor NSC-87877. 5.10^6 semiconfluent cells were then treated with 1 μ M orexin-A or 1 μ M almoxerant in fresh culture medium at 37° C for 24 h. Caspase-3 activity detection was performed according to the manufacturer's instructions using the caspase-3 assay colorimetric kit (#ab39401, Abcam, Paris, France). The caspase-3 activity measurement is based on spectrophotometric detection at 405 nm of the chromophore p-nitroaniline after cleavage by the activated caspase-3 from the labeled substrate DEVD-p-nitroaniline. Results are expressed as the optic density (O.D.) at 405 nm for 200 μ g of protein for each sample and are the means of 3 independent analyses.

Statistical analysis

Mann-Whitney non-parametric tests were performed to compare categorical with continuous variables where the number of categories was two. When the number of categories was greater than two, ANOVA (analysis of variance) tests were used instead. Data were analyzed with the GraphPad Prism 5.04 statistical software for Windows. All statistical tests were 2-sided. The critical level of statistical significance was set at $p < 0.05$.

Author contributions

SD, DS, PB, VG, JC and TV performed all the experiments and analysed the results. VR performed the statistical analyses. AC, AC and TV designed the experiments and wrote the manuscript. AS, PB, VP and PR revised the manuscript critically for important intellectual content. All authors approved the final version for publication.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank Dr. Martine Torres for critical reading of the manuscript and editorial help.

CONFLICTS OF INTEREST

No potential conflicts of interest were disclosed.

FUNDING

This study was supported by INSERM U1149/ The Inflammation Research Center (CRI), The "Institut

National du Cancer (INCA)” (Translational project N°2013–213) and the “Ligue Contre le Cancer” (RS 12/75–64). SD was granted by the “Ligue Contre le Cancer” (GB/MA/CD/EP-12062).

REFERENCES

1. Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, Rosenzweig AB, Fleshman JM, Matrisian LM. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res.* 2014; 74:2913–21.
2. Ryan DP, Hong TS, Bardeesy N. Pancreatic adenocarcinoma. *N Engl J Med.* 2014; 371:2140–41.
3. Neuzillet C, Tijeras-Raballand A, Bourget P, Cros J, Couvelard A, Sauvanet A, Vullierme MP, Tournigand C, Hammel P. State of the art and future directions of pancreatic ductal adenocarcinoma therapy. *Pharmacol Ther.* 2015; 155:80–104.
4. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin.* 2016; 66:7–30.
5. Garcea G, Neal CP, Pattenden CJ, Steward WP, Berry DP. Molecular prognostic markers in pancreatic cancer: A systematic review. *Eur J Cancer.* 2005; 41:2213–36.
6. Lappano R, Maggiolini M. G protein-coupled receptors: novel targets for drug discovery in cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2011; 10:47–60.
7. O’Hayre M, Degese MS, Gutkind JS. Novel insights into G protein and G protein-coupled receptor signaling in cancer. *Curr Opin Cell Biol.* 2014; 27:126–35.
8. Voisin T, Firar AE, Fasseu M, Rouyer-Fessard C, Descatoire V, Walker F, Paradis V, Bedossa P, Henin D, Lehy T, Laburthe M. Aberrant Expression of OX1 Receptors for Orexins in Colon Cancers and Liver Metastases: an Openable Gate to Apoptosis. *Cancer Res.* 2011; 71:3341–51.
9. Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, et al. Orexins and Orexin Receptors: A Family of Hypothalamic Neuropeptides and G Protein-Coupled Receptors that Regulate Feeding Behavior. *Cell.* 1998; 92:573–85.
10. Ohno K, Hondo M, Sakurai T. Cholinergic Regulation of Orexin/Hypocretin Neurons Through M3 Muscarinic Receptor in Mice. *J Pharmacol Sci.* 2008; 106:485–91.
11. Voisin T, Rouet-Benzineb P, Reuter N, Laburthe M. Orexins and their receptors: structural aspects and role in peripheral tissues. *Cell Mol Life Sci.* 2003; 60:72–87.
12. Heinonen MV, Purhonen AK, Mäkelä KA, Herzig KH. Functions of orexins in peripheral tissues. *Acta Physiol.* 2008; 192:471–85.
13. Jöhren O, Neidert SJ, Kummer M, Dendorfer A, Dominiak P. Prepro-Orexin and Orexin receptor mRNAs are differentially expressed in peripheral tissues of male and female rats. *Endocrinology.* 2001; 142:3324–31.
14. Laburthe M, Voisin T, El Firar A. Orexins/hypocretins and orexin receptors in apoptosis: a mini-review. *Acta Physiol.* 2010; 198:393–402.
15. Rouet-Benzineb P, Rouyer-Fessard C, Jarry A, Avondo V, Pouzet C, Yanagisawa M, Laboisse C, Laburthe M, Voisin T. Orexins Acting at Native OX1 Receptor in Colon Cancer and Neuroblastoma Cells or at Recombinant OX1 Receptor Suppress Cell Growth by Inducing Apoptosis. *J Biol Chem.* 2004; 279:45875–86.
16. Voisin T, El Firar A, Rouyer-Fessard C, Gratio V, Laburthe M. A hallmark of immunoreceptor, the tyrosine-based inhibitory motif ITIM, is present in the G protein-coupled receptor OX1R for orexins and drives apoptosis: a novel mechanism. *FASEB J.* 2008; 22:1993–2002.
17. El Firar A, Voisin T, Rouyer-Fessard C, Ostuni MA, Couvineau A, Laburthe M. Discovery of a functional immunoreceptor tyrosine-based switch motif in a 7-transmembrane-spanning receptor: role in the orexin receptor OX1R-driven apoptosis. *FASEB J.* 2009; 23:4069–80.
18. Laburthe M, Voisin T. The orexin receptor OX1R in colon cancer: a promising therapeutic target and a new paradigm in G protein-coupled receptor signalling through ITIMs. *Br J Pharmacol.* 2012; 165:1678–87.
19. Hamacher R, Schmid RM, Saur D, Schneider G. Apoptotic pathways in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol Cancer.* 2008; 7:64.
20. Iovanna J, Mallmann MC, Gonçalves A, Turrini O, Dagorn JC. Current knowledge on pancreatic cancer. *Front Oncol.* 2012; 2:6.
21. Mürköster SS, Werbing V, Koch D, Sipos B, Ammerpohl O, Kalthoff H, Tsao MS, Fölsch UR, Schäfer H. Role of myofibroblasts in innate chemoresistance of pancreatic carcinoma—Epigenetic downregulation of caspases. *Int J Cancer.* 2008; 123:1751–60.
22. Norman JL, Anderson SL. Novel class of medications, orexin receptor antagonists, in the treatment of insomnia – critical appraisal of suvorexant. *Nat Sci Sleep.* 2016; 8:239–47.
23. Capella C, Albarello L, Capelli P, Sessa F, Zamboni G. Carcinoma of the exocrine pancreas: The histology report. *Dig Liver Dis.* 2011; 43:S282–92.
24. Scartozzi M, Bearzi I, Berardi R, Mandolesi A, Fabris G, Cascinu S. Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Status in Primary Colorectal Tumors Does Not Correlate With EGFR Expression in Related Metastatic Sites: Implications for Treatment With EGFR-Targeted Monoclonal Antibodies. *J Clin Oncol.* 2004; 22:4772–78.
25. Bralet MP, Paule B, Adam R, Guettier C. Loss of Epidermal Growth Factor Receptor Expression in Lymph Node and Liver Metastases of Colon Carcinoma. *J Clin Oncol.* 2005; 23:5844–5.
26. Liu KC, Yen CY, Wu RS, Yang JS, Lu HF, Lu KW, Lo C, Chen HY, Tang NY, Wu CC, Chung JG. The roles of endoplasmic reticulum stress and mitochondrial apoptotic signaling pathway in quercetin-mediated cell death of

- human prostate cancer PC-3 cells. *Environ Toxicol.* 2014; 29:428–39.
27. Hanyaloglu AC, von Zastrow M. Regulation of GPCRs by endocytic membrane trafficking and its potential implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2008; 48:537–68.
28. Tsao P, von Zastrow M. Downregulation of G protein-coupled receptors. *Curr Opin Neurobio.* 2000; 10:365–69.
29. Tsao P, Cao T, von Zastrow M. Role of endocytosis in mediating downregulation of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 2001; 22:91–6.
30. Boivin GA, Beninger RJ. Differential effects of dopamine and AMPA receptor antagonists on the expression of conditioned avoidance responding in rats. *Behav Neurosci.* 2008; 122:377–84.
31. Reubi JC, Maecke HR. Peptide-Based Probes for Cancer Imaging. *J Nucl Med.* 2008; 49:1735–8.
32. Costa-Neto CM, Parreiras-E-Silva LT, Bouvier M. A Pluridimensional View of Biased Agonism. *Mol Pharmacol.* 2016; 90:587–95.
33. Shonberg J, Lopez L, Scammells PJ, Christopoulos A, Capuano B, Lane JR. Biased agonism at G protein-coupled receptors: the promise and the challenges—a medicinal chemistry perspective. *Med Res Rev.* 2014; 34:1286–330.
34. Nicole P, Couvineau P, Jamin N, Voisin T, Couvineau A. Crucial role of the orexin-B C-terminus in the induction of OX1 receptor-mediated apoptosis: analysis by alanine scanning, molecular modelling and site-directed mutagenesis. *Br J Pharmacol.* 2015; 172:5211–23.
35. Maoret JJ, Anini Y, Rouyer-Fessard C, Gully D, Laburthe M. Neurotensin and a non-peptide neurotensin receptor antagonist control human colon cancer cell growth in cell culture and in cells xenografted into nude mice. *Int J Cancer.* 1999; 80:448–54.
36. Stragand JJ, Barlogie B, White RA, Drewinko B. Biological Properties of the Human Colonic Adenocarcinoma Cell Line SW 620 Grown as a Xenograft in the Athymic Mouse. *Cancer Res.* 1981; 41:3364–69.

**Partie II : L'almorexant et l'anticorps « C2 » miment
les propriétés antitumorales de l'orexine A dans
l'adénocarcinome humain du côlon**

I. Introduction

Le récepteur OX1 est exprimé dans les adénocarcinomes humains du côlon et du pancréas. L'activation d'OX1R par l'orexine A induit l'apoptose mitochondriale *via* la protéine tyrosine phosphatase SHP2. De plus, l'utilisation d'un antagoniste DORA (antagoniste pour OX1R et OX2R), l'almorexant, a étonnamment montré une induction de l'apoptose mitochondriale similaire à celle induite par l'OxA, *via* la protéine tyrosine phosphatase SHP2 sur le modèle cellulaire d'adénocarcinome humain du pancréas : AsPC-1. Cet antagoniste est donc un ligand biaisé, puisqu'il bloque la voie calcique médiée par OX1R mais active la voie proapoptotique. Le but de ce travail a été de montrer l'effet de l'almorexant sur l'adénocarcinome humain de côlon par l'utilisation de lignées d'adénocarcinomes coliques : HT-29 et LoVo. Cette étude a permis de montrer que cet antagoniste se comporte de façon similaire à l'effet du peptide natif au niveau de la voie apoptotique.

Dans le but de développer des molécules à visée thérapeutique ayant des propriétés similaires à l'OxA mais n'ayant pas ses inconvénients, notamment sa nature peptidique extrêmement sensible à la dégradation et son mode d'administration (injection intrapéritonéale) non compatible avec un traitement chez l'Homme, nous avons développé un anticorps qui mime les effets proapoptotiques de l'OxA grâce à une collaboration avec une équipe de l'Institut de Recherche sur le Cancer de Montpellier (B. Robert, IRCM). La stratégie pour développer cet anticorps a été basée sur la technique du phage display.

La technique du phage display consiste à exprimer à la surface d'un bactériophage un répertoire protéique fusionné avec le domaine NH₂-terminal d'une des protéines de surface. La sélection de ces phages recombinants s'effectue en plusieurs étapes : la capture, le lavage, l'élution et l'amplification grâce à l'infection de bactéries. L'ensemble de ces étapes est répété lors de plusieurs cycles avec des pressions de sélection différentes. Ensuite, les phages sélectionnés sont analysés et testés individuellement vis-à-vis de l'activité et de la fonction recherchées. Dans notre cas, la cible étant un RCPG, un récepteur transmembranaire, nous avons effectué la sélection sur les cellules eucaryotes. Pour se faire, la banque de phages a été criblée de manière différentielle sur des cellules HEK qui n'expriment pas naturellement OX1R et des cellules HEK recombinantes transfectées par OX1R (HEK OX1R). Dans un premier temps, cette banque a été « épuisée » sur les cellules HEK natives afin d'éliminer tous les anticorps capables de reconnaître les protéines à la surface de ces cellules. Dans un second temps, elle a été criblée sur les cellules HEK OX1R. Plusieurs cycles de criblage ont été nécessaires afin : d'une part, d'enrichir en anticorps spécifiques et d'autre part, d'isoler les clones d'intérêt qui ont été validés par cytométrie de flux.

Grâce à cette stratégie, un anticorps parmi plus d'une dizaine de candidats a été sélectionné : il a été nommé C2. Les effets biologiques *in vitro* et *in vivo* du C2 ont été étudiés sur des

modèles cellulaires de cancer du côlon, HT-29 et LoVo. Cet anticorps ainsi que l'almorexant comme nous le verrons, miment les effets proapoptotiques et antitumoraux de l'OxA.

II. Matériel et méthodes

A. Culture de lignées cellulaires

Les cellules HEK-293 et HEK OX1R (qui expriment de manière stable le récepteur humain à l'orexine de type 1) ont été cultivées dans du Milieu Eagle Modifié Dulbecco (DMEM) contenant 4,5 g de glucose/L, additionné de 10 % de SVF (Life technologies) 100 µg/ml de streptomycine et de 100 unités/ml de pénicilline. Pour la lignée HEK OX1R, la pression de sélection est maintenue par addition au milieu de culture de 0,7 mg/ml de généticine.

Les lignées cellulaires d'adénocarcinomes humains du côlon, HT-29 et LoVo ont été obtenues auprès d'American Type Culture Collection (ATCC). Les lignées cellulaires ont été établies à partir de tumeurs réséquées : HT-29, à partir d'adénocarcinomes colorectaux primaires ; LoVo à partir des métastases supraclaviculaires gauches d'un adénocarcinome colique. Les cellules HT-29 ont été cultivées dans du DMEM contenant 4,5 g de glucose/L sans pyruvate, supplémenté avec 10 % de SVF, 100 µg/ml de streptomycine et 100 unités/ml de pénicilline. Les cellules LoVo sont quant à elles cultivées dans du milieu Ham's F12 additionné de 10 % de SVF, 100 µg/ml de streptomycine et 100 unités/ml de pénicilline. Toutes les lignées ont été cultivées en présence de 1 % de zellshield (anti-mycoplasme).

Toutes les cellules ont été maintenues dans un incubateur à 37°C, 5% de CO₂/air en condition humide.

B. Mobilisation du calcium intracellulaire

Les cellules HEK OX1R sont ensemencées dans une plaque noire à fond clair de 96 puits à 80 000 cellules par puits. Après 48 heures, la mobilisation du calcium intracellulaire est mesurée à l'aide du kit Fluoforte (équivalent au fluo 4). Les cellules sont chargées avec du fluorochrome pendant 1 heure à 37°C, certains puits sont prétraités pendant 1 heure avec 10 µg/ml de C2. Le niveau basal de fluorescence est ensuite mesuré sur un spectrofluorimètre (Tecan) avant injection de 1 µM d'OxA et le pic transitoire de fluorescence correspondant à une libération de calcium cytosolique est mesuré pendant environ 2 min 30.

C. Croissance cellulaire

Les cellules HT-29 et LoVo sontensemencées sur une plaque 24 puits à raison de 50 000 cellules par puits (J0). Les cellules sont traitées à J1 et J2 avec l'orexine A à 1 μM , l'Almorexant à 1 μM ou le C2 à 0,13 μM . A J3, les cellules sont comptées manuellement.

Les cellules LoVo sontensemencées sur une plaque 24 puits à raison de 50 000 cellules par puits (J0). Les cellules LoVo sont prétraitées à J1 avec l'inhibiteur NSC 87877 à 50 μM . Les cellules LoVo prétraitées sont traitées à J2 et J3 avec 1 μM d'orexine A ou 1 μM d'Almorexant ou 0,13 μM de C2, toujours en présence de l'inhibiteur NSC 87877. Au jour 3, les cellules sont lavées puis comptées manuellement.

Les résultats sont exprimés par la moyenne du compte de 3 puits \pm sem, ils représentent 3 expériences distinctes.

D. Quantification des cellules apoptotiques par marquage à l'annexine V

Les cellules HT-29 (ensemencées à 5×10^4 cellules/puits) ont été cultivées comme décrit ci-dessus. Le milieu de culture a ensuite été remplacé toutes les 24 heures par du milieu frais avec ou sans orexine A à 1 μM ou de C2 à 0,13 μM . Après 48 heures, le pourcentage de cellules apoptotiques a été déterminé en utilisant le kit Guava Nexin™ (Guava Technologies). Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules marquées à la phycoérythrine liée à l'Annexine-V (Annexine V-PE), qui correspondent aux cellules apoptotiques.

E. Détection des caspases 3 et 7 activées

Les cellules LoVo,ensemencées à 5×10^4 cellules par puits, ont été traitées avec 1 μM d'orexine A ou 1 μM d'Almorexant dans un milieu de culture frais et, incubées à 37°C pendant 48 h. La détection de l'activité des caspases 3/7 a été effectuée conformément aux instructions du kit CellEvent™ Caspase-3/7 Green ReadyProbes™ Reagent (Invitrogen). Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules présentant les caspases 3/7 activées.

F. Effet anti-tumoral chez la souris nude xénogréffée

Les cellules HT29 en croissance exponentielle ont été récoltées, lavées avec du PBS et remises en suspension à une concentration de $2 \times 10^7/\text{ml}$. Les souris « nude » ont été anesthésiées avec de l'isoflurane. Les cellules ($2 \times 10^6/100 \mu\text{l}$) ont ensuite été inoculées par voie sous-cutanée dans le flanc des souris. Toutes les souris ont développé des tumeurs après

injection de 2×10^6 cellules HT29. Le développement de la tumeur a été suivi par les mesures de la longueur et de la largeur (L et W). Le volume (V) de la tumeur a été calculé par la formule d'un ellipsoïde prolata ($V=L \times W^2 \times \pi/6$). Pour le traitement avec l'orexine A, le peptide a été dissout à une concentration de 1 mg/ml dans du PBS représentant une injection de 1,4 μ moles/kg de poids corporel. Pour le traitement avec l'almorexant, la molécule a été dissoute à une concentration de 2mg/ml dans le DMSO, puis elle a été reprise dans le PBS avant injection aux souris, soit 1,8 μ moles/kg de poids corporel. Pour le traitement avec le C2, l'anticorps a été dissout à une concentration de 8 mg/kg ce qui correspond à 0,07 μ moles/kg par injection. Les souris témoins ont reçu du PBS. Les traitements étaient administrés deux fois par semaine par injection intrapéritonéale. Le poids corporel des souris était similaire après 50 jours d'expérience avec et sans traitement, c'est-à-dire, pour le groupe contrôle $24,9 \pm 1,5$ g (n=4), pour le groupe orexine A $24,4 \pm 0,7$ g (n=4), pour le groupe almorexant $25,8 \pm 1,2$ g (n=4) et pour le groupe C2 $24,4 \pm 0,9$ g (n=4).

III. Résultats

Comme montré précédemment, l'OxA induit significativement l'apoptose mitochondriale au sein des lignées cellulaires d'adénocarcinomes humains du côlon, HT-29 et LoVo (Voisin *et al.*, 2011).

A. Effets de l'almorexant *in vitro* et *in vivo*

Les effets de l'almorexant ont été analysés sur les lignées cellulaires d'adénocarcinomes humains de côlon, HT-29 et LoVo. Les effets ont été comparés à ceux de l'orexine A à 1 μ M. L'almorexant 1 μ M inhibe la croissance cellulaire des cellules HT-29 (Figure 1A1) et de LoVo (Figure 1A2). De plus, ces résultats sont similaires à ceux obtenus pour l'orexine A. En effet, une inhibition de croissance des cellules HT-29 de 55,2% ($\pm 8,4$) est obtenue avec l'orexine A et une inhibition de croissance de 40% (± 9) avec l'almorexant. Sur les cellules LoVo, l'inhibition de croissance est de 35,7% ($\pm 2,7$) avec l'orexine A et de 43,5% ($\pm 1,1$) avec l'almorexant. Afin de montrer que ces effets sont bien dépendants de la voie de signalisation impliquant le recrutement de la protéine SHP2, j'ai utilisé l'inhibiteur NSC 87877. Les résultats montrent sur les cellules LoVo que l'effet inhibiteur de la croissance de l'almorexant est aboli par le NSC 87877 (Figure 1B). Ces effets sont associés à l'induction de l'apoptose médiée par l'almorexant comme le montre l'activité des caspases 3 et 7 après stimulation à l'almorexant et à l'orexine A (Figure 1C). Ces résultats corroborent parfaitement ceux obtenus sur les cellules cancéreuses AsPC-1 issues de PDAC (Dayot *et al.*, 2018) : l'almorexant induit bien

une apoptose mitochondriale *via* la protéine tyrosine phosphatase SHP2 dans les cancers du côlon.

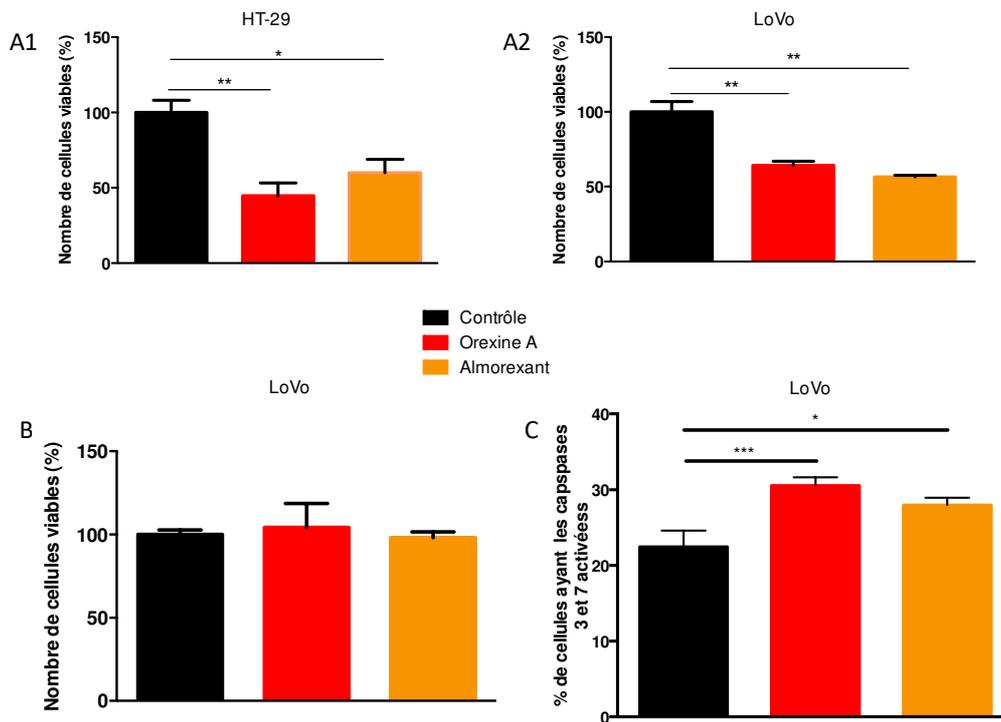


Figure 1 : Effets de l'almorexant sur la croissance cellulaire et l'activité des caspases 3/7.

(A) Les cellules HT-29 (A1) et LoVo (A2) sont traitées avec de l'orexine A 1 μ M ou de l'almorexant 1 μ M pendant 48h. (B) Les cellules LoVo sont traitées pendant 48h avec l'orexine A 1 μ M ou l'almorexant 1 μ M en présence de l'inhibiteur NSC 87877. (C) L'apoptose a été mesurée grâce à l'analyse des caspases 3/7 activées au sein des cellules. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules ayant les caspases 3 et 7 activées. T-test * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Pour démontrer l'effet antitumoral de l'almorexant, des études *in vivo* sur un modèle préclinique ont été réalisées. Une injection intrapéritonéale deux fois par semaine d'almorexant (1,8 μ mol/kg) a eu lieu à partir du premier jour de l'expérimentation sur des souris nues xéno-gréffées avec les cellules HT-29 jusqu'au sacrifice des souris. Au bout de 48 heures, une diminution significative d'environ 50% du volume tumoral a été observée en présence d'almorexant similaire à celle obtenue avec l'orexine A (Figure 2).

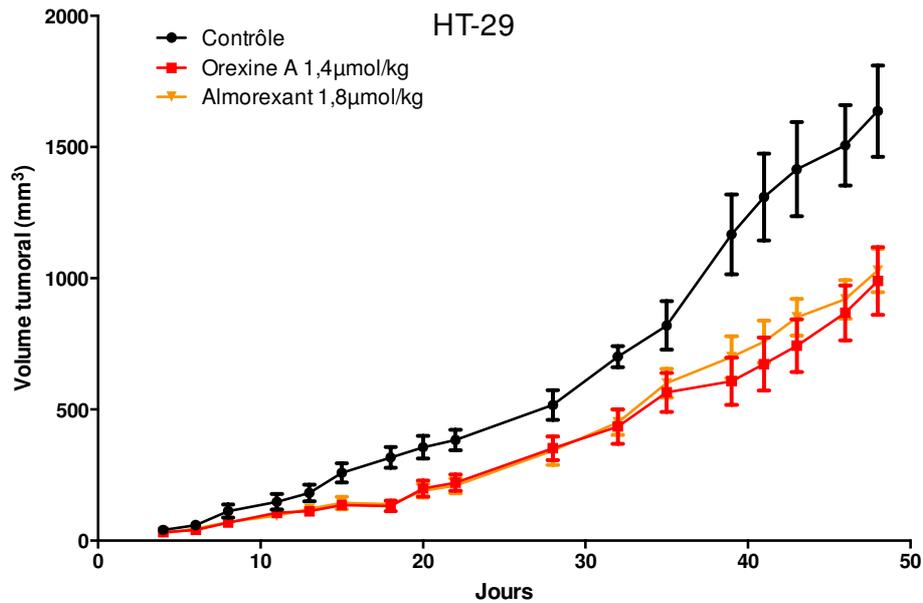


Figure 2 : Effet des injections d'almorexant deux fois par semaine sur la croissance tumorale

Des cellules HT-29 ont été inoculées au jour J0. Les traitements 1,4 μmol/kg d'orexine A et 1,8 μmol/kg d'almorexant ont été injectés par voie intrapéritonéale aux souris deux fois par semaine. Les souris contrôles ont reçu 100 μl de PBS.

B. Effets du C2 *in vitro* et *in vivo*

La première analyse a consisté à étudier l'impact du C2 sur la libération du calcium induite par OX1R. L'étude a été effectuée dans les mêmes conditions que pour l'almorexant (Dayot *et al.*, 2018). Le C2 n'inhibe pas la mobilisation du Ca²⁺ intracellulaire (Figure 3C). De plus, le C2 n'induit pas la mobilisation du Ca²⁺ intracellulaire (Figure 3A) car lorsque l'on traite les cellules avec 1 μM de C2 aucun pic transitoire de Ca²⁺ n'est observé (Figure 3B). En effet, même lorsque les cellules recombinantes HEK OX1R ont été prétraitées pendant 1h avec le C2, l'ajout d'orexine A 1 μM, permet la mobilisation du Ca²⁺ intracellulaire.

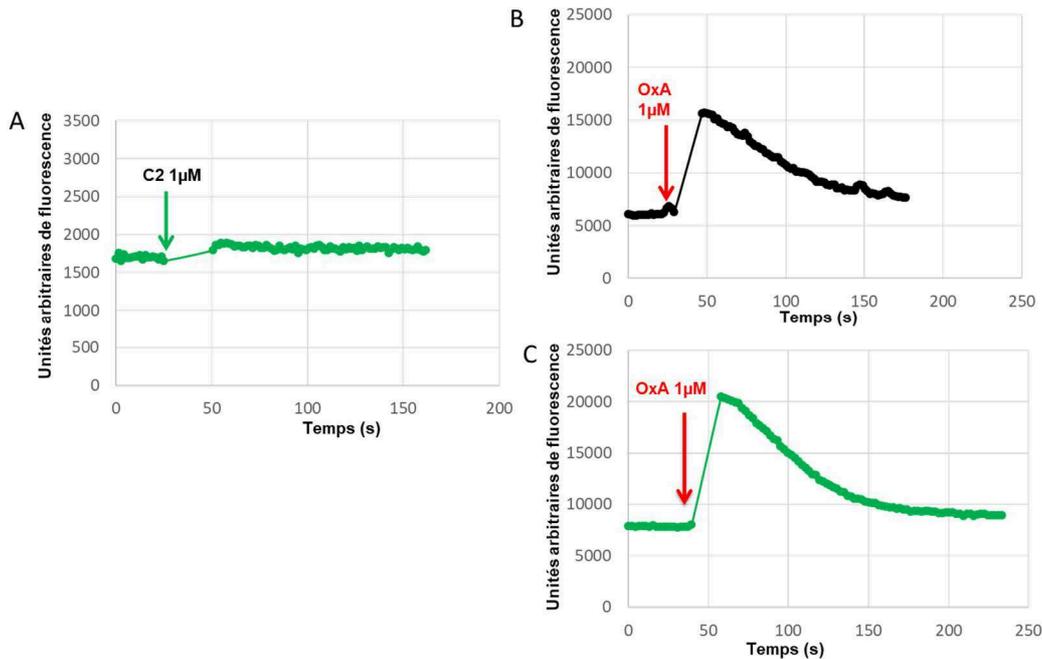


Figure 3 : Effet du C2 sur la mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire

La mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire a été détectée dans les cellules recombinantes HEK-293 exprimant OX1R, en utilisant le kit de dosage du calcium Fluoforte (Enzo Life Sciences). Les cellules ont été traitées avec $1 \mu\text{M}$ d'OxA (Figure 3B) comme contrôle positif ou $1 \mu\text{M}$ de C2 (Figure 3A) ou $1 \mu\text{M}$ d'OxA après pré-traitement avec $10 \mu\text{g/ml}$ de C2 pendant 1 h (Figure 3C).

A la suite à ces premiers résultats, l'effet proapoptotique du C2 a été étudié sur les lignées cellulaires HT-29 et LoVo. L'étude sur la croissance cellulaire, montre une inhibition du nombre de cellules en présence de C2 à $0,13 \mu\text{M}$. Cette diminution est similaire à celle obtenue avec l'orexine A sur les cellules LoVo (Figure 4 A2), soit une inhibition de 35,6% ($\pm 4,2\%$) pour l'orexine A et une inhibition de 41,2% ($\pm 3,3\%$) pour le C2. Ensuite, une étude en présence de l'inhibiteur de la protéine tyrosine phosphatase SHP2, NSC 878770 $50 \mu\text{M}$, sur les cellules LoVo montre que l'effet du C2 à $0,13 \mu\text{M}$ est aboli (Figure 1 B). Concernant le modèle cellulaire, HT-29, nos résultats montrent que l'effet d'inhibition de croissance du C2 est supérieur à celui de l'orexine A (Figure 4 A1). En effet, une inhibition de 47% ($\pm 0,9\%$) pour l'orexine A est observée alors qu'une inhibition de 83,9% ($\pm 7,4\%$) est obtenue avec le C2. Nous avons entrepris d'étudier l'effet proapoptotique du C2 sur les cellules HT-29, puisque sur ce modèle nous avons observé un effet supérieur du C2. Une augmentation des cellules marquées positivement à l'annexine V-PE de 31,9% ($\pm 3,1$) est observée en présence de C2. Cette augmentation est supérieure à celle de l'orexine A pour qui on obtient 15,7% ($\pm 1,3$). Ces résultats sont donc en adéquation avec les résultats obtenus sur la croissance cellulaire.

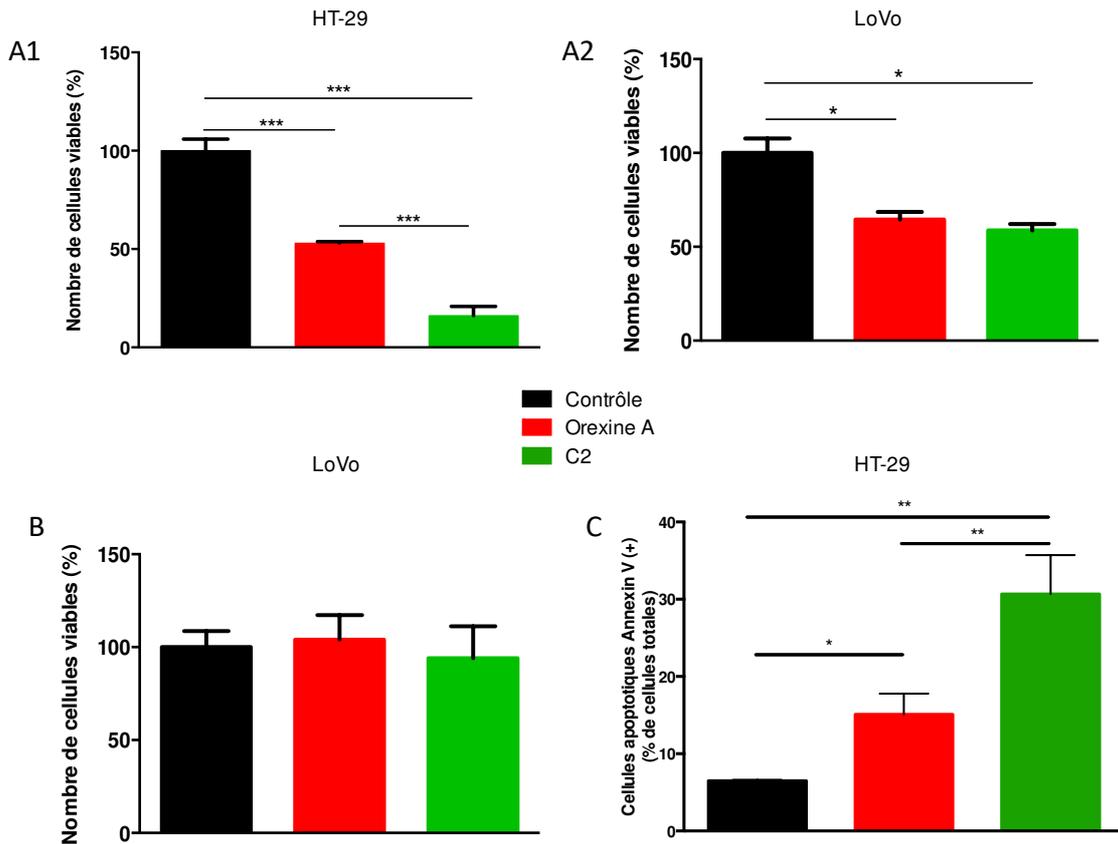


Figure 4 : Effets du C2 sur la croissance cellulaire des cellules HT-29

(A) Les cellules HT-29 (1) et LoVo (2) sont traitées avec de l'orexine A $1 \mu\text{M}$ ou du C2 $0,13 \mu\text{M}$ pendant 48 h. (B) Les cellules LoVo sont traitées pendant 48 h avec l'orexine A $1 \mu\text{M}$ ou le C2 $0,13 \mu\text{M}$ en présence de l'inhibiteur NSC 87877. (C) L'apoptose a été mesurée grâce à l'analyse du marquage des cellules à l'annexine V-PE. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules apoptotiques. T-test * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Afin de définir le rôle antitumoral de cet anticorps, une étude *in vivo* a été menée sur un modèle préclinique de souris nude xéno greffées avec des cellules HT-29. Une injection intrapéritonéale de C2 ($0,07 \mu\text{mol/kg}$) deux fois par semaine a été effectuée sur les souris dès J0 jusqu'au jour du sacrifice des souris. Une diminution de 50% du volume tumoral a été observée en présence du C2, similaire à celle observée en présence de l'orexine A (Figure 5).

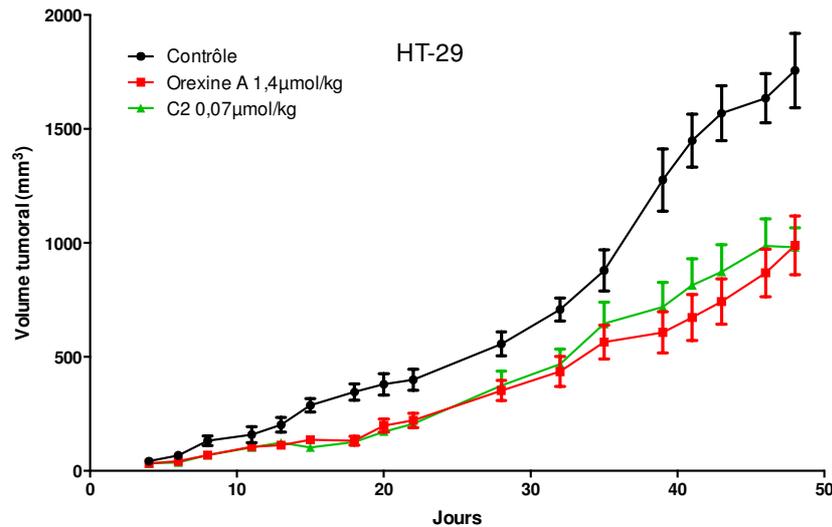


Figure 5 : Effet des injections de C2 deux fois par semaine sur la croissance tumorale

Des cellules HT-29 ont été inoculées au jour J0. Les traitements 1,4 µmol/kg d'orexine A et 0,07 µmol/kg de C2 ont été injectés par voie intrapéritonéale aux souris deux fois par semaine. Les souris contrôles ont reçu 100 µl de PBS.

IV. Discussion

Dans un premier temps, cette étude confirme le rôle proapoptotique et antitumoral de l'almorexant *via* la protéine SHP2 sur les lignées cellulaires cancéreuses du côlon comme précédemment montré sur les cellules cancéreuses du pancréas. Son action a été montrée sur deux types de lignées différentes, HT-29 et LoVo. Comme il a été décrit précédemment, cet antagoniste est un ligand biaisé. En effet, Il est capable d'inhiber la voie calcique induite par OxA et il active la voie apoptotique mitochondriale. Ce sont les deux voies de signalisation principales associées à OX1R dans les cellules tumorales. Le terme de ligand biaisé signifie qu'un ligand peut être un agoniste pour une voie de signalisation, tout en étant un agoniste inverse pour une autre voie stimulée par le même récepteur. Ce phénomène confirme que les RCPG peuvent adopter plusieurs conformations actives différentes. Ces conformations n'ont toutefois pas toutes la même affinité pour les diverses voies de signalisation activées par le récepteur. Ce concept a été nommé « sélectivité fonctionnelle » ou « signalisation biaisée par le ligand » (Bouvier, 2012). Cette découverte a été synonyme de nouvelles opportunités pour le développement de médicaments plus efficaces et permettant la diminution des effets indésirables, en ciblant seulement les voies de signalisations importantes pour leur action thérapeutique. L'almorexant confirme donc son rôle potentiel comme nouveau traitement thérapeutique dans les adénocarcinomes humains du côlon et du pancréas.

Dans un second temps, cette étude a montré l'effet de l'anticorps C2 sur les lignées cellulaires cancéreuses du côlon. Tout d'abord, cet anticorps n'induit pas par lui-même, ni n'inhibe la

mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire induite par l'orexine A. Les effets *in vitro* du C2 sur la croissance cellulaire ont été étudiés sur les cellules HT-29 et LoVo. Une forte inhibition de la croissance cellulaire est obtenue sur les cellules HT-29 et LoVo. Cette inhibition de la croissance cellulaire est bien médiée par un effet proapoptotique puisque le pourcentage de cellules apoptotiques est plus élevé en présence de C2 qu'en présence d'orexine A. L'étude sur le modèle préclinique montre que la réponse antitumorale du C2 est similaire à celle induite par l'orexine A. Le principe des xénogreffes utilisées ici est d'évaluer notamment l'action de molécules thérapeutiques anticancéreuses au sein d'un organisme vivant. En 2007, le premier anticorps monoclonal entièrement humain produit par la technique du phage display a été commercialisé. Cet anticorps se fixe au facteur de nécrose tumoral α (TNF- α) (Lawrence *et al.*, 2006). Par conséquent, l'obtention de l'anticorps C2 par la même stratégie pourrait représenter une alternative thérapeutique dans le traitement des cancers digestifs.

En conclusion, le récepteur OX1 est une cible potentielle pour le traitement thérapeutique des adénocarcinomes humains du côlon et du pancréas. De plus, la mise en évidence que l'almorexant et l'anticorps C2 miment les effets proapoptotiques et antitumoraux de l'OxA, représente une très bonne alternative au peptide naturel dont les inconvénients en termes de stabilité et d'administration peuvent représenter un frein dans son utilisation thérapeutique éventuelle.

