

Université de Montréal

Approche biophysique à l'étude des interactions allostériques entre les récepteurs et les protéines G

par
Billy Breton

Département
Faculté de Médecine

11618375

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
En vue de l'obtention du grade de Maître
en Biochimie

7 janvier 2005

© Billy Breton, 2005



w
4
U58
2005
v.109

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:
Approche biophysique à l'étude des interactions allostériques entre les
récepteurs et les protéines G

présenté par :
Billy Breton

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Nikalous Heveker Ph.D., président-rapporteur

Michel Bouvier Ph.D., directeur de recherche

Terence Hébert Ph.D., membre du jury

Résumé

Au cours des dernières années, les mécanismes de signalisations via les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) ont largement été étudiés. De ces études est né un nouveau concept, celui de la dimérisation des récepteurs. Plusieurs résultats obtenus dans le laboratoire du Dr Bouvier et d'autres groupes à travers le monde appuient cette hypothèse. Par conséquent, les mécanismes de signalisations établis préalablement sont à revoir en considérant cette dimérisation. Le modèle classique implanté prévoit que les RCPG interagissent dans un ratio un récepteur pour une protéine G qui active à son tour un effecteur. Dans le contexte de dimères, cette stœchiométrie reste à être démontrée. Dans un premier temps, les travaux réalisés dans ce mémoire ont pour objectif d'adapter la technologie transfert d'énergie de résonance non radiative par bioluminescence (BRET) pour la mesure d'interaction entre un RCPG et la protéine G, mais également permettre l'utilisation concomitante des deux générations dans un seul essai. Les résultats obtenus pour la mesure d'hétérodimérisation du récepteur métabotrope GABA, composé de GABA_BR1 et GABA_BR2, montre que les deux générations de BRET sont aptes mesurer cette dimérisation. Également, les accepteurs d'énergies de chacun de générations de BRET, la EYFP pour le BRET¹ et la GFP² pour le BRET², permettent l'élaboration d'un transfert d'énergie de résonance non radiative par fluorescence (FRET) qui permette la mesure de dimérisation comparable au deux générations de BRET. L'utilisation séparé ou concomitante des deux générations de BRET ont montré directement et ce, pour la première fois, qu'une interaction avec les trois sous unités de la protéine G nécessite la formation un dimère GABA_BR1/ GABA_BR2. De plus cette interaction entre le récepteur du GABA et la protéine G ne dépend pas de la l'activité facteur d'échange du nucléotide, car l'utilisation de récepteur mutant pour cette activité ont révélé que ces derniers peuvent aussi bien interagir avec la protéine G hétérotrimérique que le récepteur natif. Finalement, l'utilisation de ces techniques de BRET ont permis la mise en évidence l'interaction précoce entre le récepteur CRLR et la protéine G. Sans la présence de son co-récepteur, RAMP, le récepteur CRLR est confiné au réticulum endoplasmique où il peut interagir uniquement avec le dimère Gβγ qui transite par cette organelle et non avec la sous unité Gα qui est plutôt dirigé vers le Golgi. La co-expression de RAMP permet de rétablir une interaction avec la sous unité Gα, en formant un complexe CRLR-RAMP-Gα-Gβγ.

Les résultats obtenus dans ce présent mémoire donnent une ébauche sur l'utilisation des deux générations de BRET dans un même essai. Ils permettent également de soutenir la thèse de formation d'unité de signalisation, nommé signalosome, en mettant en évidence l'utilité de la dimérisation des récepteurs pour l'interaction avec la protéine G hétérotrimérique et la formation précoce d'interaction récepteur-protéine G dans le réticulum endoplasmique.

Mots clés : RCPG, protéine G, BRET, interaction protéine-protéine, interaction précoce récepteur-protéine G, dimérisation, GABA_BR, CRLR, RAMP.

Abstract

In the last few years, signalling mechanisms via G protein coupled receptors (GPCR) were largely studied. From these studies, the concept of receptor dimerization was developed. Several results obtained in Dr. Bouvier's laboratory and from other groups around the world supported this new hypothesis. Consequently, the mechanisms established previously must be re-examined taking dimerization into account. The traditional model postulates that GPCR interacts in a ratio of one receptor to one protein G which activates one effector. However this stoichiometry remains to be demonstrated in the context of dimerization. If a dimer activates only one G protein, it would be possible to measure an affinity between G protein subunits and each monomer constituting the dimer. To prove the concept of receptor dimerization, the Dr. Bouvier's laboratory used bioluminescence resonance energy transfer technology (BRET) to follow receptor complex formation. Firstly, the goal in the present study was to adapt this technology to the measurement of interaction between GPCRs and G proteins with both generations of BRET. Also, the energy acceptors of each BRET generation, EYFP for the BRET¹ and GFP² for the BRET², allowed the development of fluorescence resonance energy transfer (FRET) assay which yielded similar results as both BRET generations for the measure of GABA_B dimers. The two BRET generations provided, used alone or together for the first time, direct evidence that an interaction between the three subunits of the G protein and GABA_B receptor requires the formation of a GABABR1/GABABR2 dimer. Moreover this interaction does not depend on receptor-stimulated nucleotide exchange activity, because mutant receptor for this activity can interact with the heterotrimeric G protein as well as native receptor. Finally, BRET allowed detection of early interactions between CRLR receptor and G protein. Without RAMP, CRLR is confined in the endoplasmic reticulum, where it can interact only with the Gβγ dimer and not with the Gα subunit directed to the Golgi. The co-expression of RAMP restores the interaction with Gα subunit forming a complex CRLR-RAMP-Gα-Gβγ to form.

The results obtained in this present report provide a basis for the use of both BRET generations in the same assay. They also support the notion of the formation of a signaling unit, i.e. the signalosome, by highlighting the necessity of receptor dimerization for the interaction with heterotrimeric G proteins and the early formation receptor- G protein complexes in the endoplasmic reticulum.

Key words: GPCR, G protein, BRET, protein-protein interaction, early receptor- G protein interaction, dimerization, GABA_BR, CRLR, RAMP.

Table des matières

RÉSUMÉ	I
ABSTRACT	II
TABLE DES MATIÈRES	III
LISTE DES FIGURES	V
LISTE DES TABLEAUX	VII
LISTES DES ABRÉVIATIONS	VIII
REMERCIEMENTS	IX
CHAPITRE I : INTRODUCTION	1
SIGNALISATION CELLULAIRE	2
FAMILLE DES RÉCEPTEURS COUPLÉS AUX PROTÉINES G (RCPG)	2
<i>Généralité</i>	2
<i>Structure</i>	5
<i>Signalisation et régulation</i>	6
<i>Récepteur du GABA</i>	9
<i>Récepteurs du CGRP et ADM</i>	15
FAMILLE DE PROTÉINES G HÉTÉROTRIMÉRIQUE	21
<i>Généralités</i>	21
<i>Sous unité Gα</i>	21
<i>Sous unité G$\beta\gamma$</i>	24
<i>Assemblage du dimère G$\beta\gamma$</i>	27
<i>Modifications lipidiques des protéines G</i>	28
<i>Phosphorylation des protéines G</i>	29
<i>Activation et désactivation de la protéine G</i>	30
INTERACTION ENTRE LES RCPG ET LES PROTÉINES G	32
DIMÉRISATION DES RÉCEPTEURS ET IMPLICATION DE CETTE DIMÉRISATION DANS LE COUPLAGE AVEC LA PROTÉINE G	33
TRANSFERT D'ÉNERGIE DE RÉSONANCE NON RADIATIVE	34
<i>Bioluminescence</i>	35
<i>Luciférase</i>	36
<i>GFP (Green fluorescent protein)</i>	38
<i>Transfert d'énergie de résonance de bioluminescence (BRET)</i>	40
<i>Transfert d'énergie de résonance de fluorescence (FRET)</i>	42
OBJECTIFS DU PROJET DE MAÎTRISE	43

CHAPITRE II : MATÉRIELS ET MÉTHODES	44
MATÉRIELS	45
CONSTRUCTIONS	47
MÉTHODES	48
<i>Culture cellulaire</i>	48
<i>Transfection</i>	48
<i>Spectre de fluorescence et luminescence des coelenterazines</i>	49
<i>Essai de transfert d'énergie de bioluminescence (BRET)</i>	50
<i>Essai de transfert d'énergie de fluorescence (FRET)</i>	52
<i>Mesure de surface des récepteurs GABA_BR1b par ELISA</i>	53
CHAPITRE III : RÉSULTATS	54
COMPARAISON ENTRE LE BRET ¹ ET LE BRET ²	55
EFFET DES SUBSTRATS COELENTERAZINE SUR LES DEUX GÉNÉRATIONS DE BRET	58
DIMÉRISATION DES RCPG ET INTERACTION AVEC LA PROTÉINE G HÉTÉROTRIMÉRIQUE	60
MODULATION DE L'INTERACTION DU RÉCEPTEUR GABA _B AVEC LA PROTÉINE G	66
EFFET DE MUTATIONS DU RÉCEPTEUR GBR2 SUR L'INTERACTION DU RÉCEPTEUR DU GABA AVEC LA PROTÉINE G	75
LOCALISATION DES INTERACTIONS RCPG- PROTÉINE G	78
CHAPITRE IV : DISCUSSION	84
INNOVATION DANS LE BRET	85
DIMÈRE DE RÉCEPTEUR : COMME UNITÉ DE FIXATION DE LA PROTÉINE G HÉTÉROTRIMÉRIQUE	88
MODULATION DU SIGNAL BRET DANS L'INTERACTION PROTÉINE G/RÉCEPTEUR	91
DISTANCE ENTRE LE C-TERMINAL ET LA PROTÉINE G COMME EXPLICATION DE NON MODULATION DU SIGNAL BRET ENTRE LE RÉCEPTEUR DU GABA ET LA PROTÉINE G	94
INTERACTION PRÉCOCE ENTRE RCPG ET PROTÉINE G	100
CONCLUSION	105
LISTE DE RÉFÉRENCES	106

Liste des figures

Figure 1: Représentation de la structure des trois classes de RCGP.....	4
Figure 2: Cristallographie du récepteur rhodopsine.....	5
Figure 3: Voies de signalisation activées par les RCPG.....	8
Figure 4: Différents isoformes de GABA _B R1	12
Figure 5: Schéma des différentes localisations cellulaires des monomères du récepteur du GABA.....	14
Figure 6: Schéma des étapes et protéines essentielles à la localisation membranaire de CRLR.....	18
Figure 7: Structure de la sous unité G α_1	22
Figure 8: Structure de la sous unité G β 1 (en bleu) et G γ 2 (en vert).....	25
Figure 9: Cristallographie de la protéine Gt hétérotrimérique à l'état inactif.....	27
Figure 10: Schéma du modèle classique d'activation de la protéine G.....	30
Figure 11: Superposition du spectre de luminescence et de fluorescence des deux générations de BRET.....	41
Figure 12: comparaison des trois techniques de transfert d'énergie pour une même interaction GABA _B R1/GABA _B R2	57
Figure 13: Effet de la coelenterazine h et de la DeepBlueC sur le transfert d'énergie des deux générations de BRET.....	59
Figure 14: Interaction entre les différentes sous unités de la protéine G avec le récepteur GABA _B R1b.....	62
Figure 15: Interaction entre les différentes sous unités de la protéine G avec le récepteur GABA _B R2.....	63
Figure 16: Mesure en parallèle des interactions entre les protomères du récepteur du GABA et la protéine G par l'utilisation du BRET ¹ , du BRET ² et du FRET.....	65

Figure 17: Modulation du signal BRET entre le récepteur GABA _B R1b et la protéine G par l'addition d'un agoniste spécifique.....	67
Figure 18: Courbes de titration pour l'interaction entre la protéine G et le récepteur à la vasopressine de type 2 et modulation de cette interaction par une agoniste spécifique (AVP).....	69
Figure 19: Modulation de l'interaction entre GBR1b et la protéine G ainsi que l'interaction au sien de la protéine G par l'addition d'un agoniste spécifique.	73
Figure 20: Modulation de l'interaction entre les sous unités G α et le dimère G $\beta\gamma$ par la stimulation du récepteur du GABA via un agoniste spécifique.....	74
Figure 21: Effet des mutations sur le récepteur GABA _B R2 sur l'interaction et l'activation de la protéine G hétérotriérique.....	77
Figure 22: Courbes de titration de l'interaction entre CRLR et les sous unités G α et G γ de la protéine G.....	81
Figure 23: Modulation de l'interaction entre G α et G γ par l'activation du récepteur CRLR en présence ou non de RAMP1.....	83
Figure 24: Courbe théorique de l'effet du transfert d'énergie BRET en fonction de la distance entre deux partenaires.	95
Figure 25: Modèle d'interaction précoce entre la protéine G hétérotrimérique et les RCPG	104

Liste des tableaux

Tableau I Affinité de quelques composés agissant sur les récepteurs GABA _B	10
Tableau II : Classification des sous unités alpha de la protéine G.....	23
Tableau III: Classification de sous unités bêta et gamma de la protéine G.....	26
Tableau IV : Liste des GFP disponibles et leurs caractéristiques.....	39

Listes des abréviations

AC	Adénylate cyclase
AMPC	adénosine monphosphate cyclique
β 2-Ar	récepteur β 2 adrénérique
BRET	transfert d'énergie de résonance de bioluminescence
CRLR	calcitonine receptor-like receptor
DAG	diacylglycérol
FRET	transfert d'énergie de résonance de fluorescence
GABA	γ -aminobutyique
GDP	guaninre diphosphate
GEF	facteur d'échange de la guanine
GFP	Green Fluorescent Protein
GRK	G protein Receptor kinase
GTP	guaninre triphosphate
HEK293t	cellules embryonnaires de rein humain
IP3	inositol triphosphate
kDA	kiloDalton
PKA	protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PLC- β	Phospholipase C- β
RAMP	Receptor activity-modifying protein
RCP	Receptor coupling protein
RCPG	récepteur couplé aux protéines G
RE	réticulum endoplasmique
RGS	Regulator G protein Signaling
V2-R	récepteur vasoprésine de type 2

Remerciements

En premier lieu, j'aimerais remercier le Dr Michel Bouvier pour m'avoir permis de me rapprocher un peu plus de mon rêve, qui est de pouvoir faire de la science pour le plaisir de faire de la science. Le trajet que j'ai emprunté pour me rendre dans le laboratoire du Dr Bouvier n'est pas commun, mais il m'a permis de rencontrer une multitude de personnes passionnées et passionnantes. À commencer par la première personne qui a su éveiller en moi le désir de toujours apprendre, et j'ai dit le professeur Henri Audi. Ce professeur de science au secondaire possédait, et j'espère possède toujours, une passion pour toutes les sphères de la science fondamentale. De voir ainsi un dévouement certain pour la transmission des connaissances scientifiques m'a donné l'envie de poursuivre ma formation scientifique. Suite à cinq années de travail comme assistant de recherche dans une compagnie de biotechnologie (Biosignal), j'ai entrepris une formation universitaire qui m'a conduit dans le laboratoire du Dr Bouvier. Le principal critère, qui a incité ce choix, est la passion du professeur de science du secondaire que j'ai retrouvé en Michel Bouvier.

Comme je suis un être de passion, il me doit de remercier les gens qui suscitent en moi des passions. La personne qui partage ma vie et que j'aime profondément avec une passion qui a su dépasser ma première vraie passion, la science: Toi Marie-Élaine Caruso, je n'ai pas toujours les mots pour te dire à quel point mon amour est fort pour toi. Je te dit simplement je t'aime et merci de ton soutien. J'aimerais également remercier mes parents André Breton et Jacinthe Breton, ma sœur Véronique Breton, tous les membres de ma famille ainsi que mes amis qui m'ont toujours encouragés à persévérer dans les moments difficiles et qui m'ont toujours écoutés, même s'ils ne comprenaient pas toujours ce que je disais.

Finalement, j'aimerais remercier les organismes qui ont financé mes recherches via des bourses d'excellences; le Fond de recherche en santé du Québec FRSQ ainsi que la Faculté des études supérieures de l'Université de Montréal (FES).

Chapitre I : Introduction

Signalisation cellulaire

La communication intercellulaire représente l'une des caractéristiques importantes des organismes pluricellulaires. Elle favorise la coordination des mécanismes impliqués dans le maintien de l'homéostasie de l'organisme. Ce processus touche à toutes les étapes du développement, de la différenciation et du contrôle de la survie cellulaire. Pour ce faire, l'organisme produit une multitude de substances chimiques (molécules messagères) qui provoquent une modulation de l'activité cellulaire de façon autocrine ou paracrine (Lodish *et al*, 1995). La reconnaissance des molécules messagères se fait via des protéines de surface, appelé récepteur. Il existe une grande variété de récepteurs de surface et ces derniers ont été classés en trois grandes familles. La première famille comprend les récepteurs-canaux. Ils sont responsables de réponses cellulaires rapides en permettant le passage d'ions au travers de la membrane plasmique qui leur est imperméable. La seconde famille est composée des récepteurs à activité tyrosine kinase. Ces derniers ont la particularité de s'auto-phosphoryler suite à la fixation de leurs ligands et sont impliqués principalement dans le contrôle de la prolifération et la différenciation cellulaire. Finalement, la troisième famille est composée des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Comme leur nom l'indique, ces récepteurs requièrent la présence de protéines liant le GTP afin de transmettre le signal à l'intérieur de la cellule. La principale caractéristique de ce type de signalisation est la complexité des cascades d'amplification de signal mises en branle. Cette amplification de signal est régulée par une multitude de mécanismes qui vont moduler la nature, l'amplification, ainsi que la durée de la réponse cellulaire (Lodish *et al*, 1995).

Famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)

Généralité

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) représentent la plus grande famille de récepteurs membranaires impliqués dans la transduction de signaux extracellulaires. Environ 1000 gènes codent pour différents RCPG capables de répondre à une multitude

de ligands tel les hormones, les neurotransmetteurs, les odeurs, la lumière et les ions (Hermans, 2003). Plus de 1 à 5% des protéines de la cellule sont des RCPG, ce qui représente environ 1% des gènes totaux du génome des mammifères (Hermans, 2003). Les RCPG ont été retrouvés dans le génome d'êtres vivants éloignés dans l'évolution tel les plantes, les levures, les nématodes, les insectes et les vertébrés. Ils se divisent en trois grandes classes; la classe I regroupe la rhodopsine, les récepteurs olfactifs et les récepteurs des amines biogènes (Hermans, 2003). Cette classe est caractérisée par la présence de plusieurs acides aminés conservés représentés en rouge sur la figure 1A. La majorité des membres de cette famille possède un résidu cystéine palmytoylé dans la queue C-terminale (Ellis *et al*, 2004). De plus, la présence d'un pont disulfure entre les boucles extérieures 1 et 2 est généralement observée. La classe II, quant à elle, regroupe des récepteurs de peptides tel le glucagon, la sécrétine et le PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide). Les membres de cette classe possèdent un long domaine N-terminal qui contient une série de résidus cystéines impliquées dans un réseau de ponts disulfures. La morphologie de ces récepteurs est similaire à celle de la classe I sans toutefois avoir de résidus conservés et de cystéine palmitoylée (Ellis *et al*, 2004). Finalement, la classe III est principalement composée des récepteurs métabotropiques du glutamate et du GABA, des neurotransmetteurs activateurs et inhibiteurs respectivement du système nerveux. Les récepteurs de cette famille sont caractérisés par un long N-terminal ainsi qu'un long C-terminal. Ces membres possèdent également une boucle i3 courte et hautement conservée (Ellis *et al*, 2004). Des données récentes montrent que ces récepteurs fonctionnent sous forme de dimère voir même des complexes à plus que deux récepteurs nommé oligomère (Wess, 1998).

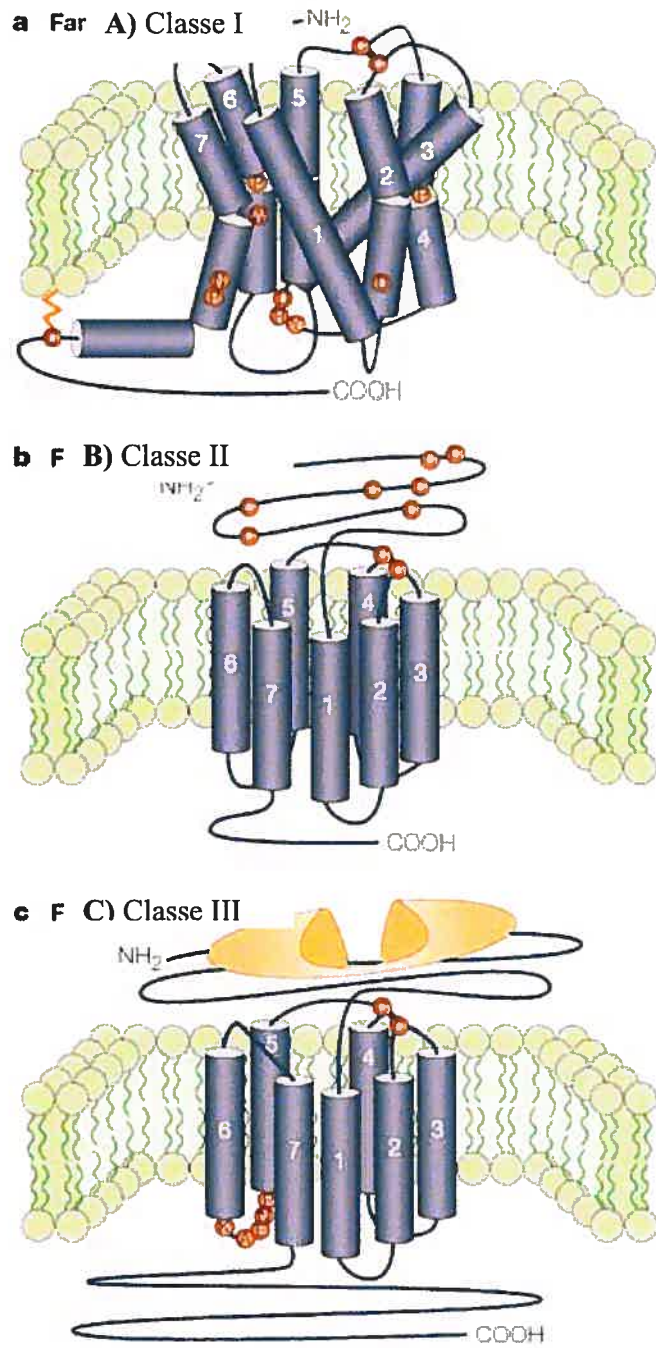


Figure 1: Représentation de la structure des trois classes de RCGP.

Les acides aminés en rouge représentent les résidus conservés dans les différentes classes. (Image tirée de Ellis *et al*, 2004)

Structure

Les RCPG sont des protéines caractérisées par une seule chaîne polypeptidique à sept passages transmembranaires ou heptahéliques. Les passages transmembranaires sont principalement composés d'acides aminés hydrophobes qui se replient en forme d'hélice α (Lefkowitz, 2004). Ces différents passages forment trois boucles extracellulaires et trois boucles intracellulaires interagissant avec différentes protéines de régulation. Le domaine N-terminal, souvent glycosylé, fait face au côté extracellulaire (Lefkowitz, 2004). Il est généralement démontré que c'est via cette partie (soit la queue N-terminal et les boucles extracellulaires) que se produit la fixation des différents ligands (Lefkowitz, 2004). Le domaine C-terminal, quant à lui, est orienté vers le cytosol. Il possède plusieurs régions de régulation : comme des sites de phosphorylation ou de palmylation servant à moduler l'activité du récepteur (Lefkowitz, 2004). La structure tridimensionnelle des passages transmembranaires, établi suite à la cristallisation de la rhodopsine, donne l'apparence de baril à cette protéine (Figure2) (Palczewski *et al*, 2000).

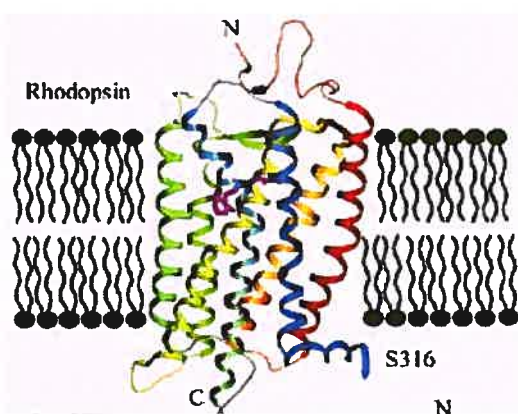


Figure 2: Cristallographie du récepteur rhodopsine.

(figure tiré de Hamm, 2001)

Plusieurs travaux ont démontré que les RCPG sont retrouvés sous forme de dimère de récepteur plutôt que monomérique. Au cours des dernières années, le laboratoire du Dr Bouvier a démontré la présence de dimères de récepteurs en cellule par co-immunoprécipitation (Hébert *et al*, 1996) et par des études de BRET (Angers *et al*, 2000). Ces résultats ont ouvert le chemin à l'étude de l'implication de la dimérisation dans les mécanismes de signalisation.

Par le passé, il était généralement accepté que la stœchiométrie d'activation de la signalisation était un récepteur pour une protéine G pour un effecteur (Gilman, 1987). Cependant des travaux récents ont démontré que les récepteurs se retrouvaient plutôt dans des complexes oligomériques, où des dimères de récepteur seraient l'unité de base. Suite à ces résultats et l'analyse de la structure 3D des RCPG il est possible de s'interroger sur la validité de la stœchiométrie actuellement proposée.

Signalisation et régulation

L'interaction de l'agoniste sur le récepteur induit un changement de conformation sur ce dernier. Cette modification de structure du récepteur active la protéine G en favorisant la fixation du GTP qui vient remplacer le GDP (Hepler et Gilman, 1992). Ce mécanisme sera vu en détails plus loin. Cette activation de la protéine G permet la transmission du signal à des effecteurs intracellulaires. Comme la fixation du ligand sur le récepteur s'effectue dans une proportion de 1 :1, aucune amplification de signal ne se produit. Par contre, l'activation d'effecteurs enzymatiques intracellulaires assure cette amplification (Hepler et Gilman, 1992). L'un de ces effecteurs est l'adénylate cyclase, un enzyme qui catalyse la dégradation de l'ATP en AMPc, un second messenger important de la cellule. L'adénylate cyclase est directement activée par la protéine G_s et inhibée par la G_i (Bunemann *et al*, 1999). Les variations de la concentration cellulaire d'AMPc encouragent une réponse rapide en modulant l'activité de plusieurs autres protéines. Parmi ces protéines figure la Protéine kinase A (PKA), une kinase spécifique aux sérines/thréonines. Une des actions de PKA est de phosphoryler la protéine CREBP (protéine liant un élément de réponse à l'AMPc) qui induit la transcription de certains gènes. Également, certains canaux ioniques sont phosphorylés par la PKA et ils ont divers rôles dans la perméabilité de la membrane plasmique (Post *et al*, 1999).

La PKA et les kinases de la famille des GRK (G protein Coupled Receptor Kinases) ont l'habileté de phosphoryler certains sites spécifiques sur les RCPG, induisant leur désensibilisation (Marullo *et al*, 1995). Sous la forme phosphorylée, la majorité des

RCPG ont une affinité pour la β -arrestine (Lefkowitz, 1998). L'interaction non-covalente de la β -arrestine empêche le récepteur de signaler de nouveau en découplant la protéine G du récepteur. De plus, le complexe β -arrestine/RCPG induit l'internalisation du récepteur (Lefkowitz, 1998). Une fois à l'intérieur de la cellule, le récepteur peut subir une déphosphorylation et être retourné à la membrane plasmique. Les récepteurs qui ne sont pas déphosphorylés sont dirigés vers des organelles spécialisées dans la dégradation protéique. Ce phénomène est appelé régulation négative (Marullo *et al*, 1995).

Un autre effecteur important dans la transmission du signal est la Phospholipase C (PLC). Cet enzyme permet la conversion du phosphatidylinositol diphosphate en inositol triphosphate (IP3) et en diacylglycérol (DAG) deux seconds messagers (Rhee, 2001). Ces messagers stimulent l'activation de la protéine kinase C (PKC) et provoquent l'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire. La famille des PLC se divise en quatre classes en fonction de une homologie de séquence pour le site actif mais avec des domaines de régulation distincts. L'isoforme PLC- β a la particularité d'être modulé par la protéine G activée. La sous unité $\text{G}\alpha\text{q}/11$ stimule dans l'ordre PLC- $\beta 1 > \text{PLC-}\beta 3 > \text{PLC-}\beta 2$. (Rhee, 2001). L'isoforme PLC- $\beta 4$ peut également être stimulée par $\text{G}\alpha\text{q}$, mais les ribonucléotides, tel le $\text{GTP}\gamma\text{S}$ utilisé *in vitro*, inhibent son activité ce qui rend difficile la mesure de cette activation. De plus, à l'exception de l'isoforme PLC- $\beta 4$, les PLC- β sont modulés par le dimère $\text{G}\beta\gamma$. Par conséquent, la sous unité $\text{G}\alpha\text{q}$ ainsi que le dimère $\text{G}\beta\gamma$ sont en mesure de stimuler une réponse cellulaire via la PLC.

Finalement, les RCPG peuvent aussi, via l'activation de la protéine G, influencer l'activité de certains canaux ioniques. Le dimère $\text{G}\beta\gamma$ peut interagir avec le canal Kir3 responsable du passage du K^+ et moduler son activité (Lei *et al*, 2003). Lorsque stimulé par $\text{G}\beta\gamma$, Kir3 va permettre le passage des ions K^+ et ainsi hyperpolariser la membrane plasmique. L'activation de la sous unité $\text{G}\alpha\text{o}$ inhibe les canaux ioniques Ca^{2+} (Li *et al*, 2004). Dans les terminaisons nerveuses, l'augmentation intracellulaire de Ca^{2+} stimule la libération des neurotransmetteurs contenus dans des vésicules de sécrétion. Par conséquent, lorsqu'un RCPG couplé à la protéine G_o est stimulé, la libération des neurotransmetteurs est diminuée. Également, le Ca^{2+} peut lier et moduler l'activité de

diverses protéines tel la calmoduline, la troponine C, aequorine et autres. Par exemple, la calmoduline, qui contient quatre sites de liaison au Ca^{2+} , fonctionne comme protéine régulatrice intracellulaire. Le complexe calmoduline/ Ca^{2+} se lie à la sous unité régulatrice de calmoduline/ Ca^{2+} kinase (Yamada, 1999). Une fois libérée de sa sous unité régulatrice, cette kinase phosphoryle certaines protéines effectrices qui induisent des réponses cellulaires. De plus, il existe d'autres systèmes d'amplification de signal passant par l'activation d'effecteurs différents tel la guanylate cyclase ou bien la phospholipase D (voir figure 3). Ces différentes voies de signalisation permettent de diversifier la réponse cellulaire provoquée par les multiples stimuli provenant de l'extérieur.