**Partie III : Le rôle antitumoral de l'OxA, l'almorexant
et l'anticorps C2 : impact sur l'internalisation
d'OX1R**

I. Introduction

Au regard de mes précédents résultats, le système orexines/OX1R semble donc être une cible thérapeutique très prometteuse pour les adénocarcinomes humains du côlon et du pancréas mais, probablement plus largement pour d'autres types de cancers dans la mesure où notre équipe a collaboré à montrer un effet antitumoral de l'OxA dans les cancers de la prostate (Alexandre *et al.*, 2014). Cependant, la régulation de l'expression des récepteurs OX1 à la surface membranaire des cellules cancéreuses ou non est peu, voire, pas connue. Comme cela a été décrit dans la partie « Introduction » de ce document, les phénomènes d'internalisation des RCPG représentent une étape clef dans la régulation de l'expression de ces récepteurs à la surface cellulaire. Au cours de ce travail, les phénomènes d'internalisation d'OX1R ainsi que le devenir intracellulaire du récepteur sous l'action de l'OxA ont été analysés. Cette étude préliminaire a été effectuée par microscopie confocale suivie d'analyse d'images. Différentes protéines vésiculaires qui nous serviront de « marqueurs », sont associées à l'internalisation des protéines et seront étudiées ici. Tout d'abord, les endosomes interviennent lors de la première étape d'internalisation des récepteurs. Ils sont nécessaires pour le tri des récepteurs et déterminent ainsi leur devenir. Ces récepteurs seront, soit recyclés à la membrane plasmique, soit dégradés. Un autre type de vésicules est impliqué dans le tri : le réseau *trans*-golgien (RTG). Ce dernier intervient plus tardivement dans le transport des récepteurs. En cas de dégradation des récepteurs, ils seront adressés aux lysosomes. En revanche, plusieurs vésicules protéiques sont impliquées dans les voies de recyclage. Or, j'ai collaboré avec une équipe de notre Centre de Recherche sur l'Inflammation, qui travaille entre autres sur la protéine IRAP (Insulin Regulated Aminopeptidase) (L. Saveanu, CRI), qui joue un rôle majeur dans la régulation du trafic des endosomes de stockage. Les endosomes de stockage sont des vésicules avec un recyclage constitutif lent. Leur caractéristique majeure est leur translocation à la surface cellulaire sous une stimulation spécifique de chaque type cellulaire. Même s'ils sont exprimés d'une façon quasi-ubiquitaire, ces endosomes sont peu étudiés.

A la suite des résultats inattendus obtenus sur la voie apoptotique, l'impact de l'almorexant sur le devenir du récepteur OX1 a été étudié. De la même façon, nous avons étudié l'impact de l'anticorps C2 sur ces processus de régulation. Le trafic membranaire du récepteur OX1 peut être modifié, par la nature différente de ces molécules qui ont la particularité de permettre différentes voies de signalisation d'OX1R. Cette étude devrait permettre de définir l'impact de l'OxA, de l'almorexant et de l'anticorps C2 sur les processus d'internalisation du récepteur OX1.

Ces travaux de recherche vont démontrer que le récepteur OX1 est partiellement dégradé bien qu'une partie semble être recyclée à la membrane plasmique en présence d'OxA. A l'inverse,

l'almorexant ne semble pas avoir d'effet sur l'internalisation du récepteur démontrant que son versant antagoniste bloque totalement ces processus de régulation. En revanche, l'anticorps C2 permet l'internalisation du récepteur avec cependant un effet moindre comparé à celui observé avec l'OxA.

II. Matériel et méthodes

A. Culture de lignées cellulaires

Les cellules HEK-293 et HEK OX1R (qui expriment de manière stable le récepteur humain à l'orexine de type 1 couplé à la YFP) ont été cultivées dans du Milieu Eagle Modifié Dulbecco (DMEM) contenant 4,5 g de glucose/L, additionné de 10 % de SVF (Life technologies), 100 µg/ml de streptomycine et de 100 unités/ml de pénicilline. Pour la lignée HEK OX1R, la pression de sélection est maintenue par addition au milieu de culture de 0,5 mg/ml de généticine.

B. Traitement cellulaire

Les cellules HEK OX1R ont étéensemencées sur des plaques 8 puits IBltreat µ (IBIDI) à 80 000 cellules par puits. Le lendemain, les cellules sont traitées pendant 10 minutes avec de l'orexine A à 1 µM, de l'Almorexant à 1 µM ou du C2 à 0,13 µM avant que les cellules soient fixées après un temps d'incubation de 0, 15, 30, 45, 60, 90 et 120 minutes dans du milieu seul.

C. Microscopie

Pour toutes les expériences, les cellules ont été fixées avec 4% de paraformaldéhyde et perméabilisées avec 0,2% de saponine dans du PBS contenant 0,2% de BSA et marquées dans le même tampon. Les anticorps primaires utilisés étaient les suivants : anti-LAMP1 (Lysosomal-associated membrane protein 1) de lapin (1/500, Sigma), anti-synthaxine 6 de lapin (1/100, Proteintech), anti-IRAP de lapin (1/100, Cell Signaling) et anti-EEa1 (Early Endosome Antigen 1) de souris (1/100, Santacruz). Les anticorps secondaires couplés aux fluorochromes d'Alexa fluor (AF 405 ou AF 642) proviennent de Molecular Probes (tous les anticorps secondaires, 1/100, Life Technologies). Les images ont été acquises sur un microscope confocal LSM 780 ZEISS. Le traitement d'images a été effectué avec le logiciel ImageJ pour individualiser chaque cellule et retirer numériquement la fluorescence de la membrane plasmique. Le pourcentage d'OX1R colocalisant avec d'autres marqueurs a été calculé à l'aide du logiciel Imaris. Le pourcentage de colocalisation est rapporté comme la proportion de fluorescence du marqueur YFP se superposant aux marqueurs des vésicules.

III. Résultats

Différentes protéines vésiculaires ont été étudiées, les endosomes marqués par l'anticorps anti-EEa1, EEa1 étant une protéine exprimée dans les endosomes précoces. Ensuite, les lysosomes ont été marqués par l'anticorps anti-Lamp1, Lamp1 est une protéine transmembranaire résidant au niveau de la membrane des lysosomes. Le réseau *trans*-golgien (RTG) a été étudié à l'aide de l'anticorps anti-synthaxine 6 (Stx6) qui est une protéine exprimée au sein du RTG. La protéine IRAP qui est exprimée au niveau des vésicules de stockage a été marquée par un anticorps anti-IRAP.

A. Effet de l'orexine A sur la régulation de l'expression membranaire du récepteur OX1

L'étude sur la régulation de l'expression du récepteur OX1 au sein des cellules HEK OX1R en présence d'OxA confirme l'internalisation des récepteurs. Le récepteur OX1 est présent significativement avec les endosomes à 60 minutes, mais on observe une tendance à la colocalisation dès 15 minutes (Figure 1A). Nous pouvons voir qu'OX1R co-localise avec le RTG à 30 min significativement, ceci correspond à une voie de recyclage lente et à un tri endocytaire plus tardif (Figure 1B). Ces résultats sont en adéquation avec les observations faites avec le marqueur Lamp1 qui montre une interaction entre OX1R et les lysosomes (Figure 1D). Cette interaction est stable dès 15 min. Les protéines IRAP qui correspondent aux vésicules de stockage et de recyclage interagissent avec OX1R après 45 min de traitement (Figure 1C). L'ensemble de ces résultats nous montrent que les récepteurs OX1R, une fois activés par l'OxA, sont donc partiellement dégradés et partiellement recyclés.

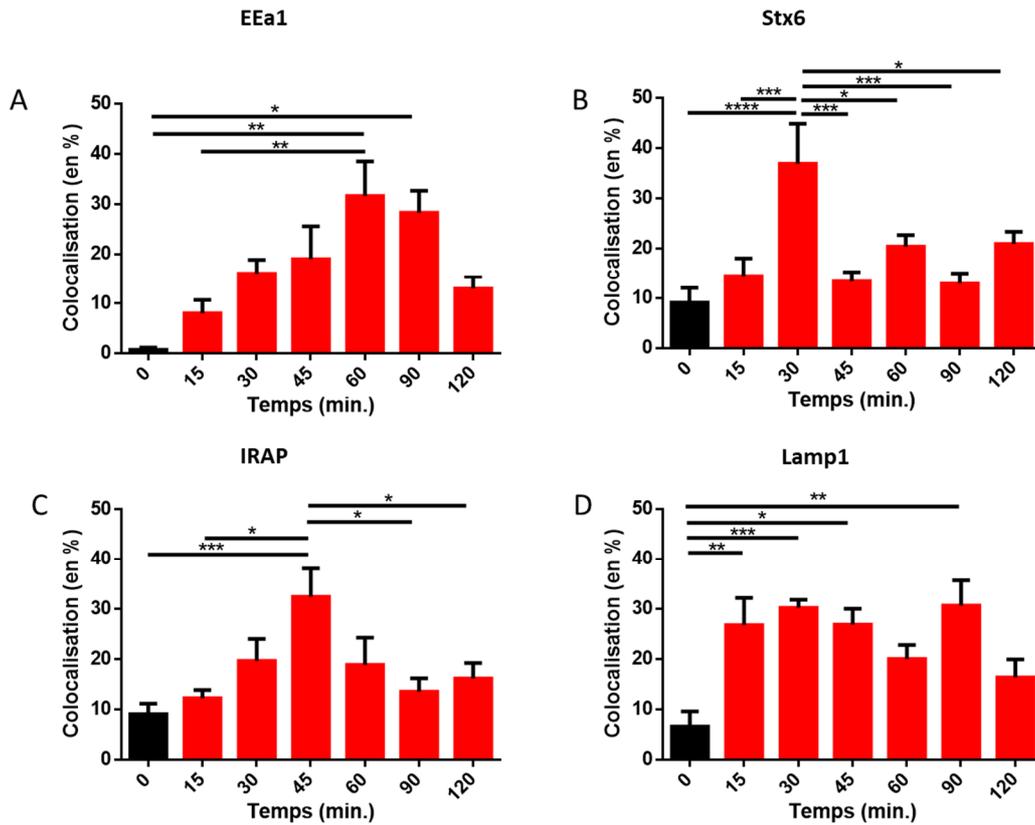


Figure 1 : Colocalisation entre OX1R et les différents compartiments cellulaires après activation par l'OxA

Les cellules HEK OX1R sont traitées pendant 10 minutes avec de l'orexine A à 1 μ M avant que les cellules soient fixées après un temps d'incubation de 0, 15, 30, 45, 60, 90 et 120 minutes. (A) Les endosomes sont marqués par l'anticorps anti-EEa1, (B) le RTG a été étudié à l'aide de l'anticorps anti-Stx6, (C) les vésicules de stockage sont étudiées grâce à un anticorps anti-IRAP et (D) les lysosomes ont été marqués par l'anticorps anti-Lamp1. Les images sont traitées par imageJ et Imaris. Anova * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

B. Effet de l'almorexant sur la régulation de l'expression membranaire du récepteur OX1

La deuxième partie de l'étude consiste à analyser la régulation de l'expression du récepteur OX1 en présence de l'almorexant. La même procédure avec les mêmes vésicules marquées que pour l'OxA a été mise en œuvre. Aucune interaction entre OX1R et les vésicules n'est observée quel que soit le temps étudié. Par conséquent, le récepteur ne semble pas internalisé après activation par l'almorexant (Figure 2). Ces résultats valident l'effet antagoniste de l'almorexant. En effet, le devenir du récepteur après activation est totalement différent de celui résultant de l'activation par l'OxA. Le récepteur n'est alors plus internalisé du tout.

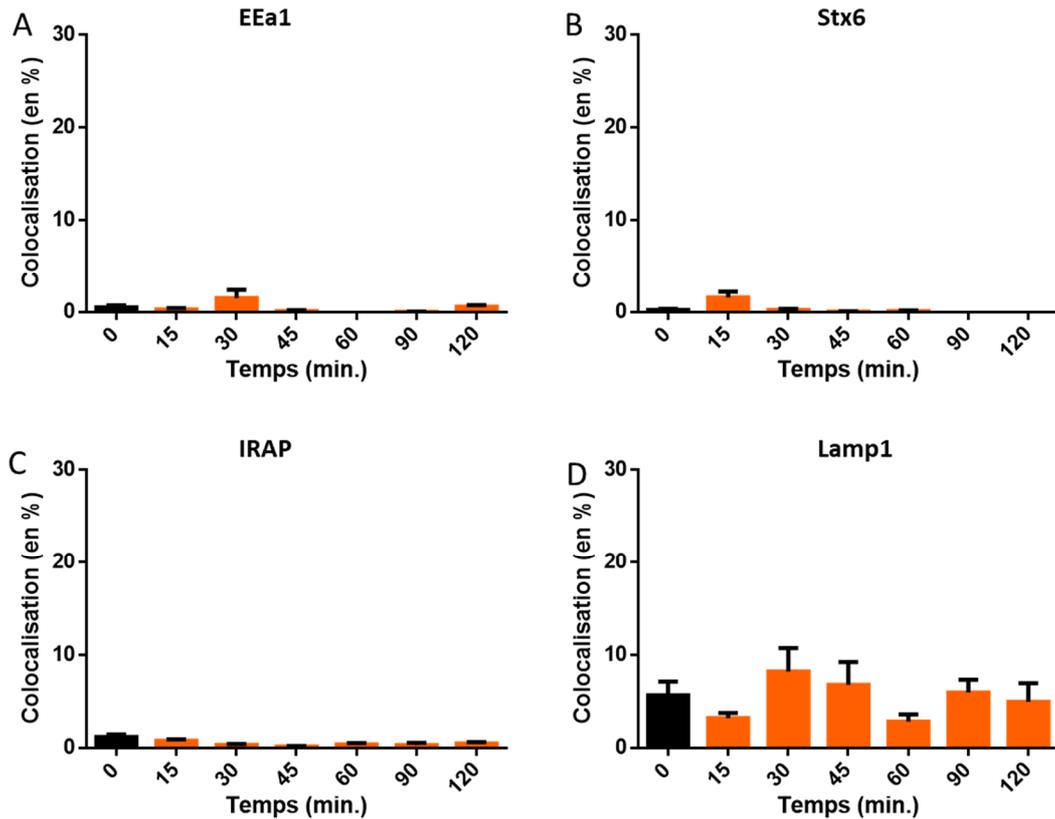


Figure 2 : Colocalisation entre OX1R et les différents compartiments cellulaires après activation par l'almorexant

Les cellules HEK OX1R sont traitées pendant 10 minutes avec de l'almorexant à 1 μ M avant que les cellules soient fixées après un temps d'incubation de 0, 15, 30, 45, 60, 90 et 120 minutes. (A) Les endosomes sont marqués par l'anticorps anti-EEa1, (B) le RTG a été étudié à l'aide de l'anticorps anti-Stx6, (C) les vésicules de stockage sont étudiées grâce à un anticorps anti-IRAP et (D) les lysosomes ont été marqués par l'anticorps anti-Lamp1. Les images sont traitées par image J et Imaris. Anova * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

C. Effet de l'anticorps C2 sur la régulation de l'expression membranaire du récepteur OX1

La troisième partie de l'étude concerne les effets de l'anticorps C2 sur la régulation de l'expression membranaire d'OX1R. Nous pouvons observer une interaction entre OX1R et deux vésicules, les endosomes et IRAP (Figure 3 A et C). Le C2 permet l'internalisation du récepteur et joue un rôle dans son recyclage à la membrane plasmique. En revanche, aucune interaction n'est observée entre OX1R et le RTG ainsi qu'avec les lysosomes. Le récepteur n'est donc pas dirigé vers les voies de dégradation ou de tri endocyttaire plus tardif (Figure 3 B et D).

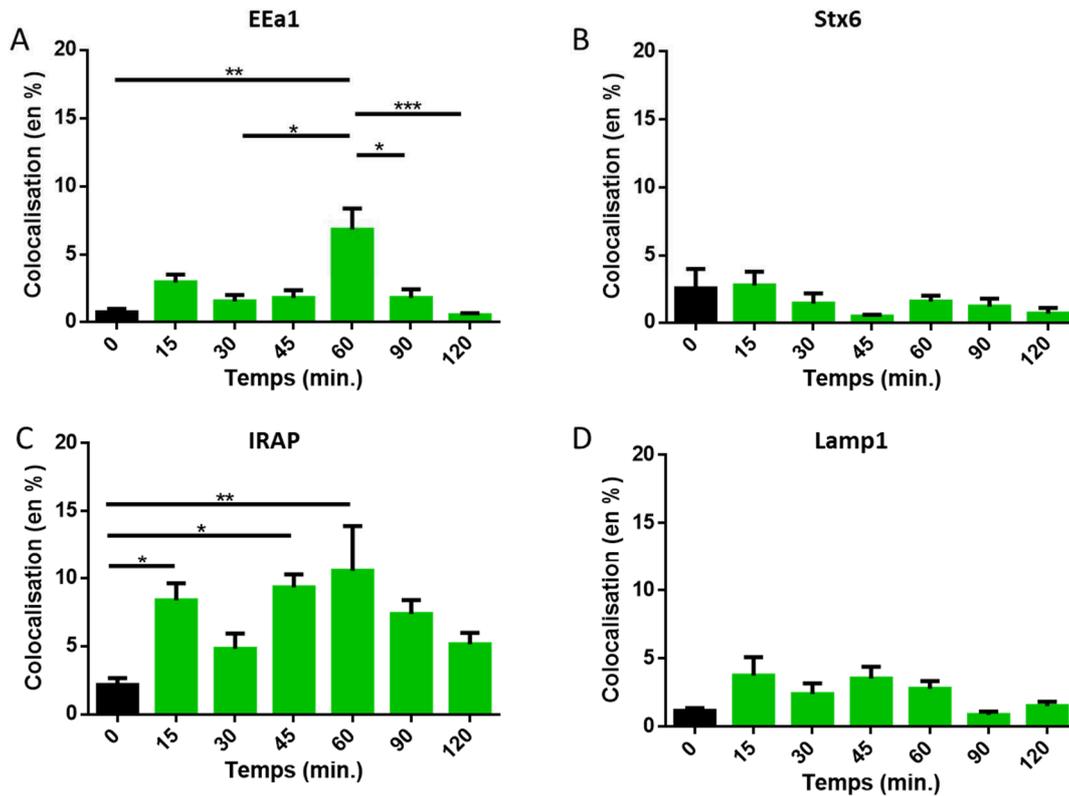


Figure 3 : Colocalisation entre OX1R et les différents compartiments cellulaires après activation par l'anticorps C2

Les cellules HEK OX1R sont traitées pendant 10 minutes avec du C2 à 0,13 μ M avant que les cellules soient fixées après un temps d'incubation de 0, 15, 30, 45, 60, 90 et 120 minutes. (A) Les endosomes sont marqués par l'anticorps anti-EEa1, (B) le RTG a été étudié à l'aide de l'anticorps anti-Stx6, (C) les vésicules de stockage sont étudiées grâce à un anticorps anti-IRAP et (D) les lysosomes ont été marqués par l'anticorps anti-Lamp1. Les images sont traitées par image J et Imaris. Anova * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

D. Comparaison des résultats en fonction de l'effet maximum de l'orexine A

Par la suite, nous avons voulu comparer les résultats obtenus en présence de l'almorexant et du C2 par rapport à ceux obtenus avec l'orexine A. L'orexine A est un des ligands naturels de l'OX1R, nous observons donc une internalisation du RCPG et son interaction avec différentes vésicules impliquées dans le trafic intracellulaire. Ce qui indique qu'une partie des récepteurs est probablement recyclée à la membrane et une autre dégradée dans les lysosomes. L'intérêt est donc de voir l'impact d'un ligand biaisé tel que l'almorexant sur le devenir d'OX1R au sein de la cellule et l'impact d'un autre agoniste d'OX1R tel que le C2. Nous observons que l'interaction du récepteur OX1 avec les endosomes et IRAP en présence d'orexine A est significativement plus importante qu'en présence de l'almorexant et du C2 pour la même durée après le traitement mais l'interaction avec le C2 est significativement plus importante que pour

l'almorexant (Figure 4B). En revanche, l'interaction du récepteur OX1 avec les lysosomes et les RTG en présence d'orexine A est significativement plus importante qu'en présence d'almorexant et du C2 pour la même durée après traitement (Figure 4B). Les résultats obtenus par analyse d'image sont observables sur les photos obtenues par microscopie confocale (Figure 4A).

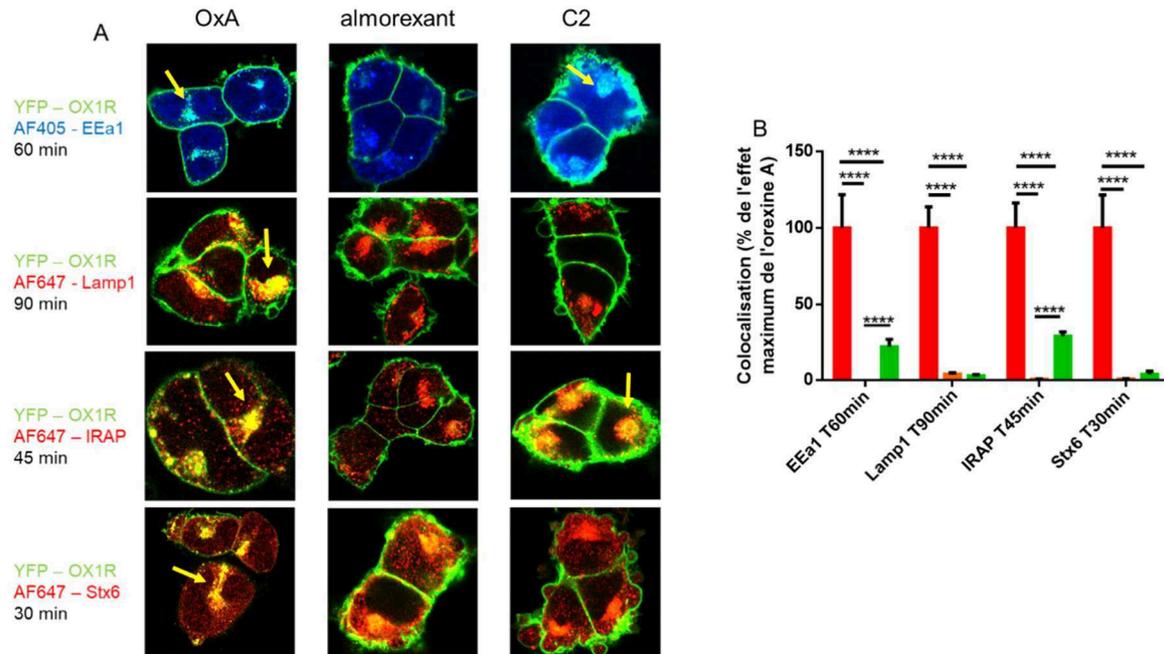


Figure 4 : Comparaison des résultats avec l'almorexant et le C2 par rapport à l'effet maximum de l'orexine A

Les cellules HEK OX1R où OX1R est couplé à la YFP sont marquées avec différents anticorps, pour les endosomes : l'anticorps anti-EEa1, pour les lysosomes : l'anticorps anti-Lamp1, pour le RTG : l'anticorps anti-Stx6 et pour les vésicules de stockage : un anticorps anti-IRAP. (A) Les images sont acquises par microscopie confocale (X630) et (B) traitées par image J et Imaris. T-test * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

IV. Discussion

Tout d'abord, nous pouvons confirmer que le récepteur OX1 est internalisé en présence de l'orexine A et va être dirigé vers de nombreuses vésicules impliquées dans le trafic intracellulaire. Les endosomes sont en effet, les vésicules qui vont prendre en charge le tri des RCPG et les adresser vers les différentes vésicules de transport. Or, nous montrons une interaction du récepteur OX1 avec EEa1. Par conséquent, le récepteur sera dirigé vers des voies intracellulaires. En effet, il a été montré que les RCPG suivent majoritairement, soit une voie de dégradation, soit la voie du recyclage à la membrane. Nous avons donc voulu savoir quel est le devenir de notre récepteur au sein de la cellule une fois activé. OX1R est en partie dégradé par les lysosomes. Une autre partie est recyclée *via* diverses voies vésiculaires telles que les vésicules exprimant la protéine IRAP mais aussi *via* le RTG qui est impliqué dans le

tri endocyttaire tardif (comparé aux endosomes), ce qui correspond à un schéma classique pour un RCPG (Hanyaloglu & von Zastrow, 2008b). Cependant, ces deux voies de trafic intracellulaire sont divergentes et produisent des effets opposés sur la signalisation cellulaire. En effet, les voies lysosomales représentent un mécanisme majeur induisant une régulation à la baisse du RCPG suite à son activation par un ligand (von Zastrow, 2003; Williams & Urbé, 2007). La voie de recyclage, quant à elle, va favoriser une récupération rapide de la réactivité cellulaire (Sorkin & Von Zastrow, 2002; von Zastrow, 2003). De plus, d'autres RCPG peuvent rester intacts et continuer à être fonctionnels vis-à-vis de ses voies de signalisation canoniques ou bien initier de nouvelles voies de signalisation à partir de la membrane endosomale (Sorkin & Von Zastrow, 2002). Ainsi, de nombreuses voies de signalisation peuvent être empruntées par un RCPG.

Il a donc été intéressant de regarder l'effet de l'almorexant qui est un ligand biaisé, un antagoniste de la voie calcique et un agoniste de la voie apoptotique d'OX1R. Nous avons pu voir que dans le cas de l'activation par l'almorexant, le récepteur OX1 n'était pas internalisé. Par conséquent, ce ligand impacte le récepteur au moment de l'internalisation en bloquant probablement les premières étapes de ce processus. En effet, certains facteurs jouent un rôle important dans la mise en place du processus d'internalisation, en particulier les β -arrestines. Les β -arrestines sont les régulateurs clefs en participant au phénomène de désensibilisation qui va conduire à une perte d'affinité du récepteur et stopper ainsi l'activation des voies de signalisation. Après l'activation du récepteur, les arrestines désensibilisent les RCPG en se liant aux récepteurs qui ont été phosphorylés par les GRK (G protein Receptor Kinases), bloquant ainsi l'activation des protéines G et initiant l'internalisation des récepteurs (Pierce & Lefkowitz, 2001). De plus, il a été montré que l'internalisation des RCPG par la voie des clathrines est également régulée par les fonctions de signalisation des β -arrestines (Fessart *et al.*, 2007). Par exemple, la phosphorylation de la β -arrestine 1 module de manière différentielle sa capacité à se lier à la clathrine et à l'AP-2 et bloque l'internalisation des récepteurs β 2-adrénergiques (β 2AR) (Khoury *et al.*, 2014). Par conséquent, lors de l'activation d'OX1R par l'almorexant, il est possible que celui-ci module la capacité du récepteur OX1 à être phosphorylé par les GRK et empêche ainsi le recrutement des β -arrestines.

L'activation d'OX1R par l'anticorps C2 permet une internalisation du récepteur OX1 ainsi qu'une interaction de celui-ci avec les endosomes et les vésicules exprimant IRAP. Par conséquent, l'anticorps C2 va impacter la signalisation intracellulaire du RCPG. Lors de précédentes études, il a été montré que l'ubiquitinylation des RCPG joue un rôle dans le devenir des récepteurs. En effet, l'ubiquitine, liée de manière covalente aux résidus cytoplasmiques de la lysine, fonctionne comme un déterminant de tri endocyttaire en favorisant l'endocytose initiale et/ou la voie lysosomale (Marchese *et al.*, 2008). Par exemple, l'ubiquitinylation du récepteur EGF (Epidermal Growth Factor) est requise pour le tri des

récepteurs internalisés vers les lysosomes mais pas pour l'endocytose initiale des récepteurs (Dunn *et al.*, 2004). Par conséquent, il est possible que l'anticorps C2 impacte le trafic intracellulaire du récepteur OX1 en modifiant sa capacité à être ubiquitinylé. En effet, son impact direct sur les processus de régulation de l'expression d'OX1R comme l'internalisation reflète son caractère d'agoniste biaisé, comme nous l'avons dit précédemment, l'anticorps C2 n'a aucun effet sur la voie de signalisation canonique du récepteur OX1 (relargage de Ca^{2+} intracellulaire) ni en terme d'activation, ni en terme d'inhibition. En revanche, cet anticorps semble avoir uniquement une action activatrice sur la voie proapoptotique.

Pour conclure, l'ensemble de ces données montre que l'expression membranaire du récepteur OX1 au sein de la cellule et son devenir sont différents en fonction du ligand. Par conséquent, ces données ont un intérêt d'un point de vue thérapeutique car l'almorexant comme l'anticorps C2 permettent au récepteur OX1 d'être exprimé à la surface cellulaire et ainsi d'être disponible pour son activité proapoptotique.

Discussion générale et perspectives

Dans un premier temps, j'ai montré que l'effet antitumoral des orexines au sein des adénocarcinomes coliques n'est pas un épiphénomène. Grâce à des expérimentations *in vitro*, *in vivo* et de façon plus originale *ex vivo*, j'ai montré que l'effet de l'orexine A est confirmé dans les adénocarcinomes canaux du pancréas (PDAC). Dans un second temps, pour valider la spécificité du système orexines/OX1R, un antagoniste d'OX1R, l'almorexant, a été utilisé. Étonnamment, cet antagoniste possède un effet antitumoral au sein des PDAC, cet effet a été validé au sein des adénocarcinomes coliques, c'est donc un ligand biaisé. En parallèle, un anticorps agoniste nommé C2 a été développé et ses effets sur les adénocarcinomes coliques ont été démontrés. À la suite de cela, je me suis demandée qu'elle était le devenir du récepteur OX1 à la membrane plasmique. L'originalité de cette étude réside dans l'utilisation de trois ligands de natures différentes : l'orexine A, le ligand naturel d'OX1R de nature peptidique, l'almorexant un ligand biaisé des OXR non peptidique et l'anticorps C2, un agoniste d'OX1R. Il a ainsi été montré que suivant la nature du ligand, le devenir du récepteur OX1 à la membrane plasmique différait.

Le 1^{er} objectif de ma thèse a été d'étudier le rôle des orexines et plus spécifiquement de l'OxA sur le PDAC chez l'Homme. Nos résultats ont montré que le récepteur OX1 est largement exprimé dans les PDAC issus de tumeurs prélevées chez les patients ainsi qu'au niveau d'AsPC-1, une lignée cellulaire dérivée d'un PDAC. L'OxA induit l'apoptose mitochondriale dans les cellules AsPC-1 et sur les coupes de tissu tumoral issu de patients, maintenues en culture. De plus, dans les modèles précliniques utilisés tels que la xénogreffe des cellules AsPC-1 et la xénogreffe de cellules issues de tumeurs prélevées chez un patient (PDX), l'OxA induit un effet antitumoral. Ces résultats corroborent les précédents résultats obtenus sur les adénocarcinomes du côlon (Voisin *et al.*, 2011).

Actuellement, les nouvelles thérapies traitant les cancers digestifs progressent. Par exemple, la virothérapie oncolytique a connu un essor avec le développement du virus T-VEC. Il détruit directement les cellules cancéreuses par lyse cellulaire. Son génome a été modifié afin d'altérer sa capacité à se reproduire dans les cellules saines alors qu'il se réplique dans les cellules cancéreuses. Ce type de traitements reste encore à optimiser car son action demeure relativement modeste (Stanford *et al.*, 2010; Bourke *et al.*, 2011; Melcher *et al.*, 2011). La mise en place de lymphocytes T génétiquement modifiés (lymphocytes T CAR) permet de montrer des effets prometteurs sur certains cancers avancés comme les leucémies et les lymphomes (Maude *et al.*, 2018). En effet, deux grands hôpitaux, Robert Debré et Saint Louis, ont reçu l'Autorisation Temporaire d'Utilisation (ATU) accordée par l'Agence Nationale de Santé et du Médicament (ANSM). Ces lymphocytes contiennent des gènes codant pour un anticorps qui peut détecter CD-19 un antigène exprimé sur les lymphocytes B. Un lentivirus, contenant les gènes codant pour l'anticorps, infectera les lymphocytes des patients et remplacera les gènes

présents au sein du lymphocyte T infecté, permettant la production de l'anticorps. Ces anticorps vont cibler les complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH), c'est donc un outil thérapeutique prometteur bien que peu de CMH soient spécifiques aux cellules cancéreuses. Les lymphocytes B sains et anormaux seront détruits, les patients auront une aplasie des lymphocytes B et recevront alors une perfusion d'immunoglobulines (Maude *et al.*, 2014; Maus *et al.*, 2014). De nouveaux traitements basés sur l'immunothérapie, orientent le système immunitaire contre les cellules tumorales. Un premier exemple s'intéresse à la protéine CTLA-4 qui est exprimée par les lymphocytes T. Les lymphocytes l'exprimant sont activés après que certains lymphocytes T aient reconnu leur cible et reçu un signal d'activation *via* CD80 et CD86. Plusieurs travaux ont visé à inhiber la protéine CTLA-4 *via* un anticorps synthétisé bloquant son activité, une régression des cancers du côlon, des sarcomes et des mélanomes a été observée. L'anticorps a donc été développé en version humanisée et testé chez l'Homme, le médicament est renommé Ipilimumab. Un second exemple s'est porté sur la protéine PD-1 qui est exprimée à la surface de nombreux lymphocytes T. Lorsque PD-1 se lie à PD-L1, elle conduit les cellules qui l'expriment à se détruire. Il a été observé que les cellules tumorales expriment à leur surface PD-L1 qui va stimuler PD-1, ceci va induire la destruction des lymphocytes T. Les premières études sur le cancer du poumon ont montré que 20% des patients obtenaient une régression durable. Ensuite, des études ont voulu évaluer l'effet de l'association de ces deux systèmes CTLA-4 et PD-1 vis-à-vis d'un mélanome métastatique. Environ 50% des patients ont montré une régression tumorale de plus de 50% à la suite de cette combo-thérapie (Larkin *et al.*, 2015). Le médicament résultant nommé nivolumab fait partie de nombreux essais cliniques. Une étude clinique au stade II impliquant le nivolumab est actuellement en cours sur le cancer du pancréas chez les patients avec ou sans chimiothérapie, mais semble être relativement décevant (Inman, 2017). Des études ont également été effectuées chez les patients ayant un cancer colorectal métastaté présentant une instabilité des microsatellites (MSI) avec le nivolumab. Ces patients (avec un cancer MSI) bénéficient moins de la chimiothérapie conventionnelle et ont une durée de vie plus courte que les patients ayant un cancer colorectal métastaté présentant des microsatellites stables (MSS). Ces types de cancer colorectaux métastatés présentant une MSI sont associés à une charge mutationnelle plus élevée, à une charge néo-antigénique tumorale et à une infiltration de cellules immunitaires denses. En conclusion, le nivolumab a fourni des taux de réponses prometteurs et durables avec une survie prolongée par rapport à la survie médiane anticipée chez ces patients (Overman *et al.*, 2017).

De notre côté, des études ont été menées sur des modèles murins de rectocolite hémorragique (RCH) et de pancréatite. Des études préliminaires ont montré qu'OX1R était fortement exprimé au cours de ces états inflammatoires chroniques. Sur les modèles de RCH, l'OxA induit une diminution de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires. Quant aux

modèles de pancréatite, une diminution de l'infiltrat lymphocytaire est observée avec l'OxA. En conséquence, l'ensemble de ces travaux montrent que l'OxA possède des effets anti-inflammatoires dans les maladies inflammatoires chroniques digestives telles que la RCH et la pancréatite. Ces maladies favorisant le développement de cancers (Messal *et al.*, 2018). Par conséquent, il serait intéressant d'étudier le taux d'expression de PD-1 dans les cancers développés sur inflammation et d'étudier les effets d'une combo-thérapie combinant les anti-PD-1 et l'orexine A.

De plus, les cancers du côlon en particulier métastasés, plus précisément présentant des MSS et du pancréas restent des cancers relativement résistants à ces nouveaux traitements d'immunothérapie de par l'importance du stroma et de la fibrose présente au sein de la tumeur qui ne permettent pas aux cellules immunitaires de pénétrer dans la masse tumorale. En effet, la pression interne au sein de la tumeur est souvent supérieure à celle de l'environnement l'entourant, ceci repousse donc de nombreux médicaments ainsi que les signaux chimiques utilisés par le système immunitaire pour cibler les cellules aberrantes. Bien que de nouvelles pistes thérapeutiques émergent de mois en mois les cancers demeurent encore une cause majeure de mortalité (Wolchok *et al.*, 2013; Larkin *et al.*, 2015).

De manière générale, les traitements chimiothérapeutiques conventionnels à large spectre agissent sur des processus cellulaires (division, survie...) communs aux cellules qu'elles soient saines ou tumorales, et ainsi induisent des effets secondaires délétères. En revanche, les thérapies ciblées incluant les inhibiteurs d'enzymes (kinases) impliquées dans diverses voies de signalisation et l'immunothérapie sont des traitements qui ne peuvent viser qu'un nombre restreint de cancers et donc de patients. Enfin, l'ensemble de ces traitements qu'ils soient à large spectre ou plus ciblés présentent à terme le développement d'une résistance par les cellules cancéreuses, par l'intermédiaire des cellules souches cancéreuses (CRC) et/ou par la mise en place d'une sélection cellulaire. Dans ce contexte, le ciblage d'une voie de signalisation comme l'apoptose qui est très souvent altérée dans les cancers, associée à l'expression d'un récepteur fonctionnel capable d'activer cette voie, représente un bon compromis entre les traitements à large spectre et les thérapies ciblées. Or, une des particularités des orexines est qu'elles sont spécifiques aux récepteurs OX1 qui sont exprimés de façon ectopique dans les cellules cancéreuses. De plus, il a été montré que l'expression d'OX1R perdurait dans les métastases hépatiques et de poumon et que l'orexine n'est pas présente dans les tumeurs. On peut très bien imaginer que les orexines par leur action antitumorale liée à l'apoptose mitochondriale, pourraient potentiellement représenter une alternative thérapeutique, probablement dans le cadre d'une combo-thérapie, dans le traitement de certains cancers incluant les cancers du côlon, du pancréas, du foie, gynécologiques, les neuroblastomes, de la prostate et les cholangiocarcinomes. En effet, notre équipe a montré que dans ces cancers une expression d'OX1R et l'induction de l'apoptose

par l'OxA. Un autre aspect prometteur est que des travaux au sein du laboratoire ont montré des effets de l'OxA sur des cellules résistantes à certains traitements. En effet, des cellules cancéreuses du côlon résistantes au 5-FU expriment toujours les récepteurs OX1 fonctionnels et capables de déclencher de l'apoptose après liaison de l'OxA (Voisin *et al.*, 2011). De la même manière, des cellules d'adénocarcinome du pancréas résistantes au Nab-paclitaxel sont toujours sensibles à l'OxA (Article en préparation). De plus, en collaboration avec Javier Vaquero (INSERM U938, Paris), nous avons montré que l'OxA est capable d'induire, dans les cellules de cholangiocarcinomes résistantes à l'Erlotinib, une apoptose mitochondriale. Ces résultats prometteurs montrent que l'OxA ou des agonistes plus stables d'OX1R pourraient être utilisés en tant que 3^{ème} ou 4^{ème} ligne de traitement lorsqu'un certain nombre de résistances se serait mis en place. Il est à noter que nos études actuelles ne semblent pas montrer le développement d'une résistance associée au système OxA/OX1R.

Le deuxième objectif de ma thèse a été d'étudier les effets d'un antagoniste de la voie calcique d'OX1R sur les adénocarcinomes du côlon et du pancréas ainsi que les effets d'un anticorps sur les adénocarcinomes du côlon. L'ensemble de nos études montre qu'OX1R est exprimé de manière aberrante dans certains cancers et que son activation par les orexines conduit à un effet antitumoral. Ces résultats démontrent que le développement de molécules agonistes à visée thérapeutique représente un enjeu majeur. En effet, l'orexine en elle-même présente deux inconvénients majeurs en terme de traitement, d'une part une sensibilité à la dégradation importante (temps de demi-vie d'environ 20 min dans le sang (Kastin & Akerstrom, 1999)) et d'autre part, un mode d'administration peu compatible avec un traitement. L'intérêt de développer des molécules ayant les mêmes propriétés antitumorales que les orexines et affichant une bonne résistance à la dégradation ainsi qu'un mode d'administration plus approprié permettrait d'envisager des essais thérapeutiques. Etonnamment, nous avons montré que l'almorexant qui est un antagoniste de la voie calcique, possède des propriétés agonistes pour la voie proapoptotique et pourrait être un bon candidat thérapeutique. En parallèle, le développement de l'anticorps C2 qui mime l'effet agoniste de la voie proapoptotique, sans avoir aucune action sur la voie calcique, représente aussi une alternative de traitement.