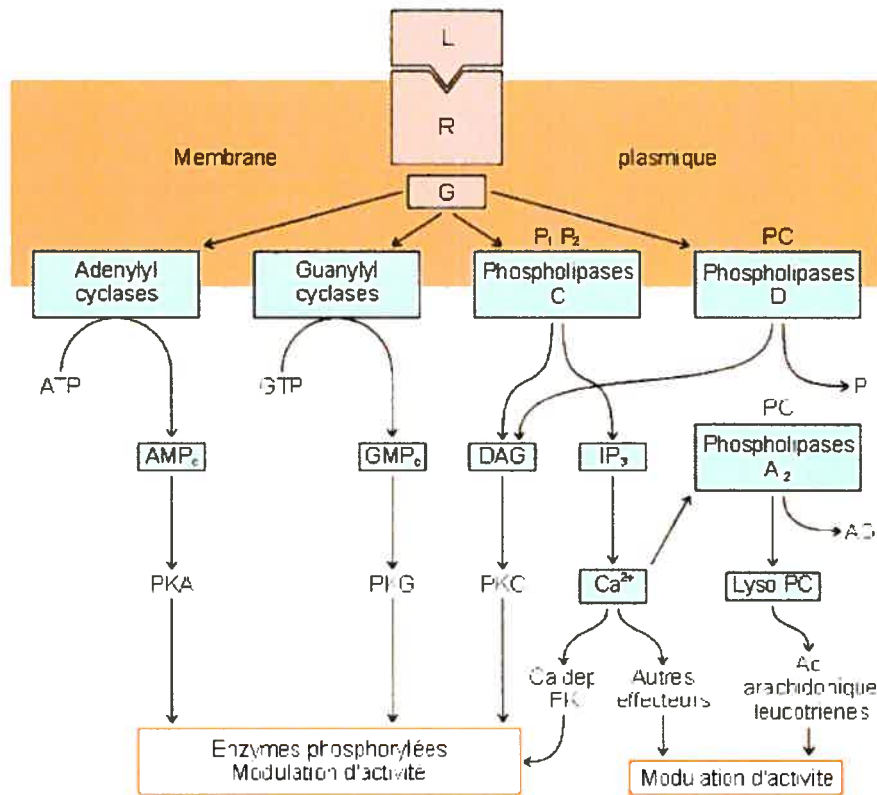


Figure 3: Voies de signalisation activées par les RCPG.

(Figure tiré du site internet <http://www.ulg.ac.be/physioan/traite.htm>)

Récepteur du GABA

Dans l'hippocampe et dans le cortex cérébral, plusieurs mécanismes sont mis en place pour réguler le passage de l'influx nerveux d'un neurone à l'autre. Un de ces mécanismes est l'inhibition de synapses via l'élaboration des potentiels post-synaptiques inhibiteurs (PPSI). Le neurotransmetteur qui joue un rôle majeur dans le contrôle des PPSI est l'acide γ -aminobutyrique (GABA) (Nurse et Lacaille, 1997). Cette inhibition GABAergique post-synaptique est divisée en deux séquences temporelles, l'une précoce et l'autre tardive. La composante précoce implique un récepteur de type GABA_A un canal ionique. Lorsque activé, les GABA_A - canaux permettent le passage d'ion Cl⁻ et HCO₃⁻ qui généreront une inhibition rapide par une hyperpolarisation de la membranaire plasmique. Cet effet peut être bloqué par la bicuculline, une molécule antagoniste spécifique pour le GABA_A (Bowery, 1993). L'inhibition tardive implique plutôt des récepteurs du GABA métabotropiques de type GABA_B (GABA_BR). Ces récepteurs ont été identifiés au niveau du système nerveux centrale et périphérique (Bowery, 1993). Suite à leur activation, ils permettent une augmentation de la conductibilité de l'ion K⁺ et cette stimulation est insensible à la bicuculline, contrairement aux récepteurs GABA_A. De plus les récepteurs GABA_B sont activés par un agoniste spécifique, le L-Baclofen, une molécule connue pour ses propriétés antispasmodique, (Bowery, 1993). Ces récepteurs modulent la transmission synaptique à deux niveaux, soit pré ou post-synaptique. Les récepteurs GABA_B post-synaptique sont à l'origine d'un PPSI tardif et durable, tandis qu'au niveau pré-synaptique, ils exercent leurs effets inhibiteurs en réduisant la libération de neurotransmetteur (Lambert et Wilson, 1996). Finalement, des récepteurs GABA_B ont été mis en évidence hors des synapses (Fritschy *et al*, 1999). Ils seraient activés uniquement lorsque du GABA serait libéré et s'échapperait du volume synaptique.

Peu de composés ayant une action sur les récepteurs GABA_B sont disponibles et ils sont compilés dans le tableau I. Trente ans après sa caractérisation, le L-baclofen est toujours l'agoniste sélectif le plus utilisé pour les études du récepteur GABA_B. Un analogue du GABA présentant toutefois une affinité 10 fois supérieur au L-baclofen est maintenant

disponible. Il s'agit de l'acide 3-aminopropyl phosphinique (APPA). Néanmoins, les agonistes spécifiques du récepteur GABA_B ont une faible affinité pour le récepteur GABA_B. Contrairement aux agonistes, les antagonistes CGP54636A et CGP64213 possèdent une meilleure affinité pour le récepteur GABA_B de l'ordre du nanomolaire.

Tableau I Affinité de quelques composés agissant sur les récepteurs GABA_B

Composés	Affinité (K _D)		
	Membrane plasmique de cerveau	GABA _B R1 seul	GABABR1 + GABA _B R2
Agonistes (μM)			
GABA	0.114	25	2.0
L-baclofen	0.210	30	5.0
APPA	0.018	2.5	0.3
Antagonistes (nM)			
CGP54636A	2.2	1.7	1.5
CGP64213	1.6	2.0	2.0

Le récepteur GABA_B est composé de deux monomères GABA_BR1 et GABA_BR2 qui font partie de la classe III des RCPG. Bien avant que le clonage des deux monomères vient confirmer que GABA_B est un RCPG plusieurs résultats pointaient dans cette direction. D'abord, sa vitesse de réaction plus lente que celle des récepteur-canaux ainsi que la modulation du signal affectée par des nucléotides guanyliques représente des caractéristiques de récepteurs métabotropiques (Innis et Aghajanian, 1987). De plus, l'effet du L-Baclofen sur les récepteurs GABA_B post-synaptiques est bloqué par un traitement à la toxine pertussique (PTX), un inhibiteur spécifique de la protéine Gi/o, suggérant la participation de la protéine Gi/o pour la transmission du signal. Cette toxine reste sans effet sur les récepteurs GABA_B pré-synaptiques, il semble donc être en mesure de lier d'autres protéines G que Gi/o.

Le GABA, via la protéine G, active différentes voies de signalisation. Dans les cellules pré-synaptiques, les récepteurs du GABA inhibent le relargage de neurotransmetteurs. Ce contrôle du relargage s'effectue via l'inhibition des canaux ioniques aux Ca²⁺ exprimés dans les terminaisons pré-synaptiques (Amico *et al*, 1995). Les agonistes spécifiques de

GABA_B vont permettre l'activation de la protéine G et ainsi le dimère Gβγ inhibera l'activité des canaux calciques (Herlitze *et al*, 1996). Les récepteurs du GABA ont également la capacité d'induire une lente inhibition du courant post-synaptique en activant des canaux K⁺ (Kir3). Une augmentation du flux de K⁺ hyperpolarise la membrane plasmique (Luscher *et al*, 1997).

La protéine G régule également l'activité de l'adénylate cyclase. Plusieurs études ont d'ailleurs démontré que l'addition d'agonistes GABA_B spécifique inhibe la stimulation d'AMPC par la forskolin. Par contre, d'autres résultats semblent indiqués le contraire (Bettler *et al*, 2004). Les sous unités Gi/o de la protéine G ont la capacité d'inhiber l'activité de l'adénylate cyclase de type I, III, V et VI, mais le dimère Gβγ quant à lui stimule les l'adénylates cyclases de type II, IV et VIII. Par conséquent, l'activation ou l'inhibition de la production d'AMPC dépend du contexte cellulaire et de l'expression des types d'adénylates cyclases présents.

Le récepteur GABA_B a été cloné 20 ans après sa découverte. L'utilisation de l'antagoniste CGP64213 radioactif a permis le clonage de GABA_BR1 une protéine de 960 acides aminés. GABA_BR1 possède la caractéristique d'être retenu dans le réticulum endoplasmique via un site de rétention composé des acides aminés RSRR. De plus, cette même sous unité semble être responsable de la fixation du ligand sur sa partie N-terminal sans activer la protéine G (Malitschek *et al*, 1998). Ceci semble contradictoire, mais l'explication de ce phénomène sera vue plus loin. Plusieurs isoformes de GABA_BR1 ont été identifiés (voir figure 4). Ces isoformes sont la résultante de diverses modifications du même gène situé sur le chromosome 6 en position p21.3 (Fritschy *et al*, 1999). La présence de différents isoformes aide probablement à l'hétérodimère GABA_B d'avoir des localisations et des voies de signalisation distinctes. Chez toutes les espèces étudiées, les isoformes GABA_BR1a et GABA_BR1b sont les plus abondants. Les principales différences entre ces deux isoformes proviennent de leur portion N-terminale, où les 147 premiers acides aminés de GABA_BR1a sont remplacés par une séquence de 18 acides aminés dans GABA_BR1b (voir figure 4). Ils semblent également être sous le contrôle de promoteur différents (Bettler *et al*, 2004). Seul GABA_BR1a possède une paire de

Une seconde protéine, GABA_BR2, composée de 941 résidus (110 kDa) et présentant 35% d'homologie avec GABA_BR1 a ensuite été obtenue (Jones *et al*, 1998). GABA_BR2 a été isolé par criblage de banques d'EST (Expressed Sequence Tag) dans le but de déterminer des homologues de GABA_BR1 (Jones *et al*, 1998). Simultanément, il a été identifié par la technique de double hybride en utilisant la portion C-terminal de GABA_BR1 (Kuner *et al*, 1999). Outre le domaine heptahélice, GABA_BR1 et GABA_BR2 possède seulement 20% d'identité. Localisé sur le chromosome 9 en position q22.2, GABA_BR2 ne possède pas les mêmes caractéristiques que GABA_BR1. GABA_BR2 peut se rendre seul à la membrane plasmique, mais est incapable de fixer le ligand GABA. Également, il a été montré dans la littérature que ce dernier possède la capacité d'activer la protéine G (Martin *et al*, 1999).

D'un côté GABA_BR1 lie l'agoniste mais n'engendre pas de signalisation et de l'autre côté GABA_BR2 ne lie pas l'agoniste mais est essentiel à l'activation de la protéine G. Ceci s'explique par le fait que GABA_BR1 et GABA_BR2 sont des hétérodimères obligatoires. Les extrémités C-terminales intracellulaires des deux formes de récepteur du GABA contiennent une séquence d'environ 30 acides aminés susceptible de former des motifs de type coil-coil parallèles (White *et al*, 1998). Ces motifs contribuent à la cohésion du complexe hétérodimérique entre GABA_BR1 et GABA_BR2, mais sans être nécessaire. Le modèle établi pour former un récepteur fonctionnel GABA_B veut que l'interaction des motifs de type coil-coil de GABA_BR1 et GABA_BR2 masque le site de rétention de GABA_BR1 et permet l'acheminement de ce dernier à la membrane plasmique (voir figure 5). Une fois à la membrane plasmique GABA_BR1 interagit avec son agoniste GABA, subit un changement de conformation qui se répercute sur GABA_BR2, qui activera ensuite la protéine G. (ref) Par conséquent, dans un système orthologue, tel les cellules HEK293, seul la co-expression de GABA_BR1 et GABA_BR2 permet d'obtenir une pharmacologie comparable à celle des tissus.

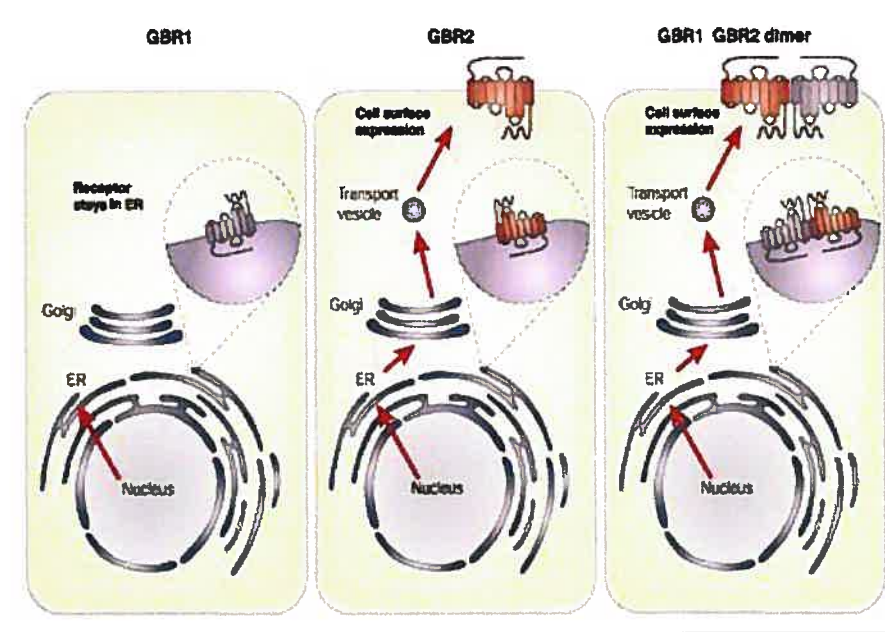


Figure 5: Schéma des différentes localisations cellulaires des monomères du récepteur du GABA.

(Image tirée de Bouvier, 2001)

Tous les récepteurs de la classe III possèdent une organisation structurale similaire qui se divise en deux parties principales : un domaine hétopahélice, comme tous les RCPG, et un domaine N-terminal extracellulaire de grande taille (environ 400 à 600 acides aminés) (Galvez *et al*, 2003). Pour les RCPG de la classe I, les agonistes se fixent sur la partie hétopahélice pour induire un changement de conformation qui active la protéine G. Pour ce qui est des récepteurs de la classe III, c'est plutôt au niveau du domaine N-terminal que la fixation de l'agoniste se produit. Le domaine extracellulaire du récepteur du glutamate mGlu1a été récemment résolu par cristallographie. Il est composé de deux lobes nommés LB1 et LB2 entre lesquels le glutamate peut venir se loger. Chacun des lobes est composé d'un feuillet β à sept brins entouré d'hélices α (Kunishima *et al*, 2000). Cette structure est similaire à celle retrouvée sur les récepteurs d'acides aminés branchés de certaines bactéries Gram négatif (Tam et Saier, 1993). Deux conformations des lobes ont été mises en évidence en fonction de leur interactions avec l'antagoniste ou avec l'agoniste. En présence d'antagonistes, les deux lobes adoptent une conformation dite ouverte alors qu'en présence d'agonistes la conformation préférée est fermée

(Kunishima *et al*, 2000). À l'état basal, c'est-à-dire libre de ligand, les deux conformations sont à l'équilibre où la conformation ouverte est favorisée. Par analogie avec le piège à mouche des plantes carnivores de la famille *Dioneae*, ce mécanisme est nommé 'Venus flytrap'. La fermeture du domaine 'Venus flytrap' sur l'agoniste constitue une des premières étapes de l'activation d'un récepteur de classe III. En cristallographie, le domaine 'Venus flytrap' serait un dimère (Kunishima *et al*, 2000). Deux hélices α parallèles du LB1 de chacun des monomères forment une première zone d'interaction. En absence de ligands, l'angle entre ces paires d'hélices est de 140° . Lorsque l'agoniste vient se loger dans la pochette de liaison, il en résulte un pivotement des deux domaines 'Venus flytrap' et l'angle entre les deux paires d'hélices α parallèles passe de 140° à 40° . Une nouvelle interface de contact est alors créée entre le domaine LB2 qui vient stabiliser la conformation fermée (Kunishima *et al*, 2000). Cette modification de structure extracellulaire se répercute sur la conformation des deux heptahélices activant la protéine G.

Récepteurs du CGRP et ADM

Le récepteur du GABA est un excellent modèle d'hétérodimérisation des RCGP et il est le premier à démontrer la nécessité de la co-expression d'un deuxième récepteur pour le transport à la membrane plasmique d'une unité de récepteur fonctionnel. Sans la présence de ces deux protomères la signalisation par le GABA n'est pas possible. Cet exemple d'influence de localisation membranaire d'un récepteur n'est pas un cas unique au récepteur du GABA. Plusieurs autres récepteurs, tel que les récepteurs du CGRP (calcitonin gene-related peptide) et de Adrénomédulin (ADM), nécessitent la co-expression d'une autre protéine qui est essentielle pour la relocalisation à la membrane plasmique de ces récepteurs.

Le CGRP est membre de la famille de la calcitonine composée de trois autres membres; la calcitonine, l'amyline et ADM. Le CGRP est un peptide de 37 acides aminés possédant un anneau formé par une liaison disulfure entre les cystéines en position 2 et 7. Des sites de liaison pour cette hormone peptidique ont été répertoriés dans le système nerveux

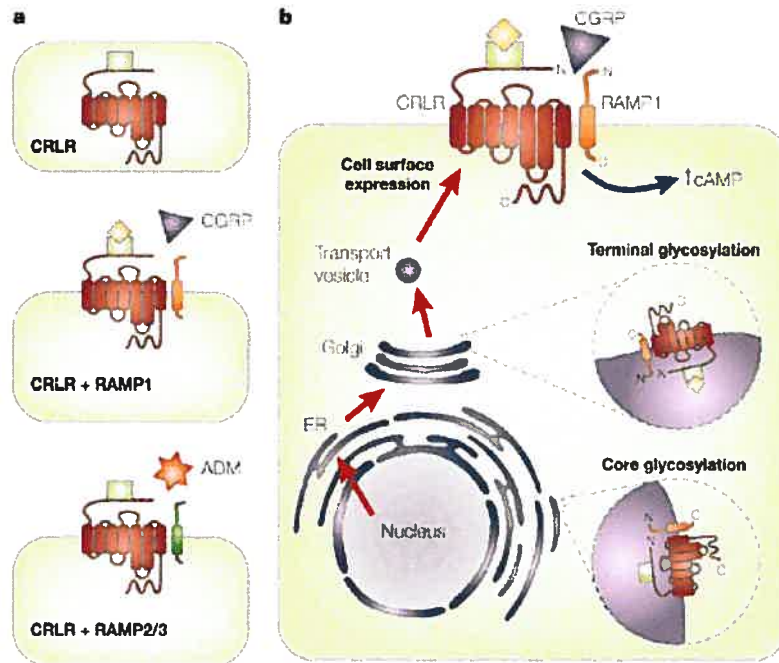
central et périphérique ainsi que dans le système cardiovasculaire (Juaneda *et al*, 2000). Pour sa part, l'adrénomédulline (ADM), membre également de la famille des peptides de la calcitonine, est un peptide de 52 acides aminés également formé d'un anneau relié par les cystéines en position 16 et 21. La liaison de cette hormone peptidique est très limitée en dehors du système nerveux et principalement concentré dans la moelle épinière (Cueille et Garel, 2004). Il est démontré que le récepteur du CGRP a la possibilité d'être activé par l'ADM et vice-versa. Cette observation a poussé les investigations afin d'établir le lien entre ces deux récepteurs activés à des niveaux distincts par deux ligands qui ont vraisemblablement des structures différentes et membre de la même famille de peptide (CGRP et ADM).

Afin d'identifier le récepteur responsable de la liaison du CGRP ou de l'ADM, une comparaison de séquence avec le récepteur de la calcitonine a été effectuée. Comme le récepteur de la calcitonine était bien caractérisé et la séquence des récepteurs pour les peptides CGRP et l'ADM ne devraient pas trop varier, car tous ces agonistes font partie de la même famille de peptide. De cette comparaison de séquence, un récepteur avec 55% d'homologie est sorti, le récepteur CRLR (McLatchie *et al*, 1998). Des analyses plus approfondies ont révélé que ce récepteur CRLR est présent dans tous les types cellulaires qui fixent le CGRP, mais que son expression dans des cellules où le récepteur CRLR n'est pas présent aucune faible liaison de CGRP n'est mesurée. De plus, le récepteur était retenu dans le réticulum endoplasmique (Sexton *et al*, 2001). À cette époque, la nécessité du récepteur GABA_BR2 pour l'expression à la membrane plasmique de GABA_BR1 venait d'être mis à jour. Afin de démontrer la nécessité d'une autre protéine pour l'expression de surface du récepteur CRLR, une librairie d'ADN complémentaire (ADNc) a été co-exprimée en présence du récepteur CRLR. De cette expérience, un ADNc codant pour une protéine compétent pour délocaliser le récepteur CRLR à la membrane plasmique, mais également permet l'apparition d'une signalisation dans des cellules qui n'expriment physiologiquement pas ce récepteur (McLatchie *et al*, 1998). Cette protéine est nommée protéine modificatrice de l'activité de récepteur (RAMP). La famille des RAMP est composée de trois membres; RAMP1, RAMP2 et RAMP3 avec seulement 30% homologie de séquence entre elles (Sexton *et al*, 2001). Toutefois, d'un point de vue structural, elles semblent posséder les mêmes caractéristiques. Les RAMP sont de petites

protéines (14 à 17 kDa) possédant à un seul passage transmembranaire, un domaine N-terminal extracellulaire d'environ 100 acides aminés et un petit domaine cytoplasmique de 10 acides aminés en C-terminal (Sexton *et al*, 2001). Les RAMP sont exprimés dans tous les tissus et lignées cellulaires analysés, mais à des niveaux différents. Par exemple, dans le cerveau, le pancréas et les gonades les isoformes de RAMP1 et de RAMP3 sont prédominantes, tandis que dans les poumons, la trachée, le système immunitaire, le rein et le fœtus les isoformes de RAMP2 et de RAMP3 sont plutôt majoritaires. Finalement, le foie représente un tissu où l'expression des trois RAMP est similaire (Cueille *et al*, 2004). Des études de liaison des ligands CGRP ou ADM radiomarqués ont révélé que la distribution des récepteurs de chacune des hormones peptidiques suit une distribution différentielle et coïncide avec l'expression d'une protéine RAMP donnée. Une expression élevée de RAMP1 est observée dans les tissus répondant au CGRP. Comparativement, les tissus qui répondent à l'ADM expriment principalement RAMP2 et/ou RAMP3 (Chakravarty *et al*, 2000).

Le récepteur CRLR est un RCPG de la classe II qui possède un long domaine extracellulaire avec des cystéines participant à des réseaux de liaison disulfure. Dans des cellules qui ne possèdent pas naturellement ce récepteur, le récepteur CRLR est retenu dans le réticulum endoplasmique tout comme le récepteur GABA_BR1 (voir figure 6). Toutefois, dans ces mêmes cellules la co-expression de la protéine RAMP favorise l'acheminement du récepteur à la surface cellulaire. En plus de modifier la pharmacologie du récepteur CRLR, RAMP est essentiel au transport du complexe (Sexton *et al*, 2001). Ce mécanisme de transport n'est pas, à ce jour, très bien élucidé, mais il est possible d'affirmer que la présence de RAMP modifie la localisation de CRLR en cellule. Également, les RAMP sont principalement retenus dans le réticulum endoplasmique et dans l'appareil de Golgi (Sexton *et al*, 2001). La co-expression de CRLR favorise l'acheminement des RAMP à la surface cellulaire (Sexton *et al*, 2001). En présence de RAMP1, le récepteur CRLR devient un récepteur du peptide CGRP (Herzog *et al*, 2002) et en présence de RAMP2 ou RAMP3 il est plutôt un récepteur du peptide ADM (Huang *et al*, 2004). Ces résultats indiquent que le récepteur CRLR interagit avec les RAMP lors de sa maturation qui modifie sa pharmacologie (récepteur CGRP ou récepteur ADM selon le type de RAMP) et sa localisation cellulaire. Il a été

démonstré, par des études co-immunoprécipitation, que RAMP1 est présent avec les formes matures et immatures de CRLR sur un gel d'immunobuvardage (Sexton *et al*, 2001). Également, des études de pontage croisé (cross-linking) ont révélées que RAMP1 contribue directement en l'interagissant avec le ligand (Sexton *et al*, 2001).



Nature Reviews | Neuroscience

Figure 6: Schéma des étapes et protéines essentielles à la localisation membranaire de CRLR
(Image tirée de Bouvier, 2001)

Toutes ces évidences indiquent que RAMP est une protéine essentielle dans la pharmacologie du récepteur CRLR, mais ce n'est pas le seul récepteur dont la pharmacologie est transformée. Celle du récepteur de la calcitonine (CTR) peut également être modifiée par RAMP (Christopoulos *et al*, 1999). En présence des RAMP, le récepteur de la calcitonine devient un récepteur à l'amyline (AMY). Contrairement au récepteur CRLR, la localisation de CTR, qui à la possibilité d'aller à la membrane plasmique seul, n'est pas affectée par la présence de RAMP, mais les RAMP sont de leur

côté transportés à la membrane plasmique. D'autres récepteurs de la classe II ont montré une interaction avec les RAMP sans modifier l'affinité de ces récepteurs pour leur agoniste (Christopoulos *et al*, 2003). La co-expression des trois types de RAMP avec le récepteur VPAC1 (vasoactive intestinal polypeptide 1) modifie ni sa localisation ni son affinité pour son agoniste VIP (vasoactive intestinal polypeptide), mais la présence de RAMP2 spécifiquement entraîne un changement dans la signalisation cellulaire. En présence de RAMP2, le récepteur VPAC1 augmente significativement l'hydrolyse du phosphoinositol, second messenger impliqué dans le re-largage du calcium intracellulaire, mais n'affecte pas la stimulation de l'AMPc, autre second messenger, comparativement au récepteur seul (Christopoulos *et al*, 2003). Les récepteurs du glucagon et le récepteur de l'hormone parathyroïdienne de type I (PTH1) permettent une localisation membranaire en présence de RAMP2, tandis que le récepteur de l'hormone parathyroïdienne de type II (PTH2) délocalise spécifiquement RAMP3 (Christopoulos *et al*, 2003). L'effet physiologique de ces interactions avec des RAMP n'a pas encore été établi.

Une troisième protéine a montré une importance dans la signalisation cellulaire de CRLR-RAMP. Cette protéine petite de 143 acides aminés est ubiquitaire et nommée RCP (Receptor Component Protein). Cette protéine RCP n'est pas ancrée directement aux membranes, car elle ne possède pas de région hydrophobe capable de traverser la membrane et elle ne possède pas de séquence consensus pour de modification lipidique (Prado *et al*, 2002). Toutefois, elle est retrouvée dans les fractions cytoplasmique et membranaire d'extrait cellulaire. La présence de RCP dans la fraction membranaire peut être altérée par l'addition de haute concentration de sel, suggérant son attachement aux membranes se produit via des interactions ioniques. De plus, il est rapporté que RCP est co-immunoprécipité avec le récepteur CRLR ainsi que de RAMP, ce qui suggère leur interaction (Evans *et al*, 2000). Malgré cette interaction avec le récepteur CRLR, RCP ne semble pas requise pour le transport du complexe CRLR-RAMP à la membrane plasmique, car une diminution de sa synthèse par ARN interférant (ARNi) ne modifie pas l'expression de surface de CRLR. Toutefois, la diminution d'expression de RCP diminue la signalisation en réponse aux agonistes CGRP ou ADM (Prado *et al*, 2002). Le complexe CRLR-RAMP-RCP représente un nouveau mode de régulation de l'activité des

RCGP, où RAMP délocalise le complexe à la membrane plasmique et RCP couple le complexe voies cellulaires de régulation de signal.

Dans les vaisseaux sanguins, l'activation du récepteur CRLR par le CGRP permet une vasodilatation indépendante de l'endothéline et de la voie NO (Herzog *et al*, 2002). Cette vasodilatation est principalement permise par l'augmentation de la concentration d'AMPc, un stimulateur de la protéine kinase A (PKA), mais également par l'activation de canaux potassiques qui hyperpolarise la membrane plasmique et finalement par une baisse de calcium intracellulaire via la fermeture de canaux calciques voltage-dépendants (Herzog *et al*, 2002). Dans les cellules épithéliales de la rétine, l'adrénomédulline (ADM) provoque l'inhibition de la migration de ces cellules, également par l'augmentation d'AMPc et diminution le calcium intracellulaire. Contrairement au CGRP, l'ADM dans les cellules épithéliales de la rétine diminue la concentration calcique en diminuant la production GMPc. Ces stimulations d'AMPc proviennent d'un couplage avec la protéine Gs qui est principal acteur dans la stimulation de l'adénylate cyclase, enzyme catalysant la formation de ce second messenger. Cette augmentation d'AMPc en réponse au CGRP est également reproduite lors de la co-expression de CRLR et RAMP1 dans des cellules Swiss 3T3. Dans des ovocytes de *Xenopus*, la co-expression de RAMP1 et du canal potassique GIRK, active par la protéine Gi, permet une réponse cellulaire avec les récepteurs CRLR endogène (Martin *et al*, 1998). En présence de CGRP l'activité basale du canal GIRK est amplifiée, mais l'addition de la PTX, un inhibiteur de l'activation de la protéine Gi, empêche l'ouverture de ce canal (Martin *et al*, 1998). Le récepteur CRLR semble être en mesure de lier différents sous type de protéine G selon le contexte cellulaire.

De par ces caractéristiques de localisation différentielle en fonction de l'expression de RAMP, le récepteur CRLR semble être un modèle de choix pour l'étude de ses interactions précoces avec la protéine G, un des objectifs de ce présent mémoire.

Famille de protéines G hétérotrimérique

Généralités

Les protéines G sont membres de la superfamille des GTPases qui sont fondamentalement conservées des bactéries aux mammifères et qui jouent divers rôles dans la régulation cellulaire (Hepler et Gilman, 1992). Plus spécifiquement, la protéine G hétérotrimérique permet la transmission de l'information des récepteurs vers les effecteurs intracellulaires. Comme son nom l'indique, la famille des protéines G hétérotrimériques est composée de trois sous unités différentes : $G\alpha$, $G\beta$ et $G\gamma$. Sous sa forme inactive, la sous unité $G\alpha$ est liée à un guanosine diphosphate (GDP). Suite à la liaison d'un agoniste sur le récepteur son activité facteur d'échange du guanosine (GEF) est stimulée, ce qui lui permet de favoriser l'échange du GDP pour du guanosine triphosphate (GTP) (Hepler et Gilman, 1992). La protéine G est alors activée. C'est uniquement lorsque liée au GTP que la protéine G peut inhiber/activer certains canaux ioniques ou activer différents effecteurs de la signalisation tel que l'adénylate cyclase et la phospholipase C.