Le troisième objectif de ma thèse a été d'étudier la régulation de l'expression du récepteur OX1 à la membrane plasmique en présence d'OxA. Nous avons observé qu'une partie des récepteurs était dégradée dans la cellule pendant qu'une autre partie était recyclée à la membrane plasmique, suggérant que la cellule cancéreuse possède un signal permanent d'OX1R à sa surface. A l'inverse, comme nous pouvions nous y attendre, cette régulation de l'expression d'OX1R à la membrane des cellules est très différente en présence de

l'almorexant et de l'anticorps C2. En effet, une régulation du trafic intracellulaire d'OX1R est différente en présence de l'anticorps C2, le récepteur ne semble emprunter que la voie de recyclage. Ces résultats sont cohérents avec la littérature. En effet, le tri endocytaire d'un RCPG peut différer en fonction du ligand qui l'active, suggérant ainsi une diversité parmi les ligands pouvant expliquer une diversité d'effet. Différentes modulations dans la signalisation des RCPG sont possibles, telles que l'ubiquitinylation des récepteurs (Dunn *et al.*, 2004) qui intervient dans l'adressage des récepteurs aux lysosomes. Ensuite, d'autres modulations sont possibles vis-à-vis du complexe ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) (Hurley & Emr, 2006), des protéines GASP (GPCR-associated sorting proteins) (Whistler *et al.*, 2002) et de la protéine SNX-1 (Sorting Nexin 1) (Chin *et al.*, 2001) qui jouent un rôle dans le trafic intracellulaire impliqué entre les endosomes et les lysosomes.

En revanche, aucune internalisation d'OX1R n'est observée après traitement à l'almorexant. Pour tenter d'expliquer ce résultat, des études préliminaires dans le laboratoire visent à mettre en évidence le recrutement de la β -arrestine 2 et de la protéine tyrosine phosphatase SHP2 par la technique du BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer), technique qui permet de démontrer des interactions physiques entre deux protéines. Cette technique est basée sur le transfert d'énergie entre un émetteur de luminescence (système luciférase/luciférine : Rluc8) et un accepteur fluorescent (Yellow Fluorescent Protein). Ce transfert ne peut avoir lieu que lorsque les deux protéines portant chacune un des groupes émetteur/accepteur sont extrêmement proches. Dans la technique de BRET utilisée par notre équipe, la luciférase de Renilla est fusionnée à une protéine d'intérêt (ici la SHP2 ou la β -arrestine 2 (collaboration avec X. Iturrioz, INSERM U1050, Paris)). La YFP est fusionnée au récepteur OX1, susceptible d'interagir avec la SHP2 et/ou la β -arrestine 2. La luciférase est excitée à l'aide d'un substrat qui pénètre dans la cellule (coelenterazine). Si les deux protéines sont proches ($d < 10$ nm), un transfert d'énergie peut avoir lieu entre les deux molécules avec l'émission d'une fluorescence caractéristique à 530 nm. En absence de toute interaction, l'ajout de coelenterazine sur des cellules co-exprimant les deux protéines recombinantes se traduit par un spectre d'émission avec un pic centré à 480 nm. Nous avons montré que le système OX1R/OxA recrutait la SHP2 ainsi que la β -arrestine. Ces deux résultats confirment physiquement les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo*. En effet, le recrutement de la SHP2 lors de l'activation d'OX1R par l'OxA induit la voie d'apoptose mitochondriale. Le recrutement de la β -arrestine 2 corrobore nos résultats obtenus sur le trafic intracellulaire, puisque le recrutement de cette protéine représente la première étape des phénomènes de désensibilisation/internalisation associés aux RCPG (Lefkowitz & Whalen, 2004). En présence d'almorexant, la β -arrestine n'est pas recrutée car aucun signal de BRET n'a pu être détecté entre celle-ci et OX1R. Concernant le recrutement de la SHP2 par OX1R en présence d'almorexant, les études sont actuellement en cours. Les résultats obtenus sur l'activation de

la voie apoptotique nous suggèrent que l'interaction entre l'almorexant et le récepteur OX1R induit la phosphorylation des sites ITIM indispensable au recrutement de la protéine SHP2 et donc à l'induction de l'apoptose, comme cela a été montré pour l'orexine A (Voisin *et al.*, 2008) mais que les sites de phosphorylation indispensable au recrutement des β -arrestines ne le seraient pas.

Une question se pose, comment l'interaction entre l'almorexant et le récepteur peut-elle différencier ces deux types de régulation sachant qu'elles sont dépendantes de la protéine G ? Une des hypothèses serait que la protéine G pourrait être recrutée au niveau du récepteur mais que seul le dimère $\beta\gamma$ jouant un rôle important dans la phosphorylation des sites ITIM par des kinases de type Src, serait libéré. A l'inverse, vu que l'almorexant est un antagoniste de la voie calcique la sous unité α_q ne serait pas active et ainsi ne permettrait pas les phosphorylations des sites présents au niveau de l'extrémité C-terminale d'OX1R. L'état actuel des connaissances structurales et mécanistiques des RCPG suggèrent que ceux-ci peuvent exister dans plusieurs conformations, ce qui signifie qu'il existe plusieurs états actifs et inactifs de ces RCPG et que ces différents états peuvent être stabilisés en fonction du ligand (Manglik *et al.*, 2015; Gurevich & Gurevich, 2017).

Nous pouvons supposer que les conformations actives d'OX1R en présence, soit de l'OxA, soit de l'almorexant, sont différentes. Or, nous savons qu'un ligand biaisé comme l'almorexant peut activer une voie de signalisation dépendante du récepteur mais en inhiber une autre (Bouvier, 2012). Cependant, les deux voies de signalisation contrôlées par OX1R, à savoir, la voie canonique calcique et la voie proapoptotique, sont toutes deux médiées par la protéine Gq. En effet, la sous-unité α_q une fois activée peut induire l'activation de la PLC tandis que le dimère $\beta\gamma$ permettrait l'activation des kinases de type Src (Luttrell *et al.*, 1996) permettant le recrutement de SHP2. Donc, la question est de savoir si la protéine G peut être recrutée par OX1R après liaison de l'almorexant sans que G α_q soit activée alors que le dimère $\beta\gamma$ est fonctionnel. Une étude a montré que l'agoniste biaisé du récepteur DRD2 (récepteur à la dopamine D2) peut activer G α mais inhibe l'activité du dimère $\beta\gamma$ (Brust *et al.*, 2015). Afin de répondre à cette question, nous pourrions étudier dans un premier temps, les relations de structure/fonction du récepteur. En effet, la structure cristallographique du récepteur OX2R en présence de l'antagoniste suvorexant (qui lui aussi présente des propriétés proapoptotiques) a été obtenue récemment (Yin *et al.*, 2015). On pourrait donc comparer la structure d'OX1R en présence de suvorexant ou en présence d'OxA (Nicole *et al.*, 2015) par des techniques de modélisation moléculaire associées à de la dynamique, afin d'identifier les différentes zones d'interaction avec les deux ligands. Un modèle 3D du récepteur OX1R en présence d'OxA a été obtenu (Nicole *et al.*, 2015) et il a été depuis cristallisé en présence du suvorexant (Yin *et al.*, 2016). A l'aide des techniques de mutagénèse dirigée associées à des études fonctionnelles des mutants (capacité à induire un flux de calcium, à induire une apoptose, à

recruter SHP2 et/ou la β -arrestine...), il pourrait être possible d'identifier les résidus clés impliqués dans l'activation de ces deux voies de signalisation. Au niveau mécanistique, en revanche, il sera intéressant d'étudier le relargage du dimère $\beta\gamma$ par l'almorexant et son action vis à vis de la tyrosine kinase Src. L'équipe de Hynes a mis en place une technique de BiFC (bimolecular fluorescence complementation) pour visualiser le dimère $\beta\gamma$. Cette technique consiste à produire un signal fluorescent lorsque deux fragments non fluorescents de la YFP sont réunis par des interactions entre des protéines fusionnées à chaque fragment. Ils ont donc fusionné un fragment YFP à l'extrémité N-terminale de la sous-unité β et un autre fragment d'YFP à l'extrémité C-terminale de la sous-unité γ . Lorsque ces deux protéines sont exprimées ensemble, il y a émission d'un signal fluorescent dans les cellules. Cette technique permet la visualisation de paires de $\beta\gamma$ qui forment des complexes. En revanche, aucune fluorescence n'est obtenue si β et γ ne peuvent s'associer (Hynes *et al.*, 2004). Par la suite, une équipe a regardé au BRET, l'interaction de ce dimère $\beta\gamma$ avec l'adénylate cyclase couplée à la luciférase de Renilla. Cette étude montre l'interaction de $\beta\gamma$ et de l'adénylate cyclase lors de l'activation du récepteur β -adrénergique en présence d'un agoniste, l'isoprénaline (Rebois *et al.*, 2006). Par conséquent, il pourrait être intéressant d'utiliser cette technique et de l'associer à du BRET en présence de la protéine c-Src couplée à la luciférase de Renilla pour regarder l'interaction du dimère $\beta\gamma$ et de la protéine c-Src en présence d'almorexant.

En ce qui concerne la régulation de l'expression du récepteur OX1 sur la membrane plasmique, des études ont montré que des ligands pouvaient rester liés aux récepteurs endocytés et ainsi maintenir l'activité de ces récepteurs dans les endosomes. Cette activation prolongée permet aux protéines de signalisation de se lier aux RCPG présents dans les endosomes. En effet, par exemple, les complexes récepteur-ligand des RTK (récepteurs à activité tyrosine kinase) tels que l'EGF (Epidermal Growth Factor), le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) et le facteur de croissance nerveux (NGF) ne vont pas se dissocier du récepteur malgré la diminution du pH au sein des endosomes (Zapf-Colby & Olefsky, 1998; Sorkin & Von Zastrow, 2002; Hanyaloglu & von Zastrow, 2008b). Cependant, tous les ligands d'un même récepteur ne vont pas agir de la même manière. En effet, le facteur de croissance transformant α (TGF- α) qui se lie au récepteur de l'EGF est plus sensible au pH des endosomes (French *et al.*, 1995), il va donc se dissocier du récepteur et donc favoriser le recyclage à la membrane des récepteurs internalisés. Alors que l'occupation du récepteur par les ligands dans les endosomes favorise le tri des récepteurs aux lysosomes. Même si de nombreux RCPG se sont avérés endocytés avec leur ligand lié, seuls quelques cas ont été étudiés. Dans certains cas, tels que l'endocytose des catécholamines par les récepteurs β 2AR, ou de la substance P (neurotransmetteur de peptide de tachykinine de 11 acides aminés), par les récepteurs aux neuropeptides NK1, la dissociation des ligands se produirait peu après l'endocytose et serait favorisée par l'environnement légèrement acide des

endosomes précoces (Grady *et al.*, 1995; Pitcher *et al.*, 1998). Dans d'autres cas, tels que l'endocytose de certains ligands peptidiques par les récepteurs neuropeptidiques opioïdes, les ligands pourraient rester liés au récepteur dans les endosomes tardifs et peut-être même dans les lysosomes (Gaudriault *et al.*, 1997; Sorkin & Von Zastrow, 2002; Hanyaloglu & von Zastrow, 2008b). Par conséquent, l'ensemble de ces données montrent qu'il peut y avoir un impact différent suivant les ligands sur le devenir des récepteurs mais également sur la transduction du signal au cours du trafic intracellulaire.

Pour conclure, le système OxA/OX1R a un rôle anti-apoptotique et antitumoral dans les cancers du pancréas. Ces résultats ont été obtenus grâce à des études sur des modèles précliniques humains *ex vivo* et également des modèles précliniques murins *in vivo*. De plus, il a été montré qu'un antagoniste des récepteurs aux orexines était un ligand biaisé et induisait l'apoptose *via* OX1R dans les cancers du côlon et du pancréas. Et, en parallèle, l'étude d'un anticorps agoniste, nommé C2, a montré qu'il activait la voie apoptotique *via* OX1R mais qu'il n'induisait pas la mobilisation du calcium, c'est donc un agoniste biaisé. Ceci a permis de développer deux nouveaux agents thérapeutiques. Pour finir, des études en microscopie confocale ont permis d'expliquer comment se déroulait la régulation de l'expression d'OX1R à la membrane plasmique en présence de ces ligands de nature différente.

Publications et communications

I. Publications

J'ai participé à diverses publications au sein de mon laboratoire :

Dayot, S., Speisky, D., Couvelard, A., Bourgoïn, P., Gratio, V., Cros, J., *et al.* (2018) In vitro, in vivo and ex vivo demonstration of the antitumoral role of hypocretin-1/orexin-A and almorexant in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncotarget*, **9**, 6952–6967.

Messal, N., Fernandez, N., **Dayot, S.**, Gratio, V., Nicole, P., Prochasson, C., *et al.* (2018) Ectopic expression of OX1R in ulcerative colitis mediates anti-inflammatory effect of orexin-A. *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*, **1864**, 3618–3628

Couvineau, A., **Dayot, S.**, Nicole, P., Gratio, V., Rebours, V., Couvelard, A., Voisin, T. (2018) The anti-tumoral properties of orexin/hypocretin hypothalamic neuropeptides: an unexpected therapeutic role. *Frontiers in Endocrinology*, **9**: 573.

II. Encadrements

Au cours de ma thèse j'ai également encadré deux étudiants en BTS, Ivan et Laurine et un étudiant en Licence 2 Lorenzo dont les projets étaient :

- de m'aider à confirmer l'hypothèse qu'un autre type de mort cellulaire était impliqué en présence de l'orexine A et de l'almorexant, dans l'inhibition de la croissance des cellules qui expriment OX1R
- d'étudier la voie de dégradation des récepteurs OX1 vers les lysosomes en présence d'orexine A,
- d'étudier la régulation de l'expression du récepteur OX1 à la surface membranaire de cellules d'adénocarcinome de pancréas en présence d'orexine A.

III. Présentations en congrès

J'ai aussi participé à de nombreux congrès lors desquels j'ai présenté mon travail sous forme de communication orale ou de poster.

Communication orale :

Dayot S., Gratio V, Nicole P, Voisin T and Couvineau A. Almorexant: a new promising molecule in the treatment of digestive cancers. Summer school "A systems approach to cardiovascular and metabolic diseases", Bad Saarow, Germany 2016

Dayot S., Gratio V, Le Guilloux G, Nicole P, Voisin T et Couvineau A. Un somnifère peut-il avoir un intérêt sur les cancers digestifs ? CECED, Paris, France, 2017

Dayot S, Gratio V, Nicole P, Voisin T et Couvineau A. Le rôle antitumoral de l'almorexant dans les cancers digestifs : impact sur l'internalisation d'OX1R. CECED, Marseille, France 2018

Dayot S, Couvelard A, Bourgoïn P, Gratio V, Cros J, Rebours V, Sauvanet A, Paradis V, Ruzsniowski P, Voisin T and Couvineau A. Anti-tumoral properties of orexin-A, almorexant and an agonist antibody (C2) in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). AFRCP, Clichy, France, 2018

Poster :

Dayot S, Gratio V, Le Guilloux G, Nicole P, Voisin T et Couvineau A. Un somnifère peut-il avoir un intérêt sur les cancers digestifs ? 12^e colloque annuel du Cancéropôle Île-de-France sur le sujet de l'immunothérapie dans le domaine du cancer, Paris, France 2016

Dayot S, Gratio V, Le Guilloux G, Nicole P, Voisin T and Couvineau A. Can a sleeping pill have an interest in the treatment of digestive cancers? DDW, Chicago, Etats Unis, 2017

Dayot S, Gratio V, Le Guilloux G, Nicole P, Voisin T and Couvineau A. Almorexant and C2 antibody mimic the anti-tumor properties of orexin A in digestive cancers. GDR, Paris, France, 2017

Dayot S, Gratio V, Benadda S, Nicole P, Saveanu L, Voisin T and Couvineau A. Impact of orexin-A and almorexant, two pancreatic cancer antitumoral molecules, on the regulation of OX1R expression at the cell surface. AACR, Boston, Etats Unis, 2018

Autres publications

Partie IV : L'expression ectopique d'OX1R dans la
rectocolite hémorragique induit un effet anti-
inflammatoire de l'orexine-A

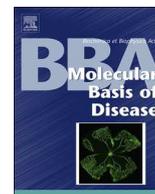
I. Préambule

OX1R est exprimé dans bon nombre de cancers incluant les cancers du côlon (Voisin *et al.*, 2011), du pancréas (Dayot *et al.*, 2018) et du foie. Cette expression est précoce puisque des études préliminaires ont montré l'expression d'OX1R dans des polypes dysplasiques et dans les lésions précancéreuses pancréatiques (PanIN) chez l'Homme. Il est clairement établi que l'inflammation chronique est un terrain favorable au développement tumoral (Fichtner-Feigl *et al.*, 2015). Environ 20% des cancers développés chez l'Homme se déclarent dans un environnement inflammatoire chronique. Récemment, nous avons montré que le récepteur OX1R était fortement exprimé dans les MICI (maladie de Crohn et rectocolite hémorragique) et les pancréatites. Basés sur ces observations, nous avons étudié le rôle de l'OxA sur la rectocolite hémorragique (RCH) à l'aide de deux modèles murins incluant un modèle induit chimiquement (souris DSS (Dextran Sulfate Sodium)) et un modèle de souris génétiquement modifiée (souris IL-10^{-/-}, Nox1^{-/-}). Nos résultats indiquent que l'injection intrapéritonéale quotidienne d'OxA améliore fortement le DAI (Disease Activity Index) déterminé par la mesure du poids, de la longueur du côlon, la présence de diarrhées et de sang dans les selles. Ces observations sont confirmées par les aspects histologiques de l'épithélium colique. L'effet anti-inflammatoire de l'OxA a été évalué sur le profil de sécrétion de certaines cytokines extraites des côlons issus des souris traitées par le DSS. L'analyse du profil cytokinique révèle que l'OxA réduit fortement la sécrétion de cytokines dites pro-inflammatoires comme le TNF α , l'IL6, l'IL8 et IL1 β . A l'inverse, l'OxA n'a aucun effet sur l'IFN γ , l'IL10 et IL12. Le développement récent par le groupe d'E. Ogier-Denis (INSERM U1149/CRI) d'une souris génétiquement modifiée (modèle EXCY2) développant spontanément une RCH (Tréton *et al.*, 2014) et qui consiste en un double KO de IL10 et de Nox1 (IL10^{-/-} ; Nox1^{-/-}) représente un très bon modèle pour étudier l'effet d'OxA sur les MICI et sur le développement de cancers initiés par l'inflammation. En effet, dans ce modèle, les souris développent : 1) une colite spontanée à l'âge de 6/7 semaines avec un gradient de sévérité du rectum au caecum qui reproduit très bien les altérations moléculaires observées dans la RCH, telles que la perte de cellules à mucus, la dérégulation du stress du réticulum et l'effet protecteur du tabac ; 2) spontanément des cancers coliques au bout de 8 mois (pour 40% des souris) et ; 3) une cholangite modérée. Nos résultats montrent que le traitement à l'OxA améliore très nettement la colite développée à 10 semaines chez les souris EXCY2. De plus, nos données montrent qu'OxA induit une forte amélioration des symptômes observés chez ces souris (score DAI) et un profil cytokinique qui indique qu'OxA induit une inhibition de la sécrétion de TNF α , l'IL6, l'IL8, IL1 β et MCP1. Je suis co-auteur du papier (Messal *et al.*, 2018).

De la même manière, nous avons montré qu'OX1R est fortement exprimé au cours de la pancréatite chez l'Homme alors que son expression est uniquement présente dans les ilots

de Langerhans dans le pancréas sain (Couvelard *et al.*, 2016). Un des modèles murins les plus utilisés pour étudier la pancréatite consiste à injecter de la ceruléine (un analogue de la cholécystokinine) chez l'animal entraînant à l'analyse histologique, l'apparition d'une fibrose, d'une inflammation chronique et d'une transition acino-canalair. Chez les souris traitées par l'OxA, les transitions acino-canalaires sont fortement diminuées. Le traitement par l'OxA diminue la fibrose pancréatique. De plus, le traitement par OxA réduit l'infiltration lymphocytaire évaluée par immunohistochimie utilisant un anticorps anti-CD45 associé à l'analyse d'image quantitative. Ces travaux préliminaires ont fait l'objet d'une communication écrite dans laquelle je suis 6^{ème} auteur (Couvelard *et al.*, 2016).

En conséquence, l'ensemble de ces travaux préliminaires montrent que l'OxA possède, outre des effets anti-tumoraux, des effets anti-inflammatoires dans les maladies inflammatoires chroniques digestives telles que la RCH et la pancréatite.



Ectopic expression of OX1R in ulcerative colitis mediates anti-inflammatory effect of orexin-A

N. Messal^a, N. Fernandez^b, S. Dayot^a, V. Gratio^a, P. Nicole^a, C. Prochasson^a, I. Chantret^c, G. LeGuilloux^a, A. Jarry^d, A. Couvelard^a, X. Tréton^b, T. Voisin^a, E. Ogier-Denis^b, A. Couvineau^{a,*}

^aINSERM UMR1149/Inflammation Research Center (CRI), Team “From inflammation to cancer in digestive diseases” labeled by “la Ligue Nationale contre le Cancer”, Paris-Diderot University, DHU UNITY, 75018 Paris, France

^bINSERM UMR1149/Inflammation Research Center (CRI), Team “Intestinal inflammation”, Paris-Diderot University, DHU UNITY, 75018 Paris, France

^cINSERM UMR1149/Inflammation Research Center (CRI), Team “Inflammatory and stress responses in chronic liver diseases”, Paris-Diderot University, DHU UNITY, 75018 Paris, France

^dEA4273 Biometadys, Faculté de Médecine, Université de Nantes, 1 Rue Gaston Veil, 44035 Nantes, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Orexins
Neuropeptide
GPCR
Inflammation
Inflammatory bowel disease
Ulcerative colitis

ABSTRACT

Orexins (orexin-A and orexin-B) are hypothalamic peptides that are produced by the same precursor and are involved in sleep/wake control, which is mediated by two G protein-coupled receptor subtypes, OX1R and OX2R. Ulcerative colitis (UC) is an inflammatory bowel disease, (IBD) which is characterized by long-lasting inflammation and ulcers that affect the colon and rectum mucosa and is known to be a significant risk factor for colon cancer development. Based on our recent studies showing that OX1R is aberrantly expressed in colon cancer, we wondered whether orexin-A could play a role in UC. Immunohistochemistry studies revealed that OX1R is highly expressed in the affected colonic epithelium of most UC patients, but not in the non-affected colonic mucosa. Injection of exogenous orexin-A specifically improved the inflammatory symptoms in the two colitis murine models. Conversely, injection of inactive orexin-A analog, OxB7–28 or OX1R specific antagonist SB-408124 did not have anti-inflammatory effect. Moreover, treatment with orexin-A in DSS-colitis induced OX1R^{-/-} knockout mice did not have any protective effect. The orexin-A anti-inflammatory effect was due to the decreased expression of pro-inflammatory cytokines in immune cells and specifically in T-cells isolated from colonic mucosa. Moreover, orexin-A inhibited canonical NFκB activation in an immune cell line and in intestinal epithelial cell line. These results suggest that orexin-A might represent a promising alternative to current UC therapies.

1. Introduction

Ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease are the two main forms of chronic inflammatory bowel diseases (IBD). UC is a chronic, relapsing-remitting and disabling disease that specifically affects the mucosa and superficial submucosa of the colon and rectum, with a distal to proximal gradient of inflammation [1]. UC is characterized by mucosal architectural changes, including early alterations of mucus-secreting goblet cells, crypt distortion, cryptitis, and typical crypt abscesses resulting from the transepithelial infiltration of immune cells during the acute phase of the disease [1]. In addition, these lesions can over time evolve towards dysplasia and cancer [2]. The exact etiology of UC remains unknown, and the course of the disease is variable. Multiple pathogenic factors are thought to be involved in UC, including

environmental changes, susceptibility gene variants, dysbiosis, and dysregulated intestinal innate and adaptive immune responses [3]. Recently, the inflammasome pathway, regulatory RNAs, damage-associated molecular patterns (DAMPs) as well as ER stress in epithelial cells have all been associated with UC [3]. Currently, the treatment of UC remains limited and varies with the severity of the symptoms. The failure or intolerance to drug therapy, or the constant battle with the disease (acute severe colitis, perforation, uncontrollable bleeding, severe side effects of the medications and risk of cancer) are all indications for colectomy [4]. Thus, the identification of new therapeutic targets represents a major challenge in the treatment of UC.

Targeting G protein-coupled receptors (GPCRs), a large superfamily (800 members) of seven transmembrane cell surface receptors, has demonstrated significant potential for the treatment of chronic

* Corresponding author at: INSERM U1149/Inflammation Research Center (CRI), Paris-Diderot University, DHU UNITY, Faculté de Médecine Site Bichat, 16, rue H. Huchard, 75018 Paris, France.

E-mail address: alain.couvineau@inserm.fr (A. Couvineau).

<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.08.023>

Received 30 April 2018; Received in revised form 7 August 2018; Accepted 17 August 2018

Available online 18 August 2018

0925-4439/ © 2018 Published by Elsevier B.V.

inflammatory diseases [5]. Most of those receptors are involved in inflammation and more specifically in colitis such as i) chemokine receptors including CCR5 [6], CCR6 [7]; ii) histamine receptor such as H4R [8]; cannabinoid receptor such as CB2 [9]; some orphan receptors [10] and; iii) neuropeptide receptors including VPAC/PACAP receptors [11].

Orexins (OxA and OxB) are hypothalamic neuropeptides that are both produced from the 131-residues prepro-orexin precursor [12]. These two peptides have been shown to be involved in multiple physiological processes, including the regulation of the sleep/wakefulness state, energy homeostasis, reward seeking, and drug addiction [13,14]. While the most important target of the orexins is the central nervous system, orexins also play a role in various peripheral organs such as the intestine, pancreas, adrenal glands, kidney, adipose tissue and reproductive tract [15], although their roles remain controversial [16]. Studies have demonstrated that OxA exerts neuroprotective effects, suggesting that it could affect the microglia, the resident macrophage-like cells of the brain [17]. In post-stroke cerebral neuroinflammation, treatment with OxA could reduce the infarct size through a microglial-mediated pathway inducing modulation of immune mediators [18]. Recent study reveals that OxA improved the survival of mice in which lipopolysaccharide (LPS) was intraperitoneally injected [19]. However, the role of orexins in neuroinflammation is still weakly documented and to date, the potential modulatory role of orexins in chronic inflammation, including IBD, is entirely unknown.

Orexins mediate their central and peripheral biological effects by binding to two GPCR subtypes, OX1R and OX2R [20], leading to the subsequent release of intracellular calcium transients via a Gq-dependent pathway [21]. Our group has recently reported that: 1) OX1R is highly expressed in colon, pancreas and prostate cancers, but is not detectable in normal tissue counterparts [22–24]; 2) OxA and OxB induce a massive apoptosis in cell lines derived from colon, pancreas and prostate cancers [22–24]; and 3) OxA and OxB display an anti-tumor effect in nude mice xenografted with these cell lines [22,24]. Considering our data in colon cancer and the potential role of orexins in neuroinflammation, we hypothesized that the OX1R/OxA pathway may have an important role in colonic inflammation in UC.

We provide here the first demonstration that OX1R is aberrantly expressed in the inflamed mucosa of UC patients, both in the epithelial and immune cells. This expression is associated with a strong specific immunomodulatory effect of OxA via OX1R and down-regulation of the pro-inflammatory cytokine production and secretion, as shown in two murine models recapitulating either the acute or chronic phase of UC.

2. Materials and methods

2.1. Patients and tissue collection

Nineteen patients (7 men and 12 women) with UC were selected from the records of the Departments of Pathology at the Beaujon Hospital, Clichy, France and the Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, Nantes, France. Charts from patients were retrospectively reviewed for clinical and pathological data. The median age was 32 years (range 20–53). It should be noted that 10/19 patients have received a drug therapy whose 8 patients presented a drug resistance. The use of human material and retrospective study were approved by the Institutional Review Board (CEERB GHU Paris Nord No. IRB12-059 and 12-033).

2.2. Animal procedures

Wild-type (wt) female BALB/c mice (Harlan laboratories), 7 to 12 weeks of age (weight 18–22 g), or 8 weeks of age (weight 18–22 g) female wt C57BL/6 or female C57BL/6 IL10^{-/-}NOX1^{-/-} or female C57BL/6 OX1R^{-/-} mice were co-housed in filter-topped cages in a 12-h light/dark cycle with environmental enrichment. Food pellets

(standard diet) and water were provided *ad libitum*. The animals were treated according to the guidelines of the Ministère de la Recherche et de la Technologie (Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche), and experiments were approved by the Comité d'Éthique Paris Nord (No 121).

DSS-induced colitis was induced in wt BALB/c, wt C57BL/6 and C57BL/6 OX1R^{-/-} mice by oral treatment with tap water containing 5% (w/v) of DSS (TdB Consultancy, Uppsala, Sweden) for wt BALB/c mice or 3.5% (w/v) of DSS for wt C57BL/6 and C57BL/6 OX1R^{-/-} mice. DSS mice were treated by i.p. injection of 0.22 μmol/kg OxA or OxB7-28 inactive analog or SB-408124 antagonist two days before DSS induction, followed by daily i.p. injection of 0.22 μmol/kg OxA or OxB7-28 inactive analog or SB-408124 antagonist for 7 days in the absence or presence of the SB-408124 OX1R antagonist. C57BL/6 IL10^{-/-}NOX1^{-/-} mice, 8 weeks of age, were treated with 2 i.p. injections of 0.22 μmol/kg OxA per week for 3 weeks. A group of IL10^{-/-}NOX1^{-/-} mice were also treated by gavage every day with 53 mg/kg of 5-ASA or water (control mice) for 3 weeks. All control mice (wt BALB/c, wt C57BL/6, C57BL/6 IL10^{-/-}NOX1^{-/-} and C57BL/6 OX1R^{-/-}) received the same volume of PBS by injection or oral gavage.

UC symptoms were monitored by measuring the colon length (DSS-induced colitis model), weight and DAI (Disease Activity Index) score, which was determined by the presence and severity of diarrhea, blood in the stool, inflammation, edema, and weight loss. The DAI scores ranged from 0 (no symptoms) to 4 (watery diarrhea, blood in the whole colon, heavy inflammation, ulcerations and edema). The animals were randomly assigned to each treatment group. Data processing did not exclude results from any of the animals.

2.3. Histopathological analyses

Colons from the two UC mouse models were collected and the length was measured after sacrifice. Sections (0.5 cm) of the distal, medium and proximal colon were cut, fixed in formalin and embedded in paraffin blocks (Shandon Cytoblock, Thermo Scientific, USA), then cut into 3 μm sections, which were then stained with hematoxylin and eosin and periodic acid–schiff. A histological score (HAI) was determined by scoring the damage of the crypt, inflammatory infiltrate, number of goblet cells, and integrity of epithelium were scored from 0 (normal) to 4 (severe) in a double blinded fashion by two pathologists. OX1R expression was assessed by IHC in human and mice. After de-waxing, the 3 μm paraffin sections were rehydrated, antigen retrieval was performed by pretreatment with high temperature at pH 9, and immunohistochemical procedures were carried out using an automated immunohistochemical apparatus according to the manufacturer's instructions (Bond-Max slide stainer, Menarini, Leica Microsystems). Briefly, after antigen retrieval, sections were incubated for 30 min with a polyclonal anti-OX1R antibody (Life Technology, PA5-33837, polyclonal rabbit, 1/100), rinsed, and then incubated with a biotinylated secondary rabbit anti-goat antibody (Vector BA-500, 1/400). Sections were rinsed and the reaction was developed according to the manufacturer's guidelines (streptavidin-peroxidase with an automate BOND, Leica Microsystems). Substitution of the primary antibody with PBS was used as a negative control. OX1R immunostaining scores were obtained by multiplying the intensity (negative, 0; weak, 1; moderate, 2; and strong, 3) by the percentage of stained epithelial cells (0–300) by high-power field (20×) and were performed by three investigators. Specificity of the anti-OX1R antibody was tested using recombinant HEK-OX1R cells expressing OX1R and the parental HEK cells. Moreover, addition of immunogenic peptide to the incubation completely abolished labeling by the anti-OX1R antibody.

2.4. Cytokine quantification

Colonic tissues from control, DSS (wt BALB/c, wt C57BL/6 and

OX1R^{-/-} mice) and IL10^{-/-} NOX1^{-/-} mice were collected as described above, washed and cut in small pieces. For cytokine/chemokine quantification, tissues suspended in 1 ml of PBS containing 1% (v/v) anti-Protease and anti-Phosphatase Inhibitor Cocktail (Thermo Scientific No. 78441) were homogenized at 30 Hz for 5 min using the TissueLyser technology (Qiagen). Colon extracts were obtained by centrifugation at 10,000 × g for 10 min, and cytokine and chemokine (IL-6, IL-10, MCP-1, INF-γ, TNFα and IL-12p70) levels were assessed using the Cytometric Bead Array (CBA Mouse Inflammation Kit, BD Biosciences). IL-17, IL-1α and IL-1β cytokines were assessed in colon extracts from IL10^{-/-} NOX1^{-/-} mice using the LEGENDplex Mouse Inflammation Panel (13-plex) kit (BioLegend No 740,150). IL-8 cytokine was assessed in Mono-Mac-6 and HT-29 cell lines using Human Quantikine kit (R&D system).

2.5. Immune cell isolation

Colon fragments from control and DSS mice were incubated in digestion buffer according to the *Lamina Propria* Dissociation kit (Miltenyi Biotech) and dissociated using the GentleMACS® Dissociator (Miltenyi Biotech). After dissociation, the suspension was centrifuged at 300g for 10 min at 4 °C and the resulting pellet was used to obtain all immune cells or to isolate the T-lymphocyte enriched fraction using the Pan T Cell Isolation kit II (Miltenyi Biotech). Isolated immune cells (0.5 × 10⁶ cells/well) were cultured in the presence of 100 ng/ml LPS supplemented or not with 1 μM OxA. After 48 h, cells were collected and used for RNA extraction, and cell supernatants were used for cytokine quantification. Peripheral blood mononuclear cells were isolated using Ficoll-Paque Premium sterile solution at density of 1.077 ± 0.001 g/ml (GE Healthcare Europe, Velizy-Villacoublay, France).

2.6. Occludin expression

The occludin rabbit polyclonal antibody (NBP1-87402) was obtained from NOVUS (Abingdon, UK). The actin goat polyclonal antibody (I-19; product number: sc-1616) was obtained from Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany). For the detection of occludin or actin by western blot, colonic mucosa scraping was extracted on ice with cold lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.0, 250 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.1% NP40, 10% glycerol supplemented with proteases inhibitors). The lysates were then centrifuged at 14,000 × g for 10 min and supernatants were obtained. Total proteins (50 μg) from the colonic extracts were separated by SDS-PAGE and electrotransferred to PVDF membranes. The primary and the horseradish-coupled secondary antibodies were diluted to 1/1000 and 1/10,000, respectively, in PBS-supplemented with 5% non-fat dry milk and 0.1% Tween 20. The secondary antibodies were detected as above using the ECL detection system (ThermoFisher, USA). Occludin and actin expression was quantified by densitometry using ImageJ v.1.50 h software [25].

2.7. Cell culture and NF-κB activation

The human colon cancer cell line HT29 and human monocytic Mono-Mac-6 cell lines were obtained from American Type Culture Collection (ATCC) and was free of mycoplasma contamination. HT-29 cells were transfected with the pNL3.2.NF-κB/RE plasmid containing 5 NF-κB response element sequences that drives transcription of luciferase (Promega) using FuGENE® HD transfection reagent (Promega), as previously described [26]. HT-29 cells were treated with 3 ng/ml TNFα in the presence or in the absence of 1 μM OxA or 10 μM SB408124 for 1 h and then, luminescence was detected according to the manufacturer's recommendations. Intracellular Ca²⁺ production was detected using Fluoroforte Calcium Assay Kit (Enzo Life Sciences, NY, USA). Apoptosis was measured using Guava Nexin Reagent (Merck Millipore Bioscience, Fontenay sous Bois, France).

2.8. RT-PCR

Colonic tissues from mice were rinsed and homogenized with the TissueLyser (Qiagen) in 1 ml of Trizol reagent (Life Technology). Total RNA was recovered as previously described, and classical RT-PCR was performed [21]. OX1R expression was quantified by densitometry using the ImageJ software [25].

2.9. Statistical analysis

Results were expressed as mean ± SEM. All statistical analyses were performed with GraphPad Prism v.6.0 (GraphPad Software). The Student's *t*-test (two-tailed 95% confidence intervals) was used for comparison of 2 mean values. When groups of mean values were > 2, a normality test (Agostino-Pearson test) was performed to validate the use of an ANOVA with *post hoc* Bonferroni's tests. The sample sizes for individual analyses are indicated in the figure legends. Statistical significance was defined as *p* < 0.05.

3. Results

3.1. OX1R is expressed in the inflamed mucosa of patients with UC, but absent in normal colon

The expression of OX1R was first determined by immunohistochemistry (IHC) with an antibody against OX1R in 19 biopsies of the inflamed colonic mucosa from patients with active UC (15 patients) or quiescent UC (4 patients) and compared to tissues from healthy controls (9 biopsies). In normal colonic mucosa, OX1R expression was absent or very low, with faint expression in the epithelium and no expression in the mononuclear cells of the lamina propria (Fig. 1A). In the inflamed mucosa from patients with UC (70%; 13/19 cases), intense to moderate staining was observed both in epithelial cells (membrane and cytoplasmic staining) and in the mononuclear cell infiltrate, indicating strengthened expression of OX1R (Fig. 1B, C). However, in the non-affected mucosa from quiescent or active patients (30%; 6/19 cases), OX1R expression was very low. The median score of OX1R expression was 35 (range 15–49) for normal colons, 53 (range 20–75) for quiescent area and 240 (range 80–300) for active area in patients with UC (Fig. 1D). These results show that OX1R was mainly expressed in inflamed mucosa of patients with UC.

3.2. Orexin-A improves wasting disease symptoms in the DSS-induced acute colitis model

We next investigated the effect of exogenous OxA, which is more resistant to degradation than OxB [27], in a murine model of chemically-induced acute colitis. Oral administration of dextran sodium sulfate (DSS) in control mice induces severe acute colitis, which is characterized by colon length reduction (ranged from 25 to 56 mm, median: 41.50 mm), weight loss (ranged from 1.85 to 6.20 g, median: 3.70 g), bloody diarrhea, intestinal ulcerations and immune cell infiltrations. As shown in Fig. 2, daily intraperitoneal administration of 0.22 μmol/kg OxA induced a striking improvement of the wasting disease when compared to DSS-only treated mice. As assessed by macroscopic and clinical analyses, OxA significantly reduced the colitis symptoms (Fig. 2A–D) such as colon length reduction (ranged from 5 to 35 mm, median: 21 mm), weight loss (ranged from 0.30 to 2.50 g, median: 1.37 g) and DAI (ranged from 1 to 2, median: 1.50). Furthermore, the effects of OxA on DSS-induced colitis were dose-dependent (Fig. S1) with 0.22 μmol/kg resulting in maximal effect and the lowest doses (0.002 μmol/kg) being less beneficial on colon length (Fig. S1A) and DAI score (Fig. S1B).