Sous unité $G\alpha$

La sous unité $G\alpha$, qui varie entre 45-52 kDa, possède un domaine alpha hélice et un domaine GTPasique similaire à la structure de $p21^{ras}$ (Gilman, 1987). Plus précisément, le domaine GTPasique est composé de cinq hélices alpha entourant six feuillets bêta standard dont cinq parallèles et un antiparallèle. Le domaine alpha hélice possède une longue hélice alpha entourée par cinq hélices plus courtes. Il est lié au domaine GTPasique par deux segments, le premier composé des résidus 54 à 58 et le deuxième des résidus 173 à 179 (Raw *et al*, 1997). Ces deux segments lient une structure en fourche responsable de la liaison des nucléotides (GDP/GTP). Les changements conformationnels de cette structure en fourche favorisent le contact avec le dimère bêta/gamma (voire figure 7).

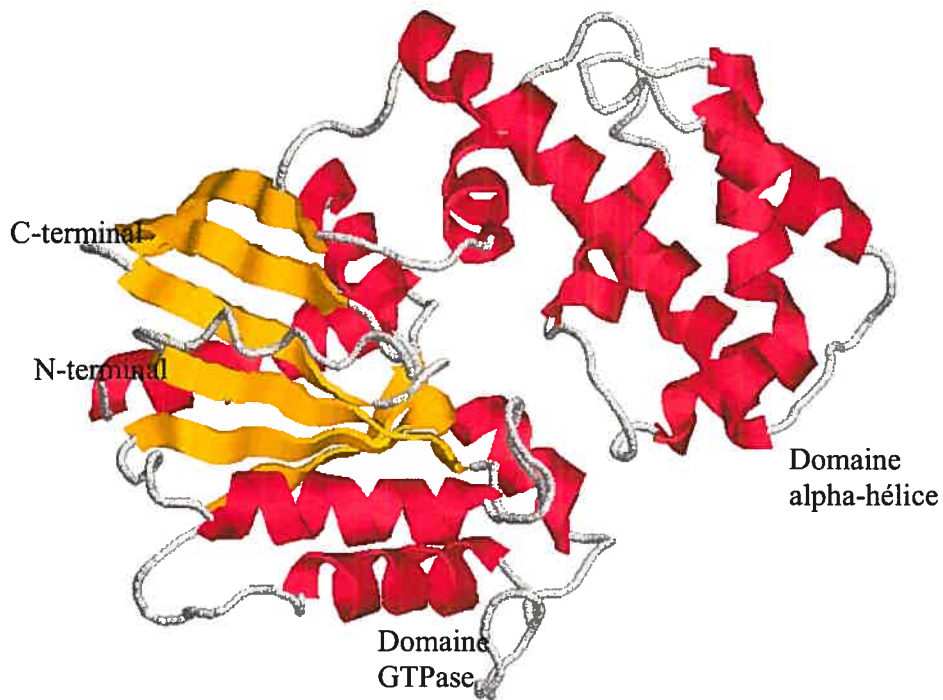


Figure 7: Structure de la sous unité $G\alpha_{i1}$.

Les hélices alpha sont colorées en rose et les feuillets bêta sont colorés en jaune. (Image adaptée de Protein data Bank (PDB) de la protéine $G\alpha_{i1}$:1CIP)

En dehors de certaines régions communes, les protéines $G\alpha$ sont très divergentes et il est possible de les classer en quatre sous types; G_s , G_i , G_q et G_{12} (voir Tableau I). La classe G_s est composée de G_{α_s} et $G_{\alpha_{olf}}$, identiques à près de 88% (Neves et al, 2002). Tous deux possèdent la capacité d'activer l'adénylate cyclase. Également, elles sont le substrat d'une ADP-ribosylation catalysée par une toxine de *Vibrio cholera*. Cette modification post-traductionnelle inhibe l'activité GTPasique de la protéine G résultant en une protéine constitutivement active (Neves et al, 2002).

Tableau II : Classification des sous unités alpha de la protéine G

	Massa moléculaire (kDa)	sensibilité (toxine)	Distribution	Effecteur
Gs				
G α s	46/44.5	Cholera	ubiquitaire	AC
G α olf	46	Choléra	Cerveau/olfaction	AC
Gi/o				
G α i-1	40.4	Pertussis	ubiquitaire	AC/K+
G α i-2	40.5	Pertussis	ubiquitaire	AC/K+
G α i-3	40.4	Pertussis	ubiquitaire	AC/K+
G α o-A	39	Pertussis	Cerveau	K+
G α o-B	39	Pertussis	Cerveau	K+
G α t-1	40	Pertussis	Rétine	PDE
G α t-2	40.5	Pertussis	Rétine	PDE
G α z				
Gq/11				
G α 11			ubiquitaire	PLC- β
G α 14			épithélium/Stromal	PLC- β
G α 15			Myeloid	PLC- β
G α 16			Myeloid	PLC- β
G α q			ubiquitaire	PLC- β
Gα_{12/13}				
G α 12			ubiquitaire	Channel Cl-
G α 13				

La classe Gi est composée de G α i1, G α i2, G α i3, des deux isoformes rétiniennes G α t1 et G α t2, des deux isoformes cervicales G α o-A et G α o-B et finalement se G α z. Tous les membres de cette famille contiennent un résidu cystéine en C-terminal sensible à ADP-ribosylation par la PTX (Neves et al, 2002). Cette modification covalente irréversible rend impossible la libération du GDP suite à la fixation d'un ligand sur un récepteur couplé Gi. Le blocage des réponses cellulaires par la PTX a été un outil important pour l'étude de l'implication des protéines Gi dans les processus de signalisation cellulaire. Ainsi, il a été déterminé que la sous unité G α t active la GMPc phosphodiesterase de la rétine, un effecteur majeur dans la vision chez les vertébrés (Neves et al, 2002). Les membres de la sous-famille G α i et G α o sont impliqués dans l'inhibition de l'adénylate cyclase, dans la régulation de certains canaux ioniques et dans la régulation de la

phospholipase C. Pour ce qui est de la sous unité $G\alpha_z$, ses fonctions dans la signalisation n'ont pas encore été élucidées (Neves et al, 2002).

La classe G_q contient cinq membres $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{14}$, $G\alpha_{15}$, $G\alpha_{16}$ et $G\alpha_q$. Les membres de cette classe ne sont pas des substrats pour la réaction ADP-ribosylation. $G\alpha_q$ est responsable de la régulation de la classe β des phospholipase de type C (PLC- β), qui est impliqué dans l'accumulation inositol triphosphate (IP3) et de Ca^{2+} . $G\alpha_q$ et $G\alpha_{11}$ sont largement exprimés dans tous les tissus, contrairement aux autres membres qui sont plutôt restreint à certains types cellulaires (Neves et al, 2002).

Finalement, la dernière classe de sous unité $G\alpha$ est composée de $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$. Malgré le fait qu'elles soient exprimées dans la majorité des tissus, la fonction de ces deux $G\alpha$ n'est pas clairement définie. L'expression et l'activation de $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ dans des cellules embryonnaires P19 en différenciation sont observées en réponse à l'acide rétinoïque (Neves et al, 2002). La stimulation de récepteurs couplés à $G\alpha_{13}$ engage l'activation sélective de la protéine kinase mitogénique Jun kinase (JunK). Finalement, $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ semblent être impliquées dans la régulation du canal antiport Na^+/Cl^- (Neves et al, 2002).

Sous unité $G\beta\gamma$

Les sous unités $G\beta$ et $G\gamma$ peuvent être considérées comme un monomère parce que les deux sous unités ne peuvent être dissociées sans dénaturation complète. La sous unité $G\gamma$, une petite protéine de 9 kDa, est composée de deux hélices alpha, dont une hélice qui est impliquée dans l'interaction avec $G\beta$ (Clapham et Neer, 1997). Il existe 13 isoformes de $G\gamma$ (voir Tableau II)

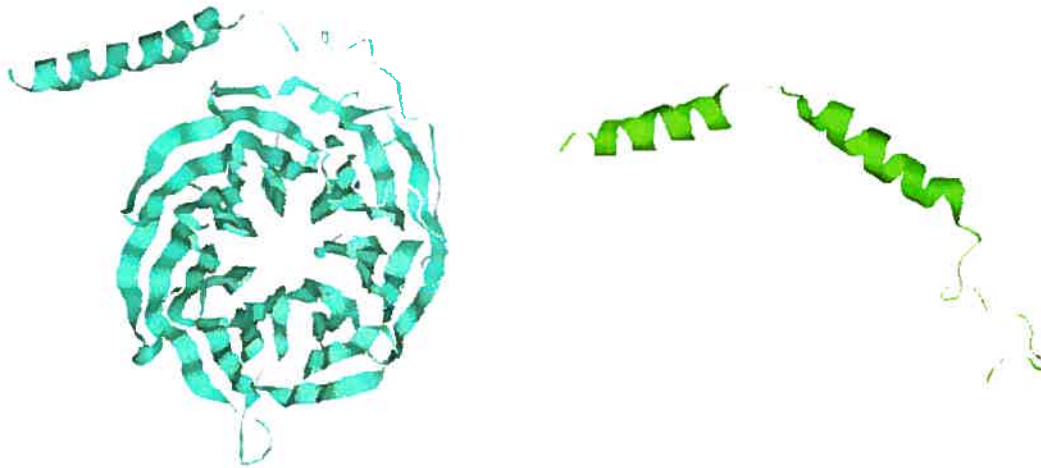


Figure 8: Structure de la sous unité G β 1 (en bleu) et G γ 2 (en vert).

(Image adaptée de Protein data Bank (PDB) de la protéine G chimérique Gt/Gi en complexe avec le dimère G $\beta\gamma$:1GOT)

La sous unité G β , une protéine d'environ 35 kDa, est constituée de deux régions structurales distinctes, un segment N-terminal d'environ 20 acides aminés en alpha hélice et le reste de la séquence impliqué dans la formation d'une structure particulière répétée 7 fois (Clapham et Neer, 1997). Cette séquence répétée est appelée 'WD-repeat' et elle n'est pas unique à la sous unité G β . Plus d'une quarantaine de protéines possèdent un motif 'WD-repeat'. Ces protéines sont impliquées dans plusieurs phénomènes cellulaires tel que la transduction des signaux, l'épissage des pré-ARNm, la régulation transformationnelle, l'assemblage du cytosquelette et le transport de vésicules (Tam *et al*, 1993) Le lien qui uni les membres de cette super famille est leur capacité à faire partie d'assemblage macromoléculaire. Par conséquent, cette propension à former des complexes protéiques s'avère être une part essentiel du fonctionnement des ces protéines à WD-repeat. La structure cristalline révèle que la sous unité G β est principalement composée de feuillets- β arrangés en anneau. Chacun des 'WD-repeat' est formé de deux dimères de résidus Tryptophane-Aspartate (WD) et de Glycine - Histidine (GH) séparé par région variable de 40 acides aminés (Tam *et al*, 1993). Chez l'humain, il existe cinq

formes distinctes de sous unité $G\beta$: $G\beta 1$ à 5 (voir Tableau III). Pour chacune des sous unités, sept 'WD-repeat' avec des régions variables distinctes permettant l'arrangement en anneau. Cette forme en anneau expose deux surfaces distinctes (comme montré à la figure 8). La fonction de ces surfaces n'est pas très bien caractérisée, mais elles sembleraient être impliquées dans des interactions protéine-protéine. À la figure 8, il est possible de voir une interaction entre la sous unité $G\alpha$ et l'une des deux surfaces exposées par la sous unité $G\beta$.

Tableau III: Classification de sous unités bêta et gamma de la protéine G

	Masse moléculaire (kDa)	Distribution
$G\beta$		
$G\beta 1$	35	ubiquitaire
$G\beta 2$	35	ubiquitaire
$G\beta 3$	35	ubiquitaire
$G\beta 4$	35	ubiquitaire
$G\beta 5$		
$G\gamma$		
$G\gamma 1$	8.4	Rétine
$G\gamma 2$	7.3	Cerveau
$G\gamma 3$		Cerveau
$G\gamma 4$		ubiquitaire
$G\gamma 5$		ubiquitaire
$G\gamma 6$		
$G\gamma 7$		ubiquitaire
$G\gamma 8$ olf		
$G\gamma 9$		
$G\gamma 10$		
$G\gamma 11$		
$G\gamma 12$		
$G\gamma 13$		

Assemblage du dimère $G\beta\gamma$

Comme mentionné plus tôt, $G\beta$ et $G\gamma$ forment un hétérodimère difficilement dissociable bien que non covalent. Cette interaction se fait via un enroulement des parties N-terminal de chacune des sous unités (voir figure 8). Contrairement à $G\alpha$ et $G\gamma$, qu'il est possible d'exprimer dans un système bactérien, la sous unité $G\beta$ demande une maturation supplémentaire que les bactéries ne sont pas en mesure de produire (Mende *et al*, 1995). Des $G\beta$ compétents peuvent être synthétisés dans un système de réticulocyte de lapin pour former des interactions $G\beta\gamma$, mais seulement 30 à 50% des polypeptides formeront des complexes. Ce faible pourcentage laisse croire que la synthèse de $G\beta$ pourrait être régulée par une protéine chaperonnes (Mende *et al*, 1995). Des résultats non publiés montrent que suite à l'immunoprécipitation de hsp90 (90 kDa heat shock protein), seule la forme non dimérique de $G\beta$ est coimmunoprécipitée et non le complexe $G\beta\gamma$. Cette observation démontre bien que la formation d'un dimère $G\beta\gamma$ fonctionnelle nécessite une ou plusieurs protéines chaperonnes.

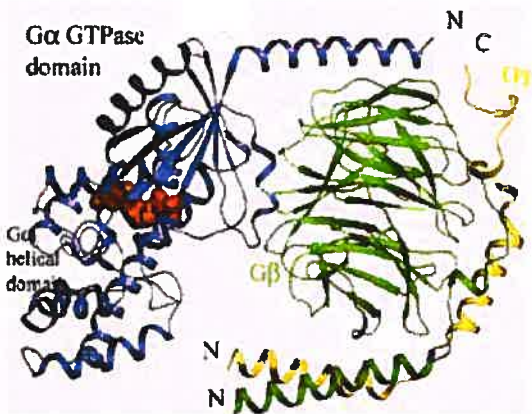


Figure 9: Cristallographie de la protéine Gt hétérotrimérique à l'état inactif.

(En bleu la sous unité alpha, en vert la sous unité bêta, en jaune la sous unité gamma et en rouge le GDP. Figure tirée Hamm, 2001)

Modifications lipidiques des protéines G

Pour remplir leurs fonctions, les protéines G, synthétisées dans le cytosol, doivent subir une lipidation nécessaire à leur acheminement vers la membrane plasmique. Deux types de modifications lipidiques réalisées dans la portion N-terminale de la sous unité $G\alpha$ ont été décrites dans la littérature. Toutes les sous unités $G\alpha$ subissent une palmitoylation, mais les sous unités α_i , α_o et α_z sont également myristoylées. Les myristates, des chaînes d'acide gras de 14 carbones, sont ajoutés directement lors de la synthèse des $G\alpha$ et sont irréversibles et les palmitates, des chaînes d'acide gras de 16 carbones, sont ajoutés post-traductionnellement à la protéine et leur attachement est réversible (Evanko et al, 2000). Dans le cas du dimère $G\beta\gamma$, les sous unités $G\gamma_1$, γ_9 et γ_{11} sont modifiées par un farnésyl, une chaîne d'acide gras de 15 carbones, suite à leur traduction. Pour les autres $G\gamma$, un groupe geranylgeranyl, une chaîne d'acide gras de 20 carbones, est plutôt ajoutée. La conséquence fonctionnelle de ces modifications différentes sur les sous unités $G\gamma$ n'est, à ce jour, pas complètement résolue (Takida et Wedegaertner, 2003). La fixation irréversible des groupements prényles s'effectue sur un résidu cystéine du motif CAAX (ou C est une cystéine, A est un acide aminé aliphatique et X peut être différents acides aminés) en C-terminal de la protéine (Gelb *et al*, 1998). La prénylation de la boîte CAAX est bien connue et se produit par un mécanisme en trois étapes : Suite à l'ajout de groupement prényl, la partie AAX est protéolysée, puis le carboxylate terminal du résidu cystéine est méthylé (Clarke, 1992). D'autres protéines prénylées, tel les petites GTPases de la super famille Ras, requièrent un second signal pour être dirigées vers la membrane plasmique. H-Ras et N-Ras possèdent un site de palmitoylation en amont du motif CAAX. K-Ras, quant à elle, possède une séquence de lysines polybasiques adjacentes au résidu cystéine prénylé (Clarke, 1992). La mutation de ce second signal retient ces protéines mutantes dans le réticulum endoplasmique. Contrairement aux petites GTPases, le dimère $G\beta\gamma$ ne possède ni cystéine palmitoylée ni une séquence de lysines polybasiques pour lui commander ce bon ciblage à la membrane plasmique.

Il a été démontré dans la littérature que $G\beta\gamma$ n'est pas ciblé efficacement vers la membrane plasmique lorsque exprimées transitoirement dans des cellules embryonnaires de rein humain (HEK293), mais qu'une co-expression avec $G\alpha$ augmente le ciblage à la membrane plasmique (Evanko *et al*, 2001). Ceci laisse croire que l'information nécessaire à un bon acheminement de $G\beta\gamma$ n'est pas uniquement dictée par le dimère, mais que l'interaction avec $G\alpha$ favorise ce ciblage. Par conséquent, $G\alpha$ jouerait le même rôle que le second signal pour les protéines Ras pour l'acheminement du dimère $G\beta\gamma$ à la membrane plasmique.

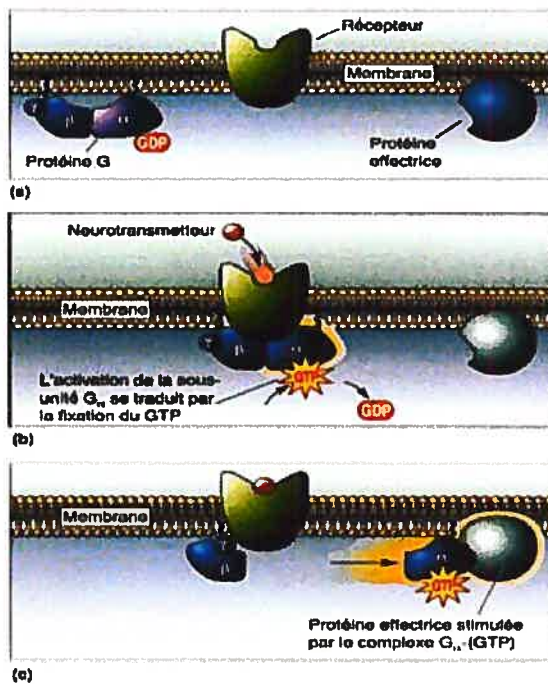
Phosphorylation des protéines G

La phosphorylation est un moyen largement employé pour moduler les activités des protéines. Les protéines G sont phosphorylées par diverses kinases pour la régulation de la signalisation membranaire. La première protéine G identifiée comme étant phosphorylée est la sous unité $G\alpha_z$ (Carlson *et al*, 1989). Cette phosphorylation, via PKC, empêche la liaison avec $G\beta\gamma$ ainsi que l'interaction avec les protéines RGS (Regulator of G-protein Signaling). En terme fonctionnel, l'inhibition de la liaison avec les protéines régulatrices prolonge l'activité de $G\alpha_z$. Certains autres résultats ont démontré que $G\alpha_i$, $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_t$ sont phosphorylées directement par PKC (Katada *et al*, 1985, Zick *et al*, 1986, Carlson *et al*, 1989, Lounsbury *et al*, 1991, Kozasa *et al*, 1996 et Daniel-Issakani *et al*, 1989) ou indirectement par l'activation d'autre kinases (Strassheim *et al*, 1994).

La sous unité $G\gamma_{12}$ est également un substrat de la PKC dans des essais *in vitro* ou en cellules entières (Morishita *et al*, 1995). $G\gamma_{12}$ est la seule des sous unités $G\gamma$ à posséder un motif SSK en N-terminal. Le premier résidu sérine du motif SSK est responsable de cette phosphorylation. Une fois $G\gamma_{12}$ phosphorylé, le dimère $G\beta\gamma_{12}$ possède une meilleure affinité pour la sous unité $G\alpha_o$ (Morishita *et al*, 1995). Ces évidences indiquent que la phosphorylation des sous unités de la protéine G joue un rôle dans la fonction de ces dernières.

Activation et désactivation de la protéine G

Selon le modèle classique, l'activation du récepteur par son agoniste recrute la protéine G hétérotrimère pour ainsi accélérer l'échange du GDP pour du GTP. Cet échange GDP/GTP crée une scission de l'hétérotrimère en $G\alpha$ -GTP et $G\beta\gamma$. Chacun de leur côté, $G\alpha$ et $G\beta\gamma$ ont la capacité de réguler l'activité de différents effecteurs soit indépendamment, en synergie ou de façon antagoniste (Gilman, 1987). Suite à l'hydrolyse du GTP en GDP par $G\alpha$, qui possède une activité GTPasique intrinsèque, le complexe $G\alpha\beta\gamma$ se reforme et est prêt pour un autre tour d'activation par les récepteurs (Gilman, 1987). L'activité GTPasique ainsi que la réassociation de $G\alpha$ à $G\beta\gamma$ sont sujettes à plusieurs régulations par des protéines accessoires comprenant la famille des RGS (regulators G protein signalling). Les RGS stimulent l'activité GTPasique de la protéine $G\alpha$ et favorise ainsi un retour rapide à l'état inactif (Koelle, 1997) Les $G\beta\gamma$ peuvent également subir une régulation par des protéines accessoires. Par exemple, la phosducin fixe le dimère $G\beta\gamma$ et l'empêche de se réassocier avec la sous unité $G\alpha$.



A) État de base du système, la protéine G hétérotrimérique est fixée à du GDP.

B) Activation de la signalisation par la fixation d'un agoniste sur le récepteur. Il s'ensuit un recrutement de la protéine G et l'échange du GDP par du GTP sur la sous unité $G\alpha$.

C) Dissociation du récepteur et scission de l'hétérotrimère en $G\alpha$ -GTP et $G\beta\gamma$ qui vont activer différents types d'effecteurs.

Figure 10: Schéma du modèle classique d'activation de la protéine G.

(image tiré du site internet :

<http://www.medecine.unige.ch/~bertrand/cours1/neurones/neurotran/metabo.html>)

De nouveaux résultats remettent en doute le mécanisme classique d'activation de la protéine G par les RCPG. Chez la levure, la reproduction sexuée est régie par une signalisation passant par un récepteur de type RCPG. Sous la forme haploïde, la levure *Saccharomyces cerevisiae* exprime les gènes *gpa1*, *ste4* et *ste18* qui traduisent respectivement les protéines $G\alpha$, $G\beta$ et $G\gamma$ (Klein *et al*, 2000). La fixation d'un phéromone sur son récepteur active l'hétérotrimère et ainsi $G\beta\gamma$ stimule la voie de signalisation responsable de l'accouplement (Klein *et al*, 2000). Chez des levures haploïdes stériles n'exprimant pas le gène *ste4* ($G\beta$), une protéine de fusion entre STE4 et GAP1 a été exprimée. Les résultats ont démontré que l'expression de cette protéine de fusion active aussi bien la voie de l'accouplement que la co-expression des ces mêmes protéines non fusionnées (Klein *et al*, 2000). Également, des travaux réalisés par le groupe de Lohse ont démontré, en utilisant la technique de transfert d'énergie de fluorescence (FRET) que la protéine G n'est pas dissocié suite à l'activation de la protéine G. Selon la position du fluorophore sur la sous unité $G\beta$, le transfert d'énergie du donneur fusionné à $G\alpha$ vers l'accepteur fusionné à $G\beta$ est augmenté ou diminué. (Bunemann *et al*, 2003) Contrairement au mécanisme classique d'activation de la protéine G, la dissociation de l'hétérotrimère en $G\alpha$ -GTP et $G\beta\gamma$ ne semble pas être nécessaire à l'activation des voies de signalisation.

Dans le laboratoire du Dr Michel Bouvier, des résultats allant dans le même ordre d'idée ont été obtenus lors d'études d'interaction protéine-protéine en temps réel. En utilisant la technique de transfert d'énergie de bioluminescence (BRET), qui sera décrite en détails ultérieurement, une interaction basale entre les RCPG et les protéines $G\alpha$, $G\beta$ ou $G\beta\gamma$ a été mesurée (Gales *et al*, 2005). Suite à l'activation du récepteur par son agoniste, une augmentation très rapide du signal BRET a été observée. Ces résultats indiquent que les protéines G sont à proximité des RCPG et que la liaison d'un agoniste sur le récepteur produit un changement de conformation qui modifie cette proximité. Par conséquent, les RCPG ne recrutent pas les protéines G tel qu'établie par le modèle classique et surtout la protéine G ne semble pas être dissociée du récepteur après son activation (Gales *et al*, 2005).

Interaction entre les RCPG et les protéines G

Au niveau du récepteur, se sont les boucles intracellulaires qui sont responsables du contact avec la protéine G. Il a été montré que pour le récepteur muscarinique m2, s'est l'extrémité C-terminal de la boucle i3 qui est responsable de la spécificité d'interaction avec la protéine Gi/o (Liu et al, 1996). Pour les récepteurs de la classe III, la boucle i2 serait plutôt l'élément de spécificité d'interaction à la protéine G. En effet, pour le récepteur mGlu3, normalement couplé à Gi/o, le remplacement de la boucle i2 par celle du récepteur mGlu1, couplé à Gq/11, rend le récepteur chimère capable de signaler comme de la même façon qu'un récepteur couplé à Gq (Francesconi et Duvoisin, 1998). Pour ce qui est de la boucle i3, elle est hautement conservée dans la classe III et joue un rôle clé dans l'efficacité de couplage de la protéine G plutôt que la sélectivité (Chang *et al*, 2000).

Au niveau de la protéine G, la sous unité G α et le dimère G $\beta\gamma$ semblent interagir avec le récepteur (Hamm, 1998). La sous unité G α joue un rôle crucial dans la spécificité de reconnaissance par les récepteurs. Lorsque ADP-ribosylé par la PTX, le résidu cystéine en position -4 de G α_i , G α_o et G α_t , entraîne un découplage de la protéine G du récepteur (Umemori *et al*, 1997). La sous unité G α_q possède plutôt un résidu tyrosine en position -4 qui doit être phosphorylé pour un couplage efficace avec les récepteurs (Umemori *et al*, 1997). De plus, il est possible de réaliser une sous unité G α_q chimérique avec les cinq derniers résidus de G α_i , de G α_o ou de G α_t . Lorsque cette protéine G α_q chimérique est co-exprimée avec des récepteurs normalement G α_i , une activité G α_q est mesurée suite à la stimulation du récepteur par son agoniste (Blahos *et al*, 1998).

Le dimère G $\beta\gamma$ est aussi en interaction avec le récepteur. Les soixante résidus C-terminaux de G β interagissent avec la même région sur le récepteur α_2 -adénergique que la sous unité G α_o (Taylor *et al*, 1996). Finalement, l'extrémité C-terminal de G γ serait en contact avec le récepteur lors de son activation (Ernst *et al*, 2000).

Dimérisation des récepteurs et implication de cette dimérisation dans le couplage avec la protéine G

Des expériences biochimiques de 'western blots' et de co-immunoprécipitations ont confirmé la nature oligomérique des RCPG. Des 'western blots' réalisés à partir de membranes de cellules sur-exprimant des RCPG révèlent des bandes dont la taille est un multiple de celle du monomère, en particulier un bande dont la taille est deux fois supérieur à celle d'un monomère (Hebert *et al*, 1996). Des expériences de co-immunoprécipitations des récepteurs avec deux d'étiquettes antigéniques ont confirmé que les bandes de taille élevées sont bien des oligomères de récepteurs et non une interaction avec d'autres protéines (Bai, 1998). Également, des études avec les techniques de BRET (Angers *et al*, 2000) et de FRET (McVey *et al*, 2001) en cellules vivantes ont confirmé les observations faites avec les techniques biochimiques.

Le paradigme d'activation de la protéine G par les RCPG stipule que les interactions entre ces deux partenaires ont une stoechiométrie 1 :1 (Bourne, 1997). En considérant que les récepteurs forment des oligomères, la stoechiométrie est-elle d'un dimère activant une protéine G ou chacun des protomères du dimères active leur propre protéine G? La surface cytoplasmique de la rhodopsine est environ deux fois supérieure à celle de la protéine G hétérotrimérique (Palczewski *et al*, 2000). Il serait donc possible de placer deux monomères côte à côte pour couvrir entièrement la protéine G. Ceci représente des observations faite sur la superposition des cristaux de la rhodopsine et de la protéine G hétérotrimérique. Également des résultats expérimentaux confirment la possibilité d'avoir un dimère interagissant avec une protéine G. Un peptide dimérique de la boucle i3 du récepteur α_2 -adrénergique est 10 à 20 fois plus efficace à compétitionner l'activation de $G\alpha_i$ que le même peptide monomérique. (Wade *et al*, 1994). Ainsi, la protéine G reconnaît plus facilement un dimère de boucle i3 qu'un monomère. De même, il a été démontré que cette boucle i3 contacte à la fois une l'extrémité N-terminal de la $G\alpha$ et le C-terminal de $G\beta$ (Taylor *et al*, 1996). Il reste encore beaucoup de travail à effectuer dans ce domaine afin de conclure sur cette question. Le présent mémoire sert à mettre au point des outils efficaces pour répondre à la question de l'utilité de la dimérisation pour l'interaction avec la protéine G, via l'utilisation des techniques de transfert d'énergie de résonance de bioluminescence (BRET) ou fluorescence (FRET).

Transfert d'énergie de résonance non radiative

Présentement, des nouveaux outils de détection d'interaction protéine-protéine sont disponibles. Certaines de ces techniques biophysiques exploitent les phénomènes de BRET et de FRET. Le principe du BRET et du FRET se base sur un transfert d'énergie de résonance non radiatif entre une molécule donneuse d'énergie et une molécule accepteuse d'énergie. Les dipôles électriques du couple donneur/accepteur doivent être dans une orientation permissive (Angers *et al*, 2000). De plus, il doit y avoir un recouvrement entre les maximums d'excitation du l'accepteur et d'émission du donneur pour obtenir un transfert d'énergie non radiatif spontané. L'efficacité du transfert d'énergie dépend de la distance qui sépare le donneur et l'accepteur. Cette efficacité est inversement proportionnelle à sixième puissance de à la distance entre le donneur et l'accepteur. Donc un faible changement dans la distance entraînera un grand changement de transfert d'énergie mesuré. (Angers *et al*, 2000) et autre meilleur ref

Pour le FRET, le donneur et l'accepteur d'énergie sont des protéines fluorescentes (GFP) fusionnées à des protéines d'intérêt surexprimées dans des cellules vivante. Pour le BRET, l'accepteur est une protéine fluorescente similaire à celle du FRET, mais le donneur est remplacé par une enzyme bioluminescence (Salahpour *et al*, 2000). Le FRET et le BRET sont des techniques de choix pour l'étude des interactions protéiques in vivo puisque l'efficacité du transfert d'énergie dépend de la distance entre l'accepteur et le donneur. Par conséquent, seules deux protéines interagissant approcheront l'accepteur et le donneur de façon à transmettre efficacement l'énergie (Salahpour *et al*, 2000). Cette propriété permet donc à ces techniques de discriminer entre deux protéines en interaction et deux protéine n'interagissant pas ensemble. De plus, les protéines fusionnées à l'accepteur ou au donneur peuvent être surexprimées en cellules et l'interaction entre les deux protéines de fusion peut être suivit en temps réel. Ceci est vrai à la seule condition que les fusions de la molécule donneuse ou accepteur d'énergie ne perturbent pas la fonction ou la localisation des protéines d'intérêt.