Morphological analysis of colons after 7 days of DSS induction showed an important thickening of the colon wall, a massive infiltration of the mucosa by immune cells, ulcerations, and a loss of goblet cells as

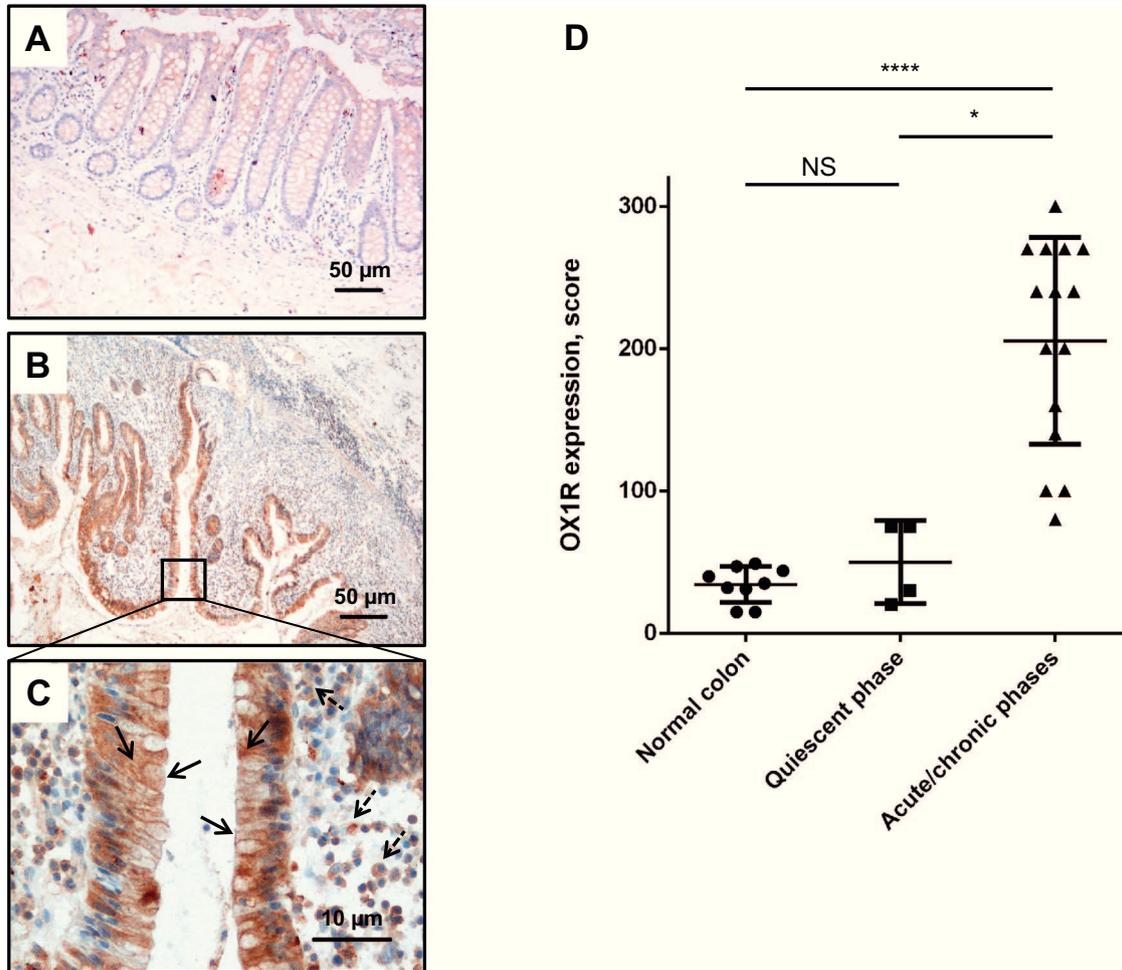


Fig. 1. OX1R expression in the intestinal mucosa from UC patients. (A) Representative OX1R immunostaining of human normal colonic mucosa from healthy controls; (B) Representative OX1R immunostaining of colonic mucosa from patients with UC; (C) Magnification of representative OX1R immunostaining of colonic mucosa from patients with UC. Black arrows indicate OX1R immunostaining in the plasma membrane and cytoplasm. Dashed arrows indicate the OX1R immunostaining in immune cells; (D) Representation of OX1R expression in human normal colonic mucosa from 9 patients and UC colonic mucosa from 4 patients in quiescent phase and 15 patients in active phase. The scores were obtained by multiplying the staining intensity (negative, 0; weak, 1; moderate, 2; and strong, 3) by the percentage of stained cells estimated independently by 2 researchers. **** $p < 0.0001$ and * $p < 0.05$ (non-parametric ANOVA test).

compared to untreated control mice (Fig. 2E). OxA treatment reverted the histological appearance of the colonic mucosa (Fig. 2E) to that of healthy control mice (Fig. 2E). The histological scores, determined by assessing the size of the crypts, presence of immune cell infiltration, number of goblet cells and mucosa integrity was significantly reduced in OxA-treated DSS mice (ranged from 0.5 to 2; median: 1.41) compared to DSS mice (ranged from 3 to 4; median: 3.64) (Fig. 2F). The immunostaining of OX1R revealed that OX1R was highly expressed in inflamed colonic mucosa from DSS-treated mice (Fig. 2E) as compared with control mice in which OX1R was not expressed (Fig. 2E). As shown in Fig. 2E (bottom right), after weekly OxA treatment, the OX1R expression was strongly decreased in colon epithelium. We next assessed OX1R mRNA expression in the colon mucosa by RT-PCR. As expected highly expression of OX1R mRNA was only detected in DSS-induced mice. This ectopic expression dramatically dropped upon OxA treatment (Fig. 2G). To demonstrate the involvement of OX1R in the curative effect of OxA on DSS-induced colitis, colitis was induced in OX1R-deficient mice (C57BL/6 OX1R^{-/-}). DSS administration to OX1R^{-/-} mice induced severe colitis characterized by a strong colon length reduction (ranged from 38 to 53 mm; median 41 mm) and DAI score (ranged from 2 to 4; median 3) as compared to control mice (Fig. 3A–C). OxA treatment did not revert colitis in term of colon length reduction (ranged from 37 to 55 mm; median 46 mm) and DAI

score (ranged from 1 to 4; median 2) as compared to untreated DSS-induced mice (Fig. 3A–C). It should be noted that the DSS administration to wild-type C57BL6 mice (OX1R^{+/+}) induced a severe colitis similar to DSS-induced OX1R^{-/-} mice, suggesting that the presence of OX1R had no intrinsic protective effect on DSS-induced colitis (Fig. 3). Morphological analysis shown that DSS induced a large inflammation of colon mucosa in OX1R^{-/-} mice characterized by an important thickening of the colon wall and a massive infiltration of the mucosa by immune cells (Fig. 3D). These effects were definitively not reverted by OxA treatment (Fig. 3D). As expected, OX1R was not expressed in colon mucosa in OX1R^{-/-} mice induced by DSS in the absence and in the presence of OxA treatment (Fig. 3D). In parallel, to demonstrate the specificity of OxA treatment, we used the OxB7–28 analog which displayed a very low affinity to OX1R [28]. As described above, DSS administration induced a severe colitis in mice in terms of colon length reduction (ranged from 40 to 52 mm; median: 44 mm) and DAI score (ranged from 2 to 3; median: 3) as compared to control mice (Fig. S2A–C). Moreover, no significant improvement in term of colon length reduction (ranged from 36 to 48 mm; median: 46 mm) and DAI score (ranged from 1 to 3; median: 2) was observed when DSS-induced mice were treated with OxB7–28 (Fig. S2A–C). Similarly, OxB7–28 treatment of DSS-induced colitis had no effect on colon epithelium structure and OX1R expression as compared to untreated mice (Fig. S2D–G). Finally,

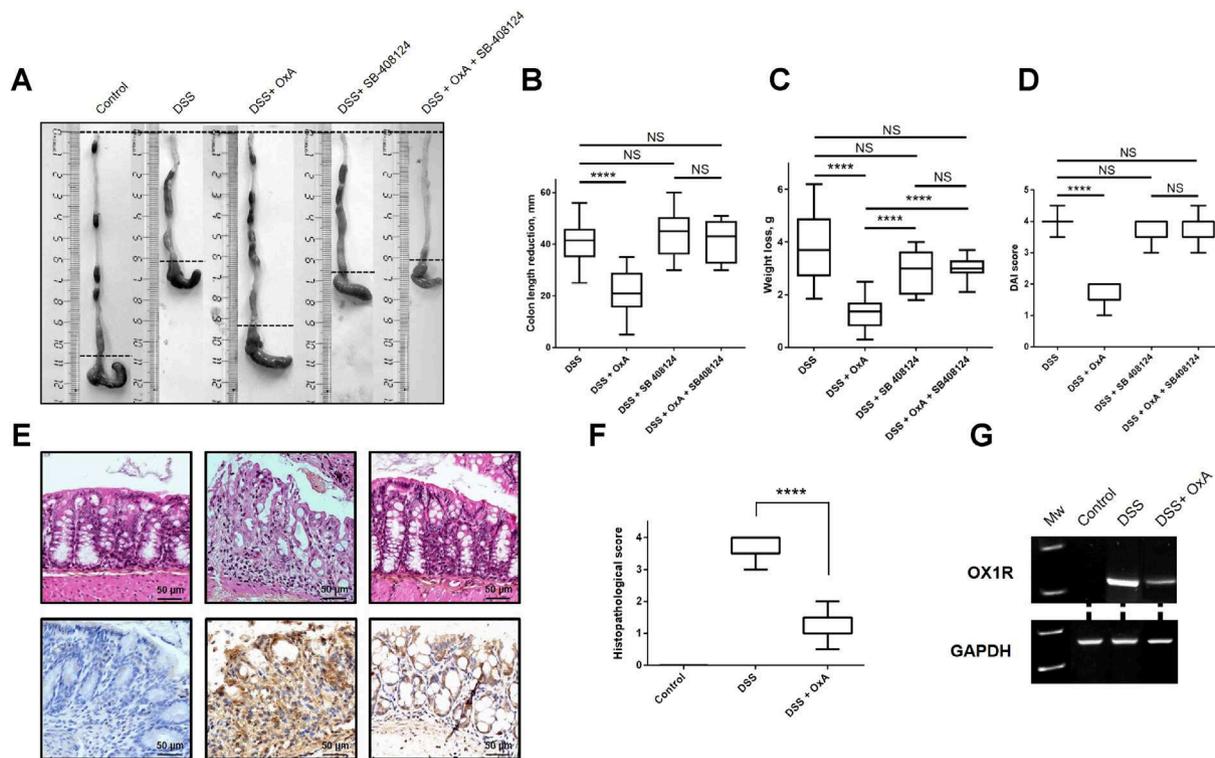


Fig. 2. Effect of OxA on colon length, loss of weight, DAI score and histological aspect of colon in DSS-induced colitis mice. Colitis was induced by oral administration of 5% DSS in water. DSS-mice were treated daily with 0.22 $\mu\text{mol/kg}$ OxA, 1 $\mu\text{mol/kg}$ SB-408124, 0.22 $\mu\text{mol/kg}$ OxA plus 1 $\mu\text{mol/kg}$ SB-408124 or PBS. Symptoms severity was monitored by macroscopic aspect (A); colon length (B), weight (C), DAI score (D) and histological aspect (E-F). (A) Representative photography of colons from control BALB/c mice and DSS-induced colitis mice at day 7. Dashed lines represent the limits between which the colon length was measured in mm; (B) quantitative reduction of colon length; (C) weight loss and (D) DAI score calculated according to weight, colon length, diarrhea and the presence of blood in the stools. Representative histological photomicrography of colon sections (E, top) from control BALB/c mice (left); DSS-induced mice (middle); DSS-induced mice treated with 0.22 $\mu\text{mol/kg}$ OxA (right). Immunodetection of OX1R in colon sections (E, bottom) from control mice (left), DSS-induced mice (middle) and DSS-induced mice treated with 0.22 $\mu\text{mol/kg}$ OxA (right). Histopathological score characterized by the size of crypts, the presence of immune cell infiltration, the number of goblet cells and the mucosal integrity (F). OX1R mRNA expression in murine colon mucosa extracts determined by RT-PCR (G). Results are the mean \pm SEM from 9 separate experiments (4 mice/group/experiment) except for the experiments in the presence of SB-408124 (3 separate experiments with 4 mice/group). **** $p < 0.0001$ (ANOVA test); NS: not significant.

we tested the OX1R/OxA pathway as combining administration of OxA with SB-408124, an OX1R specific antagonist which totally blocks the intracellular Ca^{2+} signal pathway. Indeed, incubation of 1 μM OxA on HEK-OX1R cells which expressed recombinant OX1R led to a massive increase of cytosolic Ca^{2+} released from endoplasmic reticulum (Fig. S3A). In contrast, when HEK-OX1R cells were incubated with 1 μM OxA and 10 μM SB-408124, the cytosolic Ca^{2+} release was totally inhibited (Fig. S3B). Administration of OxA with SB-408124 to DSS-induced mice totally abolished the curative effect of OxA on DSS-induced colitis, whereas the antagonist alone had no effect on the clinical symptoms (Fig. 2A to 2D). Finally, OxA injection in wt BALB/c mice had no effect in term of weight, colon length, DAI score and histological aspect of colon mucosa (Fig. S4A–F). As expected OX1R was not expressed in colon mucosa of these untreated and OxA treated mice (Fig. S4G and S4H).

The intestinal epithelial barrier integrity was also assessed by the expression of occludin, a key tight junction protein responsible for intestinal permeability [29]. Occludin protein expression was strongly reduced in DSS mice (7-day treatment), compared to control mice (Fig. S5). Interestingly, administration of OxA in these mice partially maintained occludin expression (Fig. S6).

3.3. OxA improves UC symptoms in the $IL-10^{-/-}$ $NOX-1^{-/-}$ mouse model

The DSS model has been extensively used to decipher the mucosal inflammation during the acute phase in IBD and preclinical studies. However, some features usually observed in human UC such as the

inflammation gradient from the rectum to the proximal colon [2], any dysregulation of ER stress in goblet cells known to be an early causative etiological factor of UC, and digestive complications such as colorectal cancer have not been observed in this chemically-induced model. A genetically modified murine model where both the $IL-10$ and NADPH Oxidase 1 ($NOX1$) genes are deleted, has been shown to induce a spontaneous colitis at 8 weeks of age with an upwards gradient from the rectum to caecum, thereby reproducing all the pathological characteristics seen in human UC [30]. Thus, we investigated the effects of OxA in this model. As previously described [30], histological analysis of the $IL-10^{-/-}$ $NOX-1^{-/-}$ mice revealed a loss of goblet cells, elongation of crypts leading to a thickening of the mucosa and the presence of an inflammatory infiltrate as compared to $IL-10^{+/+}$ $NOX1^{+/+}$ control mice (Fig. 4). Intraperitoneal injection of OxA improved the histological score (1 to 2, median: 1.5) and DAI score (1 to 2, median: 1.5) as compared to untreated $IL-10^{-/-}$ $NOX-1^{-/-}$ mice (histological score: 3 to 5, median 4 and DAI score: 3.5 to 4.5, median: 4) (Fig. 4B). OX1R expression in colon mucosa was determined by IHC. As shown in Fig. 4A, OX1R was expressed in colon epithelium from $IL-10^{-/-}$ $NOX-1^{-/-}$ mice as compared to the absence of OX1R expression in mucosa from $IL-10^{+/+}$ $NOX-1^{+/+}$ (Fig. 4A). In contrast, OX1R expression was widely reduced in the colonic mucosa of $IL-10^{-/-}$ $NOX-1^{-/-}$ mice treated with OxA (Fig. 4A). This is evidenced by RT-PCR analysis of OX1R transcripts extracted from colonic mucosa showing detectable expression of OX1R transcript in the normal mucosa from control mice (Fig. 4D). Increased levels of OX1R transcripts were observed in $IL-10^{-/-}$ $NOX1^{-/-}$ mice, which were strongly reduced upon OxA treatment

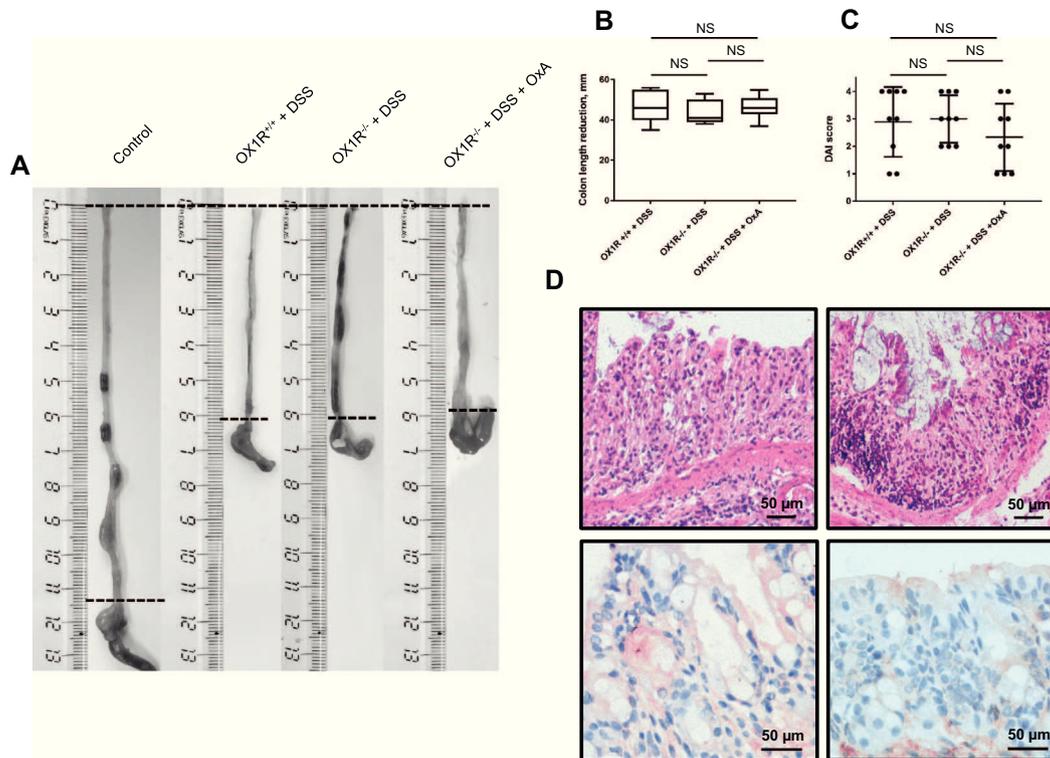


Fig. 3. Effect of OxA on colon length, DAI score, histological aspect and OX1R expression in DSS-induced colitis OX1R^{-/-} mice. Colitis was induced in wt C57BL6 or C57BL6 OX1R^{-/-} by oral administration of 5% DSS in water. DSS-mice were treated daily with 0.22 μmol/kg OxA or PBS. Symptom severity was monitored by (A) macroscopic aspect; (B) colon length, (C) DAI score. (A) Representative photography of colons from control OX1R^{-/-} mice, DSS-induced colitis OX1R^{-/-} mice and DSS-induced colitis OX1R^{-/-} mice treated with OxA. Dashed lines represent the limits between which the colon length was measured in mm; (B) Quantitative reduction of colon length; (C) DAI score calculated according to weight, colon length, diarrhea and the presence of blood in the stools; Representative histological photomicrography of colon sections (D, top) from DSS-induced OX1R^{-/-} mice (left) and DSS-induced OX1R^{-/-} mice treated with OxA (right); Immunodetection of OX1R in colon sections (D, bottom) from DSS-induced OX1R^{-/-} mice (left) and DSS-induced OX1R^{-/-} mice treated with OxA (right). Results are the mean ± SEM from 2 separate experiments (4 mice/group/experiment).

(Fig. 4D).

5-ASA is considered as the “gold standard” treatment for mild-to-moderate UC [31]. Oral administration by gavage of 5-ASA to IL-10^{-/-} NOX1^{-/-} mice partially improved both histological and DAI scores (Fig. 4B and C) that were ranging from 2.5 to 3.5 (median: 3) and 3 to 4 (median: 3.5), respectively, as compared to untreated mice (histological score: 4 and DAI score: 4), while the reduction of the morphological and DAI scores (median: 1.5 for both) was greater in OxA-treated mice (Fig. 4B and C), demonstrating that OxA treatment was more beneficial than 5-ASA treatment.

3.4. OxA downregulates the production of pro-inflammatory cytokines in the two mouse models of colitis

UC is associated with an increased production of pro-inflammatory cytokines and chemokines in the blood, stools and intestinal mucosa [32]. We tested the ability of OxA administered to DSS-induced and IL-10^{-/-} NOX1^{-/-} mice to impact the cytokine levels of colon extracts. As shown in Fig. 5A, OxA inhibited the production of the pro-inflammatory TNFα, IL-6 and monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 in DSS-induced colitis. This inhibition was totally reversed when SB-408124 was administered with OxA (Fig. 5A). In contrast, expression of the pro-inflammatory cytokines, IFNγ and IL-12p70, and the anti-inflammatory cytokine, IL-10, was barely increased by DSS and was not affected by OxA treatment in the presence or absence of SB-408124 (Fig. 5A). Similarly, daily administration of OxA to IL-10^{-/-} NOX1^{-/-} mice significantly inhibited the production of TNFα, IL-6, and MCP-1. In contrast to the DSS model, the production of IFNγ was significantly decreased in this model (Fig. 5B). The production of IL-17, IL-1α and IL-

1β was also reduced (Fig. 5G). As expected, the secretion of IL-10 was minimal in this model, and was not affected by OxA (Fig. 5B). It should be noted that the production of IL-12p70 was not altered (Fig. 5B).

3.5. Orexin-A inhibits the production of pro-inflammatory cytokines in immune cells from the colons of DSS-induced mice

Chronic inflammation in UC results from dysregulated innate and adaptive immune responses [1]. Monocytes, macrophages, dendritic cells and T lymphocytes play a key role in the initiation and perpetuation of UC [33,34]. To evaluate the role of OxA in the regulation of immune responses, total immune cells were isolated from the lamina propria of DSS-treated mice. Isolated immune cells were incubated with lipopolysaccharide (LPS) which induced the best activation and survival of cells in our condition, in the absence or presence of 1 μM OxA for 48 h. Although OX1R mRNA was expressed in immune cells, no significant difference in the OX1R mRNA transcript expression level was observed between the different treatments, as quantified by gel densitometry (Fig. 6A). As shown in Fig. 6B, colonic immune cells isolated from DSS-induced mice produced TNFα, IL-6, MCP-1, IFNγ, IL-12p70 and IL-10 cytokines. In contrast, immune cells isolated from DSS-treated mice and incubated with 1 μM OxA released significantly less TNFα, IL-6 and MCP-1 (Fig. 6B), while IFNγ, IL-12p70 and IL-10 levels were unchanged (Fig. 6B). Isolation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from DSS-induced mice and treated or not with 1 μM OxA in the presence of LPS for 48 h revealed that OxA treatment inhibits the production of TNFα and IL-6 cytokines (Fig. 6C). Our group has recently reported that orexins are able to induce mitochondrial apoptosis in colon cancer [22], prostate cancer [23] and pancreas

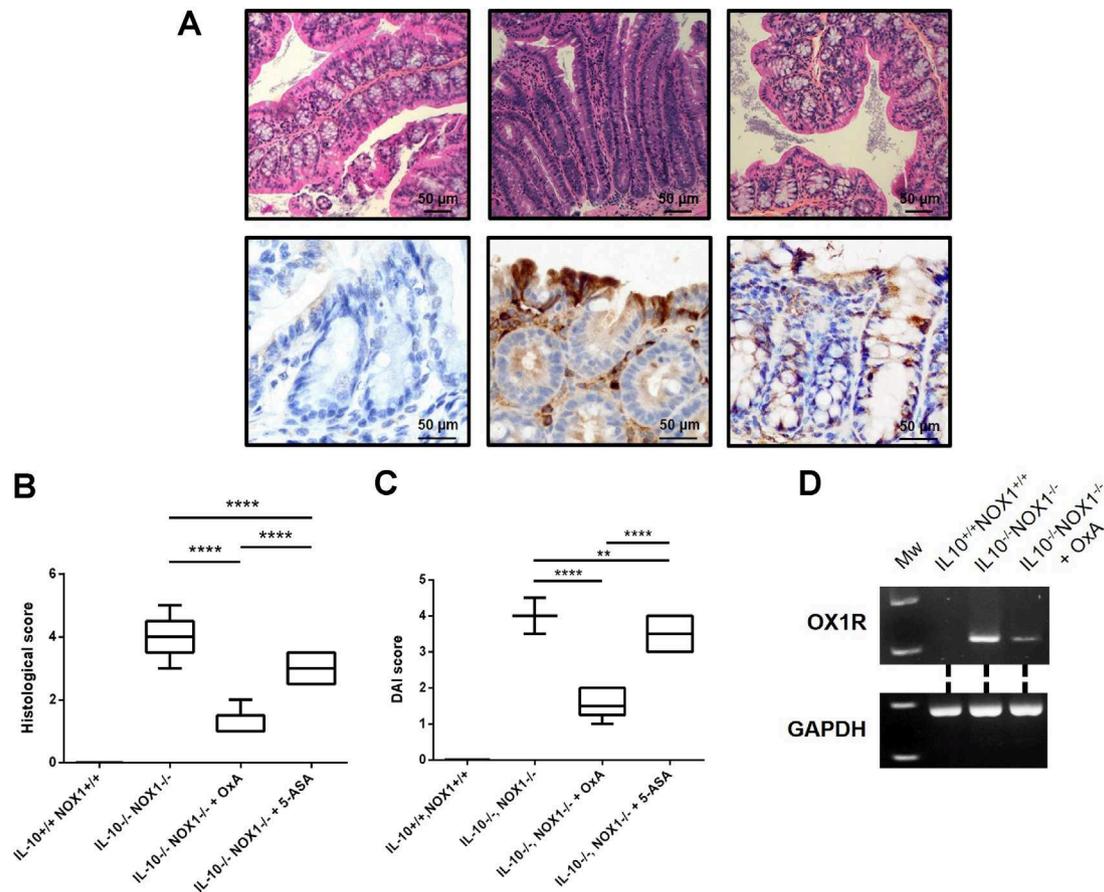


Fig. 4. OxA alleviates the clinical symptoms and microscopic aspect of the colon mucosa in IL-10^{-/-} NOX1^{-/-} mice. The double KO IL10^{-/-} NOX1^{-/-} mice displayed spontaneous colitis at 6/7 weeks of age with an upwards gradient from the rectum. Histopathological aspect (×40) of stained colon sections (A, top) from IL-10^{+/+} NOX1^{+/+} control mice (left), IL-10^{-/-}NOX1^{-/-} mice (middle), and IL-10^{-/-}NOX1^{-/-} mice treated with 0.22 μmol/kg OxA (right); Immunodetection of OX1R in colon sections (A, bottom) from IL-10^{+/+} NOX1^{+/+} control mice (left), IL-10^{-/-}NOX1^{-/-} mice (middle) and IL-10^{-/-} NOX1^{-/-} mice treated with 0.22 μmol/kg OxA (right); (B) Histopathological score calculated as a function of the size of crypts, presence of immune cell infiltration, number of goblet cells and mucosa integrity in IL10^{-/-} NOX1^{-/-} mice, IL-10^{-/-} NOX1^{-/-} mice treated with 0.22 μmol/kg OxA, or 53 mg/kg 5-ASA; (C) DAI score was calculated as a function of the presence of diarrhea, blood in the stools, thickening and edema of the colon, and the presence of rectal prolapses; (D) OX1R mRNA expression in murine colon mucosa extracts determined by PCR. Results are the mean ± SEM from 4 separate experiments (6 mice/group/experiment), except for the experiments in the presence of 5-ASA (3 separate experiments with 4 mice/group). ***p* < 0.01 and *****p* < 0.0001 (ANOVA test). MW: molecular weight.

cancer [24]. We have tested the ability of OxA to induce apoptosis in isolated immune cells. As shown in Fig. 6D, OxA was unable to induce mitochondrial apoptosis in immune cells of DSS-induced mice as compared to untreated cells (Fig. 6D), strongly suggesting that the OxA effect on cytokine production was essentially mediated by intracellular Ca²⁺ mobilization. We next isolated T-lymphocytes (CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺) from the lamina propria of DSS-treated mice. Purified T-lymphocytes cells were incubated with LPS in the absence or in the presence of 1 μM OxA for 48 h. Production of TNFα, IL-6 and MCP-1 was strongly inhibited by OxA (Fig. 7A), whereas IFNγ, IL-12p70 and IL-10 levels were unchanged (Fig. 7A). Moreover, the incubation of T-cells with OxA in the presence of the specific antagonist SB-408124 totally reverted the effect observed in the presence of OxA alone (Fig. 7A).

3.6. Orexin-A reduces NFκB activation

Among the plethora of pathways involved in chronic inflammation, the transcription factor NF-κB represents one of the major players in the modulation of cytokine expression involved in inflammation [35]. One of the major target of this transcriptional factor was the cytokines involved in pro-inflammatory response. Indeed, synthesis of IL-8 was directly mediated by NF-κB [36]. To investigate the impact of OxA on TNFα-induced NF-κB activation, we measured the IL-8 secretion induced by TNFα in the presence or in the absence of OxA in the immune

cell line Mono-Mac-6 and colonic epithelial cell line HT-29. As shown in Fig. 7B, in the presence of TNFα, Mono-Mac-6 and HT-29 cells produced IL-8 as compared to control corresponding to untreated cells. In contrast, in the presence of 1 μM OxA the IL-8 secretion induced by TNFα was significantly reduced in these two cell lines. These results suggested that OxA was able to inhibit the NF-κB activation consequently to IL-8 secretion in the immune and colonic epithelial cells. To determine the role of Ca²⁺ signaling pathway in the inhibition of TNFα-induced NF-κB activation by OxA, we transiently transfected HT-29 cells with a luciferase reporter gene driven by NF-κB response elements. TNFα treatment induced a 9-fold increase in NF-κB activation as compared to untreated cells (Fig. 7C), which was significantly reduced by treatment with 1 μM OxA (Fig. 7C). In contrast, in the presence of the antagonist SB-408124 or U-73122, a specific inhibitor of the phospholipase C which is the major actor in Ca²⁺ signaling pathway, OxA was unable to inhibit the NFκB activation induced by TNFα (Fig. 7C) demonstrating that this effect was mainly mediated by Ca²⁺ mobilization. As expected, SB-408124 and U-73122 was unable to reduce the NFκB activation induced by TNFα alone (Fig. 7C).

4. Discussion

UC is a life-long, disabling disease with morbidity despite several therapeutic strategies that involve medications such as amino-salicylate

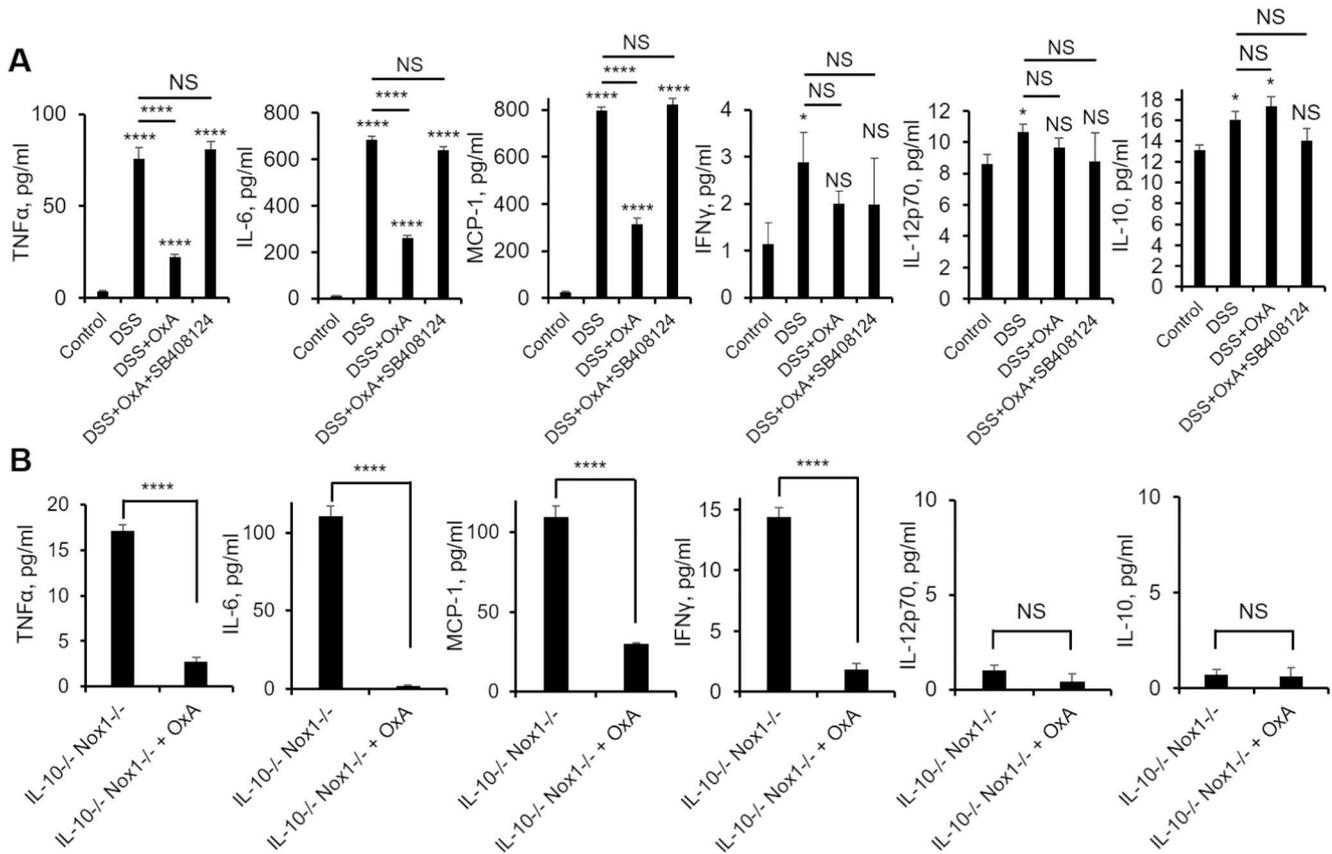


Fig. 5. Effect of OxA on the secretion of pro-inflammatory cytokines in colon extracts from DSS-induced colitis and IL10^{-/-} NOX1^{-/-} mice. (A) TNFα, IL-6, MCP-1, IFNγ, IL-12p70 and IL-10 quantification in colon extracts from DSS-induced colitis mice after intra-peritoneal injection of PBS, 0.22 μmol/kg OxA or 0.22 μmol/kg OxA mixed with 1 μmol/kg SB-408124; (B) TNFα, IL-6, MCP-1, IFNγ, IL-12p70 and IL-10 quantification in colon extracts from IL-10^{-/-}, NOX1^{-/-} mice after intra-peritoneal injection of PBS, 0.22 μmol/kg OxA or 0.22 μmol/kg OxA mixed with 1 μmol/kg SB-408124. Results are the mean ± SEM from 3 separate experiments (6 mice/group/experiment). *p < 0.05 and ****p < 0.0001 (Student's t-test and ANOVA test); NS: not significant.

derivatives, steroids and immunosuppressors, anti-TNFα and anti-integrins antibodies, or surgery in the more severe forms [37]. In this context, the development of targeted therapies represents a major challenge. Here, we demonstrate that OX1R, the receptor for the neuropeptide OxA/B, is overexpressed in the inflamed colon of patients with UC, and that OxA, via its binding to OX1R, has a beneficial immunomodulatory effect in two different murine colitis models that recapitulate either the acute (DSS) or chronic (IL-10^{-/-} NOX1^{-/-}) phases of human UC pathology. The therapeutic effects of OxA occurred in both phases of the disease and were mediated by the inhibition of inflammation and T-cell-mediated immune responses.

We demonstrate here that OX1R transcripts are also expressed in immune cells. The anti-inflammatory effects of OxA were shown by the strong inhibition of the production of the pro-inflammatory cytokines TNFα, IL-6, IL-17, IL-1α, IL-1β and IFNγ both in colon mucosa extracts and in LPS-stimulated purified T-cells from the lamina propria. In addition, OxA was able to inhibit the production of the chemokine MCP-1, which is associated with the recruitment of monocyte-macrophages and lymphocytes, which play a deleterious role in the initial phase of the disease [38]. In the present study, we show that treatment with OxA inhibits the Th1 (IFNγ, TNFα, IL-1α and IL-1β) and Th17 (IL-17) responses, and the secretion of IL-6, a Th1 cytokine involved in Th17 cell differentiation [39]. While OxA had similar anti-inflammatory effects in the two mouse models, a major difference was observed in the ability of OxA to inhibit the IFNγ production in the IL-10^{-/-} NOX1^{-/-} model, but not in DSS-treated mice. OxA treatment in the DSS-induced colitis model had no significant effect on IL-10 secretion although in the DSS-induced colitis model in the absence of OxA treatment, we observed an increasing of IL-10 secretion in the correlation of increasing secretion of

IFNγ observed in the same condition. IL-10 was an anti-inflammatory cytokine secreted by Th2 cells and involved in the inhibition of IFNγ secretion [40], suggesting that OxA was not able to inhibit the secretion of IL-10, and thereby the secretion of IFNγ. Interestingly, IFNγ was produced in the IL-10^{-/-} NOX1^{-/-} model, as reported in IL-10^{-/-} mice [41], and OxA treatment inhibited this secretion, most likely by affecting an IL-10-independent mechanism of IFNγ secretion by Th1 cells. Moreover, the anti-inflammatory properties of OxA were also demonstrated in Mono-Mac-6, an immune cell line, and in HT-29, a colonic epithelial cell line, both expressing OX1R by the inhibition of IL-8 secretion mediated by NFκB activation. The latter effect was totally reversed by addition of the specific OX1R antagonist SB-408124, strongly suggesting that the inhibition of NFκB activation induced by OxA was mediated via its binding to its receptor OX1R [42].

Neuropeptides such as vasoactive intestinal peptide (VIP), neuropeptide Y (NPY), serotonin, and substance P (SP) have been investigated for their anti-inflammatory or pro-inflammatory effects in IBD patients or colitis animal models and their therapeutic potential [43]. In contrast, the role of OxA in chronic inflammation, in particular in IBD, was not recognized until now. Nevertheless, its role was suggested by the higher prevalence of immunopathological diseases, including purpura, multiple sclerosis, systemic lupus erythematosus, psoriasis, Crohn's disease or ulcerative colitis, in narcoleptic patients who have a deficiency in OxA-producing neurons [44]. Moreover, some reports indicated that the plasma level of the soluble TNF receptor was increased in narcoleptic patients, suggesting a potential alteration of TNFα secretion [45].

GPCRs are a superfamily of receptors encompassing about 800 members [46], and their role in immunity and inflammation has been

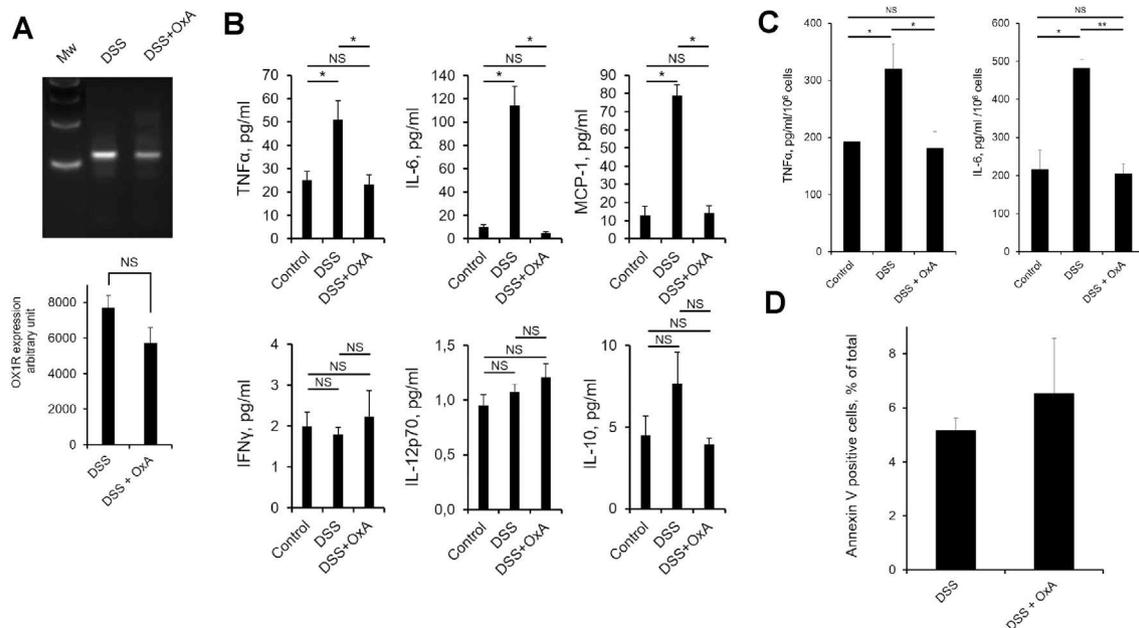


Fig. 6. OX1R is expressed in immune cells isolated from the colon of DSS-induced colitis mice and mediates the inhibition of cytokine secretion by OxA. (A) Representative photography of PCR amplification (top) of OX1R mRNA isolated from total immune cells purified from colons of DSS-induced colitis mice. The bottom panel represents the quantitative representation of three separate experiments (6 mice/group/experiment). (B) TNF α , IL-6, MCP-1, IFN γ , IL-12p70 and IL-10 quantification in total immune cells purified from colons of DSS-induced colitis mice. Total fraction of immune cells was cultured in the presence of 100 ng/ml LPS supplemented or not with 1 μ M OxA for 48 h; (C) TNF α and IL-6 quantification in PBMC isolated from blood of DSS-induced colitis mice. PBMC were cultured in the presence of 100 ng/ml LPS supplemented or not with 1 μ M OxA for 48 h. (D) Total immune cells purified from colon of DSS-induced mice were treated with (DSS + OxA) or without (DSS) OxA and the proapoptotic effect of OxA was measured as described in Material and Methods. Results are the mean \pm SEM from 3 separate experiments (6 mice/group/experiment). * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 and **** p < 0.0001 (Student's t-test). NS: not significant.

put forward, including in various inflammatory conditions [47]. Here, we show that OX1R is highly expressed at the mRNA level in the colonic mucosa of mice and at the protein level in the colonic mucosa of patients with active UC while not present in normal colon, demonstrating the specific ectopic expression of OX1R during UC. In addition, OX1R was also expressed in immune cells isolated from the colon of DSS-treated mice, as demonstrated for other neuropeptides receptors including VPAC receptors and NPY receptor. [48]. Furthermore, our data demonstrate that the anti-inflammatory effect of OxA is specifically mediated by OX1R. In fact, the use of: 1) the knockout OX1R $^{-/-}$ mice model revealed that the absence of OX1R expression totally abolished the anti-inflammatory effect of OxA; 2) the non-functional OxB7–28 analogs of OxB which has a very low affinity for OX1R [28] was unable to induce any anti-inflammatory effect; and 3) the OX1R specific antagonist, SB-408124 totally inhibited the curative effect of OxA in mice models. SB-408124 totally abolished the Ca $^{2+}$ signaling pathway [49] induced by OxA, suggesting that the main effector of the anti-inflammatory effect of OxA in UC is the intracellular Ca $^{2+}$ transients. Moreover, the antagonist SB-408124 and U-73122, a specific inhibitor of phospholipase C which plays a major role in Ca $^{2+}$ signaling pathway, were able to totally reversed the inhibitory effect of OxA on NF κ B activation which is a main cellular actor in inflammatory response [36]. It should be noted that SB-408124 alone did not affect the disease and histological scores or the cytokine secretion in DSS-induced colitis mice, suggesting that endogenous orexins do not display anti-inflammatory properties in the colon, although orexin-immunoreactive neurons have been identified in enteric nervous system [50], and orexins might play a role in intestinal motility [15]. Moreover, the induction of colitis by DSS in mice expressing OX1R (OX1R $^{+/+}$) or not expressing OX1R (OX1R $^{-/-}$) was very similar in term of symptoms support the fact that OX1R expression alone does not have any protective effect on colitis.