Bioluminescence

Aujourd'hui en biochimie, le phénomène de bioluminescence est un outil largement utilisé dans des systèmes rapporteurs ou dans des méthodes analytiques extrêmement sensibles. La bioluminescence est également utilisée dans l'étude d'interactions protéine-protéine, qui fait intervenir un transfert d'énergie de la luciférase à une protéine fluorescente tel la GFP, le BRET. Cette technique sera expliquée en détails ultérieurement.

La bioluminescence est un phénomène naturel retrouvé dans plusieurs organismes distincts tel certaines bactéries, la Cnidaria (Coelenterates), la luciole, les Dinoflagellés et certains types de ver. Cette production de lumière est la résultante de l'oxydation de la luciférine, le substrat d'une photoprotéine appelée luciférase (Wilson et Hastings, 1998). Chez certaines bactéries, cette lumière est produite continuellement par une multitude de flashes d'une durée de 0.1 à 1 seconde. Ceci demande un contrôle efficace de l'activité de la luciférase et pour ce faire la luciférine est séquestrée, puis rapidement mobilisée (Wilson et Hastings, 1998). Chez les organismes eucaryotes, la production de cette lumière est régulée par différents mécanismes de contrôle spécifique à chaque espèce. Pour les vers et les lucioles, les luciférases sont séquestrées dans des organelles provenant soit de la modification du réticulum endoplasmique soit des peroxisomes respectivement (Wilson et Hastings, 1998). Les Dinoflagellés possèdent plutôt une structure cytoplasmique responsable de l'emmagasinage des luciférases. Dans cet organisme, les flashes lumineux sont générés par une modification rapide du pH au sein de l'organelle activant ainsi la luciférase (Wilson et Hastings, 1998). Finalement, les Coelenterates vont plutôt utilisés la mobilisation du calcium pour réguler cette production de luminescence (Wilson et Hastings, 1998).

Luciférase

Dans le BRET, la protéine donneuse d'énergie est une enzyme bioluminescente, la luciférase. La séquence en acides aminés des luciférases est typiquement différente d'un organisme à l'autre et elles peuvent être classifiées en trois grandes catégories selon l'organisme dont elles proviennent; les lux représentant la classe des bactéries, les luc pour les organismes luciole et finalement les lcf pour les dinoflagellés (Wilson et Hastings, 1998). Le mécanisme de production de lumière ainsi que le type de substrats utilisés varie également d'une espèce à l'autre. La luciférase la mieux caractérisée est celle de la luciole. Cette luciférase est une protéine monomérique de 62 kDa qui a été cristallisée. Le cristal révèle la présence de deux domaines distincts, un large domaine N-terminal et un petit domaine C-terminal tous deux reliés par une hélice de quatre résidus flexibles. L'interjection des deux domaines est caractérisée par un domaine à activité ATPasique (Conti *et al*, 1996). Afin de produire de la lumière la luciférase catalyse la condensation de la luciférine (benzothiazoyl-thiazole) en présence de l'ATP et de Mg^{2+} . Cette réaction requière la formation d'un intermédiaire dioxétanone riche en énergie. Cet intermédiaire est le produit de la réaction entre un adénylate et de l'oxygène puis de la cyclisation d'un peroxyde. Le brie du dioxétanone libère environ 50 kcal/mol, l'énergie nécessaire à la génération de l'état excité de l'oxyluciférine. Au final, environ un photon sera généré par oxydation de luciférine. La couleur produite varie du vert à l'orange en fonction de la structure tridimensionnelle du site catalytique (McElroy et DeLuca, 1985).

Pour leur part, les coelenterates font intervenir un intermédiaire dioxétanone pour la production de lumière, mais sans utiliser l'ATP. La *Rénilla reniformis*, une pensée de mer, utilise un mécanisme nécessitant quatre protéines différentes et la mobilisation du calcium pour l'oxydation de la luciférine nommée plus spécifiquement coelenterazine (Wilson et Hastings, 1998). D'abord, une sulfokinase enlève un sulfate d'une coelenterazine-sulfatée. Cette coelenterazine-sulfatée est un intermédiaire dans la biosynthèse de la coelenterazine et serait sa forme de réserve. Une fois désulfatée, la coelenterazine interagit avec une protéine de 18.5 kDa qui possède trois sites de liaison au calcium (Wilson et Hastings, 1998). En présence de calcium, la protéine libère les

coelenterazines qui seront alors disponibles pour réagir avec la luciférase, protéine monomérique de 36 kDa. La quatrième protéine, la *Renilla* GFP n'est pas nécessaire à la production de lumière, mais elle modifie plutôt la couleur émise (Wilson et Hastings, 1998). Cette GFP, lorsque fixée à la luciférase, va capter l'énergie produite par la *Renilla* Luciférase et la réémettre à une autre longueur d'onde. En absence de *Renilla* GFP, la luciférase, liée à une coelenterazine, va émettre une couleur bleutée (longueur d'onde près de 480 nm). Lorsque la *Renilla* GFP est présente, la couleur émise est plutôt verdâtre (longueur d'onde près de 509 nm) (Wilson et Hastings, 1998). Ce transfert d'énergie est à la base de la technologie BRET.

Finalement, chez les dinoflagellés, l'algue unicellulaire responsable de la phosphorescence de la mer, le *Gonyaulax poledra* est le plus étudié (Wilson et Hastings, 1998). La luciférine des dinoflagellés est un dérivé de la chlorophylle et elle est très sensible à l'auto-oxydation. Cette auto-oxydation ne produit pas de lumière, mais en présence de luciférase, la luciférine va produire de la lumière. Ce phénomène n'est pas très bien résolu jusqu'à présent (Wilson et Hastings, 1998). Deux protéines sont requises pour la production de bioluminescence des *Gonyaulax*. La première est une protéine dimérique de deux sous unités identiques de 75.5 kDa qui fixe la luciférine. À pH physiologique cette protéine séquestre les luciférines (LBP) pour ainsi les protéger de l'auto-oxydation. La deuxième protéine est la luciférase (LCF) une protéine de 137 kDa inactive à un pH physiologique (Wilson et Hastings, 1998). Ces deux protéines et la luciférine sont retrouvées dans des organelles spécialisées appelées scintillons. Lorsque le pH des scintillons devient plus acide, les luciférines sont relargées de la protéine LBP et peuvent être oxydées par la luciférase. La bioluminescence produite est faible avec un maximum d'émission à 470 nm (Wilson et Hastings, 1998).

GFP (Green fluorescent protein)

La bioluminescence de la méduse *Aequorea victoria* est le produit du transfert d'énergie entre l'aequorin, une photoprotéine dépendante du calcium, et une protéine fluorescence verte (GFP). Suite à son clonage en 1992 par le groupe de Cormier, plusieurs variantes de cette GFP sont maintenant disponibles (Prasher et al, 1992). La GFP native possède deux pics d'excitation, un majoritaire à 395 nm et l'autre situé vers 475 nm. Une fois excitée, la GFP native réémet de la lumière à 509 nm (Heim et al, 1994). Le groupe de Falkow a généré des mutants de la GFP native pour ainsi créer la EGFP qui permet d'avoir un seul pic d'excitation à 488 nm, sans modifier la longueur d'onde d'émission. Une fluorescence de 4 à 35 fois supérieure à la forme native est constatée avec ce mutant (Courmack *et al*, 1996). De ce mutant ont découlé plusieurs autres protéines GFP avec des caractéristiques différentes (voir tableau IV). Par exemple, en ajoutant d'autres mutations à la séquence EGFP, il est possible d'obtenir des GFP qui réémettent la lumière dans le bleu (EBFP), dans le cyan (ECFP) ou dans le jaune (EYFP). Il est également possible de générer des mutations éliminant plutôt le pic d'excitation à 475 nm et en gardant le pic principal à 395 nm, comme la GFP² de chez BioSignal PerkinElmer. Également, dans la nature, le corail *Discosoma* exprime une chromoprotéine tétramérique responsable de la coloration rouge du corps. Cette protéine fluorescente émet de la lumière à une longueur d'onde de 583 nm.

La GFP est une protéine de 238 acide aminés, dont les résidus 7 à 229 sont essentiels pour permettre la fluorescence. La cristallographie de cette protéine a révélé une structure en forme de baril avec 11 feuillets- β (Ormo *et al*, 1996). Cette structure fournit un environnement propice à la fluorescence du chromophore suite à son excitation. Le chromophore est principalement formé par la cyclisation des résidus Ser65 (ou Thr65)-Tyr66-Gly67. Cette cyclisation est la résultante d'une réaction post-traductionnelle d'oxydation qui requiert de l'oxygène (Ormo *et al*, 1996). La formation de ce chromophore est l'étape limitante de la maturation de la GFP et est sensible à plusieurs facteurs environnementaux (Tsien, 1998).

Tableau IV : Liste des GFP disponibles et leurs caractéristiques

Nom	Mutations	abs (nm)	em (nm)	Remarque
GFP native		395 et 475	509	<i>Aequorea victoria</i>
EGFP	F64L, S65T, H231L	488	507-509	Clontech; BRET ¹
GFP2	F64L, Y100F, S108T, M141L, I219V, H231L	400	510	BioSignal PerkinElmer; BRET ²
GFP10	F64L, Y100F, S108T, M141L, S147P, S202F, I219V, H231L	400	510	Source inconnue; BRET ¹
EYFP	S65G, V68L, S72A, T203Y, H231L	515	528	Clontech; BRET ¹
Venus	EYFP: F46L, F64L M153T, V163A, S175G	515	528	Meilleur repliement et maturation Fluorescence amplifiée BRET ¹
DsRed		558	583	
EBFP		380	440	
ECFP		434	477	

La GFP mature est une protéine exceptionnellement résistante à la chaleur ($T_m = 70^\circ\text{C}$), aux détergents, aux solvants organiques, aux sels chaotropiques, aux protéases communes (sauf à la pronase) et aux pH alcalins (Tsien, 1998). Toutefois plusieurs facteurs environnementaux et cellulaires peuvent influencer l'efficacité de fluorescence de la GFP. Cette protéine est relativement stable face aux modifications de pH. Dans une fourchette entre 7 et 11.5, la EGFP possède une capacité de fluorescence non altérée, mais dans des pH plus acides la fluorescence est diminuée (Tsien, 1998).

Malgré le fait que cette protéine mature possède une thermostabilité importante, la formation du chromophore est sensible à la température. Lorsque des cellules mammifères exprimant de la GFP native sont maintenues entre 30-33°C plutôt qu'à 37°C, la fluorescence est plus importante (Tsien, 1998). Pour ce qui est de la EGFP cette thermosensibilité est diminuée, car les mutations retrouvées dans cette protéine augmentent l'efficacité de repliement et de formation du chromophore.

Transfert d'énergie de résonance de bioluminescence (BRET)

Le BRET est un phénomène naturel qui se produit chez certains êtres vivants, tel la *Renilla reniformis* et la *Aequorea victoria*. Chez ces organismes, l'enzyme luciférase effectue une dégradation oxydative de son substrat générant ainsi de la lumière. Lorsque la luciférase est fixée par des protéines accessoires GFP, l'énergie de résonance de bioluminescence est transférée à la GFP qui réémettra cette énergie à une autre longueur d'onde (Xu *et al*, 1999). Ce transfert d'énergie de la luciférase à la GFP est dépendant de plusieurs facteurs, tels que l'orientation des deux protéines, ainsi que de la distance qui les sépare. Pour avoir un transfert d'énergie efficace, les protéines doivent être à une distance maximal de 100Å (Xu *et al*, 1999). À une distance supérieure, l'énergie de résonance ne peut être transférée à la GFP. L'efficacité de transfert d'énergie est déterminée par le rapport de la lumière provenant de la GFP sur la lumière produite par la luciférase.

Ce transfert d'énergie a été mis à profit dans l'étude d'interaction protéine-protéine. Xu *et al* ont démonté l'homodimérisation de kaiB, une protéine impliquée dans cycle circadien, par l'utilisation des protéines de fusion luciférase et GFP. Lorsque les protéines kaiB-Luc et kaiB-EYFP ont été exprimées dans des bactéries, un transfert d'énergie BRET a été mesuré (Xu *et al*, 1999). Ce transfert d'énergie témoigne de la proximité des deux protéines d'intérêt. Cette approche a été réutilisée pour étudier de la dimérisation du récepteur β_2 -adrénergique (β_2 AR) par le groupe de Dr. Bouvier (Angers *et al*). Après avoir co-exprimées les protéines de fusion β_2 AR-Luc et β_2 AR-GFP dans un système d'expression hétérologue de mammifères, ils ont observé un transfert d'énergie à l'état basal. Ces résultats ont permis de poser l'hypothèse que le récepteur β_2 AR pouvait être retrouvé dans les cellules sous forme d'oligomère et ce très tôt dans sa maturation.

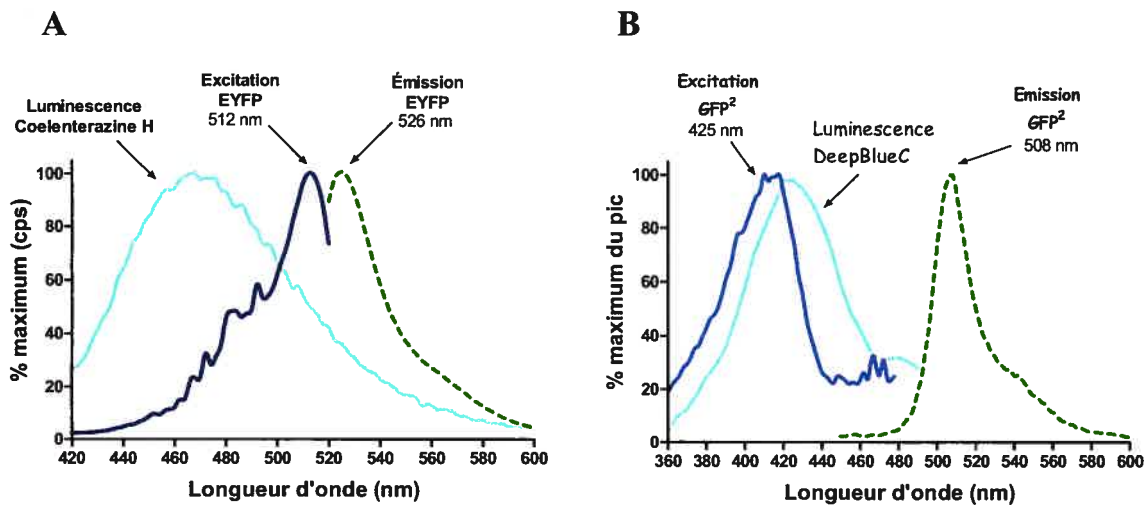


Figure 11: Superposition du spectre de luminescence et de fluorescence des deux générations de BRET.

(Spectres de bioluminescence et de fluorescence obtenus au laboratoire dans le cardede ma métrise)

Deux générations de BRET sont présentement disponibles. La première génération développée utilise une protéine EYFP, la luciférase et coelenterazine H comme substrat (voir figure 11A). La bioluminescence produite par la luciférase possède un maximum d'émission à environ 475 nm. La EYFP de son côté possède un maximum d'excitation à 512 nm. Par conséquent, le recouvrement des spectres du donneur et de l'accepteur n'est pas optimal, ce qui résulte en une moins bonne efficacité de transfert d'énergie. Pour pallier à ce problème, la compagnie Packard a développé un nouveau substrat coelenterazine, la DeepBlueC, qui permet d'avoir un maximum d'émission de 420 nm (voir figure 11B). De plus, l'utilisation de la GFP² qui possède un maximum d'excitation près de 400 nm comme accepteur d'énergie permet un meilleur recouvrement entre le spectre d'émission de la DeepBlueC et le spectre d'excitation de la GFP². Selon la théorie du transfert d'énergie de résonance, meilleur est le chevauchement des spectres entre le donneur et l'accepteur d'énergie, meilleur est le transfert. Non seulement le spectre de recouvrement est meilleur avec la génération 2, mais la séparation entre les spectres d'excitation et d'émission de la GFP² est plus importante, ce qui facilite leur détection. Comme l'efficacité de transfert d'énergie est le ratio entre la réémission de lumière produite par la GFP et celle produite par la luciférase, il est important de pouvoir bien les distinguer.

Transfert d'énergie de résonance de fluorescence (FRET)

La technique de transfert d'énergie de résonance de fluorescence (FRET) est également utilisée pour suivre la formation d'interactions protéiques. Tout comme pour le BRET cette technique exploite le rapprochement d'une protéine donneuse d'énergie avec une protéine accepteuse d'énergie. Ce transfert d'énergie répond aux mêmes exigences que le BRET. La distance entre les partenaires ne doit pas excéder 100Å et l'orientation dipolaire des fluorophores doit être permissif pour le transfert d'énergie. Le couple de fluorophores principalement utilisé est la CFP comme donneur et EYFP comme accepteur d'énergie. La CFP possède un pic d'émission à 488 nm qui est en mesure de transférer son énergie à la EYFP possédant un pic d'excitation à 512 nm. Le maximum d'émission de la CFP n'est pas exactement à la même longueur d'onde que l'excitation de la EYFP, mais les deux pics se chevauchent de sorte que la EYFP est allumée par la CFP à courte distance.

Le principal avantage de cette technique est la possibilité de la combiner avec la puissance de la microscopie pour ainsi localiser les interactions protéiques en cellules vivantes. Également, le couplage à la microscopie permet de suivre la cinétique et le mouvement de ces interactions. Son principal désavantage est l'excitation croisée des fluorophores. Ainsi, lors de l'excitation du donneur d'énergie, une faible stimulation de l'accepteur est possible. Cette stimulation doit être prise en compte dans l'analyse des résultats. Pour chacun des couples de protéines étudiés, des contrôles serrés doivent être introduits pour corriger les valeurs afin d'éliminer toute trace de contamination. Pour ce faire, la mesure croisée de chacun des fluorophores doit être effectuée en utilisant les paramètres de l'autre fluorophore (Cardullo et Parpura, 2003).

Objectifs du projet de maîtrise

Au moment de débiter ce projet de maîtrise, plusieurs évidences permettent de croire que les récepteurs forment des dimères très tôt dans leurs maturations, mais également que ces récepteurs en maturation possèdent la capacité d'interagir avec d'autres protéines impliquées dans la signalisation.

1- Valider la possibilité de mesurer l'interaction protéine G hétérotrimérique /Récepteur en BRET ainsi que de certifier de la possibilité de mesurer plus d'une interactions protéiques au sein de la même cellule en utilisant le BRET¹ et le BRET² conjointement

2- Mesurer l'impact de la dimérisation sur l'interaction de la protéine G hétérotrimérique avec les sous type du récepteur du GABA ainsi que le l'effet de la modulation de cette interaction par la stimulation du récepteur par un agoniste spécifique.

3- Localiser les interactions entre les récepteurs et la protéine G hétérotrimérique au sein de la cellule.

Chapitre II : Matériels et Méthodes

Matériels

Culture cellulaire :

HEK293T (BCM3)	(Département de Biochimie)
DMEM	(Wisent Inc.)
Solution EDTA/trypsine	(Wisent Inc.)
Sérum fœtal de bœuf	(Wisent Inc.)
Antibiotique mixte 10X pénicilline (1000 unité/mL) et streptomycine (1 mg/mL)	(Wisent Inc.)
Glutamine	(Wisent Inc.)
Plaque 6 puits de culture cellulaire	(Falcon)
Pétri 150 X 25 mm	
Pétri 100 mm	
PBS	(Sigma)
BSA	(Sigma)
EDTA	(Sigma)

Transfection :

Lipofectamine2000	(Invitrogen)
Polyéthylènimine (PEI)	(PolyScience)
NaCl	(Sigma)
HEPES	(Sigma)
CaCl ₂	(Sigma)
Na ₂ HPO ₄	(Sigma)

BRET et FRET :

Plaque 96 puits à fond blanc	(Optiplate, PerkinElmer)
Plaque 96 puits à fond transparent	(Costar)
Coelenterazine H	(Molecular Probes)
DeepBlueC	(PerkinElmer)
GABA	(CalBiochem)
AVP	(Sigma)

ELISA :

Anticorps anti-myc 9E10	(Installation du Département de Biochimie)
Plaque 12 puits de culture cellulaire	(Falcon)
Anticorps anti-souris de Chèvre conjugué Horseradish Peroxydase HRP	(Amersham)
SuperSignal ELISA Femto	(Pierce)

Appareil de mesure :

Fusion- α	(PerkinElmer)
Topcount NXT (BRETCount)	(PerkinElmer)
FluoroCount	(PerkinElmer)
LumiCount	(PerkinElmer)
FlexStation	(Molecular Devices)
Spectrophotomètre	(Eppendorf)

Constructions

Tous les plasmides utilisés dans ce mémoire ont été clonés dans pcDNA3.1 et proviennent de différentes sources. Les plasmides du récepteur du GABA sont originaire de chez GlaxoSmithKline soit :

myc-GABA_BR1b
myc-GABA_BR1b-EYFP
myc-GABA_BR1b-GFP²
myc-GABA_BR1b-hRluc
HA- GABA_BR2
HA-GABA_BR2-EYFP
HA-GABA_BR2- GFP²
HA-GABA_BR2-hRluc

Certains plasmides ont été obtenus de chez BioSignal PerkinElmer

Gβ₁ natif
Gβ₁-hRluc
Gβ₁-GFP²
Gγ₂ natif
Gγ₂-hRluc
Gγ₂-GFP²

Finalement certaines constructions ont été fournies par différents membres du laboratoire du Dr Michel Bouvier :

V2R-EYFP
δ-opioïde
CCKb
β-arrestine-hRluc
Gα_{i1}-hRluc
β₂AR-hRLuc
CRLR natif
CRLR-EYFP
RAMPnatif

Méthodes

Culture cellulaire

Les cellules HEK293T sont cultivées en monocouche dans du milieu DMEM (Dulbecco modified eagle medium) auquel est ajouté 10% de sérum fœtal bovin, 100 unités/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine et 1mM glutamine. Selon les besoins, des pétris de 150 mm, des de 100 mm, des plaques de 6 puits ou des plaque de 12 puits ont été utilisées. Les cellules sont placées dans un incubateur à 37°C avec un mélange 95% air et 5% CO₂.

La journée de la transfection, les cellules ont été décollées à l'aide d'une solution trypsine/EDTA, puis reprises dans un volume de DMEM. Par la suite, la densité optique (DO_{600nm}) a été prise sur un spectrophotomètre à 600 nm afin de quantifier le nombre de cellules. Pour ce faire, la DO_{600nm} a été multipliée par 1 673 000, cette valeur ayant été déterminée à l'aide d'une courbe standard utilisant une gamme de concentration de cellules HEK293T comptées à l'hémacytomètre et reportée en fonction de la DO_{600nm} obtenue. Pour une transfection dans une plaque de 6 puits, 400 000 cellules ont été distribuées par puits alors que 3 000 000 cellules ont été plutôt introduites dans un pétri de 100 mm. Les cellules ont été replacées dans l'incubateur de quatre à six heures afin de leur permettre d'adhérer à la surface de la plaque, puis elles ont été transfectées.

Transfection

Les cellules HEK293t ont été transfectées selon trois protocoles différents. Le premier fait intervenir une précipitation de l'ADN avec du Ca²⁺ en présence d'un tampon phosphate. Ce protocole est une modification de celui décrit par Mellon (Mellon *et al*, 1981). Pour une plaque de 100 mm, 20 µg d'ADN total ont été dissous dans 500 µL de CaCl₂ 2.5 mM. Puis 500 µL d'une solution 0.05M HEPES, 0.28M NaCl et 1.5mM Na₂HPO₄ a été ajoutée goûte à goûte à la solution d'ADN. Le mélange a été bien agité

puis incubé deux minutes à température ambiante. Le précipité ainsi formé a été déposé sur les cellules et le tout a été incubé 24 heures à 37°C. Le milieu de culture a été remplacé par du milieu frais et les cellules ont été incubées 24 heures additionnel avant d'être décollées dans du PBS/ 1mM EDTA, puis diluées à 1000 cellules/ μ L.

La seconde méthode fait intervenir la fixation de l'ADN sur du polyéthylèneimine (PEI). Le complexe ADN/PEI passe la membrane plasmique, ce qui transporte l'ADN à l'intérieur des cellules. Le ratio optimal PEI/ADN, en μ g pour chacun des composés, est de 3 pour 1. Par conséquent pour une plaques 6 puits, 12 μ g de PEI ont été mélangés à 4 μ g d'ADN total dans un volume final de 200 μ L, puis incubés 15 minutes à température ambiante. Le complexe ADN/PEI a été déposé sur les cellules et le tout a été incubé 24 heures à 37°C. Le milieu a été changé et les cellules décollées de la même façon que pour le protocole de phosphate de calcium.

Finalement, la troisième méthode fait intervenir la complexion de l'ADN avec un lipofectant commercial (Lipofectamine2000). Le protocole utilisé est celui décrit dans le manuel d'instruction du produit où l'on conseille d'utiliser un ratio de 3 μ L de Lipofectamine2000 par μ g d'ADN. Par conséquent, pour une plaque 6 puits, 6 μ L de Lipofectamine2000 ont été mélangés à 2 μ g d'ADN total dans un volume final de 200 μ L, puis incubés 15 minutes à température ambiante. Le complexe ADN/Lipofectamine2000 a été déposé sur les cellules et le tout incubé 48 heures à 37°C avant l'analyse. Les cellules ont ensuite été préparées comme pour les autres protocoles.

Spectre de fluorescence et luminescence des coelenterazines

Pour réaliser les spectres d'excitation et d'émission des différents substrats de coelenterazine (coelenterazine H et DeepBlueC), 5 μ M de substrat plus 100 000 cellules HEK293t ont été placées dans un puit d'une plaque 96 puits à fond transparent (Costar). Pour mesurer le spectre d'excitation, le spectrofluorimètre de type FlexStation (Molecular Devices) a été programmé pour prendre des mesures de fluorescence toutes les cinq nanomètres entre 380 nm et 500 nm en maintenant la longueur d'onde

d'émission fixe à 508 nm. Pour le spectre d'émission, la fixation de la longueur d'onde d'excitation a été déduite des résultats du spectre d'excitation fait préalablement. Un balayage des longueurs d'onde comprises entre 480 nm et 620 nm a été effectué pour une excitation fixe à 430 nm. Pour effectuer les spectres de luminescence de la coelenterazine H et de la DeepBlueC, 5 μ M des différents substrats et 100 000 ou 1 000 000 cellules par puits ont été utilisés. Le FlexStation a été programmé à prendre des mesures de luminescence tous les cinq nanomètres entre 380 nm et 600 nm. Les différents spectres ont été corrigés en pourcentage de la longueur d'onde ayant une intensité maximale et compilés sur un seul graphique pour chacun des substrats.

Essai de transfert d'énergie de bioluminescence (BRET)

Afin de mesurer le niveau de transfection des cellules, la fluorescence et la luminescence ont été effectuées. Pour la fluorescence, 100 000 cellules ont été mises dans une plaque 96 puits à fond transparent (Costar). Les mesures ont été prises dans un fluorimètre de type FluoroCount (PerkinElmer), avec des filtres d'excitation/Émission de 400nm/510nm pour la GFP² et 480nm/530nm pour la EYFP. Pour la luminescence, 100 000 cellules ont été additionnées à 5 μ M de coelenterazine H dans une plaque 96 puits à fond transparent (Costar), incubées 10 minutes puis mesurées dans un luminomètre de type LumiCount (PerkinElmer). Les valeurs obtenues pour la fluorescence et la luminescence de chacun des échantillons ont été utilisées pour calculer le ratio GFP/Luc. Ce ratio a été utilisé pour l'axe des x dans les graphiques de titration.

Pour la mesure du BRET, 100 000 cellules ont été ajoutés par puits dans un volume finale de 90 μ L dans une plaque blanche 96 puits à font opaque (Optiplate de PerkinElmer). 10 μ L de substrats coelenterazine H (Molecular Probe) ou DeepBlueC (BioSignal PerkinElmer) utilisé pour les BRET de génération 1 et de génération 2 respectivement ont été ajoutés pour atteindre une concentration final de substrat de 5 μ M. Le mélange cellules/coelenterazine a été incubé une minute avant d'être mesuré. Pour le BRET de la

génération 1, la mesure des échantillons a été effectuée avec un lecteur de microplaques de type Fusion- α (PerkinElmer) en mode luminescence. Cette acquisition de luminescence s'opère en deux temps. Premièrement, la lumière produite par la luciférase (donneur d'énergie) a été captée avec un filtre à 470 nm avec une bande passante de 60 nm, tandis que la mesure de la lumière résultant du transfert d'énergie à la GFP (accepteur d'énergie) a été mesurée avec un filtre à 530 nm avec une bande passante de 40 nm. Pour ce qui est du BRET de la génération 2, l'appareil de mesure utilisé a été un TopCount modifié pour le BRET². Le filtre utilisé pour la mesure de la luciférase a été de 410 nm avec une bande passante de 80 nm et pour la mesure de la GFP², un filtre de 515 nm avec une bande passante de 30 nm a été utilisé. Le signal BRET a été obtenu en divisant la mesure du filtre de l'accepteur par celle du filtre du donneur d'énergie. Cette valeur est la somme de deux phénomènes, la contamination de la lumière émise par la luciférase dans le filtre de l'accepteur (signal de base obtenu lorsque les constructions luciférase sont exprimées seule) et le transfert d'énergie du donneur vers l'accepteur. Afin d'avoir uniquement le transfert d'énergie, il est possible de corriger le signal BRET en soustrayant la contribution de la contamination par la luciférase seule. Pour ce faire, nous soustrayons la valeur de BRET obtenue d'un échantillon où les cellules expriment uniquement de la luciférase à toutes les autres valeurs de la courbe pour obtenir uniquement le transfert d'énergie. C'est cette valeur de BRET corrigée qui est utilisée pour tous les graphiques de la partie résultat sauf un où nous avons appliqué une deuxième correction. Pour la comparaison des trois techniques de transfert d'énergie (BRET¹, BRET² et FRET), nous avons dû corriger les deux axes du graphique afin de pouvoir réaliser cette comparaison, car ces trois techniques n'ont pas exactement les mêmes unités. Pour la figure 12, nous avons corrigé les résultats en considérant que le point maximum de chacune des trois techniques de transfert d'énergie était le 100% et ainsi mettre les autres points en pourcentage de ce point maximum.

Afin de déterminer le maximum de signal BRET entre deux partenaires, une courbe de titration de la protéine fusionnée à l'accepteur a été effectuée. L'établissement de cette titration nécessite la transfection de quantités croissantes de plasmide de l'accepteur avec une quantité constante du donneur. Pour ce qui est des essais de modulations par l'agoniste, les cellules ont été mises deux minutes en présence de différentes

concentrations d'AVP pour le récepteur V2R et de 10mM de GABA pour le récepteur du GABA, puis le substrat coelenterazine a été ajouté une minutes avant la lecture de l'échantillon.

Essai de transfert d'énergie de fluorescence (FRET)

Afin de mesurer le niveau de transfection des cellules, la fluorescence des deux fluorophores a été effectuée. 100 000 cellules ont été mises dans une plaque 96 puits à fond transparent (Costar). Les mesures ont été prises dans un fluorimètre de type FluoroCount (PerkinElmer), avec des filtres d'excitation/Émission de 400nm/510nm pour la GFP² et 480nm/530nm pour la EYFP. Pour la mesure du FRET, 100 000 cellules par puits ont été ajoutées par puit dans un volume finale de 100 µL dans une plaque fond transparent (Costar). Dans un premier temps des cellules qui expriment uniquement la construction EYFP est mesurée dans les trois conditions suivante : 1- mesurée à l'excitation de la EYFP avec l'émission de la EYFP (signal EYFP). 2- mesurée à l'excitation de la GFP² avec l'émission de la GFP² (signal GFP²). 3- finalement mesurée à l'excitation de la GFP² avec l'émission de la EYFP (signal FRET). Cette étape définit l'apport de l'accepteur dans le signal total du FRET. Pour calculer la valeur de correction, le signal FRET est divisé par le signal EYFP. Cette valeur de correction sera appelée (a) dans la formule subséquente. Habituellement, cette contribution est d'environ 20 à 30% du signal, car la EYFP peut être excitée par les longueurs d'onde de la GFP².

Dans un deuxième temps, des cellules qui expriment uniquement, cette fois, la construction GFP² est mesurée dans les mêmes trois conditions que pour le EYFP seule. Cette étape détermine la contribution du donneur dans la signal FRET total. De façon similaire à la EYFP, la valeur de correction pour la GFP² est calculée par le ratio entre le signal FRET et cette fois le signal GFP². Cette valeur de correction sera appelée (b) dans la formule subséquente. Cet apport est estimé à près de 50 à 70% du signal total mesuré.

Finalement, les échantillons où les deux constructions sont mesurés également dans les trois mêmes conditions que précédemment. Les résultats de chacun des conditions sont incorporés dans la formule suivante :

$$\text{FRET net} = \text{signal FRET} - (a * \text{signal EYFP}) - (b * \text{signal GFP}^2)$$

Suite à l'application de cette formule, le résultat du calcul représente le transfert d'énergie réel entre les partenaires. À remarquer, qu'il est important d'avoir le même temps d'exposition pour les trois conditions de lecture. Il est également important d'avoir des cellules qui expriment les constructions dans des niveaux relativement comparables. Finalement, de meilleurs résultats sont obtenus si le signal de EYFP est égal ou supérieur au signal GFP².

Mesure de surface des récepteurs GABA_BR1b par ELISA

La journée suivant leur transfection, les cellules ont été décollées dans du PBS/1 mM EDTA, comptées, puis remises dans une plaque de 96 puits à raison de 40 000 cellules par puit. Par la suite, elles ont été incubées de nouveau 24h à 37°C. Les cellules ont ensuite été lavées au PBS trois fois, puis fixées dans la plaque en utilisant du PFA 3% durant 15 minutes. Elles ont été lavées et incubées 30 minutes avec du PBS/BSA 0.2% afin de masquer les sites non spécifiques d'interaction. Les cellules ont été incubées 30 minutes avec le premier anticorps spécifique anti-myc 9E10 de souris (Installation départementale). Elles ont été de nouveau lavées au PBS/BSA 0.2%, puis incubées 30 minutes avec un anticorps anti-souris conjugué à la peroxydase HRP (Amersham). Un dernier lavage a été effectué avec du PBS et la solution de révélation luminescent du kit SuperSignal ELISA Femto (Pierce) a été ajouté selon les recommandations du fabricant. Après une minutes le mesure de luminescence à et prise sur un Fusion-α (PerkinElmer) en mode luminescence.

Chapitre III : Résultats

Comparaison entre le BRET¹ et le BRET²

Depuis sa première utilisation pour mesurer des interactions protéine-protéine, la technique de transfert d'énergie de résonance de bioluminescence (BRET) a évolué pour donner naissance à deux générations. Toutes deux sont basées sur le transfert d'énergie d'un donneur (la luciférase) vers un accepteur (la GFP) lorsqu'à proximité l'un de l'autre. La première génération, le BRET¹, est caractérisée par l'utilisation de la variante jaune de la GFP (EYFP) comme accepteur d'énergie, tandis que pour la deuxième génération, le BRET², la GFP² est utilisée. De son côté, la luciférase utilisée (donneur d'énergie possédant une activité enzymatique) est la même pour les deux générations. Seul le substrat produisant de la luminescence lorsque oxydé varie; pour le BRET¹ c'est la coelenterazine h (maximum d'émission près de 472 nm) alors que la DeepBlueC (maximum d'émission près de 420 nm) sert de substrat pour le BRET². Puisque ces deux générations utilisent le même donneur d'énergie, il est possible d'imaginer leurs utilisations simultanées afin de suivre la formation d'une interaction à plusieurs partenaires au sein de la même population cellulaire. Comme leur utilisation concomitante n'a jamais été rapportée, nous avons d'abord voulu vérifier que les deux générations de BRET sont aptes à suivre la formation d'un même type d'interaction protéique dans des conditions séparément. Pour ce faire, nous avons mesuré la formation de l'interaction entre les récepteurs GABA_BR1 et GABA_BR2, un hétérodimère décrit comme obligatoire pour l'activation d'une signalisation cellulaire via le GABA sur ce récepteur métabotropique. Pour ces expériences, la luciférase est fusionnée à GABA_BR1b (GBR1b-hRLuc) et les accepteurs d'énergies, EYFP ou GFP² sont fusionnées à GABA_BR2 (GBR2-EYFP et GBR2-GFP²). De plus, lorsque nous observons les spectres d'excitation/émission des deux GFP utilisées dans les deux générations de BRET, il est intéressant de remarquer un chevauchement des spectres entre les deux accepteurs d'énergie. Ceci représente une des caractéristiques requises pour avoir transfert d'énergie en FRET (voir figure 11). Dans ce FRET, la GFP² serait le donneur d'énergie avec ses maximums d'excitation/émission à 420 nm/510 nm et la EYFP serait plutôt un accepteur d'énergie avec ses maximums d'excitation/émission à 515 nm/530 nm. Afin de vérifier si le FRET entre la GFP² et la EYFP est possible, nous avons également mesuré l'interaction entre les récepteurs GABA_BR1 et GABA_BR2, mais cette fois GABA_BR1 est

fusionnée à la GFP² (GBR1b-GFP²) et GBR2-EYFP est utilisé comme accepteur d'énergie.

Pour cette étude de comparaison entre le BRET¹, le BRET² et le FRET, nous avons réalisé des courbes de titration de l'interaction entre GBR1b et GBR2. Dans ces courbes de titration, la protéine de fusion contenant le donneur d'énergie est maintenue constante et co-exprimé avec une quantité croissante de protéine fusionnée à l'accepteur d'énergie. Ce type de courbe permet de suivre l'évolution du signal de transfert d'énergie en fonction de l'augmentation de l'interaction entre les deux protéines d'intérêt. Lorsque le signal de transfert d'énergie atteint un plateau, ceci signifie que toutes les protéine-donneurs sont en interaction avec des protéine-accepteurs. Dans le cas présent, GBR1b-hRLuc (pour le BRET) et GBR1b-GFP² (pour le FRET) sont maintenues constant alors que GBR2-GFP² ou GBR2-EYFP sont co-exprimées à des quantités croissantes. Les résultats de la figure 12 montrent bien que l'accroissement de la quantité d'accepteur produit une augmente du transfert d'énergie qui, à une certaine quantité de GBR2-accepteur, atteint un plateau, et ce pour les trois techniques. De plus, les trois courbes sont superposables, résultat attendu uniquement si les trois techniques de transfert d'énergie sont en mesure de suivre l'interaction entre deux protéines de façon comparable. Le principe de transfert d'énergie entre un donneur et un accepteur d'énergie se base principalement sur le chevauchement du spectre d'émission du donneur avec le spectre d'excitation de l'accepteur, mais également sur la distance et l'orientation entre ces derniers. Dans l'expérience précédente, seule les types de donneurs et d'accepteurs sont modifiés dans les trois techniques de mesure de transfert d'énergie. La proximité entre l'accepteur et le donneur devrait être similaire, car dans les trois cas, la même interaction entre GBR1 et GBR2 est utilisé pour rapprocher les partenaires de transfert d'énergie. Par conséquent, si le chevauchement des spectres est permissif, le transfert d'énergie devrait être le même d'une technique à l'autre.

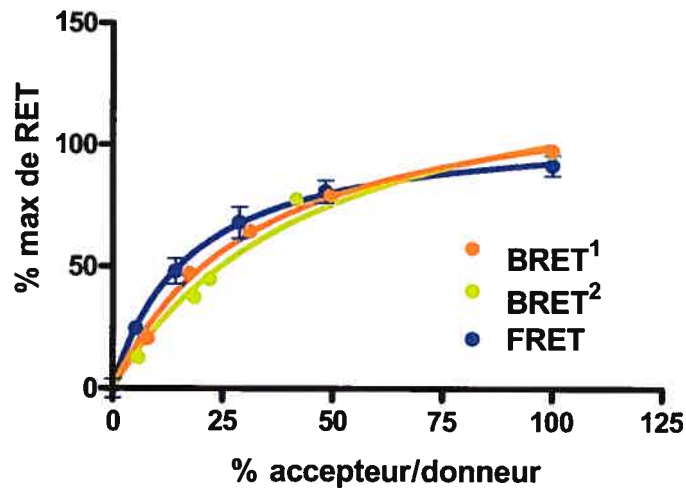


Figure 12: comparaison des trois techniques de transfert d'énergie pour une même interaction GABA_BR1/GABA_BR2

Des cellules HEK293t ont été transfectées, selon le protocole utilisant la Lipofectamine2000, avec différent ratio de protéines de fusion donneur et accepteur d'énergie. La courbe en rouge représente la titration de l'interaction entre GABA_BR1b-hRLuc et GABA_BR2-EYFP mesuré dans le Fusion-α (PerkinElmer). La courbe en vert représente la titration de l'interaction entre GABA_BR1b-hRLuc et GABA_BR2-GFP² mesuré dans le TopCount modifié pour le BRET de la génération 2 (Packard). Finalement, la courbe en bleu représente la titration de l'interaction entre GABA_BR1b- GFP² et GABA_BR2-EYFP mesuré dans le FlexStation (Molecular Devices). Les trois courbes représentent la cumulation deux expériences réalisées en triplicata (± SEM).

En plus de pouvoir mesurer le même type d'interaction protéique avec les deux générations de BRET, il est possible d'utiliser les accepteurs d'énergie de chacune pour suivre la formation d'interaction en FRET. Ceci en fait un avantage, car lors de l'utilisation des deux techniques de BRET dans le même essai, il sera possible de suivre l'évolution de l'interaction des différentes protéines de fusion l'une avec l'autre en même temps, comme schématisé plus bas.

Effet des substrats coelenterazine sur les deux générations de BRET

Les deux générations de BRET possèdent des caractéristiques spectrales différentes et ceci dépend largement du substrat utilisé pour produire la bioluminescence. Dans le cas de la coelenterazine h le maximum d'émission d'énergie se situe près de 472 nm et pour la DeepBlueC ce maximum est plutôt de 420 nm. Toujours dans l'optique d'utiliser les deux générations de BRET dans un seul essai, il est important de mesurer l'impact du substrat d'une génération de BRET sur l'autre génération et vice-versa. Afin de mesurer l'influence des substrats sur le signal BRET mesurer pour chacune des générations, nous avons réalisé des courbes de titration entre le récepteur GBR1-hRluc et GBR2-GFP² pour le BRET² ou GBR2-EYFP pour le BRET¹ séparément tel que d'écrit précédemment et nous avons mesuré le transfert d'énergie en utilisant les deux substrats.

Dans le cas de l'interaction entre GBR1-hRluc et GBR2-GFP², les résultats de la figure 13A montrent une augmentation de signal BRET suivie de l'apparition d'un plateau uniquement avec la DeepBlueC. La coelenterazine h ne semble pas être en mesure de transférer son énergie à la GFP² pour produire un BRET. Pour ce qui est de l'interaction entre GBR1-hRluc et GBR2-EYFP (BRET¹), une courbe de saturation est observée lors de l'utilisation de la coelenterazine h, mais il est également possible d'observer une courbe de saturation avec le substrat de l'autre génération (la DeepBlueC) (figure 13B). L'amplitude de cette courbe avec la DeepBlueC représente 30% du signal obtenu avec la coelenterazine h. Ces résultats signifient que l'oxydation de la DeepBlueC par la luciférase permet non seulement un transfert d'énergie vers la GFP², mais également vers la EYFP lorsque ces deux protéines fluorescentes sont à proximité. La EYFP peut être excitée par la DeepBlueC, car il existe une petite région où le spectre d'émission de la DeepBlueC chevauche le spectre d'excitation de la EYFP. Inversement, la coelenterazine h peut uniquement activée la EYFP, car son spectre chevauche uniquement celui de la EYFP, ce qui permet un transfert d'énergie exclusif.

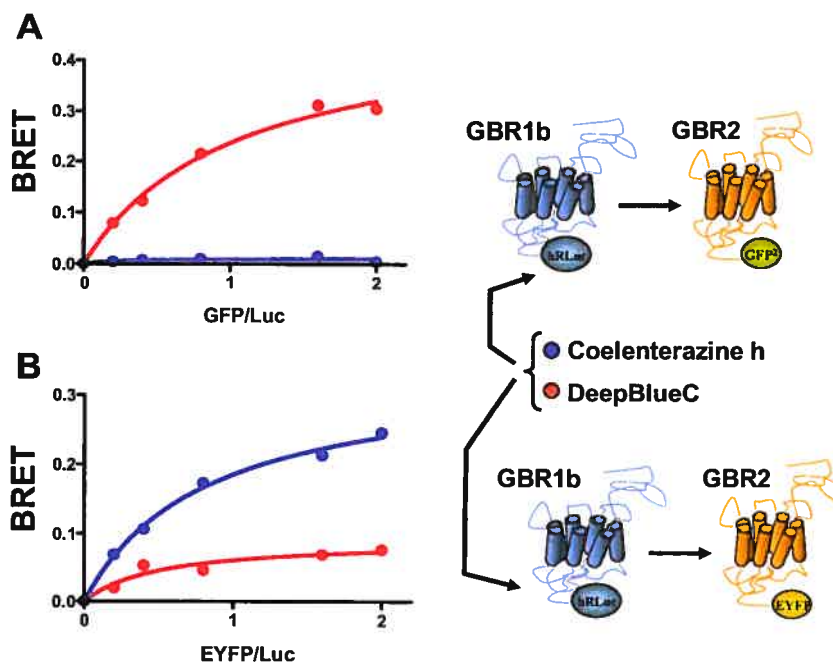


Figure 13: Effet de la coelenterazine h et de la DeepBlueC sur le transfert d'énergie des deux générations de BRET.

Des cellules HEK293t ont été transfectées avec 2 μg de $\text{GABA}_B\text{R1b-hRLuc}$ et une quantité croissante de $\text{GABA}_B\text{R2-EYFP}$ en A ou une quantité croissante de $\text{GABA}_B\text{R2-GFP}^2$ en B. Chacune des courbes de titration a été mesurée en présence de 5 μM de Coelenterazine H (dans le Fusion- α de PerkinElmer) et de 5 μM de DeepBlueC (dans le TopCount modifié pour le BRET de la génération 2 de Packard). Courbe de titration représentative de trois expériences différentes.

Le fait que la EYFP soit excitée à la fois par le coelenterazine h et la DeepBlueC rend l'utilisation des deux générations dans le même essai plus complexe, mais pas impossible. Lors de la mesure du signal BRET² (par l'utilisation de la DeepBlueC), dans des conditions où la GFP² et la EYFP sont à proximité de la luciférase, la mesure effectuée avec le DeepBlueC sera la résultante du transfert d'énergie vers le GFP² ainsi que vers la EYFP. Afin d'avoir uniquement le transfert d'énergie de la luciférase vers la GFP², il est possible de soustraire l'influence de la EYFP dans ce signal. Comme le transfert d'énergie entre la luciférase et la EYFP en présence de DeepBlueC représente 30% de celui obtenu avec le coelenterazine h, il est possible de calculer cette valeur en effectuant une mesure de signal BRET¹ (par l'utilisation de la coelenterazine h). Par

conséquent, la soustraction de la valeur calculée (30% du signal de BRET¹) à la valeur mesurée de BRET² donnera le transfert d'énergie réel entre la luciférase et la GFP². Cette simple opération mathématique permet l'utilisation des deux générations de BRET sur la même population cellulaire. Ceci nous permettra de suivre l'évolution de diverses interactions sur une même population cellulaire, ce qui représente un avantage considérable.

Dimérisation des RCPG et interaction avec la protéine G hétérotrimérique

Une des caractéristiques des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) est la capacité d'induire une signalisation cellulaire par l'activation de protéines G hétérotrimériques. Cette activation dépend de l'échange d'une molécule de GDP au sein de la sous unité $G\alpha$ par une molécule de GTP. Les RCPG, une fois stimulés par leurs agonistes spécifiques, vont accélérer cet échange de GDP/GTP. Selon le model actuel, une activation d'un récepteur entraîne un recrutement de la protéine G hétérotrimérique au récepteur ce qui stimule l'échange du nucléotide. Cependant, certains résultats laissent plutôt croire que l'interaction de la protéine G avec le récepteur serait constitutive et qu'un changement de conformation du RCPG entraînerait l'échange GDP/GTP. Parallèlement, il a été démontré que les RCPG existent sous la forme de dimère. Un des exemples classiques est le récepteur du GABA de type B ($GABA_B$ R ou GBR), qui pour être fonctionnel, doit être composé de deux sous unités distinctes : soit $GABA_B$ R1 (GBR1) et $GABA_B$ R2 (GBR2). Sans la formation de cet hétérodimère, le récepteur ne peut activer la protéine G. Ces différentes observations permettent de soulever la question de stœchiométrie d'interaction récepteur/protéine G; il est possible d'imaginer que la sous unité $G\alpha$ interagisse avec un protomère du dimère de récepteur et que $G\beta\gamma$ interagisse avec l'autre protomère et ainsi former un complexe à cinq protéines distinctes. Un des objectifs de ce présent mémoire est de mesurer l'interaction de chacun des protomères du récepteur GBR1/GBR2, modèle de dimérisation, avec les différentes sous unités de la protéine G en utilisant la technique de BRET, afin de déterminer la stœchiométrie d'interaction. Pour rendre le système plus simple nous avons utilisé seulement le récepteur GBR1b et pas GBR1a ou GBR1c pour cette étude d'interaction récepteur et protéine G.

Pour évaluer l'importance de l'hétérodimérisation du récepteur du GABA dans l'interaction avec les différentes sous unités de la protéine G, nous avons mesuré l'interaction des différentes sous unités de la protéine G avec chacun des deux protomères lorsque exprimé indépendamment. Également, nous avons mesuré l'influence de la présence des deux protomères sur l'interaction du récepteur avec la protéine G. Le protomère GBR1b a été le premier à être analysé par des courbes de titration. Dans cette expérience, trois courbes de titration sont produites avec des donneurs d'énergie différents. Nous avons co-exprimé à des quantités constantes les trois sous unités de la protéine G ($G\alpha_{i1}$, $G\beta_1$ et $G\gamma_2$) ou une seule sous unité est fusionnée à la luciférase avec une quantité croissante de GBR1b-EYFP en présence ou non de GBR2 natif. Pour les trois sous unités de la protéine G, il n'est pas possible de mesurer un signal BRET suite à l'augmentation de GBR1b-EYFP seule (voir figure 14), tel qu'attendu par ce type d'expérience, puisque le protomère GBR1b est retenu dans le RE lorsque exprimé seul. Ces résultats nous indiquent que les GBR1b et la protéine G hétérotrimérique ne semblent pas former d'interactions constitutives mesurables. Au contraire, lorsque GBR2 est ajouté dans ces cellules une élévation du signal BRET proportionnel à l'augmentation de GBR1b-EYFP est mesurée et ce pour les trois sous unités de la protéine G. De plus, cette augmentation de signal BRET atteint un plateau dans les trois cas. Cette hausse de signal BRET semble indiquer que la présence de GBR2 est essentielle au rapprochement de la protéine G et du protomère GBR1b. Ce rapprochement semble également spécifique dû à l'apparition d'une saturation du signal BRET. Il est à noter que le ratio BRET est faible. Comme le C-terminal du récepteur GBR1b est très long, la distance entre la EYFP du récepteur et la luciférase des protéines G n'est pas permissive pour un transfert d'énergie fort. L'efficacité de transfert d'énergie est proportionnelle à l'inverse de la sixième puissance de la distance entre le donneur et l'accepteur (Angers *et al*, 2000).

Parallèlement, nous avons mesuré l'interaction entre les différentes sous unités de la protéine G fusionnées à la luciférase avec une quantité croissante de GBR2-EYFP en présence ou non de GBR1b natif. Les résultats obtenus nous révèlent que l'augmentation de GBR2-EYFP, en l'absence de GBR1b, permet une élévation linéaire du signal BRET sans atteindre de plateau et ce pour les trois sous unités de la protéine G (voir figure 15A). La co-expression de GBR1b change cette augmentation linéaire en une courbe

possédant un plateau (voir figure 15B). Dans les deux cas, en présence ou en absence de GBR1b, les courbes sont similaires pour les trois sous unités de la protéine G. Lors de l'établissement d'une courbe de titration en BRET, si une interaction entre deux protéines est spécifique, une saturation du signal sera mesurée. Par contre, si aucune saturation n'est mesurée, le signal obtenu peut être attribué à des rapprochements dû au hasard, donc non spécifique, comme ce qui semble être le cas de l'interaction entre GBR2 et les différentes sous unités de la protéine G. De plus

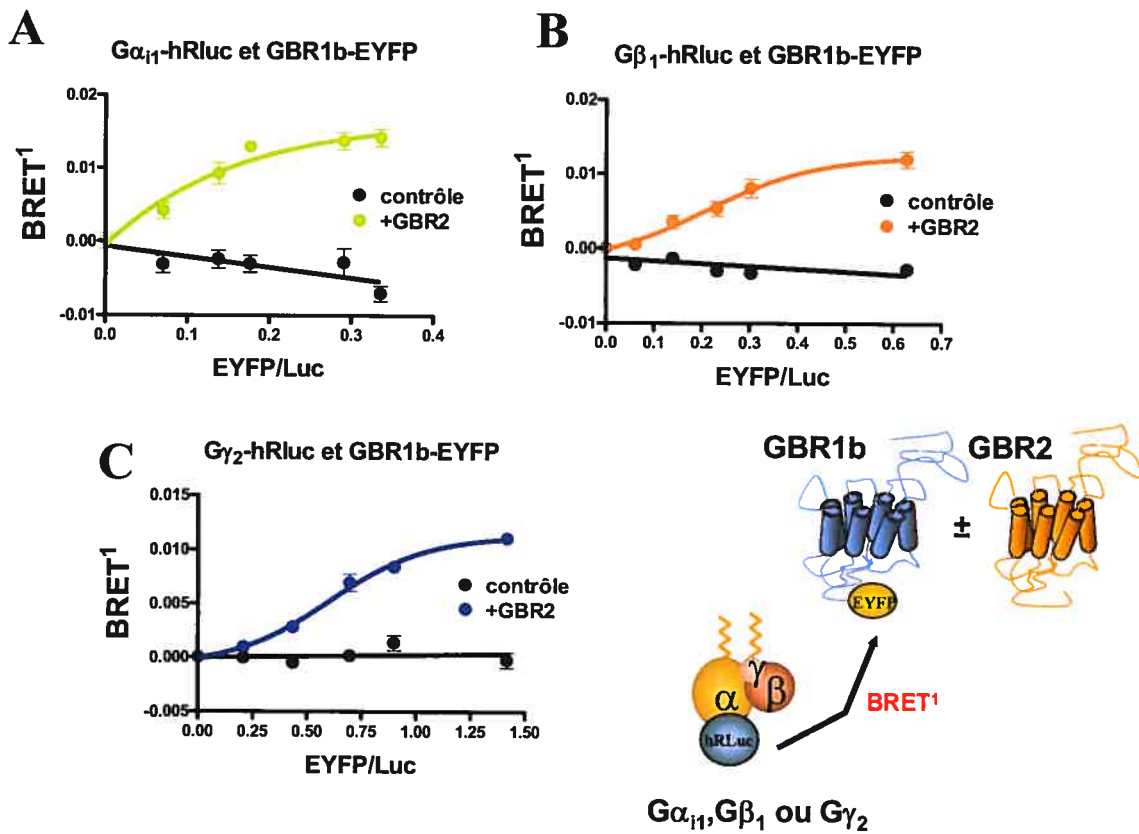


Figure 14: Interaction entre les différentes sous unités de la protéine G avec le récepteur GABA_BR1b

Des cellules HEK293t sont transfectées par la méthode Lipofectamine2000 dans des plaques 6 puits. En A), les résultats proviennent d'une co-transfection de 0.2 μ g $G\alpha_{i1}$ -hRLuc, 0.8 μ g de $G\beta_1$ natif, 0.8 μ g de $G\gamma_2$ natif et une quantité croissante de GABA_BR1b-EYFP ou d'un mélange 1 :1 de GABA_BR1b-EYFP : GABA_BR2. En B) les résultats proviennent d'une co-transfection de 0.2 μ g $G\beta_1$ -hRLuc, 0.8 μ g de $G\alpha_{i1}$ natif, 0.8 μ g de $G\gamma_2$ natif et une quantité croissante de GABA_BR1b-EYFP ou d'un mélange 1 :1 GABA_BR1b-EYFP : GABA_BR2. Finalement en C) les résultats représentent un co-transfection de 0.2 μ g $G\gamma_2$ -hRLuc, 0.8 μ g de $G\alpha_{i1}$ natif, 0.8 μ g de $G\beta_1$ natif et une quantité croissante de GABA_BR1b-EYFP ou un mélange 1 :1 GABA_BR1b-EYFP : GABA_BR2. Le BRET a été mesuré dans le Fusion- α de PerkinElmer. Les courbes représentent la cumulation trois expériences réalisées en triplicata (\pm SEM).

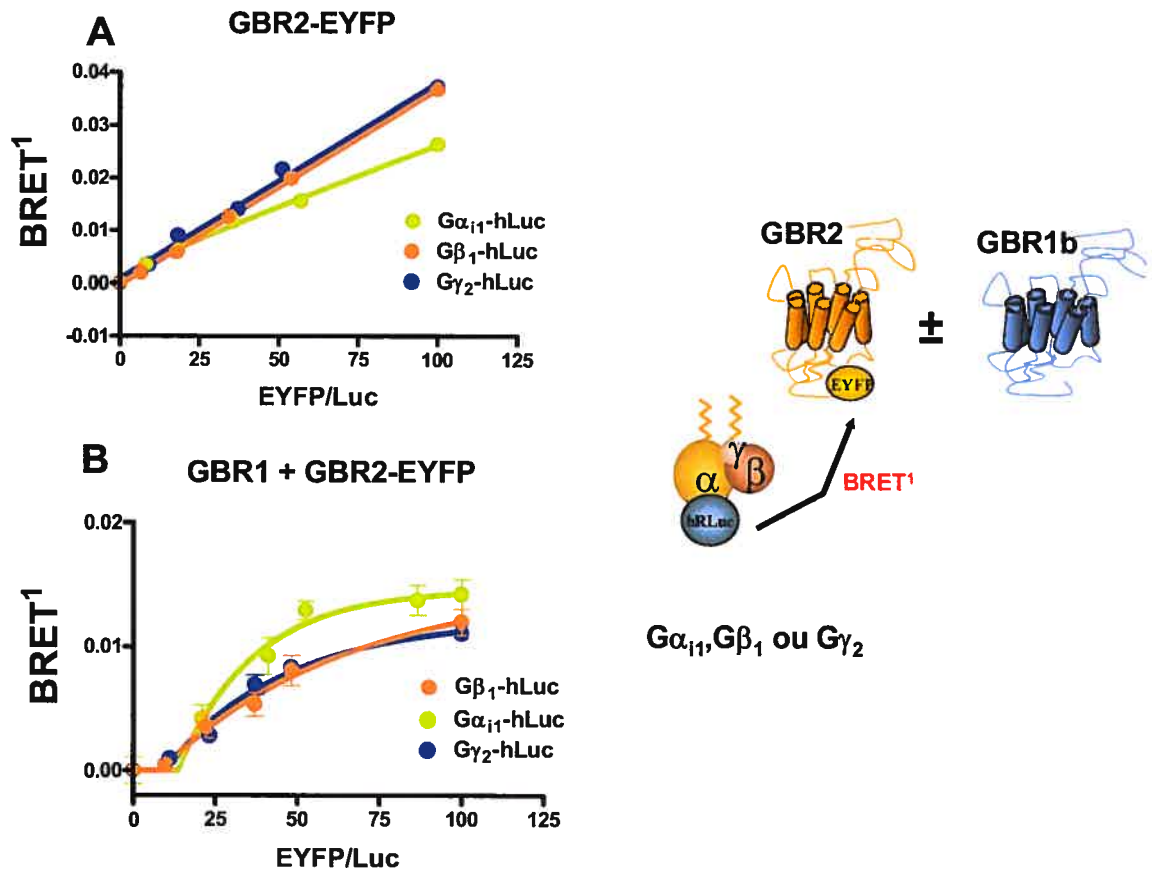


Figure 15: Interaction entre les différentes sous unités de la protéine G avec le récepteur GABA_BR2

Des cellules HEK293T ont été transfectées par la méthode Lipofectamine2000 en plaque 6 puits. En A) la courbe en vert représente les résultats de la co-transfection de 0.2 µg Gα_{i1}-hRLuc, 0.8 µg de Gβ₁ natif, 0.8 µg de Gγ₂ natif et une quantité croissante de GABA_BR2-EYFP. La courbe orange représente les résultats de la co-transfection de 0.2 µg Gβ₁-hRLuc, 0.8 µg de Gα_{i1} natif, 0.8 µg de Gγ₂ natif et une quantité croissante de GABA_BR2-EYFP. Finalement, la courbe bleu représente les résultats de la co-transfection de 0.2 µg Gγ₂-hRLuc, 0.8 µg de Gα_{i1} natif, 0.8 µg de Gβ₁ natif et une quantité croissante de GABA_BR2. En B) les courbes sont produites par 0.2 µg Gα_{i1}-hRLuc, 0.8 µg de Gβ₁ natif, 0.8 µg de Gγ₂ natif et une quantité croissante de GABA_BR2-EYFP ou un mélange 1 : 1 GABA_BR2-EYFP : GABA_BR1b. Le BRET a été mesuré dans le Fusion-α de PerkinElmer. Les courbes représentent la cumulation trois expériences réalisées en triplicata (± SEM).