As widely reported, 5-ASA has been recommended as the first-line treatment and maintenance in UC [1]. As demonstrated by the histological and DAI scores, our observations indicated that OxA seemed

more efficient than 5-ASA in the treatment of IL-10 $^{-/-}$ NOX1 $^{-/-}$ mice although the administration routes were different (i.p. vs oral administration, respectively). We did not observe any side effects induced by OxA throughout treatment of the mice. Indeed, recent data revealed that chronic injection of OxA at the doses used in this study for a period of two months barely affected the control of energy homeostasis in mice [51]. Moreover, OxA administration had no effect on colon mucosa of healthy control mice. In contrast, 5-ASA can often cause several side effects including headache, nausea, fever, rash, and reversible infertility in men, and much less frequently, serious inflammation of the liver and lung [52].

5. Conclusion

We demonstrate for the first time that OX1R is aberrantly expressed in human UC and OxA exerts anti-inflammatory effects in two animal models recapitulating the acute and chronic phases of human UC. These anti-inflammatory effects mediated by OX1R resulted in: 1) the inhibition of the production of pro-inflammatory cytokines secreted by immune cells; and 2) the inhibition of NF κ B activation leading to epithelial cell protection. The future development of OX1R peptidic or non-peptidic agonists may open new avenues in the treatment of human UC.

Transparency document

The [Transparency document](#) associated this article can be found, in online version.

Acknowledgments

The authors acknowledge Dr. Yanagisawa M. and Dr. Sakurai T. to provide us C57BL/6 OX1R $^{-/-}$ mice. The authors wish to thank Dr. Martine Torres for critical reading of the manuscript and editorial help.

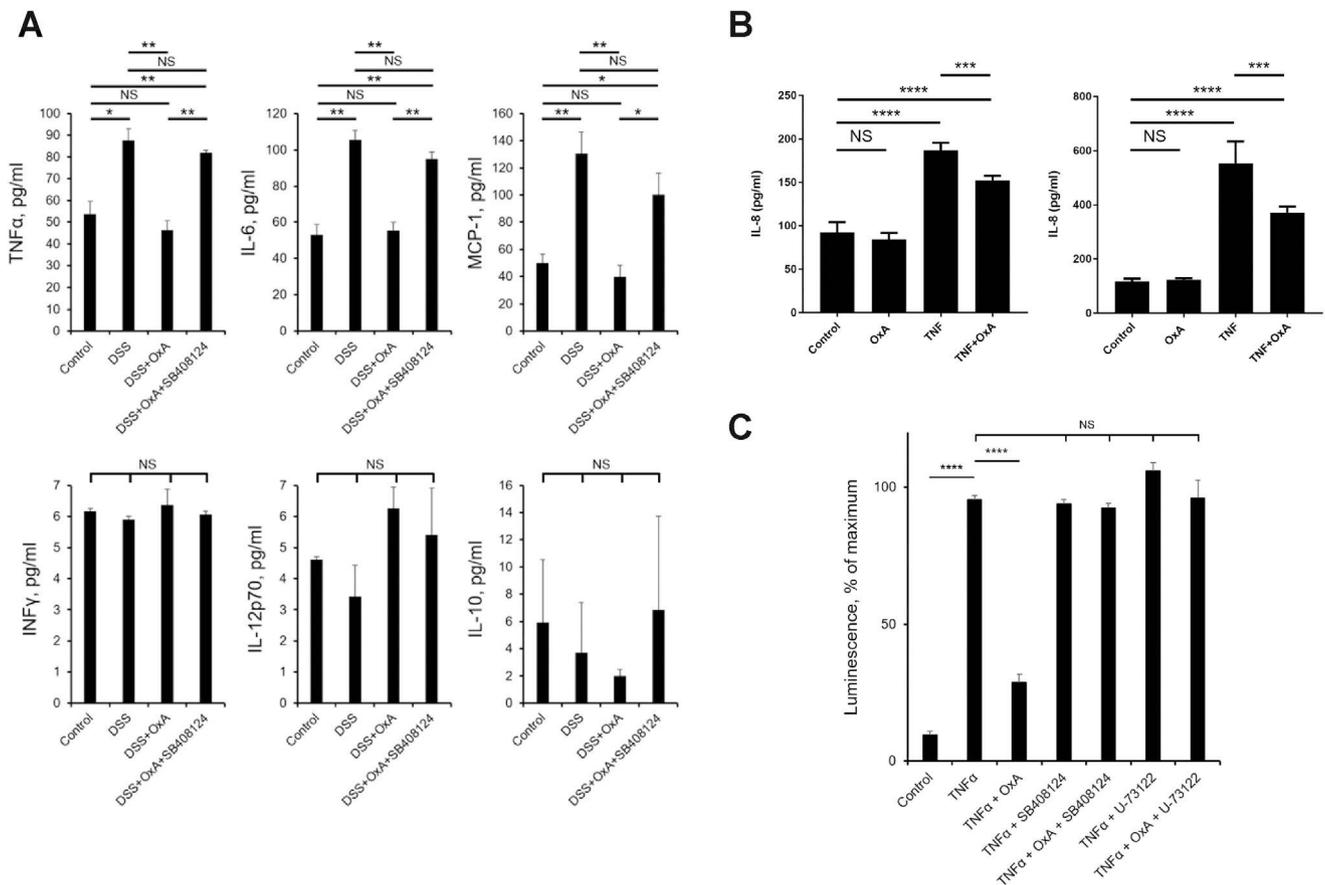


Fig. 7. OxA inhibits (A) the cytokine secretion in the T-cell enriched fractions purified from the lamina propria of DSS-induced colitis mice, (B) IL-8 production in cultured immune and colon epithelial cells and (C) NFκB activation induced by TNFα in colon epithelial cells. (A), TNFα, IL-6, MCP-1, IFNγ, IL-12p70 and IL-10 cytokine quantification in the T-cell enriched fractions purified from colons of DSS-induced colitis mice. T-cells were cultured in the presence of 100 ng/ml LPS supplemented or not (DSS) with 1 μM OxA (DSS + OxA) or 1 μM OxA and 10 μM SB-408124 (DSS + OxA + SB408124). (B), IL-8 cytokine quantification in the immune cell line (Mono-Mac-6) and colon epithelial cell line (HT-29). Cells were treated with 20 ng/ml of TNFα in the presence or in the absence of 1 μM OxA. (C), Effect of OxA, SB-408124 and U-73122 on the activation of NFκB induced by 3 ng/ml TNFα in the human colon cancer cell line HT29 transiently transfected with the pNL3.2.NF-κB/RE reporter plasmid. Results are the mean ± SEM from 3 separate experiments (4 mice/group/experiment). *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 and ****p < 0.0001 (ANOVA test). NS: not significant.

Funding

This study was supported by INSERM U1149/The Inflammation Research Center (CRI), The “Institut National du Cancer (INCA)” [grant number 2013-213], the “Ligue contre le Cancer” [grant numbers R16020HH, GB/MA/CD/EP-12062], the Laboratory of Excellence Labex Inflammex (ANR) and INSERM-Transfert.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.08.023>.

References

[1] S. Danese, C. Fiocchi, Ulcerative colitis, *N. Engl. J. Med.* 365 (2011) 1713–1725.
 [2] E. Domènech, M. Mañosa, E. Cabré, An overview of the natural history of inflammatory bowel diseases, *Dig. Dis.* 32 (2014) 320–327.
 [3] H.S.P. De Souza, C. Fiocchi, Immunopathogenesis of IBD: current state of the art, *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 13 (2016) 13–27.
 [4] P. Hindryckx, V. Jairath, G. D’Haens, Acute severe ulcerative colitis: from pathophysiology to clinical management, *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 13 (2016) 654–664.
 [5] M. Jo, S.T. Jung, Engineering therapeutic antibodies targeting G-protein-coupled receptors, *Exp. Mol. Med.* 48 (2016) e207.
 [6] T. Saskia, D.C. Baumgart, Targeting leukocyte migration and adhesion in Crohn’s disease and ulcerative colitis, *Inflammopharmacol* 20 (2012) 1–18.
 [7] R. Cheluvappa, Experimental appendicitis and appendectomy modulate the

CCL20–CCR6 axis to limit inflammatory colitis pathology, *Int. J. Color. Dis.* 29 (2014) 1181–1188.
 [8] M. Zhang, J.D. Venable, R.L. Thurmond, The histamine H4 receptor in autoimmune disease, *Expert Opin. Investig. Drugs* 15 (2006) 1443–1452.
 [9] J.C. Ashton, Cannabinoids for the treatment of inflammation, *Curr. Opin. Investig. Drugs* 8 (2007) 373–384.
 [10] A. Wasilewski, M. Storr, M. Zieli, J. Fichna, Role of G protein-coupled orphan receptors in intestinal inflammation: novel targets in inflammatory bowel diseases, *Inflamm. Bowel Dis.* 21 (2015) 666–673.
 [11] J.A. Waschek, VIP and PACAP: neuropeptide modulators of CNS inflammation, injury, and repair, *Br. J. Pharmacol.* 169 (2013) 512–523.
 [12] T. Sakurai, A. Amemiya, M. Ishii, et al., Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior, *Cell* 92 (1998) 573–585.
 [13] K. Ohno, M. Hondo, T. Sakurai, Cholinergic regulation of orexin/hypocretin neurons through M₃ muscarinic receptor in mice, *J. Pharmacol. Sci.* 106 (2008) 485–491.
 [14] T. Sakurai, The neural circuit of orexin (hypocretin): maintaining sleep and wakefulness, *Nat. Rev. Neurosci.* 8 (2007) 171–181.
 [15] M.V. Heinson, A.K. Purhonen, K.A. Mäkelä, K.H. Herzog, Functions of orexins in peripheral tissues, *Acta Physiol (Oxf)* 192 (2008) 471–485.
 [16] T. Voisin, P. Rouet-Benzineb, N. Reuter, M. Laburthe, Orexins and their receptors: structural aspects and role in peripheral tissues, *Cell Mol Life Sci CMLS* 60 (2003) 72–87.
 [17] C.M. Duffy, C. Yuan, L.E. Wisor, et al., Role of orexin signaling in dietary palmitic acid-activated microglial cells, *Neurosci. Lett.* 606 (2015) 140–144.
 [18] X. Xiong, R.E. White, L. Xu, et al., Mitigation of murine focal cerebral ischemia by the hypocretin/orexin system is associated with reduced inflammation, *Stroke* 44 (2013) 764–770.
 [19] Y. Ogawa, Y. Irukayama-Tomobe, N. Murakoshi, et al., Peripherally administered orexin improves survival of mice with endotoxin shock, *Life* 5 (2016) e21055.
 [20] M. Laburthe, T. Voisin, A. El Firar, Orexins/hypocretins and orexin receptors in apoptosis: a mini-review, *Acta Physiol.* 198 (2010) 393–402.

- [21] M. Laburthe, T. Voisin, The orexin receptor OX1R in colon cancer: a promising therapeutic target and a new paradigm in G protein-coupled receptor signalling through ITIMs, *Br. J. Pharmacol.* 165 (2012) 1678–1687.
- [22] T. Voisin, A. Elfirar, M. Fasseu, et al., Aberrant expression of OX1 receptors for orexins in colon cancers and liver metastases: an openable gate to apoptosis, *Cancer Res.* 71 (2011) 3341–3351.
- [23] D. Alexandre, C. Hautot, M. Mehio, et al., The orexin type 1 receptor is over-expressed in advanced prostate cancer with a neuroendocrine differentiation, and mediates apoptosis, *Eur. J. Cancer* 50 (2014) 2126–2133.
- [24] S. Dayot, D. Speisky, A. Couvelard, et al., In vitro, in vivo and ex vivo demonstration of the antitumoral role of hypocretin-1/orexin-A and almorexant in pancreatic ductal adenocarcinoma, *Oncotarget* 9 (2018) 6952–6967.
- [25] C.A. Schneider, W.S. Rasband, K.W. Eliceiri, NIH image to ImageJ: 25 years of image analysis, *Nat. Methods* 9 (2012) 671–675.
- [26] A. El Firar, T. Voisin, C. Rouyer-Fessard, et al., Discovery of a functional immunoreceptor tyrosine-based switch motif in a 7-transmembrane-spanning receptor: role in the orexin receptor OX1R-driven apoptosis, *FASEB J.* 23 (2009) 4069–4080.
- [27] M. Ehrström, E. Näslund, F. Levin, et al., Pharmacokinetic profile of orexin A and effects on plasma insulin and glucagon in the rat, *Regul. Pept.* 119 (2004) 209–212.
- [28] P. Nicole, P. Couvineau, N. Jamin, et al., Crucial role of the orexin-B C-terminus in the induction of OX1 receptor-mediated apoptosis: analysis by alanine scanning, molecular modelling and site-directed mutagenesis, *Br. J. Pharmacol.* 172 (2015) 5211–5223.
- [29] P.M. Cummins, Occludin: one protein, many forms, *Mol. Cell. Biol.* 32 (2012) 242–250.
- [30] X. Treton, E. Pedruzzi, C. Guichard, et al., Combined NADPH oxidase 1 and interleukin 10 deficiency induces chronic endoplasmic reticulum stress and causes ulcerative colitis-like disease in mice, *PLoS One* 9 (2014) e101669.
- [31] W. Blonski, A.M. Buchner, G.R. Lichtenstein, Treatment of ulcerative colitis, *Curr. Opin. Gastroenterol.* 30 (2014) 84–96.
- [32] M.N. Ajuebor, M.G. Swain, Role of chemokine and chemokine receptors in the gastrointestinal tract, *Immunology* 105 (2002) 137–143.
- [33] J. Torres, R.K. Boyapati, N.A. Kennedy, et al., Systematic review of effects of withdrawal of immunomodulators or biologic agents from patients with inflammatory bowel disease, *Gastroenterology* 149 (2015) 1716–1730.
- [34] S. Agarwal, L. Mayer, Gastrointestinal manifestations in primary immune disorders, *Inflamm. Bowel Dis.* 16 (2010) 703–711.
- [35] I. Attreya, R. Attreya, M.F. Neurath, NF- κ B in inflammatory bowel disease, *J. Intern. Med.* 263 (2008) 591–596.
- [36] P.P. Tak, G.S. Firestein, NF- κ B: a key role in inflammatory diseases, *J. Clin. Invest.* 107 (2001) 7–11.
- [37] A. Grinspan, A. Kornbluth, Positioning therapy for ulcerative colitis, *Curr. Gastroenterol. Rep* 17 (2015) 1–8.
- [38] R.P. MacDermott, Chemokines in the inflammatory bowel diseases, *J. Clin. Immunol.* 19 (1999) 266–272.
- [39] M.S. Maddur, P. Miossec, S.V. Kaveri, J. Bayry, Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies, *Am J Pathol* 181 (2012) 8–18.
- [40] M.R. Walter, The molecular basis of IL-10 function: from receptor structure to the onset of signaling, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 380 (2014) 191–212.
- [41] D.M. Rennick, M.M. Fort, N.J. Davidson, Studies with IL-10^{-/-} mice: an overview, *J. Leukoc. Biol.* 61 (1997) 389–396.
- [42] C.S. Leonard, J.P. Kukkonen, Orexin/hypocretin receptor signaling: a functional perspective, *Br. J. Pharmacol.* 171 (2014) 294–313.
- [43] M. Di Giovangiulio, S. Verheijden, G. Boesmans, et al., The neuromodulation of the intestinal immune system and its relevance in inflammatory bowel disease, *Front. Immunol.* 6 (2015) 1–15.
- [44] F.J. Martinez-Orozco, J.L. Vicario, I. Villalibre-Valderrey, et al., Narcolepsy with cataplexy and comorbid immunopathological diseases, *J. Sleep Res.* 23 (2014) 414–419.
- [45] H. Himmerich, P.A. Beiting, S. Fulda, et al., Plasma levels of tumor necrosis factor alpha and soluble tumor necrosis factor receptors in patients with narcolepsy, *Arch. Intern. Med.* 166 (2006) 1739–1743.
- [46] A. Couvineau, M. Laburthe, The family B1 GPCR: structural aspects and interaction with accessory proteins, *Curr. Drug Targets* 13 (2012) 103–115.
- [47] K. Newton, V.M. Dixit, Signaling in innate immunity and inflammation, *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4 (2016) a006049.
- [48] C. Boullaran, J.H. Kehrl, Implications of non-canonical G-protein signaling for the immune system, *Cell. Signal.* 26 (2014) 1269–1282.
- [49] C.J. Langmead, J.C. Jerman, S.J. Brough, et al., Characterization of the binding of [3H]-SB-674042, a novel nonpeptide antagonist, to the human orexin-1 receptor, *Br. J. Pharmacol.* 141 (2004) 340–346.
- [50] A.L. Kirchgessner, M.-T. Liu, Orexin synthesis and response in the gut, *Neuron* 24 (1999) 941–951.
- [51] A. Blais, G. Drouin, C. Chaumontet, et al., Impact of orexin-A treatment on food intake, energy metabolism and body weight in mice, *PLoS One* 12 (2017) e0169908.
- [52] M.A. Kamm, Review article: maintenance of remission in ulcerative colitis, *Aliment. Pharmacol. Ther.* 16 (2002) 21–24.

Partie V : Les propriétés antitumorales des
neuropeptides hypothalamiques
orexines/hypocretines : un rôle thérapeutique
inattendu



The Anti-tumoral Properties of Orexin/Hypocretin Hypothalamic Neuropeptides: An Unexpected Therapeutic Role

Alain Couvineau*, Stéphanie Dayot, Pascal Nicole, Valérie Gratio, Vinciane Rebours, Anne Couvelard and Thierry Voisin

INSERM UMR1149/Inflammation Research Center (CRI), Team "From Inflammation to Cancer in Digestive Diseases" Labeled by "La Ligue Nationale Contre Le Cancer," Paris-Diderot University, DHU UNITY, Paris, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Miguel López,
Universidade de Santiago de
Compostela, Spain

Reviewed by:

Jolanta B. Zawilska,
Medical University of Lodz, Poland
Kazuhiro Takahashi,
Tohoku University, Japan

*Correspondence:

Alain Couvineau
alain.couvineau@inserm.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Neuroendocrine Science,
a section of the journal
Frontiers in Endocrinology

Received: 10 August 2018

Accepted: 10 September 2018

Published: 27 September 2018

Citation:

Couvineau A, Dayot S, Nicole P,
Gratio V, Rebours V, Couvelard A and
Voisin T (2018) The Anti-tumoral
Properties of Orexin/Hypocretin
Hypothalamic Neuropeptides: An
Unexpected Therapeutic Role.
Front. Endocrinol. 9:573.
doi: 10.3389/fendo.2018.00573

Orexins (OxA and OxB) also termed hypocretins are hypothalamic neuropeptides involved in central nervous system (CNS) to control the sleep/wake process which is mediated by two G protein-coupled receptor subtypes, OX1R, and OX2R. Beside these central effects, orexins also play a role in various peripheral organs such as the intestine, pancreas, adrenal glands, kidney, adipose tissue and reproductive tract. In the past few years, an unexpected anti-tumoral role of orexins mediated by a new signaling pathway involving the presence of two immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs (ITIM) in both orexin receptors subtypes, the recruitment of the phosphotyrosine phosphatase SHP2 and the induction of mitochondrial apoptosis has been elucidated. In the present review, we will discuss the anti-tumoral effect of orexin/OXR system in colon, pancreas, prostate and other cancers, and its interest as a possible therapeutic target.

Keywords: orexins, neuropeptides, GPCR, cancer, inflammation, gastroenterology, signaling pathway

INTRODUCTION

Since its discovery in 1998 (1, 2), the role of orexins also named hypocretins has been extensively studied in the central nervous system (CNS) (3). Literature analysis revealed that about 2,000 articles have been published (Pubmed source, 1978 articles on July, 2018) demonstrating the great interest of "orexin" field in its role in the central nervous system. In contrast, the study of orexins in peripheral systems has been much less investigated, with only a hundred of articles published (Pubmed source, 103 articles on July, 2018). This great interest in central action of orexins was directly associated to their discovery in hypothalamus (1, 2). Orexins (OxA/hypocretin-1 and OxB/hypocretin-2) are two neuropeptides isoforms produced by the same prepro-orexin precursor (2). These two peptides have been shown to be involved in multiple CNS processes, including energy homeostasis, reward seeking, and drug addiction and the regulation of the sleep/wakefulness state which represents the major central effect of orexins, (4, 5). In human, narcolepsy type 1 (also known as narcolepsy with cataplexy) is the main pathology associated to a misregulation of orexins production caused by the loss of orexin neurons and characterized by a decreased ability to regulate sleep/wake cycles (6, 7). As mentioned above, orexins also play a role in various peripheral organs such as the intestine, pancreas, kidney, reproductive tract, adipose tissue and adrenal glands (8), although their roles remain controversial (9). Expression of orexins in peripheral tissues has been investigated using immunohistochemistry and/or RT-PCR techniques. Orexin have been detected

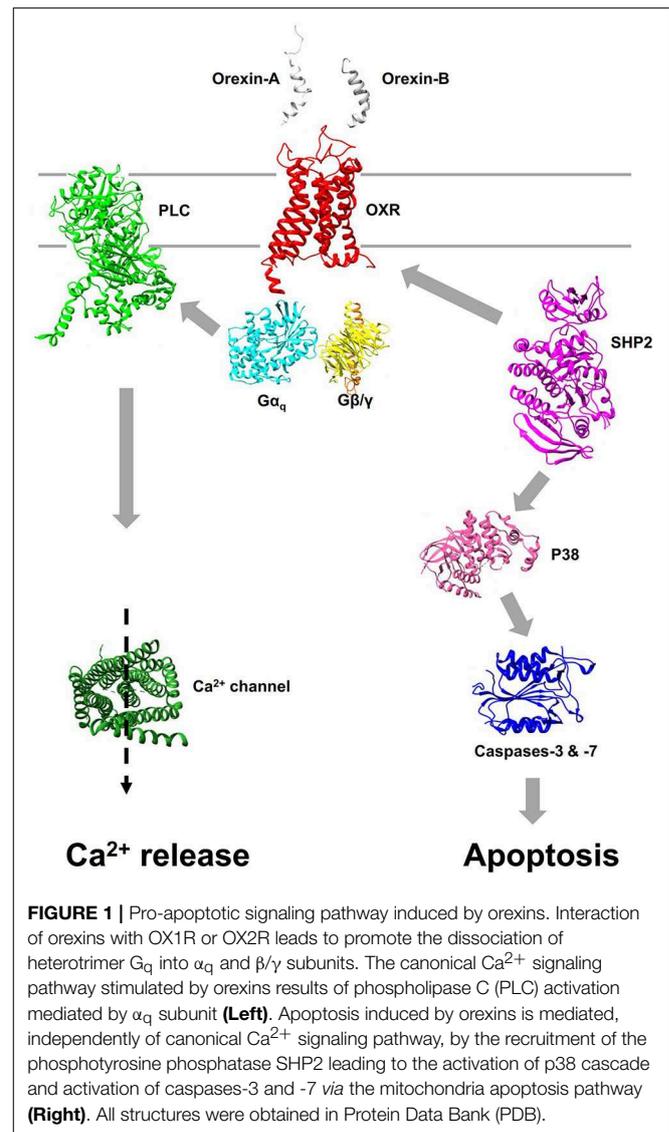
in gastrointestinal tract, including colon (10), and pancreas (11), adrenal glands (12), kidney (11), adipose tissues (12) and reproductive tract including testis (13), and prostate (14). It should be noted that the analysis of literature related to orexins expression in peripheral tissues, revealed a large variability in term of orexins level and/or none expression. This could be related to the used tools, in particular the specificity of antibodies and/or RT-PCR, which reflected only the presence of preproorexin transcripts. The determination of basal circulating orexins concentration indicated a range of 2–45 pM (15, 16) which was about 1,000 times less in term of concentration than the IC_{50} of orexin receptors estimated to few 10 nM (17).

Orexins mediate their biological effects by interaction with two G-protein coupled receptors (GPCRs) subtypes, OX1R, and OX2R (also named Hcrtr-1 and Hcrtr-2, respectively) (18, 19), leading to the intracellular calcium releasing involving the Gq pathway (**Figure 1**). Although stimulation of orexin receptors predominantly leads to an increase in intracellular free calcium ions level, other signaling second messengers/pathways, i.e., cAMP, MAPK-Erk1/2, PI3K-Akt and JNK are also involved in orexins actions (19).

GPCRs characterized by seven α -helices transmembrane domains, belongs to the largest family of cell surface receptors with over 800 members in the human genome which are involved in the mainly pathophysiological actions (20). Classically, it was admitted that their major physiological actions were mediated “exclusively” by the G-protein signaling pathway, including effector stimulation and/or inhibition, desensitization and cellular internalization (21, 22). However, since several years, it has seen an increasing trend that many GPCRs action can also be mediated by other transduction mechanisms leading to a rich set of new physiopathological functions (20). Among their new roles, GPCRs are often overexpressed/underexpressed in tumor cells and also involved in the progression and/or initiation of cancer by inhibiting or stimulating proliferation and/or apoptosis (23, 24). In this review, we focus on the expression and anti-tumoral properties of OX1R in different cancers as gastrointestinal cancers (colon and pancreatic cancers) and prostate cancer, including their potential roles as therapeutic targets.

COLON CANCERS

Colorectal cancer is the third most common cancer in men and the second most common in women, represents almost 10% of the annual global cancer incidence (25). Incidence rates of colorectal cancer show a strong positive gradient with an increasing level of economic development. Approximately 60% of patients with colorectal will present liver metastases during the course of disease (26). The only option to fight against the appearance of hepatic metastases of the colorectal cancers is the surgical resection. However, the rate of second recurrence stays of 75 % after metastasectomy (27). The patient's survival is dependent on the stage at diagnosis. It is positive for the premature lesions (Stage I), intermediate for stages II and III and poor for the metastatic stages. A post-operative



chemotherapy is proposed for stages II and III. In the case of the rectal cancer, the association of a chemotherapy and a radiotherapy strongly reduced the relapse incidences and prolonged patients' survival (27). Since the 1980s, the global survival of the metastatic diagnosed patients increased by the use of new cytotoxic molecules (i.e., oxaliplatin, irinotecan), combined with anti-angiogenic and anti-EGFR molecules (28). To date, this survival was strongly increased by the combination of the three most effective chemotherapeutic agents (fluorouracil, irinotecan and oxaliplatin) (29).

Tumor-suppressor genes and oncogenes was identified as key genes whose mutations or altered expression are associated with colorectal cancer (30). Colon cancer initiation and progression, which are under these genes control, are also regulated by growth factors or hormones present in the tumor environment which action are mediated trough tyrosine kinase receptors or G protein-coupled receptors (GPCRs) (31). Many GPCRs were

similarly expressed in normal colon epithelial cells, others are overexpressed and some of them are ectopically expressed in cancer cells (31–36). The peptide hormones mediated-growth effects such as gastrin (34) or neurotensin (33), serine proteases such as thrombin (35) or trypsin (37) or lipids such as lysophosphatidic acid (38) or prostaglandin E2 (39) are promoted through GPCRs. Activation of these GPCRs activation leads tumoral growth via G protein transduction pathways and/or by transactivating the tyrosine kinase epidermal growth factor receptor (EGFR) (40, 41). The environment of primary colon tumors is rich in growth factors, however the existence of growth inhibitory factors for colon cancer is not well documented. In order to determine these inhibitory factors, the screening of the ability of different peptide hormones and neuropeptides to inhibit colon cancer growth was investigated (42). Twenty-six peptides were tested, including orexins which were present in few peripheral tissues including the gastrointestinal tract (10). The screening, using the human colon cancer cell line HT-29 grown in standard trophic conditions shows that only the two related peptides OxA and OxB was able to inhibit tumoral cell growth (42). Orexins do not modify cell cycle and proliferation, but activate cell death by apoptosis with a plasma membrane phosphatidylserine externalization, chromatin condensation and DNA fragmentation (42–44). Only OX1R, and not OX2R, is expressed in HT-29 cells and is involved in the orexin-induced apoptosis. Orexins promote cell death described by a mitochondrial cytochrome c release and caspase-3 and caspase-7 protease activations (42, 44). The ability of orexins to activate a robust apoptosis has been shown in 9/10 (90%) different human colon cancer cell lines (44). Conversely, orexins do not trigger apoptosis in explant cultures of human normal colonic mucosa demonstrating that the orexin-induced apoptosis appeared during the colonic epithelial cell oncogenesis (44). However, preproorexin and OxA has been detected in normal total colon (10, 11). In contrast, no detection of preproorexin was observed in normal and tumoral colonic epithelia (44). Moreover, in preclinical models, the tumoral development of xenografted tumor from HT-29 cells which expressed OX1R or HCT-116 cells which do not expressed OX1R were identical (44). These observations indicate that endogenous OxA, present in colon but not in colonic epithelium, have no impact on tumoral development.

The drug resistance occurrence is a primary cause of chemotherapy failure. The 5-fluorouracil (5-FU) represents the “gold standard” molecule used in treatment of colon cancer. The OX1R expression was investigated in the HT-29-FU colon cancer cell line model, developed after a long-term 5-FU exposure clonal cells resistant against the drug (45). The OX1R expression, orexins-induced apoptosis and subsequent growth inhibition were similar in resistant HT-29-FU cells and sensitive initial HT-29 cells (44), suggesting that orexins-induced apoptosis persists in resistant cells (44). Moreover, OX1R is expressed in 100% of primary colorectal tumors resected from patients (38 different colorectal cancers) whatever their stages and in 10 hepatic metastases and in human colon cancer cell lines established from lymph nodes, ascite, and lung metastases tested (44).

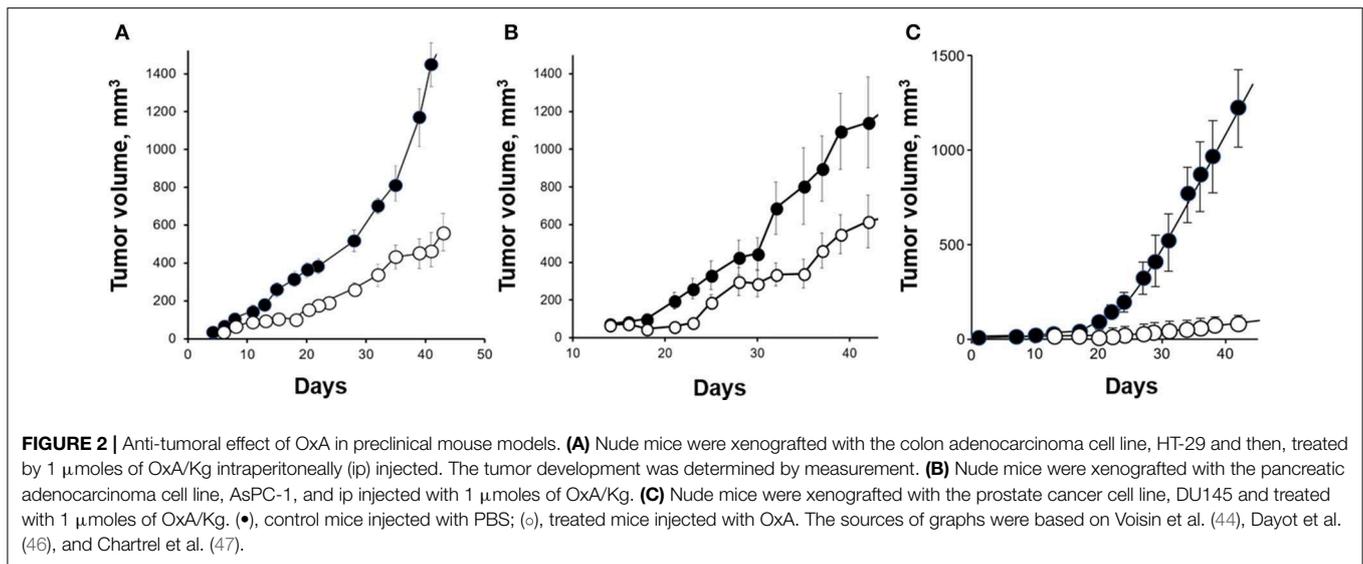
The efficiency of *in vivo* orexin treatment was addressed using human colon cancer cells xenografted in nude mice. When human colon cancer cells were xenografted in nude mice, daily OxA administration strongly slowed the tumor growth and even reversed the development of established tumors when administered 7 days after cell inoculation. After a 15-days orexins treatment, the tumor volume is decreased by 80% (**Figure 2**) (44). It was shown that orexins treatment reduces tumor growth *in vivo* by promoting apoptosis, through activation of caspase-3 (44).

The OX1R-driven apoptosis even though calcium pathway could not be explained only by the classical Gq-mediated calcium response. Two tyrosine-based motifs (ITIM) were identified in OX1R which have a crucial role in OX1R-driven apoptosis (**Figure 1**) (43, 48). The ITIM is not considered to be a GPCRs' signature, but represents a hallmark of immune inhibitory receptors (49). After activation of OX1R by orexins, the two ITIMs are phosphorylated on tyrosine residue (43, 48). It should be noted that the classical Gq-mediated activation of phospholipase C is not involved in this process. When orexins promoted tyrosine phosphorylation of ITIMs, OX1R recruits and activates the phosphotyrosine phosphatase SHP2 which is crucial in the orexin-induced apoptosis process (43, 48). The intracellular signaling pathway downstream of SHP2 includes the p38 mitogen-/stress activated protein kinase phosphorylation, which leads to the proapoptotic protein Bax translocation in the mitochondria, the apoptosome formation, caspase-3 and caspase-7 activation and cell death (**Figure 1**).

PANCREAS CANCER

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is the tenth most common cancer sites in terms of frequency and is the fifth cause of cancer mortality (50, 51). Moreover, the projection cancer incidence and deaths in 2030 indicate that this cancer could become the second cause of cancer-related death (52). Invasive PDAC which carries a very poor prognosis (5-year survival rate < 8%), is rarely surgically resectable and <20% of patients undergoing a curative surgery. In addition, PDAC is one of the most chemotherapeutic drug-resistant tumors (53). The high therapeutic resistance of PDAC can be explained by immunodepression, hypoxic microenvironment and a pronounced fibrotic reaction consisting of proliferating stromal cells together with collagen-rich extracellular matrix (53). This fibrotic stroma can account for more than 80% of the tumor mass (54), has been shown to limit the delivery of therapeutics, and contribute to tumor progression and drug resistance (55). Despite increased knowledge in the etiology of PDAC, successful therapeutic strategies are still very poor.

Recently, the OX1R expression was detected in 70/73 human PDAC (96 %) and in 83/103 human pancreatic neuroendocrine tumors (46). It should be noted that OX1R was not expressed in normal pancreas (acini and ducts) except in the Langerhans islets (**Figure 3A**) in which orexins could play a role in insulin secretion (8). This expression in tumoral tissue was independent of patient age, gender, tumor size, and lymph



node metastasis (46). The use of AsPC-1 cell line derived from human PDAC revealed that OxA was able to strongly inhibit cell growth by the SHP2-induced apoptosis (46). Moreover, the treatment by OxA of tumor slices obtained from patients and maintained in culture, induced the activation of caspases-3 in tumoral tissue demonstrating that OxA was able to induce apoptosis in PDAC (46). In preclinical model consisting in sub-cutaneous xenografted AsPC-1 cells in nude mice, OxA reduced significantly the tumor growth (Figure 2B). This tumor regression was also observed in tumors established 14 days prior OxA treatment (46). For translational studies, the patient-derived xenograft (PDX) model was frequently used. In such models, the tumoral fragments, or the isolated cells from the patient's cancer were implanted in immunodeficient mice, OxA was also able to drastically reduce the tumor growth derived from PDAC indicating its potential therapeutic interest (46). Previously report revealed the expression of OxA in endocrine pancreas (11). However, the presence of endogenous OxA does not seem to be involved in anti-tumoral effect of exogenous OxA since the tumoral development of xenografted tumor from AsPC-1 cells which expressed OX1R or HPAF-II cells which do not expressed OX1R were very similar (46). Moreover, the concentration of circulating orexins was very low (about 40 pM) to functionally activate OX1R.

As mentioned in the introduction, orexins and their receptors have been extensively studied in CNS notably in sleep regulation. In this context, many academic and pharmaceutical laboratories have focused their researches in the development of molecules able to improve sleeping regulation, in particular, in insomnia (57, 58). A lot of antagonists were developed and sub-divided into two classes named single orexin-receptor antagonists (SORAs) and dual orexin-receptor antagonists (DORAs). Among them, the SORA small molecule SB-408124 or SB-334867 was shown to be specific of OX1R (59, 60) and JNJ-42847922 specific of OX2R (61). However, the main molecule development, in particular antagonists, was related to the sleep-wakefulness actions of

orexins leading to the design of DORA such as SB-649868, almorexant (ACT-078573) (62) and suvorexant (MK-4305) for which the U.S. Food and Drug Administration (FDA) approved the use for the treatment of insomnia (63). In parallel, the development of OXR agonists was substantially much lower. Despite some attempts, no OX1R agonist was actually available (64) and only few OX2R agonists have been developed such as the non-peptidic molecules YNT-185 (65), OX2R-agonist 26 (66), and the peptide agonist SB-668875 (67) but these molecules are poorly documented.

Surprisingly, the use of suvorexant or almorexant on PDAC cell line, AsPC-1 revealed that these molecules inhibited the cellular growth by apoptosis induction (46). Almorexant appearing to be more potent than suvorexant to induce this inhibitory effect. Moreover, intraperitoneal injections of almorexant in xenografted mouse model, induced a significant reduction in tumor size (>50%) similar to the anti-tumoral effect of OxA in the same conditions (46). As shown in Figure 1, OxA and OxB activated two signaling pathways, including: (1) the canonical intracellular Ca^{2+} release effect mediated by the Gq protein which was totally inhibited in the presence of SORA and/or DORA (46) and; (2) the recruitment of SHP2 mediated by the phosphorylation of ITIM sites leading to the intrinsic apoptosis mediated by the p38 signaling pathway which was not affected by DORA (46). Recently, structure-function relationship analysis of OxB evidenced that some residues of the peptide discriminated between proapoptotic and calcium pathways (17). Likewise, almorexant which binds to OX1R with the similar affinity than OxA could discriminate these two signaling pathways demonstrating the existence of two independent molecular activation of the OX1R. These observations, suggest that almorexant (and also suvorexant) belong to ligand-biased family (68). Therefore, OX1R antagonists, which was prescribed for insomnia could be used in the anti-tumoral therapy as full agonist.