En comparant les résultats des deux protomères du récepteur du GABA, il est possible de déduire que la présence des deux co-récepteurs modifie l'interaction de l'hétérodimère avec la protéine G comparativement aux conditions où les récepteurs sont exprimés individuellement. Dans le cas du protomère GBR1b, la présence de GBR2 permet une interaction avec la protéine G qui n'était pas mesurée en l'absence de ce dernier. En contrepartie, la présence de GBR1 rend spécifique l'interaction entre GBR2 et la protéine G. Les expériences réalisées avec les deux protomères se servent de contrôle mutuel. De ne pas avoir d'interaction entre GBR1b et les différentes sous unités de la protéine G indique que la localisation des protéines dans un même compartiment est important pour leur interaction. De plus, leur localisation dans les mêmes compartiments n'est pas le gage d'une interaction spécifique, car GBR2 seul ne permet pas d'obtenir une saturation pour l'interaction avec les sous unités de la protéine G. En plus d'une localisation similaire, deux protéines doivent être en interaction directe pour nous donner des courbes de titration classique en BRET. Ces résultats ont mis en évidence l'importance de la formation d'un hétérodimère GBR1/GBR2 pour l'interaction avec la protéine G hétérotrimérique.

Afin de suivre la formation du complexe entre l'hétérodimère du récepteur du GABA et la protéine G hétérotrimérique, nous avons mis à profit l'utilisation conjointe des deux générations de BRET. Cette expérience permet de suivre la formation de trois interactions différentes à l'intérieur de la même population cellulaire. Pour réaliser cette expérience, nous avons maintenu constant la quantité de GBR1-GFP², G α _{i1}-hRLuc ainsi que G β ₁/ γ ₂ natif et co-exprimé une quantité croissante de GBR2-EYFP. La mesure du signal de BRET¹ met en évidence le rapprochement entre GBR2 et la protéine G α . De son côté, le signal BRET² témoigne d'un rapprochement entre GBR1b et la protéine G α . Finalement, le FRET mesure l'assemblage de l'hétérodimère GBR1b/GBR2. Ces trois techniques de transfert d'énergie montrent une augmentation de signal en fonction de l'augmentation de l'expression de GBR2-EYFP (voir figure 16). Précédemment, nous avons établi qu'il n'y a pas d'interaction entre GBR1 et la protéine G en l'absence de GBR2, ce qui est confirmé dans cette expérience (voir figure 16, BRET²). En plus de favoriser un transfert d'énergie en BRET¹ entre G α _{i1}-hRLuc et GBR2-EYFP,

l'augmentation de GBR2-EYFP permet une élévation de signal entre GBR1b-GFP² et Gα₁₁-hRLuc. Ces modulations de signal en BRET¹ ainsi qu'en BRET² coïncident avec la formation d'hétérodimère GBR1/GBR2 qui est mesurée par l'augmentation de FRET. Cette observation renforce l'hypothèse que la dimérisation du récepteur du GABA est essentiel à la formation d'une interaction spécifique et constitutive avec la protéine G hétérotrimérique pour permettre la signalisation de ce récepteur.

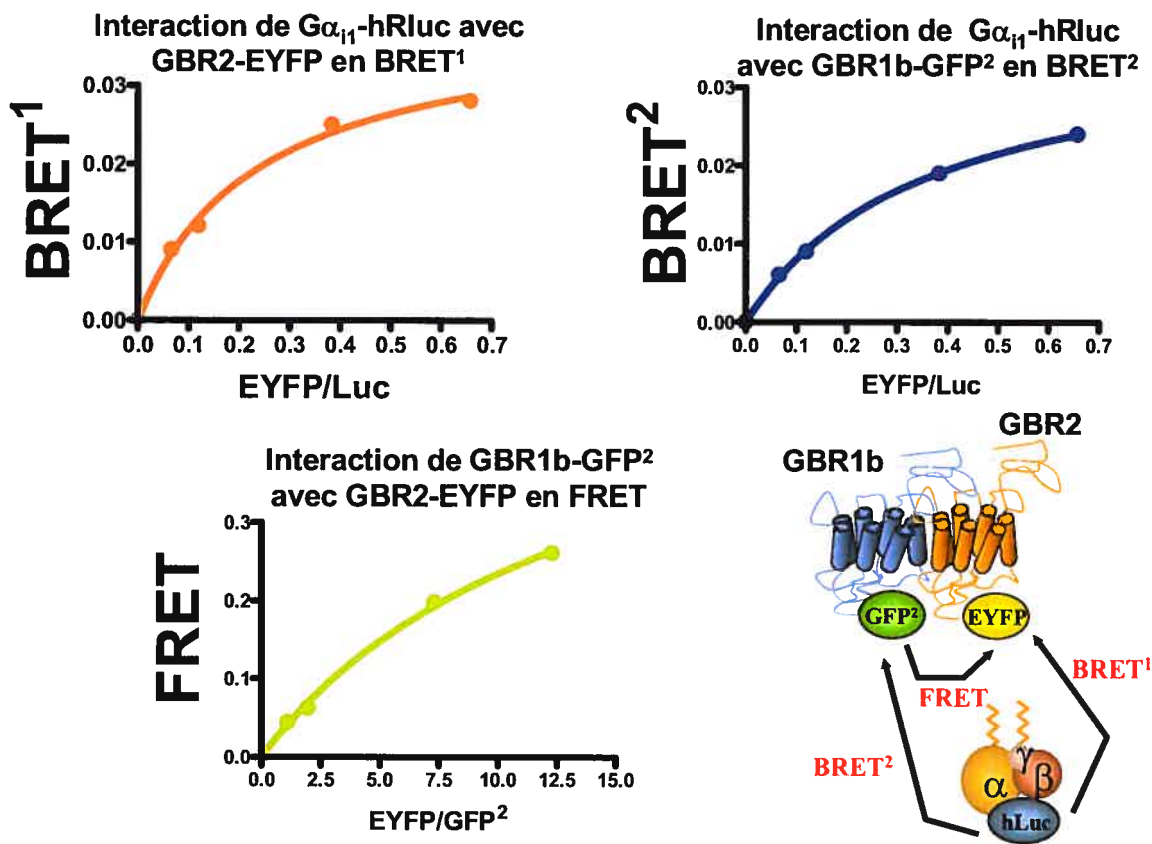


Figure 16: Mesure en parallèle des interactions entre les protomères du récepteur du GABA et la protéine G par l'utilisation du BRET¹, du BRET² et du FRET

Des cellules HEK293t ont été transfectées par la méthode Lipofectamine2000 dans des plaques 6 puits. Ces résultats proviennent de la co-transfection de cellules par 0.2 µg Gα₁₁-hRLuc, 1 µg de myc-GABA_BR1b-GFP² et différentes concentrations de HA- GABA_BR2-EYFP. 5 µg de DeepBlueC ou coelenterazine H ont été ajoutés pour le BRET² et le BRET¹ respectivement. Puis, le BRET¹ a été mesuré dans le Fusion-α de PerkinElmer et le BRET² a été mesuré dans un TopCount modifié pour le BRET² de PerkinElmer. Le FRET est mesuré dans un FlexStation, les valeurs sont corrigées tel que décrit dans les matériels et méthodes. Courbes de titration représentatives de deux expériences différentes.

Modulation de l'interaction du récepteur GABA_B avec la protéine G

Pour induire une réponse cellulaire suite à une stimulation, les RCPG activent principalement l'échange GDP/GTP de la sous unité $G\alpha$ de la protéine G hétérotrimérique. Le modèle classique d'activation de la protéine G suppose que le récepteur recrute la protéine G et favorise ainsi l'échange de nucléotides. On peut donc retrouver le RCPG dans deux états; celui lié à une protéine G qui est favorisée par la présence d'un agoniste, ou celui non lié qui représente l'état de base du récepteur. Comme présentée dans la section précédente, la technique de BRET nous permet de mesurer une interaction de base entre un RCPG et une protéine G, ce qui semble indiquer une pré-association entre ceux-ci à l'état basal. Le signal de BRET peut représenter un couplage de base selon le modèle classique d'activation de la protéine G ou une association des partenaires dans un pré-complexe de signalisation. Il est important de vérifier si la présence d'un agoniste peut modifier le signal BRET de base et également permettre de distinguer entre les deux possibilités, c'est-à-dire entre la recrutement de la protéine G ou un changement de conformation.

Dans la section précédente nous avons démontré qu'une interaction basale entre la protéine G et le récepteur du GABA était possible en l'absence d'agoniste. Afin de mesurer l'impact sur le signal BRET mesuré entre la protéine G et le récepteur du GABA, nous avons étudié l'effet de la stimulation du récepteur par un agoniste spécifique. Pour cette expérience, le protomère GBR1b du récepteur du GABA est fusionné à l'accepteur d'énergie, la GFP², puis co-exprimé avec GBR2. Les deux protomères du récepteur GABA ont été co-exprimées avec les trois sous unités de la protéine G où une seule est fusionnée à la luciférase. Pour ces expériences, nous avons analysé l'interaction avec deux des sous unités de la protéine G hétérotrimérique; soit sur la sous unité $G\alpha$ ($G\alpha_1$ -hRLuc) ou sur la sous unité $G\beta$ ($G\beta_1$ -hRLuc). Pour ces deux conditions différentes, un signal de BRET² a été observé à l'état basal, comme rapporté précédemment. L'addition d'une concentration saturante (1 mM) de GABA ne semble pas engendrer de variation du signal BRET² mesuré (voir figure 17). Le fait de ne pas

voir de modulation d'interaction entre le récepteur et la protéine G nous limite dans l'interprétation possible de ce résultat. Deux hypothèses peuvent expliquer ce résultat : soit que la position des rapporteurs sur les protéine d'intérêt ou que les conditions expérimentales ne sont pas permissif pour une modulation de signal BRET.

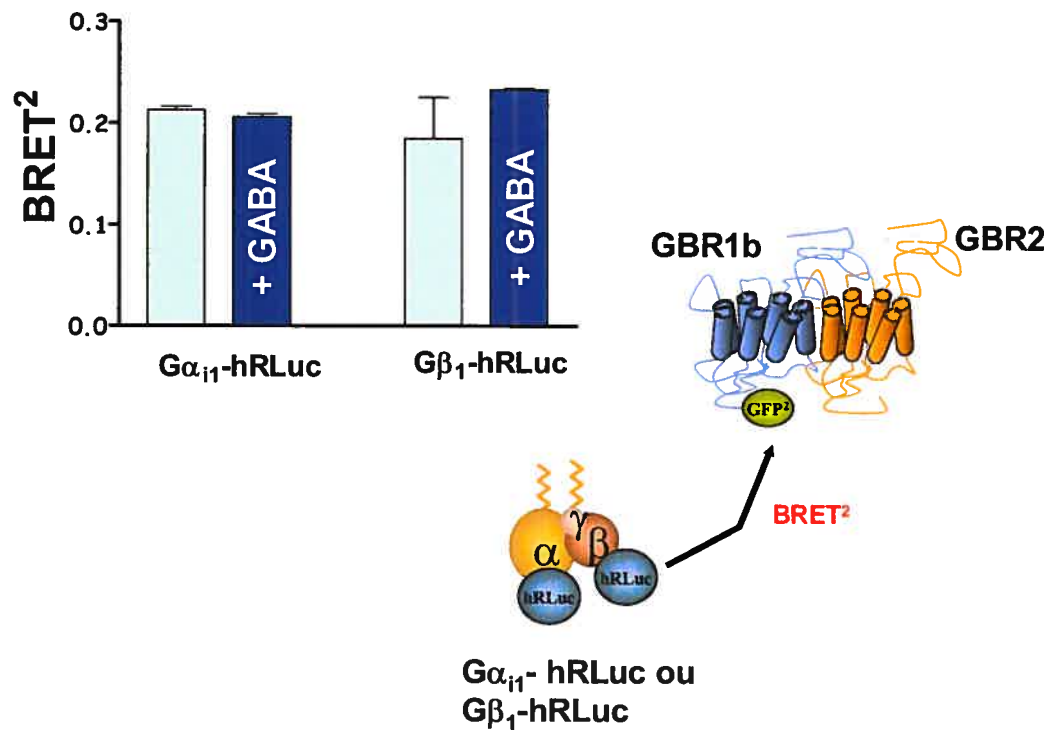


Figure 17: Modulation du signal BRET entre le récepteur GABA_BR1b et la protéine G par l'addition d'un agoniste spécifique.

Des cellules HEK293t ont été transfectées par la méthode Lipofectamine2000 dans des plaques 6 puits. Ces résultats représentent la co-transfection de cellules par 0.2 µg Gα₁₁-hRLuc ou par 0.2 µg Gβ₁-hRLuc, 0.8 µg de myc-GABA_BR1b-GFP² et 2µg de HA- GABA_BR2. Les cellules ont été mises en présence de 10 nM GABA durant cinq minutes puis 5µg de DeepBlueC ont été ajoutés et incubés une autre minute. Finalement, le BRET² a été mesuré dans un TopCount modifié pour le BRET². Résultats représentatifs de trois expériences différentes (± SEM).

La modulation de l'interaction entre un RCPG et la protéine G hétérotrimérique par un agoniste spécifique en utilisant la technique de BRET a été observé pour la majorité des RCPG analysés au laboratoire (Gales, en cours de publication). Pour le dimère $G\beta\gamma$ ainsi que pour $G\alpha$ la stimulation par un agoniste d'un RCPG favorise le transfert d'énergie. Initialement, la position des rapporteurs était inversée, soit la protéine G était fusionnée à la GFP et le récepteur était fusionné au récepteur. Afin d'exclure un problème dû à ce changement de position du donneur et de l'accepteur, nous avons donc validé cette approche inversée avec un autre récepteur, le récepteur à la vasopressine de type 2 (V2). Fusionné à la EYFP, le récepteur V2 représente l'accepteur d'énergie dans la mesure d'un signal BRET¹ et il est co-exprimé avec les trois sous unités de la protéine G ($G\alpha_s$, $G\beta_1$ et $G\gamma_2$), dont seul $G\beta_1$ est fusionné à la luciférase ($G\beta_1$ -hRLuc). Une courbe de titration a été effectuée en gardant l'expression de la protéine G constante et en augmentant uniquement la quantité de V2-EYFP. Afin de voir l'influence d'un agoniste sur le signal BRET entre la protéine G et le récepteur V2, la mesure du signal de BRET¹ a été réalisée sur une population cellulaire incubée deux minutes en présence d'une concentration saturante de vasopressine (1 μ M AVP). La figure 18A montre une augmentation de signal BRET¹ qui atteint un plateau en fonction de l'augmentation de l'expression du récepteur V2-EYFP. La présence d'AVP semble potentialiser le signal BRET¹ mesuré en atteignant un niveau plus élevé à saturation du signal. La potentialisation du signal BRET par la présence d'un agoniste indique que la modulation de l'interaction entre le récepteur V2 et la sous unité $G\beta$ peut être suivi par la technique de BRET.

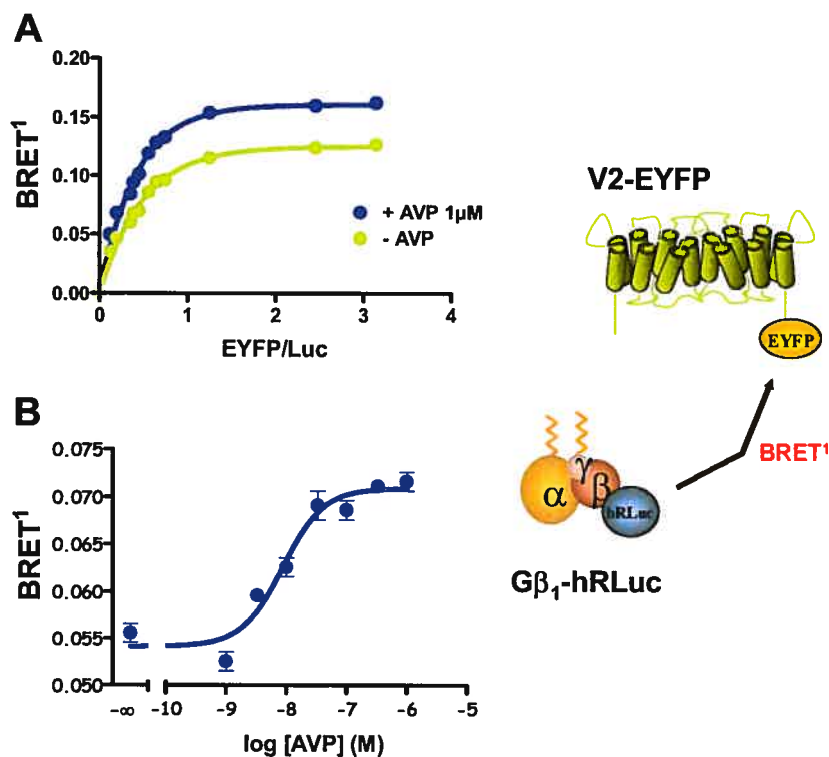


Figure 18: Courbes de titration pour l'interaction entre la protéine G et le récepteur à la vasopressine de type 2 et modulation de cette interaction par un agoniste spécifique (AVP).

A) Des cellules HEK293t ont été transfectées par la méthode calcium/phosphate par 2 μg de Gβ₁-hRLuc, 8 μg de Gα_s natif, 8 μg de Gγ₂ natif et une concentration croissante de V2R-EYFP (0 à 10 μg). Cette courbe de titration a été réalisée en présence ou non de 1 μM d'AVP. Le BRET¹ a été mesuré dans le Fusion-α de PerkinElmer.

B) Des cellules HEK293t ont été transfectées par la méthode calcium/phosphate par 2 μg de Gβ₁-hRLuc, 8 μg de Gα_s natif, 8 μg de Gγ₂ natif et 4 μg de V2R-EYFP (quantité de récepteur pour être dans la portion linéaire de la courbe de titration). Ces cellules ont été incubées 2 minutes en présence de différentes concentrations d'AVP et le BRET¹ a été mesuré dans le Fusion-α de PerkinElmer. Les courbes représentent la cumulation deux expériences réalisées en triplicata (± SEM).

Afin de vérifier si cette potentialisation du signal BRET est spécifique à la présence d'AVP, nous avons réalisé une courbe dose-réponse de l'effet de cet agoniste sur le signal BRET. Pour cette courbe dose-réponse, nous avons choisi une concentration de récepteur dans la portion linéaire d'augmentation de signal BRET. Le signal BRET mesuré croît en fonction l'augmentation de la concentration d'AVP en produisant une courbe sigmoïde typique d'une courbe dose réponse (voir figure 18B). Cette sigmoïde possède un EC_{50} de 10 nM, qui se rapproche du K_d de liaison de ce ligand pour le récepteur V_2 -R qui est entre 2 nM (Sadeghi *et al*, 1997). Cette similarité entre l' EC_{50} et le K_d de liaison indique que la modulation de signal BRET mesuré est directement dépendante de la stimulation du récepteur par son agoniste, puisque la concentration d'agoniste pour avoir 50% de l'effet maximal est égale à la concentration d'agoniste pour avoir la moitié des récepteurs liés. Cette augmentation de signal BRET¹ entre le récepteur V_2 et la protéine G peut être attribuée à deux phénomènes. Premièrement, le modèle classique prévoit une interaction basale entre le récepteur et la protéine G. Une fois stimulé par son agoniste, le récepteur changerait de conformation, favorisant ainsi le recrutement des sous unités de la protéine G résultant en une augmentation de signal BRET¹ mesuré. Cependant, il est aussi possible d'imaginer qu'un complexe de signalisation formé par le récepteur et la protéine G serait présent à la membrane plasmique. Lors de l'activation, un changement de conformation du récepteur induirait une réorientation des membres de ce complexe en modifiant l'orientation entre les rapporteurs du transfert d'énergie. La différence entre ces deux possibilités sera discutée plus en détails dans le chapitre suivant.

L'utilisation du récepteur V_2 nous a permis de conclure que la position du donneur et de l'accepteur d'énergie utilisée pour la mesurer de modulation de l'interaction entre la protéine G et le récepteur du GABA n'est pas responsable des résultats négatifs obtenus. Il est possible que les changements de conformation induits au sein du récepteur par la présence d'un agoniste n'altèrent pas la distance ou l'orientation entre les rapporteurs de transfert d'énergie, ce qui expliquerai la stabilité du signal BRET en présence d'agoniste. La particularité du récepteur au GABA est que les deux protomères le composant sont pourvus d'une longue queue C-terminal comparativement au récepteur V_2 . Cette distance augmentée entre le site de liaison de la protéine G (cette région est composée des boucles

cytoplasmiques du récepteur) et la région où est fusionnée le rapporteur se traduit par un faible changement de distance entre les rapporteurs du transfert d'énergie. Afin de démontrer que les conditions choisies sont aptes à l'activation de la protéine G hétérotrimérique, nous avons mis à profit l'utilisation des deux techniques de BRET pour mesurer l'interaction de la protéine G au récepteur ainsi que l'activation par le récepteur du GABA de cette protéine G.

Afin de mesurer l'activation de la protéine G en BRET, nous mesurons la modulation du transfert d'énergie entre une sous unité $G\alpha$ fusionnée à une luciférase et une sous unité $G\gamma$ fusionnée à la GFP. Au laboratoire, l'activation des récepteurs par leurs agonistes spécifiques montre que le signal BRET basal entre les deux sous unités de la protéine G subit une modulation. Nous avons vérifié si cette modulation par un agoniste était possible pour le récepteur du GABA. Dans cette expérience, le protomère GBR1b est fusionné à la EYFP (GBR1b-EYFP) pour le signal BRET¹, la sous unité $G\gamma$ est fusionnée à la GFP² ($G\gamma_2$ -GFP²) pour le signal BRET², et finalement la sous unité $G\alpha$ est fusionné à la luciférase ($G\alpha_{i1}$ -hRLuc) donneur d'énergie dans les deux générations de BRET. En plus de mesurer l'interaction de la protéine G avec le récepteur en BRET¹, cette expérience tente de suivre l'activation de la protéine G par la modulation du transfert d'énergie entre les sous unités $G\alpha$ et $G\gamma$ en BRET². Nous avons effectué une courbe de titration, dans lequel nous avons co-exprimé une quantité constante de GBR2, $G\alpha_{i1}$ -hRLuc, $G\gamma_2$ -GFP² et $G\beta_1$ en présence d'une quantité croissante de GBR1b-EYFP. De plus, la courbe de titration a été réalisée en présence ou en absence d'une concentration saturante de GABA. Comme montré précédemment, l'expression croissante de GBR1b-EYFP favorise l'augmentation du transfert d'énergie entre les rapporteurs du BRET¹ (entre $G\alpha_{i1}$ -hRLuc et GBR1b-EYFP) seulement lorsque GBR2 est présent dans les cellules (voir figure 19A). Comme démontré auparavant, la présence d'un agoniste ne semble pas modifier le transfert d'énergie, car la courbe obtenu en présence de 1 mM GABA est identique à celle obtenue en absence de GABA.

En parallèle, nous avons mesuré le signal BRET² produit par l'interaction des sous unités $G\alpha_{i1}$ -hRLuc et $G\gamma_2$ -GFP², en utilisant uniquement la condition qui produit une valeur

maximale de chacune des courbes de titration effectuées en BRET¹. Dans la condition où GBR1b-EYFP est exprimé sans GBR2, l'addition de 1 mM de GABA ne semble pas moduler le signal BRET² (voir figure 19B). Ceci était attendu, car lorsque exprimé seul, le protomère GBR1b est incapable d'interagir avec la protéine G, donc d'induire une modulation à l'intérieur de celle-ci. Cependant, lorsque GBR2 est co-exprimé, formant l'hétérodimère GBR1b-EYFP/GBR2, l'addition de GABA diminue le signal BRET² mesuré d'environ 7%. Cette diminution est faible, mais très reproductible comme l'indique la valeur de probabilité ($P = 0.00073$). Pour avoir une modulation du signal BRET² entre les sous unités $G\alpha$ et $G\gamma$, la présence des deux co-récepteurs est essentielle, ce qui confirme les données de la littérature où la formation de l'hétérodimère est indispensable à la signalisation via la protéine G. De plus, ce résultat indique qu'il semble être possible de mesurer la modulation d'interaction au sein de la protéine G à la suite de l'activation d'un RCPG par son agoniste.

Afin de suivre l'évolution de l'interaction au sein de la protéine G, une modulation du signal BRET² entre les sous unités $G\alpha_{i1}$ -hRLuc et $G\gamma_2$ -GFP² a été réalisée par l'activation du récepteur du GABA. Cette expérience a été réalisée en co-exprimant les trois sous unités de la protéine G ($G\beta_1$, $G\alpha_{i1}$ -hRLuc et $G\gamma_2$ -GFP²) en présence de GBR2 ainsi qu'une quantité croissante de GBR1-EYFP. En parallèle, nous avons vérifié en maintenant GBR1 l'effet de l'augmentation de GBR2-EYFP constant sur la modulation au sein de la protéine G. Les résultats obtenus ne présentent aucune modification du transfert d'énergie par les rapporteurs portés par les sous unités de la protéine G en présence de 1 mM de GABA, lorsque les protomères GBR1b-EYFP et GBR2-EYFP sont exprimés séparément (voir figure 20).

Le fait d'avoir un seul protomère est insuffisant pour activer la protéine G. À l'inverse, l'augmentation de l'expression de GBR1b-EYFP ou de GBR2-EYFP en présence de son co-récepteur permet de moduler le signal BRET² au sein de la protéine G. Dans les deux cas, nous observons une diminution du signal BRET² qui atteint un plateau à 7% de diminution. Le fait que les deux courbes soient identiques indique que la présence de la protéine EYFP fusionnée soit à GBR1b ou à GBR2 n'influence pas la formation et la modulation du complexe entre l'hétérodimère de récepteur et la protéine G hétérotrimérique.

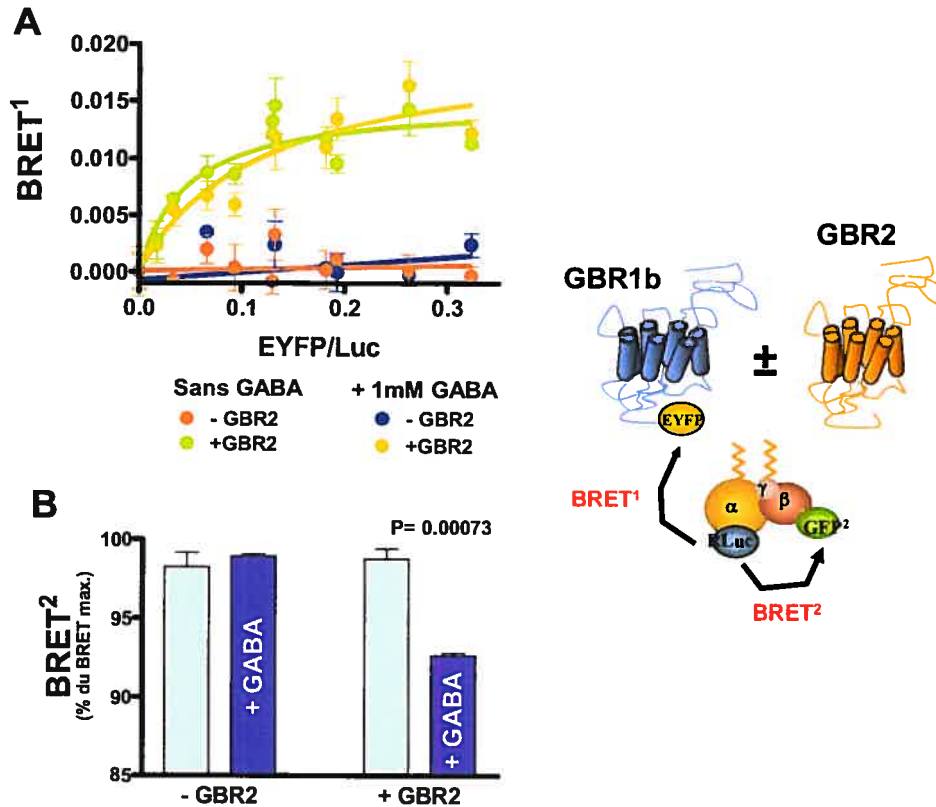


Figure 19: Modulation de l'interaction entre GBR1b et la protéine G ainsi que l'interaction au sein de la protéine G par l'addition d'un agoniste spécifique.

Des cellules HEK293t ont été transfectées par la méthode PEI avec une quantité constante des trois sous unités de la protéine G (40 ng de $G\alpha_i$ -hRLuc, 100 ng de $G\beta$ et 100 ng $G\gamma$ -GFP²) et une quantité croissante de GABA_BR1b-EYFP. A) Les courbes bleu et orange ont été réalisées en l'absence de GABA_BR2 tandis que les courbes jaune et verte ont été réalisées en présence de GABA_BR2. De plus, l'effet sur la courbe de saturation de 1 mM GABA a été fait pour les conditions avec ou sans GABA_BR2. B) Les points maximums de chacune des courbes en (A) ont été utilisés pour mesurer la modulation de la protéine G par 1 mM GABA en BRET². Résultats représentatifs de deux expériences différentes réalisées en triplicata (\pm SEM).