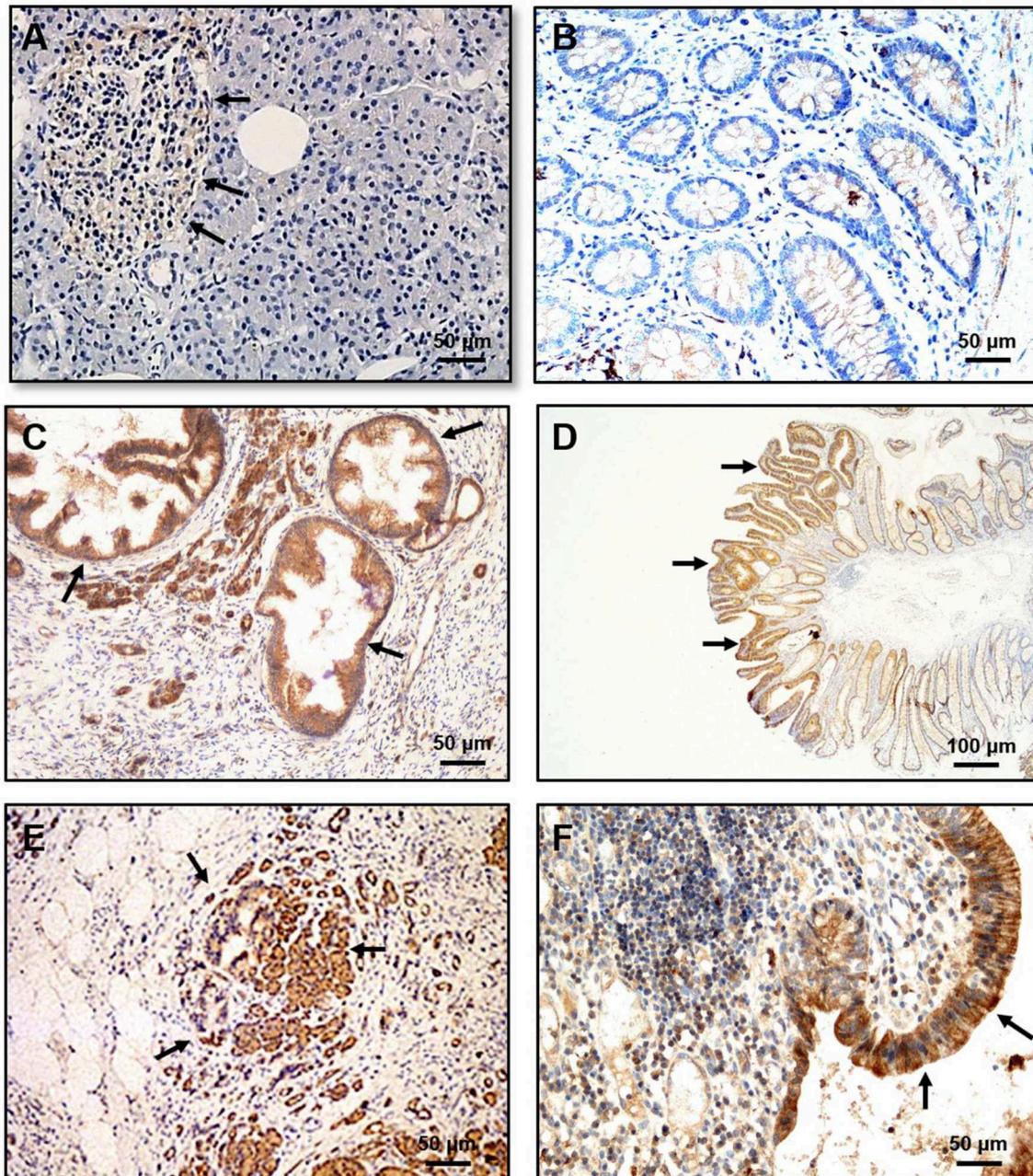


FIGURE 3 | Immunohistochemical expression of OX1R in PanIN, dysplastic colonic polyp, pancreatitis and ulcerative colitis (UC). **(A)** OX1R was not detected in the normal pancreas either in normal duct and acinar cells. **(B)** OX1R was not detected in colonic mucosa. **(C)** OX1R was expressed in PanIN lesions. **(D)** OX1R was expressed in dysplastic cells present in colonic polyps. **(E)** OX1R immunostaining of colonic mucosa from patients with pancreatitis. **(F)** OX1R immunostaining of colonic mucosa from patients with UC. Arrows indicated the OX1R expression. Bar = 50 μm for **(A, B, C, E, F)**; Bar = 100 μm for **(D)**. The sources of graphs were based on Voisin et al. (44), Dayot et al. (46), and Messal et al. (56).

PROSTATE CANCER

With about 71,000 new cases of prostate cancer in France each year, this cancer represents the most commonly diagnosed malignant tumor for men in the Western world, far ahead lung cancers and colorectal cancers (69). Despite the progress in

screening, prostate cancer is the second cause of cancer-related mortality (70) and is associated with resistance to chemohormonal therapy in the metastatic setting. It should be noted that, more one in nine men will disclose a prostate cancer during his life. Because androgens stimulate the tumor growth, androgen ablation therapy represents the first line of treatment of advanced

cancer inducing an effective tumoral regression (71). However, over the years an androgen resistance named castration-resistant prostate cancer (CRPC) develops. The cause of this resistance remains still unclear, but some investigations revealed an overexpression/amplification of androgen receptors (AR), a gain-of-function of AR, a production of AR variants having constitutive properties, an overexpression of co-factors of AR and an intra-tumoral production of androgen (72). In addition to the major role of the androgen/AR system in prostate cancer, various GPCRs are involved in the development and progression of prostate cancer (73). These GPCRs include gonadotropin hormone receptors [luteinizing hormone receptor (LHR) and follicle-stimulating hormone receptor (FSHR)], peptide receptors [neurotensin receptor (NTR), bombesin receptor (BBR), endothelin-1 receptor (ETR), oxytocin receptor (OXTR), and ghrelin receptor (GHSR)], protease receptors [thrombin receptors (PARs)] and neuropeptide receptors [neuropeptide Y receptor (NPYR)], vasoactive intestinal peptide receptor (VIPAC), and pituitary adenylyl cyclase activating peptide (PAC1). This partial list of GPCRs and their ligands promoted proliferation, migration, invasion, mitogenic signaling, and neuroendocrine differentiation of prostate cancer cells (73–81). Moreover, GPCRs expressed and/or overexpressed in prostate cancer are able to engage a cooperative crosstalk with growth factor receptors such as epidermal growth factor receptor (EGFR) (82). This transactivation mediated by GPCRs such as PAR receptors leads to the cleavage of EGF-like transmembrane ligands [EGF, transforming growth factor α (TGF α) ...] by cancer cells. Thereby, a soluble biologically active growth factor was produced and induced mitogenic effects mediated by EGFR (40). In contrast, few GPCRs were involved in the inhibition of growth and/or in apoptosis of prostate cancer cells. The gonadotropin-releasing hormone receptor (GnRH) was expressed in human malignant prostate tumors where its activation induced an anti-tumoral activity mediated by p38 MAPK and protein tyrosine phosphatase (73). However, nothing is known about neuropeptides and their receptors in anti-tumoral properties in prostate cancer. OX1R but not OX2R was highly expressed in high grade advanced prostate cancer (CaP) whereas this expression was much lower in low grade cancer (83). Inversely, in benign prostatic hyperplasia (BPH), OX1R expression was mostly absent and mainly confined in scattered cells (83). It should be noted that OX2R seemed to be expressed in BPH, which was associated with a decrease of OxA serum concentration (84). The expression of OxA and its precursor was found in “fiber-like” stroma of prostate cancer tissues which did not correspond to nerve and smooth muscle fibers (83). In normal tissue, OxA was expressed in follicular exocrine epithelium (14) and also in hyperplastic epithelium. However, large areas of prostate epithelium were not immunoreactive (14). Moreover, the presence of OxA was never detected in cancerous foci whatever the cancer grade (83). Taken together these observations suggested that OX1R which is expressed in cancer cells was probably not activated by endogenous OxA produced by the prostate stroma and/or delivered by the blood circulation (83). OX1R was expressed in androgen-unresponsive cell line, DU145 in which OxA or OxB

induced a significant apoptosis (83). In addition, OX1R was also expressed in androgen-responsive cell line LNCaP in which OxA induced an up-regulation of OX1R gene expression and inhibited cell survival (85). *In vivo* studies using xenografted mouse model with DU145 cells revealed that daily intraperitoneally injection of OxA induced a strong reduction of tumor volume (**Figure 2C**).

OTHER CANCERS

Like the peripheral biological role of orexins that remains still under discussion (86), OXR expression and orexins actions in cancer have been poorly documented (87). Several lines of evidence indicated that OX1R/OX2R were expressed in various cancer cells, but their actions depended on the cancer types. It should be noted that the OXR expression was mainly determined using a great variety of antibodies (produced by various manufacturers) some of them have been identified as non-specific, in particular for anti-OX2R antibody which also recognized OX1R. In the same manner, the use of antibodies to detect the presence of OxA and/or OxB peptides in tissues was also questionable. Nevertheless, the possibility of OXR expression by other solid tumors is always under investigation. OX1R was expressed in neuroblastoma in which orexins treatment induced apoptosis (42). OX1R was also identified in cortical adenomas but its relation to apoptosis was not investigated (88, 89). In human hepatocellular carcinoma tissues (90), in gastric cancer cell lines, SGC-7901 and BGC-823, OxA seemed to enhance the proliferation and inhibited the apoptosis which is mediated by the ERK or AKT signaling pathway (91, 92), respectively. Moreover, OxA and cholecystokinin (CCK) inhibited the migration of colorectal cancer cell line, HT-29 mediated by heterodimerization of OX1R and CCK1R (93). In addition, OX2R was expressed in human pheochromocytomas and PC12 cells in which OxA and OxB stimulated (94) or inhibited (95) catecholamine secretion, in endometrial endometrioid carcinoma in which OxA and OxB had no effect on proliferation and/or apoptosis (96), and in human adrenocortical NCI H295R cells where OxA induced the phosphorylation of ERK1/2 and p38 (88). Taken together these observations indicated that OX1R and OX2R were expressed in various cancers. In contrast, in the corresponding healthy tissues such as colonic epithelium and pancreatic acini, OX1R was not expressed [**Figure 3** and (49)]. It may be noted that OX1R is expressed in Langerhans's islets (**Figure 3**). In this context, an important question arises: is OX1R expressed at early stages of cancer development? As shown in **Figure 3**, the dysplastic cells present in colon polyps or pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) lesions highly expressed OX1R indicating that the expression of the receptor occurred at a very early stage (46). Chronic inflammation, including intestinal bowel disease (IBD), pancreatitis, hepatic fibrosis... or metabolic syndrome which is close to chronic inflammation, represent a high-risk factor in the development of cancer (97). What is the role of OX1R expression in inflamed tissues? Various studies have demonstrated that orexins exercised neuroprotection effects and reduced cerebral neuroinflammation associated to post-stroke trauma (98, 99). Recently, Ogawa

et al. demonstrated that OxA alleviated the survival of mice with endotoxin shock characterized by a systemic inflammation (100). Some reports revealed a relationship between orexinergic system and metabolic syndrome disorder (101). In ulcerative colitis (UC) and pancreatitis, OX1R was highly expressed in inflamed areas (Figure 3). Moreover, OxA was able to induce an anti-inflammatory effect in mice models reproducing UC or pancreatitis (56, 102). A recent study indicates a higher prevalence of immunopathological diseases, including purpura, multiple sclerosis, systemic lupus erythematosus, psoriasis, Crohn's disease, or ulcerative colitis, in narcoleptic patients (103). Besides, the anti-tumoral properties of OXR/orexins system, orexins could play an important role in chronic inflammation.

CONCLUSION

These last two decades, orexins/OXR system has been extensively studied in CNS in particular in the regulation of sleep/wake. These intensive and fruitful investigations lead to development of therapeutic molecules which are prescribed to treat insomnia. Beside this innovative research in CNS, the orexins/OXR system has a potential benefit in peripheral physiopathology, especially in cancer, and chronic

inflammatory diseases. These promising perspectives open up new fields of application in the development of new therapeutic agonist molecules (including peptides, small non-peptidic molecules, and functional agonist antibodies) and/or the use of molecules already developed such as almorexant, suvorexant... In the future decade, the orexins/OXR system could constitute a crucial curative target in human cancers.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

SD, VG, PN, VR, and AnC have participated in the work and has proofread the manuscript. AIC and TV have written the manuscript. AIC was the head of the "from inflammation to cancer in digestive diseases" group.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by INSERM U1149/The Inflammation Research Center (CRI), The Institut National du Cancer (INCA) [grant number N°2013-213], the Ligue Contre le Cancer [grant numbers R16020HH, GB/MA/CD/EP-12062], and INSERM-Transfert.

REFERENCES

- de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, et al. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. (1998) 95:322–27. doi: 10.1073/pnas.95.1.322
- Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, et al. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* (1998) 92:573–85. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80949-6
- Laburthe M, Voisin T. The orexin receptor OX(1)R in colon cancer: a promising therapeutic target and a new paradigm in G protein-coupled receptor signaling through ITIMs. *Br J Pharmacol*. (2012) 165:1678–87. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01510.x
- de Lecea L, Sutcliffe JG. The hypocretins/orexins: novel hypothalamic neuropeptides involved in different physiological systems. *Cell Mol Life Sci*. (1999) 56:473–80. doi: 10.1007/s000180050446
- Mieda M, Yanagisawa M. Sleep, feeding, and neuropeptides: roles of orexins and orexin receptors. *Curr Opin Neurobiol*. (2002) 12:339–45. doi: 10.1016/S0959-4388(02)00331-8
- Lin L, Faraco J, Li R, Kadotani H, Rogers W, Lin X, et al. The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell* (1999) 98:365–76. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81965-0
- Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, Elmquist JK, Scammell T, Lee C, et al. Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell* (1999) 98:437–51. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81973-X
- Heinonen M V, Purhonen A K, Mäkelä K A, Herzig K H. Functions of orexins in peripheral tissues. *Acta Physiol*. (2008) 192:471–85. doi: 10.1111/j.1748-1716.2008.01836.x
- Voisin T, Rouet-Benzineb P, Reuter N, Laburthe M. Orexins and their receptors: structural aspects and role in peripheral tissues. *Cell Mol Life Sci*. (2003) 60:72–87. doi: 10.1007/s000180300005
- Kirchgessner AL, Liu M. Orexin synthesis and response in the gut. *Neuron* (1999) 24:941–51. doi: 10.1016/S0896-6273(00)81041-7
- Nakabayashi M, Suzuki T, Takahashi K, Totsune K, Muramatsu Y, Kaneko C, et al. Orexin-A expression in human peripheral tissues. *Mol Cell Endocrinol*. (2003) 205:43–50. doi: 10.1016/S0303-7207(03)00206-5
- Randeva HS, Karteris E, Grammatopoulos D, Hillhouse EW. Expression of orexin-A and functional orexin type 2 receptors in the human adult adrenals: implications for adrenal function and energy homeostasis. *J Clin Endocrinol Metab*. (2001) 86:4808–13. doi: 10.1210/jcem.86.10.7921
- Jöhren O, Neidert SJ, Kummer M, Dendorfer A, Dominiak P. Prepro-orexin and orexin receptor mRNAs are differentially expressed in peripheral tissues of male and female rats. *Endocrinology* (2001) 142:3324–31. doi: 10.1210/endo.142.8.8299
- Valiante S, Liguori G, Tafuri S, Campese R, Monaco R, Paino S, et al. Expression of orexin A and its receptor 1 in the human prostate *J Anat*. (2013) 222:473–80. doi: 10.1111/joa.12030
- Arihara Z, Takahashi K, Murakami O, Totsune K, Sone M, Satoh F, et al. Immunoreactive orexin-A in human plasma. *Peptides* (2001) 22:139–42. doi: 10.1016/S0196-9781(00)00369-7
- Sakurai S, Nishijima T, Takahashi S, Yamauchi K, Arihara Z, Takahashi K. Clinical significance of daytime plasma orexin-A-like immunoreactivity concentrations in patients with obstructive sleep apnea hypopnea syndrome. *Respiration* (2004) 71:380–4. doi: 10.1159/000079643
- Nicole P, Couvineau P, Jamin N, Voisin T, Couvineau A. Crucial role of the orexin-B C-terminus in the induction of OX1 receptor-mediated apoptosis: analysis by alanine scanning, molecular modelling and site-directed mutagenesis. *Br J Pharmacol*. (2015) 172:5211–23. doi: 10.1111/bph.13287
- Laburthe M, Voisin T, El Firar A. Orexins/hypocretins and orexin receptors in apoptosis: a mini-review. *Acta Physiol*. (2010) 198:393–402. doi: 10.1111/j.1748-1716.2009.02035.x
- Leonard CS, Kukkonen JP. Orexin/hypocretin receptor signaling: a functional perspective. *Br J Pharmacol*. (2014) 171:294–13. doi: 10.1111/bph.12296
- Couvineau A, Laburthe M. The family B1 GPCR: structural aspects and interaction with accessory proteins. *Curr Drug Targets* (2012) 13:103–115. doi: 10.2174/138945012798868434
- Peterson YK, Luttrell LM. The diverse roles of arrestin scaffolds in G protein-coupled receptor signaling. *Pharmacol Rev*. (2017) 69:256–97. doi: 10.1124/pr.116.013367
- Rajagopal S, Shenoy SK. GPCR desensitization: acute and prolonged phases. *Cell Signal*. (2018) 41:9–16. doi: 10.1016/j.cellsig.2017.01.024

23. Nieto Gutierrez A, McDonald PH. GPCRs: Emerging anti-cancer drug targets. *Cell Signal.* (2018) 41:65–74. doi: 10.1016/j.cellsig.2017.09.005
24. Moody TW, Ramos-Alvarez I, Jensen RT. Neuropeptide G protein-coupled receptors as oncotargets. *Front Endocrinol.* (2018) 9:345. doi: 10.3389/fendo.2018.00345
25. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics 2012. *CA Cancer J Clin.* (2015) 65:87–108. doi: 10.3322/caac.21262
26. Valentini V, van Stiphout RG, Lammering G, Gambacorta MA, Barba MC, Bebenek M, et al. Nomograms for predicting local recurrence, distant metastases, and overall survival for patients with locally advanced rectal cancer on the basis of European randomized clinical trials. *J Clin Oncol.* (2011) 29:3163–72. doi: 10.1200/JCO.2010.33.1595
27. Siegel R, Desantis C, Jemal A. Colorectal cancer statistics 2014. *CA Cancer J Clin.* (2014) 64:104–17. doi: 10.3322/caac.21220
28. Van Cutsem E, Taberero J, Lakomy R, Prenen H, Prausová J, Macarulla T, et al. Addition of aflibercept to fluorouracil, leucovorin, and irinotecan improves survival in a phase III randomized trial in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with oxaliplatin-based regimen. *J Clin Oncol.* (2012) 30:2499–506. doi: 10.1200/JCO.2012.42.8201
29. Grothey A, Sargent D, Goldberg RM, Schmoll H J. Survival of patients with advanced colorectal cancer improves with the availability of fluorouracil-leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin in the course of treatment. *J Clin Oncol.* (2004) 22:1209–14. doi: 10.1200/JCO.2004.11.037
30. Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular origins of cancer: molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med.* (2009) 361:2449–60. doi: 10.1056/NEJMra0804588
31. Insel PA, Sriram K, Wiley SZ, Wilderman A, Katakia T, McCann T, et al. GPCRomics: GPCR expression in cancer cells and tumors identifies new, potential biomarkers and therapeutic targets. *Front Pharmacol.* (2018) 9:431. doi: 10.3389/fphar.2018.00431
32. Laburthe M, Rousset M, Boissard C, Chevalier G, Zweibaum A, Rosselin G. Vasoactive intestinal peptide: a potent stimulator of adenosine 3':5' cyclic monophosphate accumulation in gut carcinoma cell lines in culture. *Proc Natl Acad Sci USA.* (1978) 75:2772–5. doi: 10.1073/pnas.75.6.2772
33. Maoret JJ, Pospai D, Rouyer-Fessard C, Couvineau A, Laboisie C, Voisin T, et al. Neurotensin receptor and its mRNA are expressed in many human colon cancer cell lines but not in normal colonic epithelium: binding studies and RT-PCR experiments. *Biochem Biophys Res Commun.* (1994) 203:465–71. doi: 10.1006/bbrc.1994.2205
34. Singh P, Dai B, Wu H, Owlia A. Role of autocrine and endocrine gastrin-like peptides in colonic carcinogenesis. *Curr Opin Gastroenterol.* (2000) 16:68–77. doi: 10.1097/00001574-200001000-00013
35. Darmoul D, Gratio V, Devaud H, Lehy T, Laburthe M. Aberrant expression and activation of the thrombin receptor protease-activated receptor-1 induces cell proliferation and motility in human colon cancer cells. *Am J Pathol.* (2003) 162:1503–13. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64283-6
36. Gratio V, Walker F, Lehy T, Laburthe M, Darmoul D. Aberrant expression of proteinase-activated receptor 4 promotes colon cancer cell proliferation through a persistent signaling that involves Src and ErbB-2 kinase. *Int J Cancer* (2009) 124:1517–25. doi: 10.1002/ijc.24070
37. Darmoul D, Gratio V, Devaud H, Peiretti F, Laburthe M. Activation of proteinase-activated receptor 1 promotes human colon cancer cell proliferation through epidermal growth factor receptor transactivation. *Mol Cancer Res.* (2004) 2:514–22.
38. Yang M, Zhong WW, Srivastava N, Slavin A, Yang J, Hoey T, et al. protein-coupled lysophosphatidic acid receptor stimulate proliferation of colon cancer cells through the {beta}-catenin pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2005) 102:6027–32. doi: 10.1073/pnas.0501535102
39. Chell S, Kaidi A, Williams AC, Paraskeva C. Mediators of PGE2 synthesis and signalling downstream of COX-2 represent potential targets for the prevention/treatment of colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta* (2006) 1766:104–19. doi: 10.1016/j.bbcan.2006.05.002
40. Darmoul D, Gratio V, Devaud H, Laburthe M. Protease-activated receptor 2 in colon cancer: trypsin-induced MAPK phosphorylation and cell proliferation are mediated by epidermal growth factor receptor transactivation. *J Biol Chem.* (2004) 279:20927–34. doi: 10.1074/jbc.M401430200
41. Lappano R, Maggiolini M. G protein-coupled receptors: novel targets for drug discovery in cancer. *Nat Rev Drug Discov.* (2011) 10:47–60. doi: 10.1038/nrd3320
42. Rouet-Benzineb P, Rouyer-Fessard C, Jarry A, Avondo V, Pouzet C, Yanagisawa M, et al. Orexins acting at native OX(1) receptor in colon cancer and neuroblastoma cells or at recombinant OX(1) receptor suppress cell growth by inducing apoptosis. *J Biol Chem.* (2004) 279:45875–86. doi: 10.1074/jbc.M404136200
43. Voisin T, El Firar A, Rouyer-Fessard C, Gratio V, Laburthe M. A hallmark of immunoreceptor, the tyrosine-based inhibitory motif ITIM, is present in the G protein-coupled receptor OX1R for orexins and drives apoptosis: a novel mechanism. *FASEB J.* (2008) 22:1993–2002. doi: 10.1096/fj.07-098723
44. Voisin T, El Firar A, Fasseu M, Rouyer-Fessard C, Descatoire V, Walker F, et al. Aberrant expression of OX1 receptors for orexins in colon cancers and liver metastases: an openable gate to apoptosis. *Cancer Res.* (2011) 71:3341–51. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3473
45. Lesuffleur T, Kornowski A, Luccioni C, Muleris M, Barbat A, Beaumatin J, et al. Adaptation to 5-fluorouracil of the heterogeneous human colon tumor cell line HT-29 results in the selection of cells committed to differentiation. *Int J Cancer* (1991) 49:721–30. doi: 10.1002/ijc.2910490516
46. Dayot S, Speisky D, Couvelard A, Bourgoin P, Gratio V, Cros J, et al. *In vitro, in vivo and ex vivo* demonstration of the antitumor role of hypocretin-1/orexin-A and almorexant in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncotarget* (2018) 9:6952–67. doi: 10.18632/oncotarget.24084
47. Chartrel N, Anouar Y, Jeandel L, Alexandre D, Leprince J, Couvineau A, et al. (2017) *Methods and Pharmaceutical Compositions Using Orexins (OXA, OXB) for the Treatment of Prostate Cancers.* US Patent Application 20170319661, Geneva.
48. El Firar A, Voisin T, Rouyer-Fessard C, Ostuni MA, Couvineau A, Laburthe M. Discovery of a functional immunoreceptor tyrosine-based switch motif in a 7-transmembrane-spanning receptor: role in the orexin receptor OX1R-driven apoptosis. *FASEB J* (2009) 23:4069–80. doi: 10.1096/fj.09-131367
49. Daëron M, Jaeger S, Du Pasquier L, Vivier E. Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs: a quest in the past and future. *Immunol Rev.* (2008) 224:11–43. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00666.x
50. Ryan DP, Hong TS, Bardeesy N. Pancreatic adenocarcinoma. *N Engl J Med.* (2014) 371:2140–41. doi: 10.1056/NEJMra1404198
51. Neuzillet C, Tijeras-Raballand A, Bourget P, Cros J, Couvelard A, Sauvanet A, et al. State of the art and future directions of pancreatic ductal adenocarcinoma therapy. *Pharmacol Ther.* (2015) 155:80–104. doi: 10.1016/j.pharmthera.2015.08.006
52. Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, Rosenzweig AB, Fleshman JM, Matrisian LM. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res* (2014) 74:2913–21. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0155
53. Garcea G, Neal CP, Pattenden CJ, Steward WP, Berry DP. Molecular prognostic markers in pancreatic cancer: a systematic review. *Eur J Cancer* (2005) 41:2213–36. doi: 10.1016/j.ejca.2005.04.044
54. Shields MA, Dangi-Garimella S, Redig AJ, Munshi HG. Biochemical role of the collagen-rich tumour microenvironment in pancreatic cancer progression. *Biochem J.* (2012) 441:541–52. doi: 10.1042/BJ20111240
55. Olive KP, Jacobetz MA, Davidson CJ, Gopinathan A, McIntyre D, Honess D, et al. Inhibition of hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science* (2009) 324:1457–61. doi: 10.1126/science.1171362
56. Messal N, Fernandez N, Dayot S, Gratio V, Nicole P, Prochasson C, et al. Ectopic expression of OX1R in ulcerative colitis mediates anti-inflammatory effect of orexin-A. *BBA Mole Basis Dis.* (2018) 1864:3618–28. doi: 10.1016/j.bbadis.2018.08.023
57. Winrow CJ, Renger JJ. Discovery and development of orexin receptor antagonists as therapeutics for insomnia. *Br J Pharmacol.* (2014) 171:283–93. doi: 10.1111/bph.12261
58. Roecker AJ, Cox CD, Coleman PJ. Orexin receptor antagonists: new therapeutic agents for the treatment of insomnia. *J Med Chem.* (2016) 59:504–30. doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b00832
59. Dugovic C, Shelton JE, Aluisio LE, Fraser IC, Jiang X, Sutton SW, et al. Blockade of orexin-1 receptors attenuates orexin-2 receptor antagonism-induced sleep promotion in the rat. *J*

- Pharmacol Exp Ther.* (2009) 330:142–51. doi: 10.1124/jpet.109.152009
60. Smart D, Sabido-David C, Brough SJ, Jewitt F, Johns A, Porter RA, et al. SB-334867-A: the first selective orexin-1 receptor antagonist. *Br J Pharmacol.* (2001) 132:1179–82. doi: 10.1038/sj.bjp.0703953
 61. Bonaventure P, Shelton J, Yun S, Nepomuceno D, Sutton S, Aluisio L, et al. Characterization of JNJ-42847922, a selective orexin-2 receptor antagonist, as a clinical candidate for the treatment of insomnia. *J Pharmacol Exp Ther.* (2015) 354:471–82. doi: 10.1124/jpet.115.225466
 62. Betschart C, Hintermann S, Behnke D, Cotesta S, Fendt M, Gee CE, et al. Identification of a novel series of orexin receptor antagonists with a distinct effect on sleep architecture for the treatment of insomnia. *J Med Chem.* (2013) 56:7590–607. doi: 10.1021/jm4007627
 63. Cox CD, Breslin MJ, Whitman DB, Schreiber JD, McGaughey GB, Bogusky MJ, et al. Discovery of the dual orexin receptor antagonist [(7R)-4-(5-chloro-1,3-benzoxazol-2-yl)-7-methyl-1,4-diazepan-1-yl][5-methyl-2-(2H-1,2,3-triazol-2-yl)phenyl]methanone (MK-4305) for the treatment of insomnia. *J Med Chem.* (2010) 53:5320–32. doi: 10.1021/jm100541c
 64. Turku A, Rinne MK, Boije Af, Gennäs G, Xhaard H, Lindholm D, et al. Orexin receptor agonist Yan 7874 is a weak agonist of orexin/hypocretin receptors and shows orexin receptor-independent cytotoxicity. *PLoS ONE* (2017) 12:e0178526. doi: 10.1371/journal.pone.0178526
 65. Irukayama-Tomobe Y, Ogawa Y, Tominaga H, Ishikawa Y, Hosokawa N, Ambai S, et al. Nonpeptide orexin type-2 receptor agonist ameliorates narcolepsy-cataplexy symptoms in mouse models. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2017) 114:5731–6. doi: 10.1073/pnas.1700499114
 66. Heifetz A, Bodkin MJ, Biggin PC. Discovery of the first selective, nonpeptidic orexin 2 receptor agonists. *J Med Chem.* (2015) 58:7928–30. doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b01394
 67. Soffin EM, Gill CH, Brough SJ, Jerman JC, Davies CH. Pharmacological characterisation of the orexin receptor subtype mediating postsynaptic excitation in the rat dorsal raphe nucleus. *Neuropharmacology* (2004) 46:1168–76. doi: 10.1016/j.neuropharm.2004.02.014
 68. Smith JS, Lefkowitz RJ, Rajagopal S. Biased signalling: from simple switches to allosteric microprocessors. *Nat Rev Drug Discov.* (2018) 17:243–60. doi: 10.1038/nrd.2017.229
 69. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin.* (2016) 66:7–30. doi: 10.3322/caac.21332
 70. Patel A, Fong L. Immunotherapy for prostate cancer: where do we go from here?—PART 2: checkpoint inhibitors, immunotherapy combinations, tumor microenvironment modulation, and cellular therapies. *Oncology* (2018) 32:e65–73.
 71. Rove KO, Crawford ED. Traditional androgen ablation approaches to advanced prostate cancer: new insights. *Can J Urol.* (2014) 21:14–21.
 72. Watson PA, Arora VK, Sawyers CL. Emerging mechanisms of resistance to androgen receptor inhibitors in prostate cancer. *Nat Rev Cancer* (2015) 15:701–11. doi: 10.1038/nrc4016
 73. Wang W, Chen ZX, Guo DY, Tao YX. Regulation of prostate cancer by hormone-responsive G protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther.* (2018) doi: 10.1016/j.pharmthera.2018.06.005. [Epub ahead of print].
 74. Maly IV, Hofmann WA. Calcium and nuclear signaling in prostate cancer. *Int J Mol Sci.* (2018) 19:E1237. doi: 10.3390/ijms19041237
 75. Li S, Huang S, Peng SB. Overexpression of G protein-coupled receptors in cancer cells: involvement in tumor progression. *Int J Oncol.* (2005) 27:1329–39. doi: 10.3892/ijo.27.5.1329
 76. Sumitomo M, Shen R, Walburg M, Dai J, Geng Y, Navarro D, et al. Neutral endopeptidase inhibits prostate cancer cell migration by blocking focal adhesion kinase signaling. *J Clin Invest.* (2000) 106:1399–407. doi: 10.1172/JCI10536
 77. Collado B, Sanchez MG, Diaz-Laviada I, Prieto JC, Carmena MJ. Vasoactive intestinal peptide (VIP) induces c-fos expression in LNCaP prostate cancer cells through a mechanism that involves Ca²⁺ signalling. Implications in angiogenesis and neuroendocrine differentiation. *Biochim Biophys Acta* (2005) 1744:224–33. doi: 10.1016/j.bbamcr.2005.04.009
 78. Farini D, Puglianiello A, Mammì C, Siracusa G, Moretti C. Dual effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on prostate tumor LNCaP cells: short- and long-term exposure affect proliferation and neuroendocrine differentiation. *Endocrinology* (2003) 144:1631–43. doi: 10.1210/en.2002-221009
 79. Juarranz MG, Bolanos O, Gutierrez-Canas I, Lerner EA, Robberecht P, Carmena MJ, et al. Neuroendocrine differentiation of the LNCaP prostate cancer cell line maintains the expression and function of VIP and PACAP receptors. *Cell Signal.* (2001) 13:887–94. doi: 10.1016/S0898-6568(01)00199-1
 80. Abasolo I, Montuenga LM, Calvo A. Adrenomedullin prevents apoptosis in prostate cancer cells. *Regul Pept.* (2006) 133:115–22. doi: 10.1016/j.regpep.2005.09.026
 81. Zhong M, Boseman ML, Millena AC, Khan SA. Oxytocin induces the migration of prostate cancer cells: involvement of the G-coupled signaling pathway. *Mol Cancer Res.* (2010) 8:1164–72. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-09-0329
 82. Bhola NE, Grandis JE. Crosstalk between G-protein-coupled receptors and Epidermal growth factor receptor in cancer. *Front Biosci.* (2008) 13:1857–65. doi: 10.2741/2805
 83. Alexandre D, Hautot C, Mehio M, Jeandel L, Courel M, Voisin T, et al. The orexin type 1 receptor is overexpressed in advanced prostate cancer with a neuroendocrine differentiation, and mediates apoptosis. *Eur J Cancer* (2014) 50:2126–33. doi: 10.1016/j.ejca.2014.05.008
 84. Malendowicz W, Szyszka M, Ziolkowska A, Rucinski M, Kwias Z. Elevated expression of orexin receptor 2 (HCRTR2) in benign prostatic hyperplasia is accompanied by lowered serum orexin A concentrations. *Int J Mol Med.* (2011) 27:377–83. doi: 10.3892/ijmm.2010.590
 85. Valiante S, Liguori G, Tafuri S, Pavone LM, Campese R, Monaco R, et al. Expression and potential role of the peptide orexin-A in prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* (2015) 464:1290–6. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.07.124
 86. Tsunematsu T, Yamanaka A. The role of orexin/hypocretin in the central nervous system and peripheral tissues. *Vitam Horm.* (2012) 89:19–33. doi: 10.1016/B978-0-12-394623-2.00002-0
 87. Graybill NL, Weissig V. A review of orexin's unprecedented potential as a novel, highly-specific treatment for various localized and metastatic cancers. *SAGE Open Med.* (2017) 5:1–9. doi: 10.1177/2050312117735774
 88. Wenzel J, Grabinski N, Knopp CA, Dendorfer A, Ramanjaneya M, Randeva HS, et al. Hypocretin/orexin increases the expression of steroidogenic enzymes in human adrenocortical NCI H295R cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* (2009) 297:R1601–9. doi: 10.1152/ajpregu.91034.2008
 89. Spinazzi R, Rucinski M, Neri G, Malendowicz LK, Nussdorfer GG. Preproorexin and orexin receptors are expressed in cortisol-secreting adrenocortical adenomas, and orexins stimulate *in vitro* cortisol secretion and growth of tumor cells. *J Clin Endocrinol Metab.* (2005) 90:3544–9. doi: 10.1210/jc.2004-2385
 90. Liu Y, Zhao Y, Guo L. Effects of orexin A on glucose metabolism in human hepatocellular carcinoma *in vitro* via PI3K/Akt/mTOR-dependent and -independent mechanism. *Mol Cell Endocrinol.* (2016) 420:208–16. doi: 10.1016/j.mce.2015.11.002
 91. Liu Y, Zhao Y, Ju S, Guo L. Orexin A upregulates the protein expression of OX1R and enhances the proliferation of SGC-7901 gastric cancer cells through the ERK signaling pathway. *Int J Mol Med.* (2015) 35:539–45. doi: 10.3892/ijmm.2014.2038
 92. Wen J, Zhao Y, Shen Y, Guo L. Effect of orexin A on apoptosis in BGC-823 gastric cancer cells via OX1R through the AKT signaling pathway. *Mol Med Rep.* (2015) 11:3439–44. doi: 10.3892/mmr.2015.3190
 93. Bai B, Chen X, Zhang R, Wang X, Jiang Y, Li D, et al. Dual-agonist occupancy of orexin receptor 1 and cholecystokinin A receptor heterodimers decreases G-protein-dependent signaling and migration in the human colon cancer cell line HT-29. *Biochim Biophys Acta* (2017) 1864:1153–64. doi: 10.1016/j.bbamcr.2017.03.003
 94. Mazzocchi G, Malendowicz LK, Aragona F, Rebuffat P, Gottardo L, Nussdorfer GG. Human pheochromocytomas express orexin receptor type 2 gene and display an *in vitro* secretory response to orexins A and B. *J Clin Endocrinol Metab.* (2001) 86:4818–21. doi: 10.1210/jcem.86.10.7929
 95. Nanmoku T, Isobe K, Sakurai T, Yamanaka A, Takekoshi K, Kawakami Y, et al. Orexins suppress catecholamine synthesis and secretion in cultured PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* (2000) 274:310–5. doi: 10.1006/bbrc.2000.3137

96. Dehan P, Canon C, Trooskens G, Rehli M, Munaut C, Van Criekinge W, et al. Expression of type 2 orexin receptor in human endometrium and its epigenetic silencing in endometrial cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* (2013) 98:1549–57. doi: 10.1210/jc.2012-3263
97. Kantono M, Guo B. Inflammasomes and cancer: the dynamic role of the inflammasome in tumor development. *Front Immunol.* (2017) 8:1132. doi: 10.3389/fimmu.2017.01132
98. Duffy C M, Yuan C, Wisdorf L E, Billington C J, Kotz C M, Nixon J P, et al. Role of orexin A signaling in dietary palmitic acid-activated microglial cells. *Neurosci Lett.* (2015) 606:140–4. doi: 10.1016/j.neulet.2015.08.033
99. Xiong X, White R E, Xu L, Yang L, Sun X, Zou B, et al. Mitigation of murine focal cerebral ischemia by the hypocretin/orexin system is associated with reduced inflammation. *Stroke* (2013) 44:764–70. doi: 10.1161/STROKEAHA.112.681700
100. Ogawa Y, Irukayama-Tomobe Y, Murakoshi N, Kiyama M, Ishikawa Y, Hosokawa N, et al. Peripherally administered orexin improves survival of mice with endotoxin shock. *Elife* (2016) 5:e21055. doi: 10.7554/eLife.21055
101. Chieffi S, Carotenuto M, Monda V, Valenzano A, Villano I, Precenzano F, et al. Orexin system: the key for a healthy life. *Front Physiol.* (2017) 8:357. doi: 10.3389/fphys.2017.00357
102. Prochasson C, Bergere M, Messal N, Dayot S, Rebours V, Voisin T, et al. The hypothalamic neuropeptide, orexin, prevents chronic pancreatitis in cerulein mice model. *Gastroenterology* (2016) 150:S917. doi: 10.1016/S0016-5085(16)33110-9
103. Martínez-Orozco F J, Vicario J L, Villalibre-Valderrey I, De Andrés C, Fernández-Arquero M, Peralta-Adrados R. Narcolepsy with cataplexy and comorbid immunopathological diseases. *J Sleep Res.* (2014) 23:414–9. doi: 10.1111/jsr.12143

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Couvineau, Dayot, Nicole, Gratio, Rebours, Couvelard and Voisin. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Références bibliographiques

A

- Adamantidis, A.R., Zhang, F., Aravanis, A.M., Deisseroth, K. & Lecea, L. de. (2007) Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons. *Nature*, **450**, 420–424.
- Adams, J.M. & Cory, S. (2007) Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Current Opinion in Immunology*, **19**, 488–496.
- Akl, H., Badran, B.M., Zein, N.E., Zein, N.E., Bex, F., Sotiriou, C., *et al.* (2007) HTLV-I infection of WE17/10 CD4+ cell line leads to progressive alteration of Ca²⁺ influx that eventually results in loss of CD7 expression and activation of an antiapoptotic pathway involving AKT and BAD which paves the way for malignant transformation. *Leukemia*, **21**, 788–796.
- Alexandre, D., Hautot, C., Mehio, M., Jeandel, L., Courel, M., Voisin, T., *et al.* (2014) The orexin type 1 receptor is overexpressed in advanced prostate cancer with a neuroendocrine differentiation, and mediates apoptosis. *European Journal of Cancer*, **50**, 2126–2133.
- Amin, M.B., Greene, F.L., Edge, S.B., Compton, C.C., Gershengwald, J.E., Brookland, R.K., *et al.* (2017) The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. *CA: a cancer journal for clinicians*, **67**, 93–99.
- Ammoun, S., Johansson, L., Ekholm, M.E., Holmqvist, T., Danis, A.S., Korhonen, L., *et al.* (2006) OX1 orexin receptors activate extracellular signal-regulated kinase in Chinese hamster ovary cells via multiple mechanisms: the role of Ca²⁺ influx in OX1 receptor signaling. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, **20**, 80–99.
- Anborgh, P.H., Seachrist, J.L., Dale, L.B. & Ferguson, S.S. (2000) Receptor/beta-arrestin complex formation and the differential trafficking and resensitization of beta2-adrenergic and angiotensin II type 1A receptors. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, **14**, 2040–2053.
- Arafat, A.M., Kaczmarek, P., Skrzypski, M., Pruszyńska-Oszmałek, E., Kołodziejki, P., Adamidou, A., *et al.* (2014) Glucagon regulates orexin A secretion in humans and rodents. *Diabetologia*, **57**, 2108–2116.