Ces résultats confirment également qu'il est possible de mesurer la stimulation du récepteur GABA par son agoniste en regardant la modulation de signal BRET au sein de la protéine G. La mesure du signal BRET¹ nous indique que la présence du protomère GBR2 est essentielle au rapprochement de la protéine G au protomère GBR1b ou GBR2. De plus, le changement de conformation de l'hétérodimère GRB1b/GBR2 produit par la fixation d'un agoniste ne module pas ce signal BRET¹. De son côté, la mesure du signal BRET² semble indiquer que dans les conditions expérimentales utilisées, l'activation de la protéine G est détectable. Par conséquent, la protéine G ne semble pas être recrutée au

récepteur suite à l'addition d'un agoniste, mais apparaît plutôt être pré-associée à celui-ci. De plus, l'activation du récepteur par son agoniste induit l'activation de cette protéine G. Ces résultats renforcent l'hypothèse qu'il y aurait un changement de conformation à l'intérieur d'un complexe de signalisation, plutôt qu'un recrutement de la protéine G, lors de la stimulation d'un RCPG.

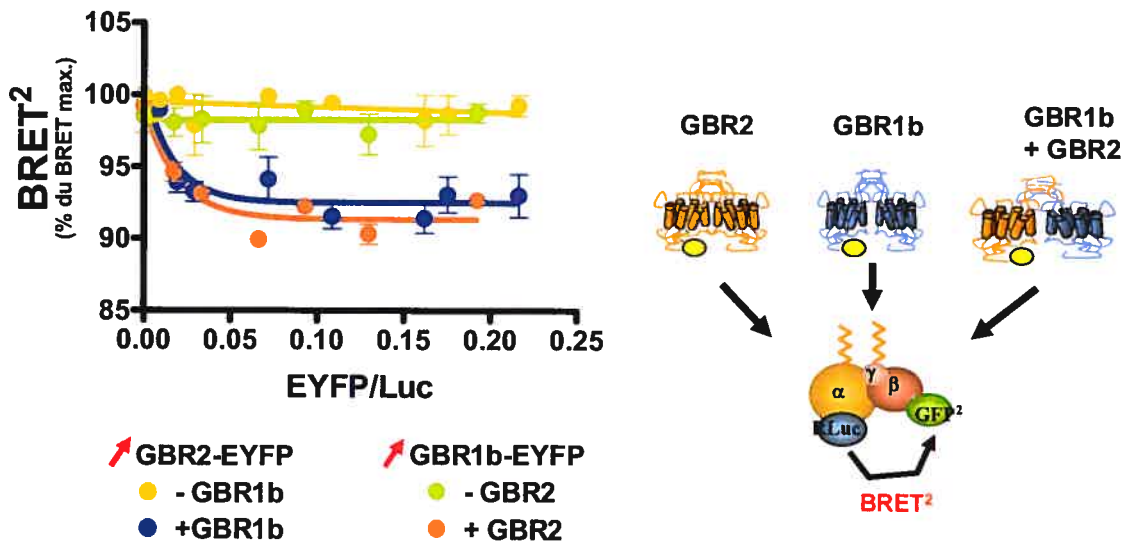


Figure 20: Modulation de l'interaction entre les sous unités $G\alpha$ et le dimère $G\beta\gamma$ par la stimulation du récepteur du GABA via un agoniste spécifique.

Des cellules HEK293t ont été transfectées par la méthode PEI avec une quantité constante des trois sous unités de la protéine G (40 ng de $G\alpha_{i1}$ -hRLuc, 100 ng de $G\beta$ et 100 ng $G\gamma$ -GFP²) et une quantité croissante de GABA_BR1b-EYFP (courbes verte et orange) ou GABA_BR2-EYFP (courbes jaune et bleu) en présence de leur co-récepteur natif. Le transfert d'énergie entre la $G\alpha_{i1}$ -hRLuc et $G\gamma$ -GFP² en BRET² a été mesuré en présence de 1 mM GABA. Les courbes représentent la cumulation deux expériences réalisées en triplicata (\pm SEM).

Effet de mutations du récepteur GBR2 sur l'interaction du récepteur du GABA avec la protéine G

Dans les sections précédentes, nous avons mis en évidence la possibilité de mesurer plusieurs interactions avec la même population cellulaire par l'utilisation des deux générations de BRET. Cette utilisation concomitante des différentes techniques de RET dans le cadre de l'interaction entre le récepteur du GABA et de la protéine G hétérotrimérique a mis en évidence la nécessité de l'hétérodimérisation des protomères GBR1b et GBR2 pour l'interaction avec la protéine G. Cependant, qu'advient-il de l'interaction récepteur/protéine G si un récepteur a perdu la capacité d'activer la protéine G hétérotrimérique. Afin de répondre à cette question, nous avons mesuré l'interaction ainsi que l'activation de la protéine G avec des récepteurs mutants incapable d'activer la protéine G. Pour ce nous avons pris avantage de l'utilisation des deux techniques de BRET comme décrit précédemment. Dans la littérature, certains mutants de GBR2 ont montré une perte d'activation de la protéine G même si ces mutants possèdent toujours la capacité d'hétérodimériser avec GBR1b et de cibler l'hétérodimère à la membrane plasmique (Duthey *et al*, 2002). Deux de ces mutants ont donc été utilisés dans notre étude. Le premier mutant est un récepteur chimère où la boucle i2 cytoplasmique de GBR2 a été remplacée par celle de GBR1b (GBR2-i2 (R1)). L'autre mutant est caractérisé par une substitution du résidu leucine en position 686 par une proline (GBR2 L686P). Le résidu 686 est situé dans la boucle i3 cytoplasmique du récepteur GBR2 qui est importante pour l'activité facteur d'échange du nucléotide des RCPG. De plus, nous avons mesuré l'apparition du protomère GBR1b à la membrane plasmique par une technique d'ELISA de surface. Ce test nous sert comme contrôle pour quantifier la présence du complexe GBR1/GBR2 à la membrane plasmique. Pour réaliser cette expérience, nous avons co-exprimé les différents mutants de GBR2 ainsi que GBR2 natif en présence de GBR1b possédant deux étiquettes : c-myc en N-terminal pour la mesure d'expression de surface du complexe en ELISA et EYFP en C-terminal pour la mesure de son interaction avec la protéine G en BRET¹ (myc-GBR1b-EYFP). Nous avons également co-exprimé les trois sous unités de la protéine G, où $G\alpha$ est fusionné à la luciférase ($G\alpha_{i1}$ -hRLuc), donneur d'énergie dans les deux générations de BRET utilisées, et $G\gamma$ est fusionné à la GFP ($G\gamma_2$ -

GFP²) pour mesurer l'activation de la protéine G par la mesure du BRET². Comme attendu, lorsque GBR1b est exprimé sans GBR2 le signal d'ELISA est petit, indiquant qu'une faible proportion de GBR1b se dirige à la membrane plasmique (figure 21, ELISA). Cependant, l'addition de GBR2 natif ou de chacun des mutants permet le transport de GBR1b vers la surface comme l'indique l'augmentation de luminescence de l'essai ELISA. La mesure de l'expression de surface de myc-GBR1b-EYFP par la méthode d'ELISA nous indique donc que les mutants sont en mesure de cibler de façon équivalente l'hétérodimère du récepteur GABA à la membrane plasmique.

Nous avons ensuite mesuré la capacité des différents hétérodimères GBR1b/GBR2 natif ou mutant d'interagir avec la protéine G. Comme auparavant, en l'absence de GBR2, aucun signal de transfert d'énergie n'est détecté entre la protéine G et GBR1b. L'addition de GBR2 natif ou des mutants incite un transfert d'énergie entre la protéine G et GBR1b de façon comparable. Ce résultat semble indiquer que l'interaction entre la protéine G et l'hétérodimère GBR1b/GBR2, composé par un GBR2 natif ou mutant n'est pas dépendante de l'activité facteur d'échange du nucléotide du récepteur, puisque les mutations dans le domaine de liaison du nucléotide n'affectent pas le signal.

Afin de s'assurer que les mutants sont incapables d'activer la protéine G, nous avons mesuré la modulation de l'interaction au sein de la protéine G hétérotrimérique par l'ajout d'une concentration saturante de GABA en BRET². Lorsque GABA_BR1b exprimé seul, le GABA ne module pas le transfert d'énergie entre G α et G γ alors que l'addition de GBR2 natif permet de voir apparaître une diminution de signal, tel que présenté précédemment. Contrairement au protomère de GBR2 natif, les mutants sont incapables de moduler le transfert d'énergie au sein de la protéine G (Duthey *et al*, 2002). Les signaux de BRET² mesurés confirment les données de la littérature et indiquent que ces mutants sont non fonctionnels pour l'activation de la protéine G, mais qu'ils n'affectent pas l'interaction avec cette dernière.

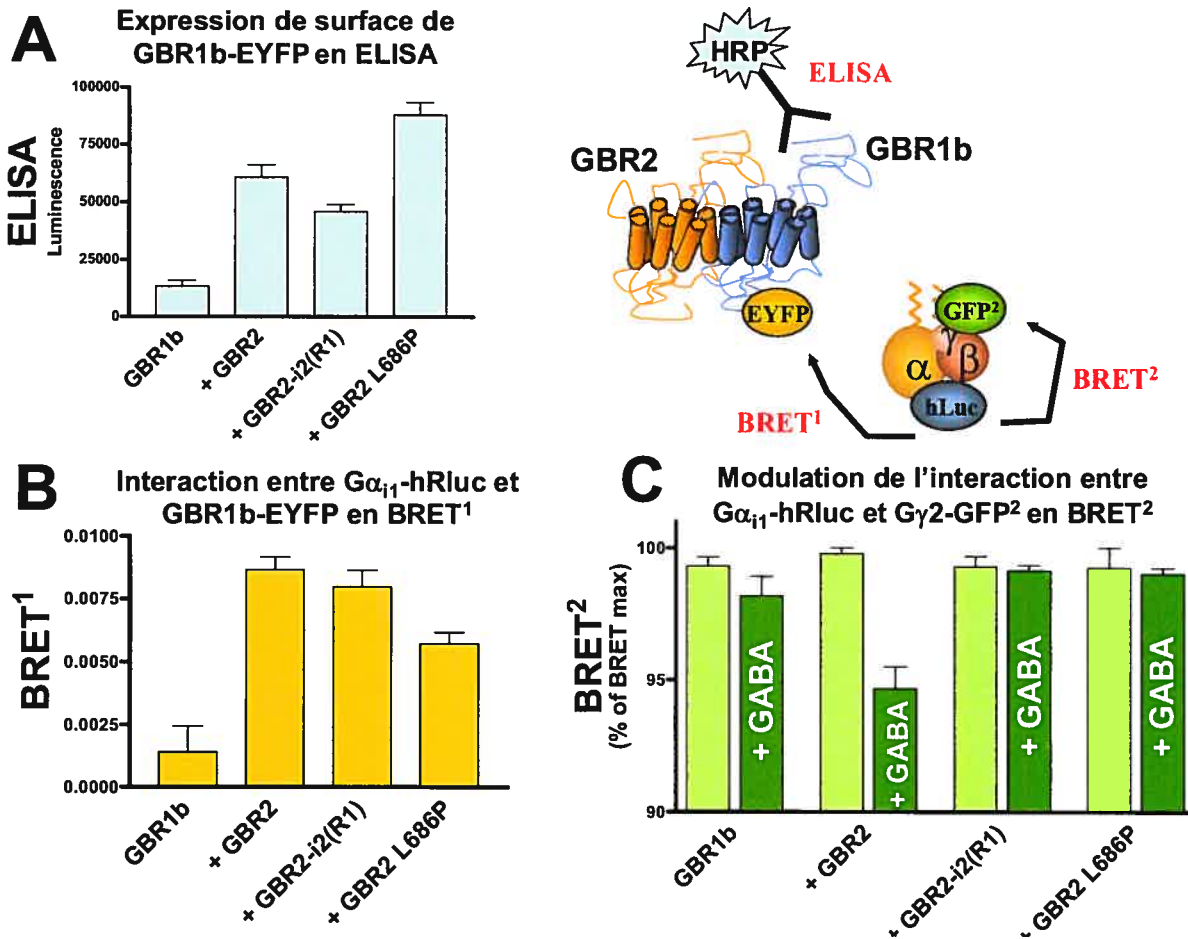


Figure 21: Effet des mutations sur le récepteur GABA_BR2 sur l'interaction et l'activation de la protéine G hétérotriérique.

Des cellules HEK293t ont été transfectées par la méthode PEI avec une quantité constante des trois sous unités de la protéine G (40 ng de $G\alpha_{11}$ -hRLuc, 100 ng de $G\beta$ et 100 ng $G\gamma$ -GFP²), de 200 ng myc-GABA_BR1b-EYFP et de 200 ng de GABA_BR2 natif ou des mutants GBR2-i2(R1) et GBR2L686P. A) Mesure de l'effet de GABA_BR2 ou des mutants sur l'expression de surface de myc-GABA_BR1b-EYFP par la technique d'ELISA. B) Mesure de l'effet des différents GABA_BR2 natif ou mutant sur l'interaction entre GABA_BR1b et $G\alpha_{11}$ -hRLuc en BRET¹. C) Finalement, mesure de la modulation de la protéine G en BRET². Résultats représentatifs de trois expériences différentes réalisées en triplicata (\pm SEM).

Suite à l'interprétation de ces différentes mesures, il est possible de conclure que les mutants du GBR2 sont capables, comme GBR2, de former des hétérodimères avec GBR1b même s'ils n'activent plus la protéine G hétérotrimérique. Ces hétérodimères sont également en mesure de former une interaction constitutive avec la protéine G hétérotrimérique aussi efficacement que l'hétérodimère composé par GBR2 natif. Ce résultat renforce donc les arguments en faveur d'une pré-association des RCPG et des protéines G en complexe de signalisation. Cette observation ouvre une toute nouvelle question sur la formation du complexe de signalisation. Cette interaction entre la protéine G et le récepteur est-elle observée uniquement à la membrane plasmique ou est-elle précoce dans l'acheminement à la membrane plasmique d'un récepteur?

Localisation des interactions RCPG- protéine G

Dans les sections précédentes, nous avons mis en évidence la nécessité de l'hétérodimérisation du récepteur du GABA pour son interaction avec la protéine G ainsi que pour l'activation de cette dernière. Également, nos résultats ont permis de mettre en évidence une interaction constitutive du récepteur avec la protéine G qui ne dépend pas de l'activité de facteur d'échange du RCPG, car des récepteurs du GABA mutés pour cette fonction n'ont pas perdus la capacité de former des complexes avec la protéine G. L'existence de tels complexes récepteurs-protéines G qui sont indépendants de l'activité du récepteur pose la question de leur site d'assemblage. Se forment-ils à la membrane plasmique ou plus tôt durant la maturation du récepteur? La présence de sous unités de protéines G dans le RE ($G\beta\gamma$) et le Golgi ($G\alpha$ et $G\beta\gamma$) permet d'imaginer que le pré-assemblage des récepteurs avec leurs protéines G puissent se faire au cours de leur acheminement vers la membrane plasmique dans la voie de sécrétion (Michaelson *et al*, 2002). Tel qu'indiqué plus tôt, le fait que la dimérisation de GBR1 et GBR2 soit nécessaire aussi bien pour le transport du récepteur à la membrane plasmique que pour son interaction avec la protéine G pourrait permettre de proposer une relation de cause à effet entre ces deux phénomènes; c'est-à-dire que l'acheminement du récepteur à la membrane plasmique est nécessaire pour son interaction avec les protéines G. Toutefois,

nos résultats ne nous permettent pas d'exclure la possibilité d'un assemblage précoce (ie : dans le RE et ou le Golgi) entre le récepteur et la protéine G suite à la dimérisation des GBR1 et GBR et même que cet interaction dans la voie de sécrétion soit nécessaire à l'acheminement membranaire. Pour tenter de différencier entre ces deux possibilités, nous avons eu recours à un autre RCPG dont l'acheminement à la membrane plasmique dépend d'une interaction avec une protéine accessoire.

Le «Calcitonine Receptor Like Receptor» (CRLR) répond à ce critère. En effet lorsqu'exprimé sans une des protéines accessoires de la familles des «receptor activity modifying proteins» (RAMP), le CRLR est retenu dans le RE. Comme décrit dans l'introduction, le RAMP, qui agit aussi comme co-récepteur, est une protéine à un seul passage transmembranaire permet le transport du CRLR à la membrane plasmique. Ainsi, nous avons mesuré l'influence de RAMP-1 ainsi que d'un agoniste spécifique du complexe CRLR-RAMP-1, le CGRP, sur l'interaction entre le récepteur CRLR et la protéine G. Pour ce faire, une courbe de titration a été effectuée entre le récepteur CRLR et $G\gamma$ ou $G\alpha$. Afin de réaliser ces expériences, une quantité croissante de CRLR-EYFP a été co-exprimé en présence ou non de RAMP-1 natif et des trois sous unités de la protéine G ($G\alpha_{i1}$, $G\beta_1$ et $G\gamma_2$), où une seule des sous unités était fusionnée à la luciférase ($G\gamma_2$ -hRLuc ou $G\alpha_{i1}$ -hRLuc). Dans le cas de l'interaction entre le récepteur CRLR et la sous unité $G\gamma$, un transfert d'énergie mesurable est observé en présence et en absence de RAMP-1, provoquant dans ces deux conditions des courbes de saturation superposables (voir figure 22A). La présence de RAMP-1 ne semble donc pas modifier l'interaction du récepteur CRLR avec la sous unité $G\gamma$, ce qui semblerait impliquer que le CRLR peut interagir avec la protéine G dans le réticulum endoplasmique. En parallèle, l'effet du CGRP, sur la modulation du transfert d'énergie entre le récepteur et la protéine G a été étudié. Sans RAMP-1, l'addition de 10 nM de CGRP durant 2 minutes n'affecte pas le transfert d'énergie de base (voir figure 22A courbe jaune). À l'inverse, en présence de RAMP-1, une modulation de transfert d'énergie est mesurée suite à l'addition de CGRP pour ainsi produire une élévation du signal BRET mesuré. Ce résultat rappelle celui observé précédemment pour le récepteur V2, où la présence d'un agoniste modifie également le transfert d'énergie. La présence de RAMP ne semble donc pas essentiel à

une interaction précoce de CRLR avec $G\gamma$, mais est essentiel à la modulation de cette interaction en BRET. Afin de permettre le transport de CRLR à la surface, le récepteur doit être co-exprimé avec RAMP-1, ce qui explique l'absence de modulation du signal BRET en absence de RAMP-1, puisque le ligand ne peut atteindre le récepteur. Dans ce cas, le CRLR, est retenu dans le réticulum endoplasmique. Parallèlement, tel que décrit précédemment (Introduction partie protéine G) le dimère $G\beta\gamma$, suite à la prénylation de la sous unité $G\gamma$, est acheminé vers le réticulum endoplasmique.

À la lumière de cette information, il est possible de supposer que l'interaction entre la sous unité $G\gamma$ et le récepteur CRLR se forme dans le réticulum endoplasmique. Dans le modèle d'acheminement à la membrane plasmique de la protéine G hétérotrimérique, contrairement au complexe $G\beta\gamma$ qui est dirigé vers le RE, la sous unité $G\alpha$ est dirigée vers l'appareil de Golgi pour y subir une palmitoylation et/ou une myristoylation selon le sous-type de $G\alpha$. Cette localisation dans le Golgi favorise la formation d'une interaction avec le dimère $G\beta\gamma$ en provenance du RE. Par conséquent, aucune interaction entre le récepteur CRLR et la sous unité $G\alpha$ ne devrait être mesurée en absence de RAMP, car les deux protéines sont compartimentées dans des régions distinctes de la cellule. Afin de tester cette hypothèse, une courbe de titration de BRET, similaire à celle faite précédemment a été effectuée, mais cette fois entre la sous unité $G\alpha$ fusionnée à la luciférase et CRLR-EYFP. En absence de RAMP-1, la mesure du transfert d'énergie entre CRLR-EYFP et $G\alpha_{i1}$ -hRLuc évolue de façon linéaire en fonction de l'augmentation de l'expression de CRLR-EYFP (voir figure 22B). Cette droite semble indiquer que l'interaction mesurée serait de nature non spécifique et probablement due à des collisions aléatoires. Il est aussi possible d'imaginer qu'une faible proportion de récepteurs CRLR puissent s'échapper du RE vers le Golgi via des RAMP-1 endogènes présents dans la cellule, car cette protéine est exprimée par tous les types cellulaires. Il est également possible, bien que peu probable, que la sous unité $G\alpha$ passe du Golgi vers le RE pour former ce signal non spécifique. À l'inverse des résultats obtenus avec $G\gamma$, la co-expression de RAMP-1 modifie le transfert d'énergie entre CRLR-EYFP et $G\alpha_{i1}$ -hRLuc (voir figure 22B). En effet, le signal de BRET mesuré devient saturable en présence de RAMP-1. La présence de RAMP-1 s'avère donc importante pour l'interaction du

récepteur avec la sous unité $G\alpha$. L'addition d'une concentration saturante de CGRP permet une faible modulation de cette interaction basale entre les deux partenaires en augmentant légèrement le signal BRET détecté (voir figure 22B, courbe orange vs courbe bleu). Cette faible modulation du signal peut être attribué à la sous unité de protéine G utilisée pour cette expérience. Physiologiquement, le récepteur CRLR est préférentiellement couplé avec la sous unité G_s mais ce récepteur semble également être sensible à la PTX, ce qui suppose un couplage à la protéine G_i dans certaines conditions (Martin et al, 1998). Nous avons dû utiliser la sous unité $G\alpha_{i1}$ -hRLuc, car aucune sous unité $G\alpha_s$ -hRLuc fonctionnel n'était disponible pour cette étude. Dans un avenir rapproché nous allons construire cette fusion $G\alpha_s$ -hRLuc et répéter les expériences.

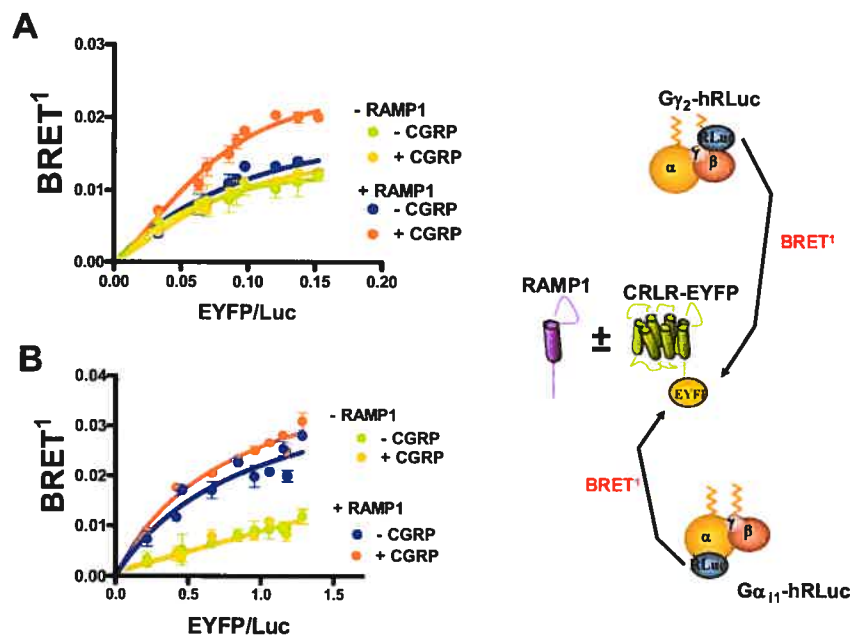


Figure 22: Courbes de titration de l'interaction entre CRLR et les sous unités $G\alpha$ et $G\gamma$ de la protéine G.

Des cellules HEK293t ont été transfectées par la méthode PEI avec une quantité constante des trois sous unités de la protéine G (en (A) 100 ng de $G\alpha_{i1}$, 100 ng de $G\beta_1$ et 40 ng $G\gamma_2$ -hRLuc ou en (B) 40 ng de $G\alpha_{i1}$ -hRLuc, 100 ng de $G\beta_1$ et 100 ng $G\gamma_2$) et avec une quantité croissante du récepteur CRLR-EYFP. L'effet de la co-expression de RAMP1 et/ou de la présence de l'agoniste CGRP a été mesuré pour toutes les conditions de (A) et (B). Courbes représentatives de deux expériences différentes réalisées en triplicata (\pm SEM).

Pour s'assurer que le récepteur CRLR peut activer la protéine G_i , nous avons mesuré l'interaction CRLR/ $G\alpha_i$ en même temps que son activation (modulation de l'interaction $G\alpha / G\gamma$) en utilisant les deux générations de BRET tel que présenté pour le récepteur du GABA. Pour cette expérience, le récepteur CRLR-EYFP (mesure de l'interaction avec la protéine G en BRET¹) a été co-exprimé en présence ou non de RAMP1 natif ainsi que des trois sous unités de la protéine G où la sous unité $G\gamma$ est fusionné à la GFP² ($G\gamma_2$ -GFP²) et la sous $G\alpha$ est fusionné à la luciférase ($G\alpha_{i1}$ -hRLuc), permettant ainsi de mesurer l'activation de la protéine G en BRET². Tel que décrit précédemment, il est possible de mesurer une augmentation du transfert d'énergie entre la protéine $G\alpha$ et le récepteur CRLR en présence de RAMP-1 (voir figure 23, BRET¹), ce qui met en évidence l'importance de RAMP-1 pour l'interaction CRLR/ $G\alpha$. Quant à la mesure de l'activation de la protéine G, l'addition de CGRP sur les cellules qui ne surexpriment pas RAMP-1 aucune modulation le signal BRET² est mesurée (voir figure 23, BRET²). Par contre dans la condition où RAMP est présent, une modulation du transfert d'énergie est observée. Cette modulation représente une diminution d'environ 5% de la valeur de signal BRET² mesuré en l'absence de CGRP. Par ces résultats, le récepteur CRLR semble pouvoir activer la protéine $G\alpha_i$ et ceci ne représente pas la seule évidence d'un couplage de CRLR avec $G\alpha_i$. En 1998, le groupe de Foord a publié que le récepteur du CGPR peut être couplé à des protéines G sensibles ou non à la toxine *pertussis* (PTX). Ils ont démontré dans les oocytes de *Xenopus*, que l'expression de RAMP-1 provoque l'élévation de la réponse endogène par le CGRP d'un canal potassique GIRK (Martin *et al*, 1998). De plus, ils ont montré que la co-expression du récepteur CRLR potentialise cette réponse potassique des oocytes, mais à l'inverse, l'ajout de PTX diminue cette réponse potassique du canal GIRK. Ces résultats indiquent que le récepteur CRLR est en mesure d'activer une réponse cellulaire dépendante de la protéine $G\alpha_i$ tout comme le fait notre biomarqueur de l'activité de la protéine G_i en BRET. Ce résultat de modulation de l'activité de la protéine G répète l'importance de RAMP dans l'interaction du récepteur CRLR avec la protéine $G\alpha$ ainsi que la nécessité de ce co-récepteur pour l'activation de la protéine G. En présence de RAMP-1, le récepteur CRLR peut rejoindre la sous unité $G\alpha$ dans des compartiments cellulaires où cette interaction peut être favorisée.

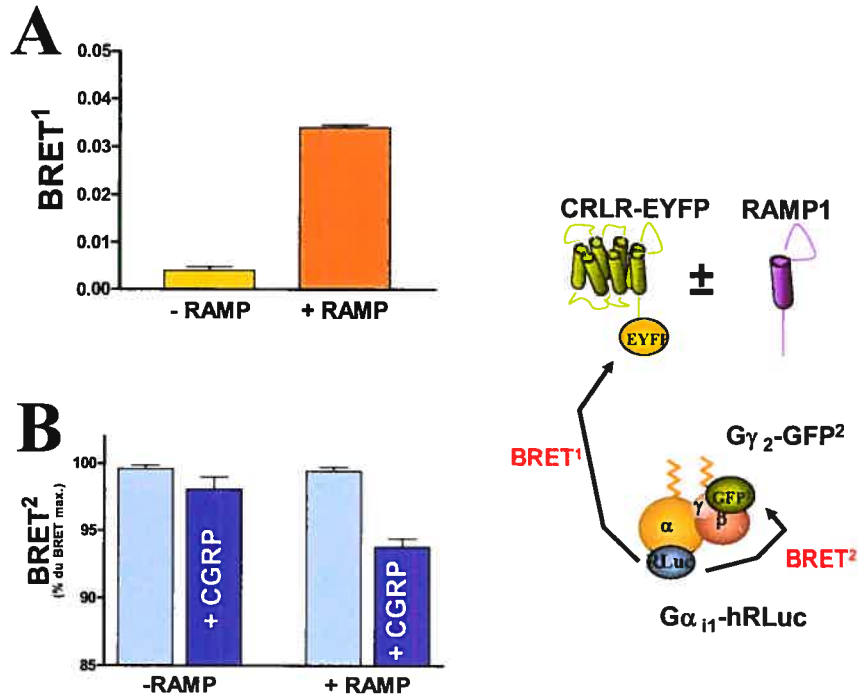


Figure 23: Modulation de l'interaction entre $G\alpha$ et $G\gamma$ par l'activation du récepteur CRLR en présence ou non de RAMP1.

Des cellules HEK293t ont été transfectées par la méthode PEI avec une quantité constante des trois sous unités de la protéine G (40 ng de $G\alpha_{11}$ -hRLuc, 100 ng de $G\beta$ et 100 ng $G\gamma$ -GFP²), de 200 ng de CRLR-EYFP en présence ou non de 200 ng de RAMP1 natif. A) Mesure de l'interaction entre le récepteur CRLR-EYFP et $G\alpha_{11}$ -hRLuc en BRET¹. B) Effet de la stimulation du récepteur CRLR par 10 μ M de CGRP sur la modulation de l'interaction au sein de la protéine G en BRET². Résultats représentatifs de deux expériences différentes réalisées en triplicata (\pm SEM).

Ces résultats semblent indiquer que précocement après la biosynthèse dans le RE, le récepteur CRLR semble avoir une pré-association avec les sous-unités $G\beta\gamma$. Cette interaction ne nécessite pas la présence de RAMP. En présence de RAMP, le complexe récepteur-RAMP- $G\beta\gamma$ peut être transporté au Golgi là où ils sont colocalisés avec la $G\alpha$ permettant la formation du complexe pentamérique CRLR-RAMP- $G\alpha\beta\gamma$ pour enfin être exporté à la membrane plasmique où ils peuvent interagir avec leur ligand le CGRP. Ceci demeure un modèle théorique qui demande à être confirmé par des expériences supplémentaires.

Chapitre IV : Discussion

Une des buts principale de ce présent travail était de mettre au point un technique permettant le mesure d'interaction entre les récepteurs RCPG et les sous unités de la protéine G dans un carte cellulaire. Les co-immunoprécipitations, les buvardages de type far-Western et le deux hydride ne possèdent pas les caractéristiques recherchées pour cette étude. Aucune de ces trois techniques ne permet la mesure t'interaction protéique en cellules vivantes de façon quantitative, mais également ces techniques ne peuvent pas mesurer des interactions protéiques en temps réel avec des cinétiques de l'ordre du milliseconde. De par leurs caractéristiques, les techniques de transfert d'énergie, tel le BRET et le FRET, représentent une alternative aux méthodes utilisées classiquement en biochimie. Actuellement, le déficit n'est plus de mesurer des interactions entre deux protéines, mais de suivre plusieurs interactions différentes en même temps. Pour ce faire nous proposons l'utilisation concomitante des deux générations de BRET ainsi que du FRET (GFP²-EYFP) dans un seul essai.