B

- Bader, J.E., Deckert, C.M., Koglin, N., Pluder, F., Mörl, K., Koczan, D., *et al.* (2004) From transcription profile to expression: the signaling repertoire of the SK-N-MC neuroepithelioma cell-line. *Journal of Receptor and Signal Transduction Research*, **24**, 257–282.
- Balkwill, F.R., Capasso, M. & Hagemann, T. (2012) The tumor microenvironment at a glance. *Journal of Cell Science*, **125**, 5591–5596.
- Balthazar, E.J., Megibow, A.J., Hulnick, D. & Naidich, D.P. (1988) Carcinoma of the colon: detection and preoperative staging by CT. *AJR. American journal of roentgenology*, **150**, 301–306.
- Barreiro, M.L., Pineda, R., Gaytan, F., Archanco, M., Burrell, M.A., Castellano, J.M., *et al.* (2005) Pattern of orexin expression and direct biological actions of orexin-a in rat testis. *Endocrinology*, **146**, 5164–5175.
- Barreiro, M.L., Pineda, R., Navarro, V.M., Lopez, M., Suominen, J.S., Pinilla, L., *et al.* (2004) Orexin 1 receptor messenger ribonucleic acid expression and stimulation of testosterone secretion by orexin-A in rat testis. *Endocrinology*, **145**, 2297–2306.
- Bar-Shavit, R., Maoz, M., Kancharla, A., Nag, J.K., Agranovich, D., Grisaru-Granovsky, S., *et al.* (2016) G Protein-Coupled Receptors in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, **17**.
- Beig, M.I., Dampney, B.W. & Carrive, P. (2015) Both Ox1r and Ox2r orexin receptors contribute to the cardiovascular and locomotor components of the novelty stress response in the rat. *Neuropharmacology*, **89**, 146–156.

- Benito, J., Zeng, Z., Konopleva, M. & Wilson, W.R. (2013) Targeting hypoxia in the leukemia microenvironment. *International Journal of Hematologic Oncology*, **2**, 279–288.
- Biegańska, K., Sokołowska, P., Jöhren, O. & Zawilska, J.B. (2012) Orexin A suppresses the growth of rat C6 glioma cells via a caspase-dependent mechanism. *Journal of molecular neuroscience: MN*, **48**, 706–712.
- Bipat, S., Leeuwen, M.S. van, Comans, E.F.I., Pijl, M.E.J., Bossuyt, P.M.M., Zwinderman, A.H., *et al.* (2005a) Colorectal liver metastases: CT, MR imaging, and PET for diagnosis--meta-analysis. *Radiology*, **237**, 123–131.
- Bipat, S., Phoa, S.S.K.S., Delden, O.M. van, Bossuyt, P.M.M., Gouma, D.J., Laméris, J.S., *et al.* (2005b) Ultrasonography, computed tomography and magnetic resonance imaging for diagnosis and determining resectability of pancreatic adenocarcinoma: a meta-analysis. *Journal of Computer Assisted Tomography*, **29**, 438–445.
- Blais, A., Drouin, G., Chaumontet, C., Voisin, T., Couvelard, A., Even, P.C., *et al.* (2017) Impact of Orexin-A Treatment on Food Intake, Energy Metabolism and Body Weight in Mice. *PLoS ONE*, **12**.
- Blanco, M., García-Caballero, T., Fraga, M., Gallego, R., Cuevas, J., Forteza, J., *et al.* (2002) Cellular localization of orexin receptors in human adrenal gland, adrenocortical adenomas and pheochromocytomas. *Regulatory Peptides*, **104**, 161–165.
- Blasco, M.A. (2005) Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nature Reviews. Genetics*, **6**, 611–622.
- Boehmer, H. von & Daniel, C. (2013) Therapeutic opportunities for manipulating T(Reg) cells in autoimmunity and cancer. *Nature Reviews. Drug Discovery*, **12**, 51–63.
- Boland, C.R. & Goel, A. (2010) Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology*, **138**, 2073-2087.e3.
- Borgland, S.L., Taha, S.A., Sarti, F., Fields, H.L. & Bonci, A. (2006) Orexin A in the VTA is critical for the induction of synaptic plasticity and behavioral sensitization to cocaine. *Neuron*, **49**, 589–601.
- Boss, C. & Roch, C. (2015) Recent trends in orexin research--2010 to 2015. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **25**, 2875–2887.
- Bourke, M.G., Salwa, S., Harrington, K.J., Kucharczyk, M.J., Forde, P.F., Kruijff, M. de, *et al.* (2011) The emerging role of viruses in the treatment of solid tumours. *Cancer Treatment Reviews*, **37**, 618–632.
- Boutrel, B., Kenny, P.J., Specio, S.E., Martin-Fardon, R., Markou, A., Koob, G.F., *et al.* (2005) Role for hypocretin in mediating stress-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **102**, 19168–19173.
- Bouvier, A.-M., Uhry, Z., Jooste, V., Drouillard, A., Remontet, L., Launoy, G., *et al.* (2017) Focus on an unusual rise in pancreatic cancer incidence in France. *International Journal of Epidemiology*, **46**, 1764–1772.
- Bouvier, M. (2012) Métaphores, nomenclature et nouveaux paradigmes de signalisation par les récepteurs couplés aux protéines G. *médecine/sciences*, **28**, 801–803.
- Bouvier, M., Hausdorff, W.P., De Blasi, A., O'Dowd, B.F., Kobilka, B.K., Caron, M.G., *et al.* (1988) Removal of phosphorylation sites from the beta 2-adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization. *Nature*, **333**, 370–373.
- Bruhns, P., Iannascoli, B., England, P., Mancardi, D.A., Fernandez, N., Jorieux, S., *et al.* (2009) Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood*, **113**, 3716–3725.
- Brust, T.F., Conley, J.M. & Watts, V.J. (2015) Gα(i/o)-coupled receptor-mediated sensitization of adenylyl cyclase: 40 years later. *European Journal of Pharmacology*, **763**, 223–232.

Bucci, C., Thomsen, P., Nicoziani, P., McCarthy, J. & Deurs, B. van. (2000) Rab7: a key to lysosome biogenesis. *Molecular Biology of the Cell*, **11**, 467–480.

Burkhardt, D.L. & Sage, J. (2008) Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nature Reviews. Cancer*, **8**, 671–682.

C

Carter, M.E., Adamantidis, A., Ohtsu, H., Deisseroth, K. & Lecea, L. de. (2009) Sleep homeostasis modulates hypocretin-mediated sleep-to-wake transitions. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, **29**, 10939–10949.

Cavallaro, U. & Christofori, G. (2004) Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nature Reviews. Cancer*, **4**, 118–132.

Ceresa, B.P. & Limbird, L.E. (1994) Mutation of an aspartate residue highly conserved among G-protein-coupled receptors results in nonreciprocal disruption of alpha 2-adrenergic receptor-G-protein interactions. A negative charge at amino acid residue 79 forecasts alpha 2A-adrenergic receptor sensitivity to allosteric modulation by monovalent cations and fully effective receptor/G-protein coupling. *The Journal of Biological Chemistry*, **269**, 29557–29564.

Chang, X., Zhao, Y., Ju, S. & Guo, L. (2014) Orexin-A stimulates 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase expression and cortisol production in H295R human adrenocortical cells through the AKT pathway. *International Journal of Molecular Medicine*, **34**, 1523–1528.

Chemelli, R.M., Willie, J.T., Sinton, C.M., Elmquist, J.K., Scammell, T., Lee, C., *et al.* (1999) Narcolepsy in orexin Knockout Mice: Molecular Genetics of Sleep Regulation. *Cell*, **98**, 437–451.

Chen, L., Zhao, Y., Zheng, D., Ju, S., Shen, Y. & Guo, L. (2013) Orexin A Affects INS-1 Rat Insulinoma Cell Proliferation via Orexin Receptor 1 and the AKT Signaling Pathway. *International Journal of Endocrinology*, **2013**, 854623.

Cherezov, V. (2011) Lipidic cubic phase technologies for membrane protein structural studies. *Current Opinion in Structural Biology*, **21**, 559–566.

Chieffi, S., Carotenuto, M., Monda, V., Valenzano, A., Villano, I., Precenzano, F., *et al.* (2017) Orexin System: The Key for a Healthy Life. *Frontiers in Physiology*, **8**.

Chin, L.S., Raynor, M.C., Wei, X., Chen, H.Q. & Li, L. (2001) Hrs interacts with sorting nexin 1 and regulates degradation of epidermal growth factor receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**, 7069–7078.

Chiorean, E.G., Von Hoff, D.D., Reni, M., Arena, F.P., Infante, J.R., Bathini, V.G., *et al.* (2016) CA19-9 decrease at 8 weeks as a predictor of overall survival in a randomized phase III trial (MPACT) of weekly nab-paclitaxel plus gemcitabine versus gemcitabine alone in patients with metastatic pancreatic cancer. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, **27**, 654–660.

Clapham, D.E. & Neer, E.J. (1997) G protein beta gamma subunits. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **37**, 167–203.

Clifford, L., Dampney, B.W. & Carrive, P. (2015) Spontaneously hypertensive rats have more orexin neurons in their medial hypothalamus than normotensive rats. *Experimental Physiology*, **100**, 388–398.

Coleman, P.J. & Renger, J.J. (2010) Orexin receptor antagonists: a review of promising compounds patented since 2006. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, **20**, 307–324.

[Consensus conference. Prevention, diagnosis and treatment of colon cancer]. (1998) *Gastroenterologie Clinique Et Biologique*, **22**, 205–226.

Couvelard, A., Rebours, V., Prochasson, C., Bergere, M., Messal, N., Dayot, S., *et al.* (2016) The hypothalamic neuropeptide, orexin, prevents chronic pancreatitis in cerulein mice model. *Pancreatology*, **16**, S11–S12.

Cowppli-Bony, A., Uhry, Z., Remontet, L., Voirin, N., Guizard, A.-V., Trétarre, B., *et al.* (2017) Survival of solid cancer patients in France, 1989-2013: a population-based study. *European journal of cancer prevention: the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, **26**, 461–468.

Cremolini, C., Loupakis, F., Antoniotti, C., Lupi, C., Sensi, E., Lonardi, S., *et al.* (2015) FOLFOXIRI plus bevacizumab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer: updated overall survival and molecular subgroup analyses of the open-label, phase 3 TRIBE study. *The Lancet. Oncology*, **16**, 1306–1315.

Curto, M. & McClatchey, A.I. (2008) Nf2/Merlin: a coordinator of receptor signalling and intercellular contact. *British Journal of Cancer*, **98**, 256–262.

Cypess, A.M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A.B., *et al.* (2009) Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *The New England Journal of Medicine*, **360**, 1509–1517.

D

Darker, J.G., Porter, R.A., Eggleston, D.S., Smart, D., Brough, S.J., Sabido-David, C., *et al.* (2001) Structure-activity analysis of truncated orexin-A analogues at the orexin-1 receptor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **11**, 737–740.

Darmoul, D., Gratio, V., Devaud, H., Peiretti, F. & Laburthe, M. (2004) Activation of proteinase-activated receptor 1 promotes human colon cancer cell proliferation through epidermal growth factor receptor transactivation. *Molecular cancer research: MCR*, **2**, 514–522.

Darmoul, D., Marie, J.C., Devaud, H., Gratio, V. & Laburthe, M. (2001) Initiation of human colon cancer cell proliferation by trypsin acting at protease-activated receptor-2. *British Journal of Cancer*, **85**, 772–779.

Date, Y., Ueta, Y., Yamashita, H., Yamaguchi, H., Matsukura, S., Kangawa, K., *et al.* (1999) Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 748–753.

Dayas, C.V., McGranahan, T.M., Martin-Fardon, R. & Weiss, F. (2008) Stimuli linked to ethanol availability activate hypothalamic CART and orexin neurons in a reinstatement model of relapse. *Biological Psychiatry*, **63**, 152–157.

Dayot, S., Speisky, D., Couvelard, A., Bourgoin, P., Gratio, V., Cros, J., *et al.* (2018) In vitro , in vivo and ex vivo demonstration of the antitumoral role of hypocretin-1/orexin-A and almorexant in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncotarget*, **9**, 6952–6967.

De Angelis, C., Brizzi, R.F. & Pellicano, R. (2013) Endoscopic ultrasonography for pancreatic cancer: current and future perspectives. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, **4**, 220–230.

Dehan, P., Canon, C., Trooskens, G., Rehli, M., Munaut, C., Van Criekinge, W., *et al.* (2013) Expression of type 2 orexin receptor in human endometrium and its epigenetic silencing in endometrial cancer. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **98**, 1549–1557.

Delpero, J.R., Bachellier, P., Regenet, N., Le Treut, Y.P., Paye, F., Carrere, N., *et al.* (2014) Pancreaticoduodenectomy for pancreatic ductal adenocarcinoma: a French multicentre prospective evaluation of resection margins in 150 evaluable specimens. *HPB: the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association*, **16**, 20–33.

Digby, J.E., Chen, J., Tang, J.Y., Lehnert, H., Matthews, R.N. & Randeve, H.S. (2006) Orexin receptor expression in human adipose tissue: effects of orexin-A and orexin-B. *Journal of Endocrinology*, **191**, 129–136.

Duguay, D., Bélanger-Nelson, E., Mongrain, V., Beben, A., Khatchadourian, A. & Cermakian, N. (2011) Dynein light chain Tctex-type 1 modulates orexin signaling through its interaction with orexin 1 receptor. *PloS One*, **6**, e26430.

Dunn, R., Klos, D.A., Adler, A.S. & Hicke, L. (2004) The C2 domain of the Rsp5 ubiquitin ligase binds membrane phosphoinositides and directs ubiquitination of endosomal cargo. *The Journal of Cell Biology*, **165**, 135–144.

E

Ehrström, M., Gustafsson, T., Finn, A., Kirchgessner, A., Grybäck, P., Jacobsson, H., *et al.* (2005a) Inhibitory Effect of Exogenous Orexin A on Gastric Emptying, Plasma Leptin, and the Distribution of Orexin and Orexin Receptors in the Gut and Pancreas in Man. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **90**, 2370–2377.

Ehrström, M., Levin, F., Kirchgessner, A.L., Schmidt, P.T., Hilsted, L.M., Grybäck, P., *et al.* (2005b) Stimulatory effect of endogenous orexin A on gastric emptying and acid secretion independent of gastrin. *Regulatory Peptides*, **132**, 9–16.

El Firar, A., Voisin, T., Rouyer-Fessard, C., Ostuni, M.A., Couvineau, A. & Laburthe, M. (2009) Discovery of a functional immunoreceptor tyrosine-based switch motif in a 7-transmembrane-spanning receptor: role in the orexin receptor OX1R-driven apoptosis. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **23**, 4069–4080.

España, R.A., Melchior, J.R., Roberts, D.C.S. & Jones, S.R. (2011) Hypocretin 1/orexin A in the ventral tegmental area enhances dopamine responses to cocaine and promotes cocaine self-administration. *Psychopharmacology*, **214**, 415–426.

Estabrooke, I.V., McCarthy, M.T., Ko, E., Chou, T.C., Chemelli, R.M., Yanagisawa, M., *et al.* (2001) Fos Expression in Orexin Neurons Varies with Behavioral State. *Journal of Neuroscience*, **21**, 1656–1662.

Evans, N.A., Groarke, D.A., Warrack, J., Greenwood, C.J., Dodgson, K., Milligan, G., *et al.* (2001) Visualizing differences in ligand-induced beta-arrestin-GFP interactions and trafficking between three recently characterized G protein-coupled receptors. *Journal of Neurochemistry*, **77**, 476–485.

F

Fearon, E.R. & Vogelstein, B. (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, **61**, 759–767.

Ferlay, J., Partensky, C. & Bray, F. (2016) More deaths from pancreatic cancer than breast cancer in the EU by 2017. *Acta Oncologica (Stockholm, Sweden)*, **55**, 1158–1160.

Fessart, D., Simaan, M., Zimmerman, B., Comeau, J., Hamdan, F.F., Wiseman, P.W., *et al.* (2007) Src-dependent phosphorylation of beta2-adaptin dissociates the beta-arrestin-AP-2 complex. *Journal of Cell Science*, **120**, 1723–1732.

Fichtner-Feigl, S., Kesselring, R. & Strober, W. (2015) Chronic inflammation and the development of malignancy in the GI tract. *Trends in Immunology*, **36**, 451–459.

Fidler, I.J. (2003) The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. *Nature Reviews. Cancer*, **3**, 453–458.

Flores, I., Benetti, R. & Blasco, M.A. (2006) Telomerase regulation and stem cell behaviour. *Current Opinion in Cell Biology*, **18**, 254–260.

Fosgerau, K. & Hoffmann, T. (2015) Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug Discovery Today*, **20**, 122–128.

French, A.R., Tadaki, D.K., Niyogi, S.K. & Lauffenburger, D.A. (1995) Intracellular trafficking of epidermal growth factor family ligands is directly influenced by the pH sensitivity of the receptor/ligand interaction. *The Journal of Biological Chemistry*, **270**, 4334–4340.

Frey, D.M., Droezer, R.A., Viehl, C.T., Zlobec, I., Lugli, A., Zingg, U., *et al.* (2010) High frequency of tumor-infiltrating FOXP3(+) regulatory T cells predicts improved survival in mismatch repair-proficient colorectal cancer patients. *International Journal of Cancer*, **126**, 2635–2643.

Fridman, W.H., Pagès, F., Sautès-Fridman, C. & Galon, J. (2012) The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nature Reviews. Cancer*, **12**, 298–306.

Fujiki, N., Yoshida, Y., Ripley, B., Honda, K., Mignot, E. & Nishino, S. (2001) Changes in CSF hypocretin-1 (orexin A) levels in rats across 24 hours and in response to food deprivation. *NeuroReport*, **12**, 993.

Funato, H., Tsai, A.L., Willie, J.T., Kisanuki, Y., Williams, S.C., Sakurai, T., *et al.* (2009) Enhanced orexin receptor-2 signaling prevents diet-induced obesity and improves leptin sensitivity. *Cell Metabolism*, **9**, 64–76.

G

Gage, R.M., Kim, K.A., Cao, T.T. & Zastrow, M. von. (2001) A transplantable sorting signal that is sufficient to mediate rapid recycling of G protein-coupled receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**, 44712–44720.

Gage, R.M., Matveeva, E.A., Whiteheart, S.W. & Zastrow, M. von. (2005) Type I PDZ ligands are sufficient to promote rapid recycling of G Protein-coupled receptors independent of binding to N-ethylmaleimide-sensitive factor. *The Journal of Biological Chemistry*, **280**, 3305–3313.

Gajewski, T.F., Schreiber, H. & Fu, Y.-X. (2013) Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nature Immunology*, **14**, 1014–1022.

Galés, C. & Bouvier, M. (2007) [New talk between receptor and trimeric G proteins: “an intertwined body dance”]. *Medecine Sciences: M/S*, **23**, 1031–1034.

Gaudriault, G., Nouel, D., Dal Farra, C., Beudet, A. & Vincent, J.P. (1997) Receptor-induced internalization of selective peptidic mu and delta opioid ligands. *The Journal of Biological Chemistry*, **272**, 2880–2888.

Gautvik, K.M., Lecea, L. de, Gautvik, V.T., Danielson, P.E., Tranque, P., Dopazo, A., *et al.* (1996) Overview of the most prevalent hypothalamus-specific mRNAs, as identified by directional tag PCR subtraction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**, 8733–8738.

Gentili, C., Boland, R. & Russo de Boland, A. (2006) Implication of Gbetagamma proteins and c-SRC tyrosine kinase in parathyroid hormone-induced signal transduction in rat enterocytes. *The Journal of Endocrinology*, **188**, 69–78.

Georgescu, D., Zachariou, V., Barrot, M., Mieda, M., Willie, J.T., Eisch, A.J., *et al.* (2003) Involvement of the lateral hypothalamic peptide orexin in morphine dependence and withdrawal. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, **23**, 3106–3111.

Gocheva, V., Wang, H.-W., Gadea, B.B., Shree, T., Hunter, K.E., Garfall, A.L., *et al.* (2010) IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion. *Genes & Development*, **24**, 241–255.

Göncz, E., Strowski, M.Z., Grötzing, C., Nowak, K.W., Kaczmarek, P., Sassek, M., *et al.* (2008) Orexin-A inhibits glucagon secretion and gene expression through a Foxo1-dependent pathway. *Endocrinology*, **149**, 1618–1626.

Gotter, A.L., Roecker, A.J., Hargreaves, R., Coleman, P.J., Winrow, C.J. & Renger, J.J. (2012) Orexin receptors as therapeutic drug targets. *Progress in Brain Research*, **198**, 163–188.

Grady, E.F., Garland, A.M., Gamp, P.D., Lovett, M., Payan, D.G. & Bunnett, N.W. (1995) Delineation of the endocytic pathway of substance P and its seven-transmembrane domain NK1 receptor. *Molecular Biology of the Cell*, **6**, 509–524.

Grady, W.M. & Carethers, J.M. (2008) Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology*, **135**, 1079–1099.

Gratio, V., Walker, F., Lehy, T., Laburthe, M. & Darmoul, D. (2009) Aberrant expression of proteinase-activated receptor 4 promotes colon cancer cell proliferation through a persistent signaling that involves Src and ErbB-2 kinase. *International Journal of Cancer*, **124**, 1517–1525.

Graybill, N.L. & Weissig, V. (2017) A review of orexin's unprecedented potential as a novel, highly-specific treatment for various localized and metastatic cancers. *SAGE open medicine*, **5**, 2050312117735774.

Grivennikov, S.I., Greten, F.R. & Karin, M. (2010) Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, **140**, 883–899.

Gurevich, V.V. & Gurevich, E.V. (2017) Molecular Mechanisms of GPCR Signaling: A Structural Perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, **18**.

H

Hagan, J.J., Leslie, R.A., Patel, S., Evans, M.L., Wattam, T.A., Holmes, S., *et al.* (1999) Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 10911–10916.

Hahn, S.A., Schutte, M., Hoque, A.T., Moskaluk, C.A., Costa, L.T. da, Rozenblum, E., *et al.* (1996) DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science (New York, N.Y.)*, **271**, 350–353.

Hanahan, D. & Coussens, L.M. (2012) Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*, **21**, 309–322.

Hanahan, D. & Folkman, J. (1996) Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, **86**, 353–364.

Hanahan, D. & Weinberg, R.A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, **144**, 646–674.

Hanyaloglu, A.C. & Zastrow, M. von. (2008a) Regulation of GPCRs by endocytic membrane trafficking and its potential implications. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **48**, 537–568.

Hanyaloglu, A.C. & Zastrow, M. von. (2008b) Regulation of GPCRs by endocytic membrane trafficking and its potential implications. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **48**, 537–568.

Hara, J., Beuckmann, C.T., Nambu, T., Willie, J.T., Chemelli, R.M., Sinton, C.M., *et al.* (2001) Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron*, **30**, 345–354.

Harris, D.M., Go, V.L.W., Reeve, J.R. & Wu, S.V. (2002) Stimulation of amylase release by Orexin is mediated by Orexin 2 receptor in AR42J cells. *Pancreas*, **25**, 405–410.

Harris, G.C., Wimmer, M. & Aston-Jones, G. (2005) A role for lateral hypothalamic orexin neurons in reward seeking. *Nature*, **437**, 556–559.

Hausdorff, W.P., Bouvier, M., O'Dowd, B.F., Irons, G.P., Caron, M.G. & Lefkowitz, R.J. (1989) Phosphorylation sites on two domains of the beta 2-adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization. *The Journal of Biological Chemistry*, **264**, 12657–12665.

Haynes, A.C., Jackson, B., Chapman, H., Tadayyon, M., Johns, A., Porter, R.A., *et al.* (2000) A selective orexin-1 receptor antagonist reduces food consumption in male and female rats. *Regulatory Peptides*, 10th European Neuropeptide Club, **96**, 45–51.

Hindmarch, I., Legangneux, E., Stanley, N., Emegbo, S. & Dawson, J. (2006) A double-blind, placebo-controlled investigation of the residual psychomotor and cognitive effects of zolpidem-MR in healthy elderly volunteers. *British Journal of Clinical Pharmacology*, **62**, 538–545.

Hofmann, K.P., Scheerer, P., Hildebrand, P.W., Choe, H.-W., Park, J.H., Heck, M., *et al.* (2009) A G protein-coupled receptor at work: the rhodopsin model. *Trends in Biochemical Sciences*, **34**, 540–552.

Hollander, J.A., Lu, Q., Cameron, M.D., Kamenecka, T.M. & Kenny, P.J. (2008) Insular hypocretin transmission regulates nicotine reward. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 19480–19485.

Hondo, M., Nagai, K., Ohno, K., Kisanuki, Y., Willie, J.T., Watanabe, T., *et al.* (2010) Histamine-1 receptor is not required as a downstream effector of orexin-2 receptor in maintenance of basal sleep/wake states. *Acta Physiologica (Oxford, England)*, **198**, 287–294.

Hu, Q., Wu, D., Chen, W., Yan, Z. & Shi, Y. (2013) Proteolytic processing of the caspase-9 zymogen is required for apoptosome-mediated activation of caspase-9. *The Journal of Biological Chemistry*, **288**, 15142–15147.

Huang, S.-C., Dai, Y.-W.E., Lee, Y.-H., Chiou, L.-C. & Hwang, L.-L. (2010) Orexins depolarize rostral ventrolateral medulla neurons and increase arterial pressure and heart rate in rats mainly via orexin 2 receptors. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **334**, 522–529.

Huang, Z.-L., Qu, W.-M., Li, W.-D., Mochizuki, T., Eguchi, N., Watanabe, T., *et al.* (2001) Arousal effect of orexin A depends on activation of the histaminergic system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 9965–9970.

Huber, M.J., Fan, Y., Jiang, E., Zhu, F., Larson, R.A., Yan, J., *et al.* (2017) Increased activity of the orexin system in the paraventricular nucleus contributes to salt-sensitive hypertension. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, **313**, H1075–H1086.

Hubert, S. & Abastado, J.-P. (2014) Les étapes précoces du processus métastatique. *médecine/sciences*, **30**, 378–384.

Hui, L. & Chen, Y. (2015) Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil. *Cancer Letters*, **368**, 7–13.

Hurley, J.H. & Emr, S.D. (2006) The ESCRT complexes: structure and mechanism of a membrane-trafficking network. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, **35**, 277–298.

Hynes, T.R., Tang, L., Mervine, S.M., Sabo, J.L., Yost, E.A., Devreotes, P.N., *et al.* (2004) Visualization of G protein betagamma dimers using bimolecular fluorescence complementation demonstrates roles for both beta and gamma in subcellular targeting. *The Journal of Biological Chemistry*, **279**, 30279–30286.

I

Inman, S. (2017) Novel Combination Shows Promising Responses in Pancreatic Cancer [WWW Document]. *Targeted Oncology*. URL <https://www.targetedonc.com/publications/targeted-therapies-cancer/2017/2017-december/novel-combination-shows-promising-responses-in-pancreatic-cancer> [accessed on 18 December 2017].
Iovanna, J., Mallmann, M.C., Gonçalves, A., Turrini, O. & Dagorn, J.-C. (2012) Current Knowledge on Pancreatic Cancer. *Frontiers in Oncology*, **2**.

Irukayama-Tomobe, Y., Ogawa, Y., Tominaga, H., Ishikawa, Y., Hosokawa, N., Ambai, S., *et al.* (2017) Nonpeptide orexin type-2 receptor agonist ameliorates narcolepsy-cataplexy symptoms in mouse models. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **114**, 5731–5736.

J

Jacobson, K.A. & Costanzi, S. (2012) New insights for drug design from the X-ray crystallographic structures of G-protein-coupled receptors. *Molecular Pharmacology*, **82**, 361–371.

Jiang, Y., Mackley, H.B., Kimchi, E.T., Zhu, J., Gusani, N., Kaifi, J., *et al.* (2014) Phase I dose escalation study of capecitabine and erlotinib concurrent with radiation in locally advanced pancreatic cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, **74**, 205–210.

Jöhren, O., Neidert, S.J., Kummer, M., Dendorfer, A. & Dominiak, P. (2001) Prepro-orexin and orexin receptor mRNAs are differentially expressed in peripheral tissues of male and female rats. *Endocrinology*, **142**, 3324–3331.

Jones, S., Zhang, X., Parsons, D.W., Lin, J.C.-H., Leary, R.J., Angenendt, P., *et al.* (2008) Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science (New York, N.Y.)*, **321**, 1801–1806.

Joyce, J.A. & Pollard, J.W. (2009) Microenvironmental regulation of metastasis. *Nature Reviews. Cancer*, **9**, 239–252.

Jupp, B., Krstew, E., Dezsi, G. & Lawrence, A.J. (2011) Discrete cue-conditioned alcohol-seeking after protracted abstinence: pattern of neural activation and involvement of orexin₁ receptors. *British Journal of Pharmacology*, **162**, 880–889.

K

Kamarajah, S.K., Burns, W.R., Frankel, T.L., Cho, C.S. & Nathan, H. (2017) Validation of the American Joint Commission on Cancer (AJCC) 8th Edition Staging System for Patients with Pancreatic Adenocarcinoma: A Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Analysis. *Annals of Surgical Oncology*, **24**, 2023–2030.

Kamoto, D., Thach, L., Bernard, R., Chan, V., Zheng, W., Kaur, H., *et al.* (2015) Structure, Function, Pharmacology, and Therapeutic Potential of the G Protein, Gα/q,11. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, **2**.

Karhu, L., Turku, A. & Xhaard, H. (2015) Modeling of the OX1R–orexin-A complex suggests two alternative binding modes. *BMC Structural Biology*, **15**.

Karnani, M.M., Apergis-Schoute, J., Adamantidis, A., Jensen, L.T., Lecea, L. de, Fugger, L., *et al.* (2011) Activation of central orexin/hypocretin neurons by dietary amino acids. *Neuron*, **72**, 616–629.

Karnoub, A.E., Dash, A.B., Vo, A.P., Sullivan, A., Brooks, M.W., Bell, G.W., *et al.* (2007) Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*, **449**, 557–563.

Karteris, E., Chen, J. & Randevara, H.S. (2004) Expression of human prepro-orexin and signaling characteristics of orexin receptors in the male reproductive system. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **89**, 1957–1962.

Kastin, A.J. & Akerstrom, V. (1999) Orexin A but Not Orexin B Rapidly Enters Brain from Blood by Simple Diffusion. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **289**, 219–223.

Keri, D. & Barth, P. (2018) Reprogramming G protein coupled receptor structure and function. *Current Opinion in Structural Biology*, **51**, 187–194.

Kern, R.C., Kang, D.S. & Benovic, J.L. (2009) Arrestin2/clathrin interaction is regulated by key N- and C-terminal regions in arrestin2. *Biochemistry*, **48**, 7190–7200.

Kessenbrock, K., Plaks, V. & Werb, Z. (2010) Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*, **141**, 52–67.

Khoury, E., Nikolajev, L., Simaan, M., Namkung, Y. & Laporte, S.A. (2014) Differential Regulation of Endosomal GPCR/β-Arrestin Complexes and Trafficking by MAPK. *The Journal of Biological Chemistry*, **289**, 23302–23317.

Kirchgessner, A.L. & Liu, M. (1999) Orexin synthesis and response in the gut. *Neuron*, **24**, 941–951.

Klemm, F. & Joyce, J.A. (2015) Microenvironmental regulation of therapeutic response in cancer. *Trends in Cell Biology*, **25**, 198–213.

Kobashi, M., Furudono, Y., Matsuo, R. & Yamamoto, T. (2002) Central orexin facilitates gastric relaxation and contractility in rats. *Neuroscience Letters*, **332**, 171–174.

Kolakowski, L.F. (1994) GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors & Channels*, **2**, 1–7.

Konieczny, V., Keebler, M.V. & Taylor, C.W. (2012) Spatial organization of intracellular Ca²⁺ signals. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **23**, 172–180.

Krowicki, Z.K., Burmeister, M.A., Berthoud, H.-R., Scullion, R.T., Fuchs, K. & Hornby, P.J. (2002) Orexins in rat dorsal motor nucleus of the vagus potently stimulate gastric motor function. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, **283**, G465-472.

Kukkonen, J.P. (2004) Regulation of receptor-coupling to (multiple) G proteins. A challenge for basic research and drug discovery. *Receptors & Channels*, **10**, 167–183.

Kukkonen, J.P. (2011) A ménage à trois made in heaven: G-protein-coupled receptors, lipids and TRP channels. *Cell Calcium*, **50**, 9–26.

Kukkonen, J.P. & Akerman, K.E. (2001) Orexin receptors couple to Ca²⁺ channels different from store-operated Ca²⁺ channels. *Neuroreport*, **12**, 2017–2020.

Kukkonen, J.P. & Leonard, C.S. (2014) Orexin/hypocretin receptor signalling cascades. *British Journal of Pharmacology*, **171**, 314–331.

L

Lang, M., Söll, R.M., Dürrenberger, F., Dautzenberg, F.M. & Beck-Sickinger, A.G. (2004) Structure-activity studies of orexin a and orexin B at the human orexin 1 and orexin 2 receptors led to orexin 2 receptor selective and orexin 1 receptor preferring ligands. *Journal of Medicinal Chemistry*, **47**, 1153–1160.

Laporte, S.A., Oakley, R.H., Holt, J.A., Barak, L.S. & Caron, M.G. (2000) The interaction of beta-arrestin with the AP-2 adaptor is required for the clustering of beta 2-adrenergic receptor into clathrin-coated pits. *The Journal of Biological Chemistry*, **275**, 23120–23126.

Laporte, S.A., Oakley, R.H., Zhang, J., Holt, J.A., Ferguson, S.S., Caron, M.G., *et al.* (1999) The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 3712–3717.

Larkin, J., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., Grob, J.J., Cowey, C.L., Lao, C.D., *et al.* (2015) Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *The New England Journal of Medicine*, **373**, 23–34.

Lawrence, A.J., Cowen, M.S., Yang, H.-J., Chen, F. & Oldfield, B. (2006) The orexin system regulates alcohol-seeking in rats. *British Journal of Pharmacology*, **148**, 752–759.

Lecea, L. de, Kilduff, T.S., Peyron, C., Gao, X.-B., Foye, P.E., Danielson, P.E., *et al.* (1998) The hypocretins: Hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 322–327.

Lee, J.-H., Bang, E., Chae, K.-J., Kim, J.-Y., Lee, D.W. & Lee, W. (1999) Solution structure of a new hypothalamic neuropeptide, human hypocretin-2/orexin-B. *European Journal of Biochemistry*, **266**, 831–839.

Lee, Y.-H., Tsai, M.-C., Li, T.-L., Dai, Y.-W.E., Huang, S.-C. & Hwang, L.-L. (2015) Spontaneously hypertensive rats have more orexin neurons in the hypothalamus and enhanced orexinergic input and orexin 2 receptor-associated nitric oxide signalling in the rostral ventrolateral medulla. *Experimental Physiology*, **100**, 993–1007.

Lefkowitz, R.J. & Whalen, E.J. (2004) beta-arrestins: traffic cops of cell signaling. *Current Opinion in Cell Biology*, **16**, 162–168.

Leininger, G.M., Opland, D.M., Jo, Y.-H., Faouzi, M., Christensen, L., Cappellucci, L.A., *et al.* (2011) Leptin action via neurotensin neurons controls orexin, the mesolimbic dopamine system and energy balance. *Cell Metabolism*, **14**, 313–323.

LeSage, M.G., Perry, J.L., Kotz, C.M., Shelley, D. & Corrigall, W.A. (2010) Nicotine self-administration in the rat: effects of hypocretin antagonists and changes in hypocretin mRNA. *Psychopharmacology*, **209**, 203–212.

Lewis, J., Eiben, L.J., Nelson, D.L., Cohen, J.I., Nichols, K.E., Ochs, H.D., *et al.* (2001) Distinct interactions of the X-linked lymphoproliferative syndrome gene product SAP with cytoplasmic domains of members of the CD2 receptor family. *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)*, **100**, 15–23.

Li, J., Hu, Z. & Lecea, L. de. (2014) The hypocretins/orexins: integrators of multiple physiological functions. *British Journal of Pharmacology*, **171**, 332–350.

Li, T.-L., Chen, J.Y.S., Huang, S.-C., Dai, Y.-W.E. & Hwang, L.-L. (2018) Cardiovascular pressor effects of orexins in the dorsomedial hypothalamus. *European Journal of Pharmacology*, **818**, 343–350.

- Li, X.-X., Liang, L., Huang, L.-Y. & Cai, S.-J. (2015) Standard chemotherapy with cetuximab for treatment of colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, **21**, 7022–7035.
- Lin, H.-H. (2013) G-protein-coupled receptors and their (Bio) chemical significance win 2012 Nobel Prize in Chemistry. *Biomedical Journal*, **36**, 118–124.
- Lin, L., Faraco, J., Li, R., Kadotani, H., Rogers, W., Lin, X., *et al.* (1999) The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell*, **98**, 365–376.
- Litosch, I. (2016) Decoding Gαq signaling. *Life Sciences*, **152**, 99–106.
- Liu, R.-J., Pol, A.N. van den & Aghajanian, G.K. (2002) Hypocretins (orexins) regulate serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus by excitatory direct and inhibitory indirect actions. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, **22**, 9453–9464.
- Liu, Y., Zhao, Y. & Guo, L. (2016) Effects of orexin A on glucose metabolism in human hepatocellular carcinoma in vitro via PI3K/Akt/mTOR-dependent and -independent mechanism. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **420**, 208–216.
- Liu, Y., Zhao, Y., Ju, S. & Guo, L. (2015) Orexin A upregulates the protein expression of OX1R and enhances the proliferation of SGC-7901 gastric cancer cells through the ERK signaling pathway. *International Journal of Molecular Medicine*, **35**, 539–545.
- Lohse, M.J., Benovic, J.L., Codina, J., Caron, M.G. & Lefkowitz, R.J. (1990) beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science (New York, N.Y.)*, **248**, 1547–1550.
- Louis, G.W., Leininger, G.M., Rhodes, C.J. & Myers, M.G. (2010) Direct innervation and modulation of orexin neurons by lateral hypothalamic LepRb neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, **30**, 11278–11287.
- Lowe, S.W., Cepero, E. & Evan, G. (2004) Intrinsic tumour suppression. *Nature*, **432**, 307–315.
- Lund, P.E., Shariatmadari, R., Uustare, A., Detheux, M., Parmentier, M., Kukkonen, J.P., *et al.* (2000) The orexin OX1 receptor activates a novel Ca²⁺ influx pathway necessary for coupling to phospholipase C. *The Journal of Biological Chemistry*, **275**, 30806–30812.
- Luttrell, L.M., Biesen, T. van, Hawes, B.E., Koch, W.J., Krueger, K.M., Touhara, K., *et al.* (1997) G-protein-coupled receptors and their regulation: activation of the MAP kinase signaling pathway by G-protein-coupled receptors. *Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research*, **31**, 263–277.
- Luttrell, L.M., Hawes, B.E., Biesen, T. van, Luttrell, D.K., Lansing, T.J. & Lefkowitz, R.J. (1996) Role of c-Src tyrosine kinase in G protein-coupled receptor- and Gbetagamma subunit-mediated activation of mitogen-activated protein kinases. *The Journal of Biological Chemistry*, **271**, 19443–19450.
- Lynch, H.T. & Chapelle, A. de la. (2003) Hereditary colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine*, **348**, 919–932.
- Lytton, J. (2007) Na⁺/Ca²⁺ exchangers: three mammalian gene families control Ca²⁺ transport. *The Biochemical Journal*, **406**, 365–382.

M

- MacDonald, P.E., Joseph, J.W. & Rorsman, P. (2005) Glucose-sensing mechanisms in pancreatic beta-cells. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, **360**, 2211–2225.
- Magga, J., Bart, G., Oker-Blom, C., Kukkonen, J.P., Akerman, K.E.O. & Näsman, J. (2006) Agonist potency differentiates G protein activation and Ca²⁺ signalling by the orexin receptor type 1. *Biochemical Pharmacology*, **71**, 827–836.

- Mahler, S.V., Smith, R.J., Moorman, D.E., Sartor, G.C. & Aston-Jones, G. (2012) Multiple roles for orexin/hypocretin in addiction. *Progress in brain research*, **198**, 79–121.
- Malbon, C.C. (2004) Frizzleds: new members of the superfamily of G-protein-coupled receptors. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, **9**, 1048–1058.
- Malleo, G., Maggino, L., Ferrone, C.R., Marchegiani, G., Mino-Kenudson, M., Capelli, P., *et al.* (2018) Number of Examined Lymph Nodes and Nodal Status Assessment in Distal Pancreatectomy for Body/Tail Ductal Adenocarcinoma. *Annals of Surgery*.
- Malumbres, M. & Barbacid, M. (2009) Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Reviews Cancer*, **9**, 153–166.
- Manglik, A., Kim, T.H., Masureel, M., Altenbach, C., Yang, Z., Hilger, D., *et al.* (2015) Structural insights into the dynamic process of β 2-adrenergic receptor signaling. *Cell*, **161**, 1101–1111.
- Maoret, J.J., Anini, Y., Rouyer-Fessard, C., Gully, D. & Laburthe, M. (1999) Neurotensin and a non-peptide neurotensin receptor antagonist control human colon cancer cell growth in cell culture and in cells xenografted into nude mice. *International Journal of Cancer*, **80**, 448–454.
- Marchese, A., Paing, M.M., Temple, B.R.S. & Trejo, J. (2008) G Protein–Coupled Receptor Sorting to Endosomes and Lysosomes. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **48**, 601–629.
- Mármol, I., Sánchez-de-Diego, C., Pradilla Dieste, A., Cerrada, E. & Rodríguez Yoldi, M.J. (2017) Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, **18**.
- Martin, E.J., Hernandez, M.E. & Hayward, L.F. (2016) Blockade of orexin receptors attenuates the cardiovascular response to air-jet stress in spontaneously hypertensive rats. *Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical*, **201**, 8–16.
- Maude, S.L., Frey, N., Shaw, P.A., Aplenc, R., Barrett, D.M., Bunin, N.J., *et al.* (2014) Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *The New England Journal of Medicine*, **371**, 1507–1517.
- Maude, S.L., Laetsch, T.W., Buechner, J., Rives, S., Boyer, M., Bittencourt, H., *et al.* (2018) Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *New England Journal of Medicine*, **378**, 439–448.
- Maus, M.V., Grupp, S.A., Porter, D.L. & June, C.H. (2014) Antibody-modified T cells: CARs take the front seat for hematologic malignancies. *Blood*, **123**, 2625–2635.
- Mazzocchi, G., Malendowicz, L.K., Aragona, F., Rebuffat, P., Gottardo, L. & Nussdorfer, G.G. (2001) Human pheochromocytomas express orexin receptor type 2 gene and display an in vitro secretory response to orexins A and B. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **86**, 4818–4821.
- Medina, V.A. & Rivera, E.S. (2010) Histamine receptors and cancer pharmacology. *British Journal of Pharmacology*, **161**, 755–767.
- Melcher, A., Parato, K., Rooney, C.M. & Bell, J.C. (2011) Thunder and lightning: immunotherapy and oncolytic viruses collide. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, **19**, 1008–1016.
- Messal, N., Fernandez, N., Dayot, S., Gratio, V., Nicole, P., Prochasson, C., *et al.* (2018) Ectopic expression of OX1R in ulcerative colitis mediates anti-inflammatory effect of orexin-A. *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*, **1864**, 3618–3628.
- Mieda, M., Hasegawa, E., Kisanuki, Y.Y., Sinton, C.M., Yanagisawa, M. & Sakurai, T. (2011) Differential roles of orexin receptor-1 and -2 in the regulation of non-REM and REM sleep. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, **31**, 6518–6526.

Mignot, E., Lammers, G.J., Ripley, B., Okun, M., Nevsimalova, S., Overeem, S., *et al.* (2002) The role of cerebrospinal fluid hypocretin measurement in the diagnosis of narcolepsy and other hypersomnias. *Archives of Neurology*, **59**, 1553–1562.

Milligan, G. & Kostenis, E. (2006) Heterotrimeric G-proteins: a short history. *British Journal of Pharmacology*, **147 Suppl 1**, S46-55.

Mochizuki, T., Arrigoni, E., Marcus, J.N., Clark, E.L., Yamamoto, M., Honer, M., *et al.* (2011) Orexin receptor 2 expression in the posterior hypothalamus rescues sleepiness in narcoleptic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**, 4471–4476.

Modolell, I., Guarner, L. & Malagelada, J.R. (1999) Vagaries of clinical presentation of pancreatic and biliary tract cancer. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, **10 Suppl 4**, 82–84.

Moody, T.W., Moreno, P. & Jensen, R.T. (2015) Neuropeptides as lung cancer growth factors. *Peptides*, **72**, 106–111.

Moody, T.W., Ramos-Alvarez, I. & Jensen, R.T. (2018) Neuropeptide G Protein-Coupled Receptors as Oncotargets. *Frontiers in Endocrinology*, **9**.

Moore, R.H., Millman, E.E., Godines, V., Hanania, N.A., Tran, T.M., Peng, H., *et al.* (2007) Salmeterol stimulation dissociates beta2-adrenergic receptor phosphorylation and internalization. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, **36**, 254–261.

Moorman, D.E. & Aston-Jones, G. (2009) Orexin-1 receptor antagonist decreases ethanol consumption and preference selectively in high-ethanol--preferring Sprague--Dawley rats. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, **43**, 379–386.

Muniz, V.P., Barnes, J.M., Paliwal, S., Zhang, X., Tang, X., Chen, S., *et al.* (2011) The ARF tumor suppressor inhibits tumor cell colonization independent of p53 in a novel mouse model of pancreatic ductal adenocarcinoma metastasis. *Molecular cancer research: MCR*, **9**, 867–877.

N

Nabhan, J.F., Pan, H. & Lu, Q. (2010) Arrestin domain-containing protein 3 recruits the NEDD4 E3 ligase to mediate ubiquitination of the beta2-adrenergic receptor. *EMBO reports*, **11**, 605–611.

Nagarajan, A., Malvi, P. & Wajapeyee, N. (2016) Oncogene-directed alterations in cancer cell metabolism. *Trends in cancer*, **2**, 365–377.

Nagy, J.A., Chang, S.-H., Shih, S.-C., Dvorak, A.M. & Dvorak, H.F. (2010) Heterogeneity of the tumor vasculature. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, **36**, 321–331.

Nakabayashi, M., Suzuki, T., Takahashi, K., Totsune, K., Muramatsu, Y., Kaneko, C., *et al.* (2003) Orexin-A expression in human peripheral tissues. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **205**, 43–50.

Nakagawa, T., Sakurai, T., Nishioka, T. & Touhara, K. (2005) [Molecular mechanisms underlying sex-pheromone reception in insects]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso. Protein, Nucleic Acid, Enzyme*, **50**, 1563–1570.

Nakamura, T., Uramura, K., Nambu, T., Yada, T., Goto, K., Yanagisawa, M., *et al.* (2000) Orexin-induced hyperlocomotion and stereotypy are mediated by the dopaminergic system. *Brain Research*, **873**, 181–187.

Narita, M., Nagumo, Y., Hashimoto, S., Narita, M., Khotib, J., Miyatake, M., *et al.* (2006) Direct involvement of orexinergic systems in the activation of the mesolimbic dopamine pathway and related behaviors induced by morphine. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, **26**, 398–405.

Näslund, E., Ehrström, M., Ma, J., Hellström, P.M. & Kirchgessner, A.L. (2002) Localization and effects of orexin on fasting motility in the rat duodenum. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, **282**, G470-479.

Nicole, P., Couvineau, P., Jamin, N., Voisin, T. & Couvineau, A. (2015) Crucial role of the orexin-B C-terminus in the induction of OX1 receptor-mediated apoptosis: analysis by alanine scanning, molecular modelling and site-directed mutagenesis. *British Journal of Pharmacology*, **172**, 5211–5223.

Nowak, K.W., Strowski, M.Z., Switonska, M.M., Kaczmarek, P., Singh, V., Fabis, M., *et al.* (2005) Evidence that orexins A and B stimulate insulin secretion from rat pancreatic islets via both receptor subtypes. *International Journal of Molecular Medicine*, **15**, 969–972.

O

Oakley, R.H., Laporte, S.A., Holt, J.A., Caron, M.G. & Barak, L.S. (2000) Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, **275**, 17201–17210.

Oldham, W.M. & Hamm, H.E. (2008) Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, **9**, 60–71.

Ouedraogo, R., Näslund, E. & Kirchgessner, A.L. (2003) Glucose regulates the release of orexin-a from the endocrine pancreas. *Diabetes*, **52**, 111–117.

Overman, M.J., McDermott, R., Leach, J.L., Lonardi, S., Lenz, H.-J., Morse, M.A., *et al.* (2017) Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study. *The Lancet. Oncology*, **18**, 1182–1191.

P

Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C.A., Motoshima, H., Fox, B.A., *et al.* (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science (New York, N.Y.)*, **289**, 739–745.

Pándy-Szekeres, G., Munk, C., Tsonkov, T.M., Mordalski, S., Harpsøe, K., Hauser, A.S., *et al.* (2018) GPCRdb in 2018: adding GPCR structure models and ligands. *Nucleic Acids Research*, **46**, D440–D446.

Park, J.-H., Shim, H.-M., Na, A.-Y., Bae, J.-H., Im, S.-S. & Song, D.-K. (2015) Orexin A regulates plasma insulin and leptin levels in a time-dependent manner following a glucose load in mice. *Diabetologia*, **58**, 1542–1550.

Partanen, J.I., Nieminen, A.I. & Klefstrom, J. (2009) 3D view to tumor suppression: Lkb1, polarity and the arrest of oncogenic c-Myc. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, **8**, 716–724.

Pasumarthi, R.K., Reznikov, L.R. & Fadel, J. (2006) Activation of orexin neurons by acute nicotine. *European Journal of Pharmacology*, **535**, 172–176.

Patel, S.P. & Kurzrock, R. (2015) PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy. *Molecular Cancer Therapeutics*, **14**, 847–856.

Perez-Leighton, C.E., Boland, K., Billington, C.J. & Kotz, C.M. (2013) High and low activity rats: elevated intrinsic physical activity drives resistance to diet-induced obesity in non-bred rats. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, **21**, 353–360.

Perroy, J., Pontier, S., Charest, P.G., Aubry, M. & Bouvier, M. (2004) Real-time monitoring of ubiquitination in living cells by BRET. *Nature Methods*, **1**, 203–208.

Peyron, C., Faraco, J., Rogers, W., Ripley, B., Overeem, S., Charnay, Y., *et al.* (2000) A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains. *Nature Medicine*, **6**, 991–997.

Pierce, K.L. & Lefkowitz, R.J. (2001) Classical and new roles of β -arrestins in the regulation of G-PROTEIN-COUPLED receptors. *Nature Reviews Neuroscience*, **2**, 727–733.

Pin, J.-P., Galvez, T. & Prézeau, L. (2003) Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors. *Pharmacology & Therapeutics*, **98**, 325–354.

Pino, M.F., Divoux, A., Simmonds, A.V., Smith, S.R. & Sparks, L.M. (2017) Investigating the effects of Orexin-A on thermogenesis in human deep neck brown adipose tissue. *International Journal of Obesity (2005)*, **41**, 1646–1653.

Pino, M.S. & Chung, D.C. (2010) The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology*, **138**, 2059–2072.

Pitcher, J.A., Freedman, N.J. & Lefkowitz, R.J. (1998) G protein-coupled receptor kinases. *Annual Review of Biochemistry*, **67**, 653–692.

Plaza-Zabala, A., Flores, Á., Maldonado, R. & Berrendero, F. (2012) Hypocretin/orexin signaling in the hypothalamic paraventricular nucleus is essential for the expression of nicotine withdrawal. *Biological Psychiatry*, **71**, 214–223.

Prabhu, Y. & Eichinger, L. (2006) The Dictyostelium repertoire of seven transmembrane domain receptors. *European Journal of Cell Biology*, **85**, 937–946.

Premont, R.T. & Gainetdinov, R.R. (2007) Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Annual Review of Physiology*, **69**, 511–534.

Premont, R.T., Inglese, J. & Lefkowitz, R.J. (1995) Protein kinases that phosphorylate activated G protein-coupled receptors. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **9**, 175–182.

Price, T.J., Peeters, M., Kim, T.W., Li, J., Cascinu, S., Ruff, P., *et al.* (2014) Panitumumab versus cetuximab in patients with chemotherapy-refractory wild-type KRAS exon 2 metastatic colorectal cancer (ASPECCT): a randomised, multicentre, open-label, non-inferiority phase 3 study. *The Lancet. Oncology*, **15**, 569–579.

Putula, J., Turunen, P.M., Johansson, L., Näsman, J., Ra, R., Korhonen, L., *et al.* (2012) Orexin/hypocretin receptor chimaeras reveal structural features important for orexin peptide distinction. *FEBS Letters*, **585**, 1368–1374.

Q

Qian, B.-Z. & Pollard, J.W. (2010) Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*, **141**, 39–51.

Quail, D. & Joyce, J. (2013) Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature medicine*, **19**, 1423–1437.

Quarta, D., Valerio, E., Hutcheson, D.M., Hedou, G. & Heidbreder, C. (2010) The orexin-1 receptor antagonist SB-334867 reduces amphetamine-evoked dopamine outflow in the shell of the nucleus accumbens and decreases the expression of amphetamine sensitization. *Neurochemistry International*, **56**, 11–15.

R

Raiborg, C., Bache, K.G., Mehlum, A., Stang, E. & Stenmark, H. (2001a) Hrs recruits clathrin to early endosomes. *The EMBO journal*, **20**, 5008–5021.

Raiborg, C., Bremnes, B., Mehlum, A., Gillooly, D.J., D'Arrigo, A., Stang, E., *et al.* (2001b) FYVE and coiled-coil domains determine the specific localisation of Hrs to early endosomes. *Journal of Cell Science*, **114**, 2255–2263.

Raica, M., Cimpean, A.M. & Ribatti, D. (2009) Angiogenesis in pre-malignant conditions. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, **45**, 1924–1934.

Rajagopal, S. & Shenoy, S.K. (2018) GPCR desensitization: Acute and prolonged phases. *Cellular Signalling*, **41**, 9–16.

Raman, S.P., Reddy, S., Weiss, M.J., Manos, L.L., Cameron, J.L., Zheng, L., *et al.* (2015) Impact of the time interval between MDCT imaging and surgery on the accuracy of identifying metastatic disease in patients with pancreatic cancer. *AJR. American journal of roentgenology*, **204**, W37-42.

- Ramanjaneya, M., Conner, A.C., Chen, J., Stanfield, P.R. & Randeva, H.S. (2008) Orexins stimulate steroidogenic acute regulatory protein expression through multiple signaling pathways in human adrenal H295R cells. *Endocrinology*, **149**, 4106–4115.
- Rasmussen, S.G.F., Choi, H.-J., Fung, J.J., Pardon, E., Casarosa, P., Chae, P.S., *et al.* (2011) Structure of a nanobody-stabilized active state of the $\beta(2)$ adrenoceptor. *Nature*, **469**, 175–180.
- Rebois, R.V., Robitaille, M., Galés, C., Dupré, D.J., Baragli, A., Trieu, P., *et al.* (2006) Heterotrimeric G proteins form stable complexes with adenylyl cyclase and Kir3.1 channels in living cells. *Journal of Cell Science*, **119**, 2807–2818.
- Redston, M.S., Caldas, C., Seymour, A.B., Hruban, R.H., Costa, L. da, Yeo, C.J., *et al.* (1994) p53 mutations in pancreatic carcinoma and evidence of common involvement of homocopolymer tracts in DNA microdeletions. *Cancer Research*, **54**, 3025–3033.
- Restifo, N.P., Dudley, M.E. & Rosenberg, S.A. (2012) Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nature Reviews. Immunology*, **12**, 269–281.
- Robishaw, J.D. & Berlot, C.H. (2004) Translating G protein subunit diversity into functional specificity. *Current Opinion in Cell Biology*, **16**, 206–209.
- Rodemer, C. & Haucke, V. (2008) Clathrin/AP-2-dependent endocytosis: a novel playground for the pharmacological toolbox? *Handbook of Experimental Pharmacology*, 105–122.
- Roehrs, T. & Roth, T. (2012) Insomnia pharmacotherapy. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental Neurotherapeutics*, **9**, 728–738.
- Rosenbaum, D.M., Cherezov, V., Hanson, M.A., Rasmussen, S.G.F., Thian, F.S., Kobilka, T.S., *et al.* (2007) GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta2-adrenergic receptor function. *Science (New York, N. Y.)*, **318**, 1266–1273.
- Rosenbaum, D.M., Zhang, C., Lyons, J., Holl, R., Aragao, D., Arlow, D.H., *et al.* (2011) Structure and Function of an Irreversible Agonist- $\beta(2)$ Adrenoceptor complex. *Nature*, **469**, 236–240.
- Rouet-Benzineb, P., Rouyer-Fessard, C., Jarry, A., Avondo, V., Pouzet, C., Yanagisawa, M., *et al.* (2004) Orexins Acting at Native OX1 Receptor in Colon Cancer and Neuroblastoma Cells or at Recombinant OX1 Receptor Suppress Cell Growth by Inducing Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 45875–45886.
- Rovati, G.E., Capra, V. & Neubig, R.R. (2007) The highly conserved DRY motif of class A G protein-coupled receptors: beyond the ground state. *Molecular Pharmacology*, **71**, 959–964.
- Ruffell, B. & Coussens, L.M. (2015) Macrophages and therapeutic resistance in cancer. *Cancer Cell*, **27**, 462–472.
- Rush, C.R., Armstrong, D.L., Ali, J.A. & Pazzaglia, P.J. (1998) Benzodiazepine-receptor ligands in humans: acute performance-impairing, subject-rated and observer-rated effects. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, **18**, 154–165.

S

- Saiki, Y. & Horii, A. (2014) Molecular pathology of pancreatic cancer. *Pathology International*, **64**, 10–19.
- Sakurai, T. (2014) The role of orexin in motivated behaviours. *Nature Reviews. Neuroscience*, **15**, 719–731.
- Sakurai, T., Amemiya, A., Ishii, M., Matsuzaki, I., Chemelli, R.M., Tanaka, H., *et al.* (1998) Orexins and Orexin Receptors: A Family of Hypothalamic Neuropeptides and G Protein-Coupled Receptors that Regulate Feeding Behavior. *Cell*, **92**, 573–585.
- Saper, C.B., Fuller, P.M., Pedersen, N.P., Lu, J. & Scammell, T.E. (2010) Sleep state switching. *Neuron*, **68**, 1023–1042.

- Saper, C.B., Scammell, T.E. & Lu, J. (2005) Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nature*, **437**, 1257–1263.
- Schuld, A., Hebebrand, J., Geller, F. & Pollmächer, T. (2000) Increased body-mass index in patients with narcolepsy. *Lancet (London, England)*, **355**, 1274–1275.
- Seachrist, J.L., Anborgh, P.H. & Ferguson, S.S. (2000) beta 2-adrenergic receptor internalization, endosomal sorting, and plasma membrane recycling are regulated by rab GTPases. *The Journal of Biological Chemistry*, **275**, 27221–27228.
- Seachrist, J.L. & Ferguson, S.S.G. (2003) Regulation of G protein-coupled receptor endocytosis and trafficking by Rab GTPases. *Life Sciences*, **74**, 225–235.
- Sellayah, D., Bharaj, P. & Sikder, D. (2011) Orexin is required for brown adipose tissue development, differentiation, and function. *Cell Metabolism*, **14**, 478–490.
- Sellayah, D. & Sikder, D. (2012) Orexin receptor-1 mediates brown fat developmental differentiation. *Adipocyte*, **1**, 58–63.
- Shahid, I.Z., Rahman, A.A. & Pilowsky, P.M. (2011) Intrathecal orexin A increases sympathetic outflow and respiratory drive, enhances baroreflex sensitivity and blocks the somato-sympathetic reflex. *British Journal of Pharmacology*, **162**, 961–973.
- Shahid, I.Z., Rahman, A.A. & Pilowsky, P.M. (2012) Orexin A in rat rostral ventrolateral medulla is pressor, sympatho-excitatory, increases barosensitivity and attenuates the somato-sympathetic reflex. *British Journal of Pharmacology*, **165**, 2292–2303.
- Sharf, R., Guarnieri, D.J., Taylor, J.R. & DiLeone, R.J. (2010a) Orexin mediates morphine place preference, but not morphine-induced hyperactivity or sensitization. *Brain Research*, **1317**, 24–32.
- Sharf, R., Sarhan, M., Brayton, C.E., Guarnieri, D.J., Taylor, J.R. & DiLeone, R.J. (2010b) Orexin signaling via the orexin 1 receptor mediates operant responding for food reinforcement. *Biological Psychiatry*, **67**, 753–760.
- Shay, J.W. & Wright, W.E. (2000) The use of telomerized cells for tissue engineering. *Nature Biotechnology*, **18**, 22–23.
- Shen, Y., Zhao, Y., Zheng, D., Chang, X., Ju, S. & Guo, L. (2013) Effects of orexin A on GLUT4 expression and lipid content via MAPK signaling in 3T3-L1 adipocytes. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **138**, 376–383.
- Shenoy, S.K. & Lefkowitz, R.J. (2003) Trafficking patterns of beta-arrestin and G protein-coupled receptors determined by the kinetics of beta-arrestin deubiquitination. *The Journal of Biological Chemistry*, **278**, 14498–14506.
- Shirasaka, T., Nakazato, M., Matsukura, S., Takasaki, M. & Kannan, H. (1999) Sympathetic and cardiovascular actions of orexins in conscious rats. *The American Journal of Physiology*, **277**, R1780-1785.
- Shlapatska, L.M., Mikhlap, S.V., Berdova, A.G., Zelensky, O.M., Yun, T.J., Nichols, K.E., *et al.* (2001) CD150 association with either the SH2-containing inositol phosphatase or the SH2-containing protein tyrosine phosphatase is regulated by the adaptor protein SH2D1A. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **166**, 5480–5487.
- Shoblock, J.R., Welty, N., Aluisio, L., Fraser, I., Motley, S.T., Morton, K., *et al.* (2011) Selective blockade of the orexin-2 receptor attenuates ethanol self-administration, place preference, and reinstatement. *Psychopharmacology*, **215**, 191–203.
- Siegel, J.M. (1999) Narcolepsy: A Key Role for Hypocretins (Orexins). *Cell*, **98**, 409–412.
- Sieminski, M., Szypienbejl, J. & Partinen, E. (2018) Orexins, Sleep, and Blood Pressure. *Current Hypertension Reports*, **20**, 79.

Skrzypski, M., Billert, M., Nowak, K.W. & Strowski, M.Z. (2018) The role of orexin in controlling the activity of the adipo-pancreatic axis. *The Journal of Endocrinology*, **238**, R95–R108.

Skrzypski, M., Kaczmarek, P., Le, T.T., Wojciechowicz, T., Pruszyńska-Oszmalek, E., Szczepankiewicz, D., *et al.* (2012) Effects of orexin A on proliferation, survival, apoptosis and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes into mature adipocytes. *FEBS letters*, **586**, 4157–4164.

Skrzypski, M., Khajavi, N., Mergler, S., Billert, M., Szczepankiewicz, D., Wojciechowicz, T., *et al.* (2016) Orexin A modulates INS-1E cell proliferation and insulin secretion via extracellular signal-regulated kinase and transient receptor potential channels. *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society*, **67**, 643–652.

Sorkin, A. & Von Zastrow, M. (2002) Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, **3**, 600–614.

Stanford, M.M., Bell, J.C. & Vähä-Koskela, M.J.V. (2010) Novel oncolytic viruses: riding high on the next wave? *Cytokine & Growth Factor Reviews*, **21**, 177–183.

Stenmark, H. (2009) Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, **10**, 513–525.

Stoffel, E.M. & Kastanos, F. (2014) Familial colorectal cancer, beyond Lynch syndrome. *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association*, **12**, 1059–1068.

Swartz, M.A., Iida, N., Roberts, E.W., Sangaletti, S., Wong, M.H., Yull, F.E., *et al.* (2012) Tumor microenvironment complexity: emerging roles in cancer therapy. *Cancer Research*, **72**, 2473–2480.

Szyska, M., Paschke, L., Tyczewska, M., Rucinski, M., Grabowska, P. & Malendowicz, L.K. (2015) Lack of expression of preproorexin and orexin receptors genes in human normal and prostate cancer cell lines. *Folia Histochemica Et Cytobiologica*, **53**, 333–341.

T

Tachibana, T., Onodera, H., Tsuruyama, T., Mori, A., Nagayama, S., Hiai, H., *et al.* (2005) Increased intratumor Valpha24-positive natural killer T cells: a prognostic factor for primary colorectal carcinomas. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, **11**, 7322–7327.

Taheri, S., Sunter, D., Dakin, C., Moyes, S., Seal, L., Gardiner, J., *et al.* (2000) Diurnal variation in orexin A immunoreactivity and prepro-orexin mRNA in the rat central nervous system. *Neuroscience Letters*, **279**, 109–112.

Takahashi, N., Okumura, T., Yamada, H. & Kohgo, Y. (1999) Stimulation of gastric acid secretion by centrally administered orexin-A in conscious rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **254**, 623–627.

Takai, T., Takaya, T., Nakano, M., Akutsu, H., Nakagawa, A., Aimoto, S., *et al.* (2006) Orexin-A is composed of a highly conserved C-terminal and a specific, hydrophilic N-terminal region, revealing the structural basis of specific recognition by the orexin-1 receptor. *Journal of Peptide Science: An Official Publication of the European Peptide Society*, **12**, 443–454.

Taximaimaiti, R., Abuliken, X., Maihemuti, M., Abudujilile, D. & Abudulimu, H. (2016) Elevated Expression of Ox2R in Cervical Cancers and Placentas of Uyghur Women in Xinjiang, China. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, **17**, 4959–4963.

Thannickal, T.C., Moore, R.Y., Nienhuis, R., Ramanathan, L., Gulyani, S., Aldrich, M., *et al.* (2000) Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy. *Neuron*, **27**, 469–474.

Tréton, X., Pedruzzi, E., Guichard, C., Ladeiro, Y., Sedghi, S., Vallée, M., *et al.* (2014) Combined NADPH oxidase 1 and interleukin 10 deficiency induces chronic endoplasmic reticulum stress and causes ulcerative colitis-like disease in mice. *PLoS One*, **9**, e101669.

Turunen, P.M., Ekholm, M.E., Somerharju, P. & Kukkonen, J.P. (2010) Arachidonic acid release mediated by OX1 orexin receptors. *British Journal of Pharmacology*, **159**, 212–221.

U

Uhry, Z., Remontet, L., Colonna, M., Belot, A., Grosclaude, P., Mitton, N., *et al.* (2013) Cancer incidence estimation at a district level without a national registry: a validation study for 24 cancer sites using French health insurance and registry data. *Cancer Epidemiology*, **37**, 99–114.

Umar, A., Boland, C.R., Terdiman, J.P., Syngal, S., Chapelle, A. de la, Rüschoff, J., *et al.* (2004) Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *Journal of the National Cancer Institute*, **96**, 261–268.

V

Valent, P., Bonnet, D., De Maria, R., Lapidot, T., Copland, M., Melo, J.V., *et al.* (2012) Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details. *Nature Reviews. Cancer*, **12**, 767–775.

Valiante, S., Liguori, G., Tafuri, S., Pavone, L.M., Campese, R., Monaco, R., *et al.* (2015) Expression and potential role of the peptide orexin-A in prostate cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **464**, 1290–1296.

Vogelstein, B. & Kinzler, K.W. (2004) Cancer genes and the pathways they control. *Nature Medicine*, **10**, 789–799.
Voisin, T., Firar, A.E., Fasseu, M., Rouyer-Fessard, C., Descatoire, V., Walker, F., *et al.* (2011) Aberrant Expression of OX1 Receptors for Orexins in Colon Cancers and Liver Metastases: an Openable Gate to Apoptosis. *Cancer Research*, **71**, 3341–3351.

Voisin, T., Firar, A.E., Rouyer-Fessard, C., Gratio, V. & Laburthe, M. (2008) A hallmark of immunoreceptor, the tyrosine-based inhibitory motif ITIM, is present in the G protein-coupled receptor OX1R for orexins and drives apoptosis: a novel mechanism. *The FASEB Journal*, **22**, 1993–2002.

Voisin, T., Rouet-Benzineb, P., Reuter, N. & Laburthe, M. (2003) Orexins and their receptors: structural aspects and role in peripheral tissues. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, **60**, 72–87.

Volovyk, Z.M., Wolf, M.J., Prasad, S.V.N. & Rockman, H.A. (2006) Agonist-stimulated beta-adrenergic receptor internalization requires dynamic cytoskeletal actin turnover. *The Journal of Biological Chemistry*, **281**, 9773–9780.

W

Walker, J.N., Ramracheya, R., Zhang, Q., Johnson, P.R.V., Braun, M. & Rorsman, P. (2011) Regulation of glucagon secretion by glucose: paracrine, intrinsic or both? *Diabetes, Obesity & Metabolism*, **13 Suppl 1**, 95–105.

Wang, Y., Zhou, Y., Szabo, K., Haft, C.R. & Trejo, J. (2002) Down-regulation of protease-activated receptor-1 is regulated by sorting nexin 1. *Molecular Biology of the Cell*, **13**, 1965–1976.

Wang, Y.-C., He, F., Feng, F., Liu, X.-W., Dong, G.-Y., Qin, H.-Y., *et al.* (2010) Notch signaling determines the M1 versus M2 polarization of macrophages in antitumor immune responses. *Cancer Research*, **70**, 4840–4849.

Warne, T., Serrano-Vega, M.J., Baker, J.G., Moukhametzianov, R., Edwards, P.C., Henderson, R., *et al.* (2008) Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature*, **454**, 486–491.

Weisenberger, D.J., Siegmund, K.D., Campan, M., Young, J., Long, T.I., Faasse, M.A., *et al.* (2006) CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nature Genetics*, **38**, 787–793.

Wen, J., Zhao, Y. & Guo, L. (2016) Orexin A induces autophagy in HCT-116 human colon cancer cells through the ERK signaling pathway. *International Journal of Molecular Medicine*, **37**, 126–132.

Wen, J., Zhao, Y., Shen, Y. & Guo, L. (2015) Effect of orexin A on apoptosis in BGC-823 gastric cancer cells via OX1R through the AKT signaling pathway. *Molecular Medicine Reports*, **11**, 3439–3444.

Wenzel, J., Grabinski, N., Knopp, C.A., Dendorfer, A., Ramanjaneya, M., Randeva, H.S., *et al.* (2009) Hypocretin/orexin increases the expression of steroidogenic enzymes in human adrenocortical NCI H295R cells. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **297**, R1601-1609.

Whistler, J.L., Enquist, J., Marley, A., Fong, J., Gladher, F., Tsuruda, P., *et al.* (2002) Modulation of postendocytic sorting of G protein-coupled receptors. *Science (New York, N.Y.)*, **297**, 615–620.

Williams, G.H. & Stoeber, K. (2012) The cell cycle and cancer. *The Journal of Pathology*, **226**, 352–364.
Williams, R.L. & Urbé, S. (2007) The emerging shape of the ESCRT machinery. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, **8**, 355–368.

Wilson, S.J., Nutt, D.J., Alford, C., Argyropoulos, S.V., Baldwin, D.S., Bateson, A.N., *et al.* (2010) British Association for Psychopharmacology consensus statement on evidence-based treatment of insomnia, parasomnias and circadian rhythm disorders. *Journal of Psychopharmacology (Oxford, England)*, **24**, 1577–1601.

Winrow, C.J. & Renger, J.J. (2014) Discovery and development of orexin receptor antagonists as therapeutics for insomnia. *British Journal of Pharmacology*, **171**, 283–293.

Winrow, C.J., Tanis, K.Q., Reiss, D.R., Rigby, A.M., Uslaner, J.M., Uebele, V.N., *et al.* (2010) Orexin receptor antagonism prevents transcriptional and behavioral plasticity resulting from stimulant exposure. *Neuropharmacology*, **58**, 185–194.

Wojciechowicz, T., Skrzypski, M., Szczepankiewicz, D., Hertig, I., Kołodziejski, P.A., Billert, M., *et al.* (2016) Original Research: Orexins A and B stimulate proliferation and differentiation of porcine preadipocytes. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, **241**, 1786–1795.

Wolchok, J.D., Kluger, H., Callahan, M.K., Postow, M.A., Rizvi, N.A., Lesokhin, A.M., *et al.* (2013) Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *The New England Journal of Medicine*, **369**, 122–133.

Wolfe, B.L. & Trejo, J. (2007) Clathrin-dependent mechanisms of G protein-coupled receptor endocytosis. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, **8**, 462–470.

Wong, S.K.-F. (2003) G protein selectivity is regulated by multiple intracellular regions of GPCRs. *Neuro-Signals*, **12**, 1–12.

X

Xiao, F., Jiang, M., Du, D., Xia, C., Wang, J., Cao, Y., *et al.* (2013) Orexin A regulates cardiovascular responses in stress-induced hypertensive rats. *Neuropharmacology*, **67**, 16–24.

Xu, F., Wu, H., Katritch, V., Han, G.W., Jacobson, K.A., Gao, Z.-G., *et al.* (2011) Structure of an agonist-bound human A2A adenosine receptor. *Science (New York, N.Y.)*, **332**, 322–327.

Xu, S., Furukawa, T., Kanai, N., Sunamura, M. & Horii, A. (2005) Abrogation of DUSP6 by hypermethylation in human pancreatic cancer. *Journal of Human Genetics*, **50**, 159–167.

Xu, T.-R., Yang, Y., Ward, R., Gao, L. & Liu, Y. (2013) Orexin receptors: Multi-functional therapeutic targets for sleeping disorders, eating disorders, drug addiction, cancers and other physiological disorders. *Cellular Signalling*, **25**, 2413–2423.

Xu, Z.-Q.D., Zhang, X. & Scott, L. (2007) Regulation of G protein-coupled receptor trafficking. *Acta Physiologica (Oxford, England)*, **190**, 39–45.

Y

Yamanaka, A., Beuckmann, C.T., Willie, J.T., Hara, J., Tsujino, N., Mieda, M., *et al.* (2003) Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice. *Neuron*, **38**, 701–713.

Ychou, M., Duffour, J., Kramar, A., Debrigode, C., Gourgou, S., Bressolle, F., *et al.* (2003) Individual 5-FU dose adaptation in metastatic colorectal cancer: results of a phase II study using a bimonthly pharmacokinetically intensified LV5FU2 regimen. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, **52**, 282–290.

Ychou, M., Raoul, J.-L., Douillard, J.-Y., Gourgou-Bourgade, S., Bugat, R., Mineur, L., *et al.* (2009) A phase III randomised trial of LV5FU2 + irinotecan versus LV5FU2 alone in adjuvant high-risk colon cancer (FNCLCC Accord02/FFCD9802). *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, **20**, 674–680.

Yin, J., Babaoglu, K., Brautigam, C.A., Clark, L., Shao, Z., Scheuermann, T.H., *et al.* (2016) Structure and ligand-binding mechanism of the human OX1 and OX2 orexin receptors. *Nature Structural & Molecular Biology*, **23**, 293–299.

Yin, J., Mobarec, J.C., Kolb, P. & Rosenbaum, D.M. (2015) Crystal structure of the human OX2 orexin receptor bound to the insomnia drug suvorexant. *Nature*, **519**, 247–250.

Z

Zamarron, B.F. & Chen, W. (2011) Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression. *International Journal of Biological Sciences*, **7**, 651–658.

Zapf-Colby, A. & Olefsky, J.M. (1998) Nerve growth factor processing and trafficking events following TrkA-mediated endocytosis. *Endocrinology*, **139**, 3232–3240.

Zastrow, M. von. (2003) Mechanisms regulating membrane trafficking of G protein-coupled receptors in the endocytic pathway. *Life Sciences*, **74**, 217–224.

Zerial, M. & McBride, H. (2001) Rab proteins as membrane organizers. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, **2**, 107–117.

Rôle antitumoral de l'orexine A et des ligands biaisés dans les cancers digestifs
Impact sur le trafic intracellulaire d'OX1R
Par Stéphanie Dayot

Les orexines sont des neuropeptides hypothalamiques qui possèdent deux isoformes, A et B (OxA et OxB, respectivement). Elles vont interagir avec deux sous-types de récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), OX1R et OX2R. Une fois activés, ces deux récepteurs induisent la mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire *via* la protéine Gq. Au sein de l'équipe où j'ai effectué ma thèse, il a été clairement montré que le système orexines/OX1R avait des propriétés anti-tumorales dans certains cancers dont le cancer du côlon (Voisin *et al.*, 2011). Il a été montré que l'OxA mais aussi l'OxB induisait une apoptose mitochondriale *via* OX1R. Ces résultats signifient que le système orexines/OX1R représente une cible potentielle dans le traitement du cancer du côlon.

Mon premier objectif de thèse a été d'étudier le rôle des orexines et en particulier de l'OxA sur l'adénocarcinome canalaire du pancréas (PDAC) chez l'Homme. Ces travaux m'ont permis de montrer qu'OX1R était exprimé dans 96% des PDAC testés. De plus, j'ai montré qu'OX1R était exprimé précocement dans les lésions précancéreuses (PanIN). J'ai démontré que la lignée cellulaire humaine dérivée d'un PDAC, la lignée AsPC1-exprimait OX1R et que l'OxA était capable d'induire une apoptose mitochondriale comparable à celle observée dans les cancers du côlon (Voisin *et al.*, 2011). Enfin contre toute attente, j'ai montré que l'almorexant, un antagoniste de type DORA (Dual Orexin Receptor Antagonist) avait des propriétés antitumorales identiques à l'OxA, l'agoniste naturel d'OX1R. Les résultats inattendus de l'almorexant vis-à-vis de ses propriétés anti-tumorales m'ont interpellée et ont ainsi déterminé l'axe de mon deuxième objectif. J'ai donc voulu savoir si cet effet était uniquement lié au PDAC ou s'il était plus largement dans d'autres cancers. Pour cela j'ai étudié l'effet de l'almorexant dans des lignées cellulaires dérivées d'adénocarcinomes coliques humains, les lignées HT-29 et LoVo. De plus, en collaboration avec le groupe de B. Robert (CRCM, INSERM U1194, Montpellier) nous avons développé, par une stratégie de « phage display », un anticorps agoniste dont j'ai montré qu'il mimait les effets de l'OxA sur les mêmes lignées cellulaires. Mon troisième objectif a été d'étudier les phénomènes d'internalisation d'OX1R sous l'action d'OxA et son devenir intracellulaire par des approches de microscopie confocale et d'analyse d'images. En effet, à ce jour peu, pour ne pas dire rien n'est connu. Plusieurs marqueurs de vésicules associées à l'internalisation des protéines ont été utilisés. Bien entendu, à la vue des effets inattendus, de l'almorexant, il me paraissait important d'étudier son impact sur ces phénomènes de régulation.

Pour conclure, le récepteur OX1 est une cible potentielle pour le traitement thérapeutique des adénocarcinomes humains du côlon et du pancréas. De plus, la mise en évidence que l'almorexant et l'anticorps C2 miment les effets proapoptotiques et antitumoraux de l'OxA, représente une très bonne alternative au peptide naturel dont les inconvénients en terme de stabilité et d'administration peuvent représenter un frein dans son utilisation thérapeutique éventuelle. De plus, l'expression membranaire du récepteur OX1 au sein de la cellule et son devenir sont différentes en fonction du ligand. Ces données ont donc un intérêt d'un point de vue thérapeutique car l'almorexant comme l'anticorps C2 permettent au récepteur OX1 de rester exprimé à la surface cellulaire et ainsi d'être disponible pour son activité proapoptotique.

Orexins are hypothalamic neuropeptides, which have two isoforms, A and B (OxA and OxB, respectively). They interact with two G protein-coupled receptor (GPCR) subtypes, OX1R and OX2R. Once activated, these two receptors induce the mobilization of intracellular Ca^{2+} *via* the Gq protein. In the team, where I began my PhD, it was clearly show that the orexins/OX1R system had anti-tumor properties in some cancers including colon cancer (Voisin *et al.*, 2011). It showed that OxA but also OxB induce mitochondrial apoptosis *via* OX1R. These results mean that the orexins/OX1R system represents a potential target in the treatment of colon cancer.

My first objective was to study the role of orexins and in particular OxA on pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) in human. This work showed that OX1R expressed in 96% of PDACs tested. In addition, I have shown that OX1R expressed early in pre-cancerous lesions (PanIN). I have demonstrated that the PDAC-derived human cell line, the AsPC-1 line, expressed OX1R, and that OxA was able to induce mitochondrial apoptosis comparable to that observed in colon cancers (Voisin *et al.*, 2011). Finally, surprisingly, my results show that almorexant, a DORA antagonist, has antitumor properties identical to OxA, the natural agonist of OX1R. The unexpected results of the almorexant with regard to its anti-tumor properties challenged me and thus determined the axis of my second objective. Therefore, I wanted to know if this effect only related to the PDAC or if it was more widely effective in other cancers in particular colon cancer. For this, I studied the effect of almorexant in cell lines derived from human colon adenocarcinoma, lines HT-29 and LoVo. In addition, in collaboration with B. Robert's group (CRCM, INSERM U1194, Montpellier) we have developed, by a "phage display" strategy, an agonist antibody that mimicked the effects of OxA on the same cancer cells. My third objective was to study the phenomena of OX1R internalization under the action of OxA and its intracellular traffic by confocal microscopy and images analysis approaches. Indeed, so far, little or nothing known. Several vesicle markers associated with the internalization of proteins used. Of course, in view of the almorexant unexpected effects, it seemed important for me to study its impact on the regulation.

To conclude, the OX1 receptor is a potential target for the therapeutic treatment of human adenocarcinoma of the colon and pancreas. In addition, the demonstration that almorexant and the C2 antibody mimic the proapoptotic and antitumor effects of OxA, represents a very good alternative to the natural peptide whose disadvantages in terms of stability and administration may represent a brake in its possible therapeutic use. In addition, the membrane expression of the OX1 receptor within the cell and its fate is different depending on the ligand. These data are therefore of interest for a therapeutic point of view because the almorexant as the antibody C2 allow the OX1 receptor to stay expressed on the cell surface and thus to be available for its proapoptotic activity.