Innovation dans le BRET

Les interactions protéiques représentent un domaine important d'étude en biochimie actuellement. L'élaboration de méthodes sensibles et faciles d'utilisation ouvre des portes sur l'explication des mécanismes mis en branle par la cellule pour maintenir son homéostasie et les fonctions cellulaires. Les méthodes de transfert d'énergie tel le BRET et le FRET servent à étudier ces interactions protéiques en temps réel dans un cadre cellulaire. De plus, le FRET permet de localiser ces interactions au sein de la cellule lorsque couplé à la microscopie confocale. Le défi actuel n'est plus de mesurer l'interaction entre deux protéines, mais de mettre au point des techniques servant à suivre l'évolution des interactions protéiques à multiples partenaires. En reliant la puissance des deux générations de BRET ainsi que du FRET, nous avons pu démontrer dans ce mémoire qu'il est possible de détecter ces interactions entre plusieurs protéines. En effet, la cumulation des deux générations de BRET dans la même expérience a permis de suivre la formation d'un hétérodimère GABA_BR1 et GABA_BR2 en même temps que la formation d'un complexe avec la protéine G. L'utilisation combinée de ces trois techniques ouvre des possibilités quant à l'étude des interactions spatio-temporelles de

différentes protéines régulatrices de l'activité des RCPG. Par exemple, selon le modèle de désensibilisation du récepteur, suite à la liaison d'un agoniste, ce dernier est phosphorylé, puis internalisé. Différentes protéines se succèdent durant ce mécanisme de désensibilisation. Avec l'utilisation des deux générations de BRET, il serait possible de mesurer l'arrivée des différents régulateurs et leur impact sur l'interaction des protéines fixées préalablement.

Les méthodes de transfert d'énergie tel le FRET et le BRET ont permises de transformer le domaine des RCPG en permettant l'étude de l'oligomérisation. L'utilisation concomitante des deux générations de BRET dans un seul essai, nous permet d'aller encore plus loin en suivant trois interactions différentes via le BRET¹, le BRET² et le FRET (GFP²-EYFP). Chacune de ces techniques, le BRET et le FRET, ont la capacité de suivre en temps réel les interactions protéiques (Pfleger et Eidne, 2005). Cette caractéristique nous a permis de comparer les cinétiques d'apparition d'interactions entre le récepteur du GABA et la sous unité alpha de la protéine G en BRET¹ et BRET² (voir figure 16), mais également la formation de dimère de récepteurs entre GABA_BR1 et GABA_BR2 en FRET. Nous avons conclu de ces résultats que l'apparition d'interaction de chacun des récepteurs de l'hétérodimère avec la protéine G se produisait en même temps que la formation de cet hétérodimère. Contrairement au FRET, le BRET ne permet pas de localiser les interactions protéiques en condition de cellules vivantes (Pfleger et Eidne, 2005). Pour les interactions entre le récepteur CRLR et la sous unité gamma de la protéine G, le BRET mesuré sans la coexpression de RAMP permet de supposer que cette interaction se produit dans le réticulum endoplasmique (RE). Sans la présence de RAMP le récepteur CRLR est incapable de sortir du RE. Afin de pouvoir confirmer ce résultats de BRET entre le récepteur CRLR et la sous unité gamma de la protéine G nous prévoyons l'utilisation de la microscopie-FRET.

D'autres techniques récemment mises au point, ont également comme but d'étudier l'interaction entre protéines. Le PCA, ou essai de complémentation protéique, en est un bon exemple. Cette technique est basée, comme son nom l'indique, sur la reconstitution de l'activité d'une protéine scindée en deux portions puis fusionnées à des protéines d'intérêts. Lorsque les protéines d'intérêt interagissent, le rapporteur est reconstitué et

retrouve son activité, puis émet un signal mesurable (Galarneau et al, 2002). Les rapporteurs généralement utilisés pour le PCA sont des enzymes tel la β -lactamase (Galarneau et al, 2002). ou la luciférase (Paulmurugan et Gambhir 2003), mais également il est possible d'utiliser la GFP (Hu *et al*, 2002. Par conséquent, le couplage de cette technique avec le BRET pourrait générer un outil très puissant pour mesurer la formation de complexe à plusieurs partenaires. Pour ce faire, la luciférase serait scindée en deux (Paulmurugan et Gambhir 2003) et chacune des parties serait fusionnée à deux protéines différentes, et finalement la GFP serait fusionné à une troisième protéine. La co-expression des trois constructions dans des cellules donnerait la possibilité de suivre la formation d'un complexe multiprotéique. L'apparition de luminescence serait le résultat de la complémentation de la luciférase dû à l'interaction des protéines étudiées, tandis que le transfert d'énergie à la GFP témoignerait de l'interaction des deux protéines fusionnées aux fragments de luciférase avec la protéine fusionnée à la GFP. L'avantage de cette nouvelle approche sera de ne plus avoir de signal croisé dû aux substrats tel qu'observé dans le cas d'utilisation des deux générations BRET en même temps, car dans le couplage du PCA avec le BRET un seul substrat pour la luciférase sera utilisé. Un autre avantage est que seul l'interaction des trois protéines étudiées donnerait du signal BRET, car l'interaction entre une seule des deux protéines fusionnées aux fragments de la luciférase et la protéine fusionnée à la GFP serait dans l'impossibilité de transférer de l'énergie. Ceci n'est pas toujours le cas lors de l'utilisation des deux générations de BRET. Il est possible d'imaginer que les trois protéines n'interagissent pas à l'intérieur d'un même complexe pour avoir un signal dans chacune des deux générations de BRET ainsi que du FRET. Dans ce contexte, il est facile d'imaginer un transfert d'énergie entre la luciférase et la EYFP sans que le GFP² soit présente et vice-versa. En d'autres termes, le jumelage des deux générations permet de mesurer trois interactions différentes en même temps sans que ces interactions soient dépendante l'une de l'autre. Dans le cas présenté dans ce mémoire, l'interaction de la protéine G avec le récepteur du GABA est dépendante de la formation de l'hétérodimère GABA_BR1b/GABA_BR2, donc l'utilisation des deux générations est possible et témoigne de la formation de complexes de signalisation (signalosomes).

Malgré le fait que le BRET est un outil puissant, cette technique possède des limites. Une de ces limites est que nous devons travailler avec des protéines de fusion dans des systèmes d'expression hétérologue tel les cellules HEK293. Le désavantage de cette approche est que la surexpression de ces protéines de fusion peut changer le comportement de la protéine d'intérêt en altérant sa localisation, la demi-vie, les cinétiques d'interaction et autres. De plus, cette technique est difficilement adaptable pour des études d'interaction protéique dans un contexte d'organiste entier. Afin de confirmer les résultats obtenus, il serait possible de faire des co-immunoprécipitations entre les récepteurs et les protéines G similaire à ceux effectuées par le groupe de Davies (Little *et al*, 2004), mais avec les différents sous unités du récepteur du GABA par l'utilisation d'anticorps spécifiques pour chacun. Ces expériences seraient effectuées sur des neurones de souris natives pour ainsi voir s'il est possible d'immunoprécipiter des protéines G hétérotrimériques. En parallèle, il serait possible de faire des co-immunoprécipitations sur des neurones de souris qui n'exprime plus (souris knockout) GABA_BR1 (Brown *et al*, 2003) ou GABA_BR2 (Gassmann *et al*, 2004) et voir s'il est toujours possible de suivre des interactions entre le co-récepteur restant et des protéines G hétérotrimériques. Les avantages de cette méthode seraient de suivre des interactions protéiques au sein d'un tissu ainsi que suivre ces interactions avec les protéines G hétérotrimériques natives. Par contre, les désavantages sont nombreux, dont la mise au point des conditions de co-immunoprécipitations permettant de suivre les interactions récepteur-protéine G et à la lumière de ces résultats, il serait toujours possible de croire que ces interactions soient non spécifiques et dues à la lyse des cellules. Comme aucune technique n'est parfaite, l'utilisation de plusieurs techniques différentes pourraient permettre d'être plus confiant des résultats obtenus.

Dimère de récepteur : comme unité de fixation de la protéine G hétérotrimérique

La dimérisation des RCPG est un concept qui existe depuis un certain nombre d'années et l'existence de récepteur sous forme de dimère n'est plus à démontrer comme le montre le nombre important de publications parus au cours de cinq dernières années. Ces

publications démontrent l'existence de dimère de récepteurs en utilisant une pléiade de techniques biochimiques, dont la technique de transfert d'énergie (BRET). Cependant, le rôle de cette dimérisation des récepteurs demeure toujours sans réponse à ce jour. Une des utilités de la dimérisation pourrait être relié avec son activité, qui dépendrait de cette dimérisation. Par exemple, il est généralement accepté que les récepteurs tyrosine kinase, récepteurs à un seul passage transmembranaire, dimérisent suite à leur activation par un agoniste (Thiery JP, Chopin, 1999). Cette dimérisation favorise une auto-phosphorylation de la portion C-terminale de chacun des récepteurs et ainsi permet le recrutement de diverses autres protéines, tel que les protéines de la famille src, pour permettre la signalisation (Thiery JP, Chopin, 1999). Il est donc concevable que la dimérisation des RCPG soit nécessaire pour certaines de leurs fonctions cellulaires, par exemple leur interaction avec la protéine G.

Les résultats du présent mémoire ont révélés que le récepteur GABA_BR1b seul n'a pas la capacité de fixer la protéine G, mais en présence de GABA_BR2, un signal BRET entre la protéine G et GABA_BR1b est mesurable. Également, GABA_BR2 ne peut avoir de signal BRET spécifique sans la présence de son co-récepteur GABA_BR1b. La formation d'un hétérodimère GABA_BR1b/GABA_BR2 crée ainsi une unité permettant la fixation et l'activation de la protéine G. C'est la première fois que des résultats expérimentaux montre la nécessité d'avoir un dimère de récepteur pour son interaction avec une protéine G. Selon le groupe de Palczewski, le ratio d'un protomère de rhodopsine et d'une protéine G hétérotrimérique ne serait pas compatible avec les observations effectuées sur les structures 3D respectives (Filipek *et al*, 2004). Ils ont remarqué que l'unité minimale permettant l'ancrage simultané de G α et de G $\beta\gamma$ était un dimère de récepteur. Ainsi, la formation du dimère créerait un site de liaison pour la protéine G hétérotrimérique. Les travaux du groupe de Palczewski ont montré que l'activation de la protéine G requiert un dimère de récepteur (Filipek *et al*, 2004), ce qui est également ressorti des résultats obtenus dans ce présent mémoire. Dans le contexte du récepteur GABA, il est évident que l'hétérodimérisation de ce récepteur est essentiel à sa signalisation tel que démontré à plusieurs reprises dans la littérature. Non seulement cette activation de la protéine G dépend de la présence des deux récepteurs du GABA, mais l'interaction de la protéine G semble également dépendre de cette formation de complexe GABA_BR1/GABA_BR2.

Afin de nous permettre de généraliser cette dépendance de la formation de dimère pour l'interaction de la protéine G, il serait important de le démontrer pour une gamme de récepteur homodimérique et hétérodimérique. Ce type d'expérience est présentement difficile à réaliser pour des homodimères, car un homodimère est formé de deux protéines identiques et, par conséquent, il n'est pas possible de différencier une interaction entre un récepteur unique avec la protéine G ou un dimère de récepteur par les techniques actuelles. L'utilisation simultanée, par exemple, du PCA et du BRET ne nous donnerait pas plus d'information sur la nécessité d'un dimère. Dans ces expériences, on pourrait imaginer la fusion de chacune des parties de la GFP sur des récepteurs β 2-AR indépendants ainsi que la luciférase sur la protéine G. La reconstitution de la GFP par la dimérisation du récepteur permettrait un transfert d'énergie avec la protéine G. Cependant, cette expérience ne nous indiquerait pas si cette dimérisation est essentielle au fonctionnement du récepteur, car il est possible d'imaginer que la co-expression d'un seul des deux récepteurs avec la protéine G pourrait activer celle-ci sans qu'il y ait transfert d'énergie entre récepteur/protéine G. En d'autres termes, il serait important de trouver un modèle de récepteur, ou des mutants de récepteur, avec lequel nous pourrions modifier la dimérisation via un traitement extérieur, soit via la température ou via l'addition des molécules qui induiraient cette dimérisation.

Le récepteur du GABA possède les caractéristiques nécessaires permettant cette étude de dépendance de la dimérisation des récepteurs pour l'interaction avec la protéine G. Le récepteur GABA_BR1 est l'unité qui fixe les agonistes, mais il ne peut transmettre une signalisation sans son co-récepteur. La mutation RSRR en ASAR du site de rétention dans le RE de GABA_BR1 induit une relocalisation du récepteur à la membrane plasmique. Malgré cette distribution à la surface cellulaire, le mutant ASAR de GABA_BR1 est incapable d'induire une signalisation par l'addition de GABA (Pagano *et al*, 2001). Cette signalisation est rétablie lors de la co-expression de GABA_BR2 avec le mutant GABA_BR1. Un autre groupe a effectué des mutations dans le site d'interaction entre GABA_BR1/GABA_BR2 en plus de la mutation du site de rétention dans le RE. Ce récepteur GABA_BR1 double mutant possède toujours la capacité de transiter vers la membrane plasmique, mais il est incapable cette fois de produire de signalisation même

en présence de GABA_BR2 (Margeta-Mitrovic *et al*, 2000). Ces résultats permettent de conclure que GABA_BR1 comme entité indépendante n'est pas en mesure d'activer la protéine G. De son côté, lors que exprimé seul en cellule, le récepteur GABA_BR2 est incapable de produire une réponse cellulaire, car GABA_BR2 est incapable de lier les agonistes naturelles. Le récepteur GABA_BR2 représente l'unité fonctionnelle pour l'activité d'échange du nucléotide de la protéine G, car des mutants des boucles cytoplasmiques de GABA_BR2 empêche l'activation de la protéine G. L'hypothèse qui est ressortie de ces résultats est que l'hétérodimérisation semble essentiel pour l'activation de la protéine G (Margeta-Mitrovic *et al*, 2000). Cette activation de la protéine G se produit par une trans activation entre les deux récepteurs, où GABA_BR1, suite à la fixation de GABA dans son domaine 'Venus Flytrap', peut stimule l'activité facteur d'échange du récepteur GABA_BR2 qui fixe la protéine G ainsi permettant la l'activation de cette dernière.

Les résultats de ce présent mémoire indiquent que l'activité facteur d'échange du GDP du récepteur GABA_BR2 ne semble pas nécessaire pour l'interaction avec la protéine G (voir figure 21) puisque des récepteurs GABA_BR2 mutants pour cette activité ont montré une habileté similaire au récepteur GABA_BR2 natif pour l'interaction avec la protéine G. Seul la formation de l'hétérodimère GABA_BR1/GABA_BR2 semble requise pour la formation d'une interaction spécifique entre la protéine G et le récepteur du GABA. Finalement, l'interaction avec la protéine G semble constitutive, car aucune modulation de cette interaction n'a été mesurée suite à l'addition de l'agoniste GABA. En BRET, l'addition d'un agoniste module l'interaction du récepteur avec la protéine G, pour la majorité des récepteurs analysés (Gales *et al*, 2005). Cette modulation de signal peut être expliquée soit par un recrutement de la protéine G au récepteur ou par un changement de conformation des protéines au sein d'un complexe de signalisation préformé.

Modulation du signal BRET dans l'interaction protéine G/Récepteur

Le BRET est une technique puissante utilisée pour mesurer des interactions protéiques dans un contexte cellulaire. Depuis son utilisation pour mesurer la formation de dimères du récepteur β_2 -adrénergique dans le laboratoire du Dr Bouvier, cette technique a extrêmement évoluée. En plus de mesurer la dimérisation, le BRET jauge les interactions

en temps réel en réponse à des stimuli. Le premier exemple de cette modulation est le recrutement de la β -arrestine au récepteur. Après sa découverte par le groupe de Lefkowitz, la β -arrestine a bien été caractérisée et a démontré une affinité accrue pour les RCPG suite à activation de ces dernières (Lohse *et al*, 1990). En BRET, il est facile de suivre en temps réel la fixation de la β -arrestine sur un RCPG après l'addition de l'agoniste. Au départ, aucune interaction entre les deux protéines n'est mesurée et l'addition d'un agoniste spécifique au récepteur recrute la β -arrestine au récepteur, ce qui produit un signal BRET. Ceci représente le premier exemple concret de modulation d'un signal BRET entre deux interacteurs et ouvre la porte à l'utilisation de cette technique pour l'étude de d'autres protéines interagissant avec les RCPG.

Très rapidement l'utilisation du BRET pour mesurer des interactions entre des récepteurs et la protéine G hétérotrimérique est devenue une priorité. La génération d'un complexe entre la protéine G et le récepteur a été très étudié depuis la découverte de cette protéine par Gilman. Selon le modèle qui découle de ces travaux, le récepteur recrute l'hétérotrimère de la protéine G et favorise l'échange du GDP pour du GTP. Une fois lié au GTP, l'hétérotrimère se scinde en deux portions, soit le $G\alpha$ -GTP et le dimère $G\beta\gamma$, qui iront par la suite activer différents effecteurs cellulaires (Gilman, 1987). A l'état basal, l'interaction entre les RCPG et la protéine G serait en équilibre entre une forme liée et non liée, et cet équilibre changerait en présence d'un agoniste pour favoriser la forme liée suite à l'induction un changement de conformation sur le récepteur. Lorsque mesuré par la technique du BRET, un signal de base et une augmentation dépendante de la dose devrait donc être observée en fonction de l'augmentation de la concentration d'agoniste ajoutée. En exploitant la technique du BRET, l'étude d'interaction entre la protéine G et les RCPG, utilisant les récepteurs β_2 -adrénergique (Gales *et al*, 2005) ou vasopressine de type 2 (voir figure 18) a révélé que la protéine G pouvait interagir directement sans la présence d'un agoniste et que la présence d'un agoniste augmentait le signal BRET, ce qui va dans le sens du modèle classique d'activation de la protéine G.

Par contre, les résultats qui ont permis l'élaboration du modèle classique ont été obtenus par des expériences *in vitro* ou par reconstitution de membranes, donc en dehors d'un

contexte physiologique normal (Gilman, 1987). Certaines nouvelles données obtenues en cellules vivantes soulèvent toutefois un doute sur la validité de ce modèle (Gales *et al*, 2005). Une autre explication pourrait élucider ces modulations du signal BRET mesuré entre le récepteur et la protéine G. Le récepteur serait en interaction avec la protéine G à l'état inactif et un simple changement de conformation provoqué par la fixation d'un agoniste rendrait possible l'activation de la protéine G. Tout comme pour l'explication par le modèle classique, un signal BRET serait mesuré à l'état de base et une agoniste produirait un changement de conformation qui orienterait différemment les rapporteurs, ce qui modulerait le signal BRET. Basé sur ces spéculations, il est possible d'imaginer qu'un changement de conformation du récepteur pourrait induire les modulations obtenues en BRET.

Le groupe de Palczewski travaillant sur le récepteur rhodopsine a établi que ce récepteur était sous forme de dimère dans les membranes natives de la rétine en utilisant la microscopie à force atomique (Fotiadis, 2003). Également, ils ont montré que lorsqu'un protomère de rhodopsine est activé, les sept passages transmembranaires de ce protomère subissent un changement de conformation et passe l'information de l'activation/inactivation au second protomère du dimère (Filipek *et al*, 2004). Par la suite, ils ont établi, à partir de calculs sur les structures cristallographiques du récepteur rhodopsine et de l'hétérorimère Gt, que la surface de contact ainsi que l'énergie interne du complexe ne favorisent pas une interaction directe entre de la protéine G et le récepteur à l'état de base. La pénétration incomplète de la région C-terminal de la sous unité G α t au sein d'un protomère conduit à éliminer le contact entre le N-terminal du même G α t avec l'autre protomère du dimère de récepteur inactif. Cependant, lorsqu'une unité de rhodopsine est activée dans le dimère, une complémentarité entre le N-terminal de G α t et le protomère inactif est maintenant envisageable (Filipek *et al*, 2004). Les travaux du groupe de Palczewski ne réfutent pas la possibilité d'une proximité de la protéine G avec un récepteur à l'état basal, mais montrent que l'interaction directe entre les deux protéines requière un changement de conformation du récepteur ainsi que l'activation de la protéine G requiert un dimère de récepteur (Filipek *et al*, 2004). Il est possible d'imaginer que la protéine G soit près du récepteur et que l'activation d'un

protomère réoriente le complexe, ce qui expliquerait la modulation positive du signal BRET mesuré pour le récepteur V2 et β 2adrénergique. Par contre, il est difficile de distinguer entre un recrutement de la protéine G versus un changement de conformation à l'intérieur d'un complexe de signalisation, pour expliquer le changement de signal BRET mesuré suite à la stimulation de ces deux récepteurs. Afin de pouvoir conclure sur la contribution du recrutement versus un changement de conformation qui serait responsable de cette modulation du signal BRET, il est important de pouvoir éliminer un des deux facteurs. Dans le but d'éliminer l'impacte du changement de conformation, l'utilisation d'un récepteur où ce changement de conformation ne se répercutera pas sur toute la structure du récepteur. Le récepteur du GABA semble un bon modèle, car le C-terminale de ce récepteur est relativement plus long que la majorité des autres récepteurs.

Distance entre le C-terminal et la protéine G comme explication de non modulation du signal BRET entre le récepteur du GABA et la protéine G

Le BRET est la résultante du transfert d'énergie entre la luciférase et la GFP. La distance entre les rapporteurs figure comme l'un des principaux facteurs influençant le transfert d'énergie. La courbe de la figure 24 représente le signal BRET obtenu en fonction de la distance entre les protéines qui génèrent ce BRET. La courbe prend l'allure d'une sigmoïde où, plus la distance est grande, moins le signal BRET est élevé. La sigmoïde se divise en trois parties, soit deux régions plateaux à chacune des extrémités et une région linéaire entre ces deux plateaux. Lorsque l'espacement entre des protéines qui produisent des signaux BRET se situe dans la portion linéaire de la courbe, un faible changement de distance entre ces protéines modulera grandement le transfert d'énergie. Par contre, lorsque les interactions produisant des signaux BRET sont situées dans les extrémités, un changement de distance même significatif ne produira pas de changement mesurable dans le signal BRET mesuré (voir figure 24, encadré rouge). Dans le cas de la modulation de l'interaction entre le récepteur V₂R-EYFP et la sous unité G γ -hRLuc par l'AVP (voir figure 18), il est possible d'expliquer le changement de BRET par un recrutement de la protéine G au récepteur. Il est également possible d'attribuer ce changement de BRET à un changement de conformation dans un pré-complexe récepteur/protéine G. Ces

protéines semblent interagir à l'état basal et l'addition du ligand change la conformation du récepteur, ce qui modulera la distance entre sa portion C-terminal (fusionnée à l'accepteur) et la protéine G (fusionné au donneur). L'espacement à l'état de base entre le récepteur et la protéine G permet d'avoir une distance qui se situe dans la portion linéaire, ce qui permet de voir cette modulation de signal BRET par un agoniste.

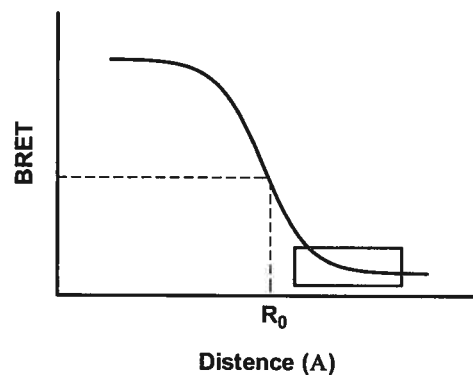


Figure 24: Courbe théorique de l'effet du transfert d'énergie BRET en fonction de la distance entre deux partenaires.

L'analyse des résultats obtenus pour l'interaction entre les récepteurs du GABA et la protéine G laisse croire que le phénomène de distance pourrait expliquer pourquoi l'addition d'un agoniste ne module pas le signal BRET. Plusieurs études attribuent les boucles internes du récepteur GABA_BR2 comme étant la cible de liaison pour la protéine G (Duthey *et al*, 2002). Les récepteurs du GABA ont la caractéristique d'avoir une queue C-terminal très longue, soit environ 200 acides aminés. L'addition de résidus dans une chaîne d'acide aminé augmente la longueur de la chaîne d'environ 1,5Å par résidu soit presque 300Å pour la queue C-terminal complète des récepteurs du GABA. Évidemment, ces queues ne sont pas linéaires et les structures secondaires et tertiaires peuvent diminuer cette distance. Toutefois, le fait de mettre un rapporteur à la fin de la queue C-terminal du récepteur du GABA augmente la distance de ce rapporteur du domaine d'interaction de la protéine G comparativement aux récepteur β₂AR ou V₂R qui ont des

queues C-terminal beaucoup plus courtes. Sur la figure 24, le rectangle rouge représente la région de la courbe où devrait être retrouvé les signaux de BRET mesurés pour une distance relativement importante entre les partenaires de BRET. Tel qu'expliqué précédemment, cette région est caractérisée par un faible transfert d'énergie et une variation de signal BRET en fonction de la distance peu importante. Il serait donc possible d'attribuer le faible niveau de signal BRET obtenu pour l'interaction entre les récepteurs du GABA et la protéine G à la longueur de la portion C-terminale des récepteurs.

D'autres explications peuvent également être mises de l'avant pour expliquer ce faible niveau de signal BRET. Certaines protéines ont la capacité de lier les portions C-terminales des récepteurs du GABA. Par exemple, pour GABA_BR1, les protéines ATF-4, 14-3-3 et Marlin-1 démontre une interaction pour différente région de la queue C-terminale de ce récepteur (Couve *et al*, 2004). Pour GABA_BR2, les protéines MUPP-1, CHOP, NSF et β -filamin semble pouvoir interagir avec la région C-terminal de ce récepteur (Couve *et al*, 2004). Ces diverses protéines pourraient diminuer le transfert d'énergie entre la GFP en C-terminal des récepteurs du GABA et la luciférase fusionnée à la protéine G en en altérant le transfert d'énergie entre les rapporteurs. Finalement, le changement de conformation des récepteurs du GABA pourrait ne pas moduler la distance entre la fin du domaine C-terminal et la protéine G. Le modèle d'activation du récepteur du GABA est bien caractérisé. Les domaines extracellulaires du récepteur GABA présentent une structure cristallographique en forme de 'Venus-flytrap', lorsque inactif la portion N-ternimal de GABA_BR1 et GABA_BR2 est en position ouverte. La présence de GABA dans la pochette de liaison sur GABA_BR1 produit une fermeture du domaine 'flytrap', ce qui engendre un glissement des deux domaines transmembranaires des récepteurs l'un vers l'autre. Du coup, ce glissement pourrait activer la protéine G sans moduler la distance de cette dernière et la portion C-terminal du récepteur.

Afin d'éliminer les différentes possibilités pouvant explique l'absence de modulation du signal BRET entre la protéine G et le récepteur du GABA, la construction d'un récepteur avec un rapporteur dans une position différente pourrait être utilisée. Dans leur étude du réarrangement du dimère de récepteurs au glutamate de type 1 (mGluR1), Tateyama et al.

(Tateyama *et al*, 2004) ont construit des récepteurs avec des GFP dans les trois boucles internes. À la lumière de leurs résultats, ils ont conclu que les boucles i1 et i2 peuvent recevoir une GFP, alors que la boucle i3 ne peut recevoir la GFP car le récepteur ne semble plus fonctionnel. Ils ont également construit des récepteurs possédant une ECFP en C-terminal et un EYFP dans l'une ou l'autre des boucles (i1 et i2) et ont démontré la possibilité de mesurer du FRET intramoléculaire (Tateyama *et al*, 2004). Cependant, ce signal FRET n'était pas modulable par la présence d'agoniste. Les récepteurs mGlu et GABA font parti de la même famille et ils possèdent tous deux un C-terminal très long. Ces résultats obtenus avec le récepteur mGlu vont dans le même sens que ceux obtenus dans le présent mémoire, car le changement de conformation du récepteur par la présence du ligand ne semble pas affecter la conformation du C-terminal ni même rapprocher le C-terminal des boucles du récepteur (Tateyama *et al*, 2004). Par conséquent, la construction de récepteur du GABA avec une GFP dans les boucles internes pourrait possiblement permettre de mesurer un BRET de base avec la protéine G ainsi qu'une modulation de cette interaction en présence de ligands.

Dans une autre étude, ils ont construit des récepteurs doublement marqués avec deux GFP pour mesurer un signal FRET intramoléculaire (Vilardaga *et al*, 2003). Les récepteurs α_{2A} -adrénergique (α_{2A} -AR) de la classe I et l'hormone parathyroïde (PTHrP) de la classe II ont été fusionnés avec la ECFP dans la boucle interne i3 et en C-terminal par la EYFP. Contrairement au récepteur mGluR1 double GFP, α_{2A} -AR et PTHrP ont la capacité de moduler le signal de base par la présence d'agoniste alors que le signal FRET reste inchangé en présence d'antagoniste. Ceci suppose que la longueur du C-terminal peut avoir une influence directe sur les résultats obtenus en FRET, mais également lorsque le BRET est utilisé, puisque ces deux techniques sont très similaires.

Peu importe la raison réelle qui explique l'absence de modulation de signal BRET entre le récepteur du GABA et la protéine G, la résultante de cet effet est la même, soit de ne pas permettre un changement de distance entre les rapporteurs du signal BRET, donc pas de modulation de signal. Ce qui, à première vue, peut sembler un problème technique, est en réalité le meilleur argument pour prouver que le changement de conformation du

récepteur joue un rôle majeur dans la modulation du signal BRET en présence d'un agoniste. Dans le contexte du récepteur GABA, comme la distance entre le site d'interaction avec la protéine G heterotrimérique (les boucles cytoplasmiques Chang *et al*, 2000 ou le portion C-terminal Blahos *et al*, 1998) est éloigné du site de liaison de l'accepteur d'énergie pour le BRET (fin de la queue C-terminal des récepteurs), il est possible d'imaginer que la distance entre les rapporteurs du signal BRET se situe dans la portion représenté en rouge sur la figure 24, soit vers la fin de la courbe sigmoïde. Dans cette région, tel que mentionné précédemment, un changement de distance entre les rapporteurs de transfert d'énergie ne module pas le signal BRET mesuré.

Replaçons nous dans le contexte où une protéine G serait recrutée suite à l'activation du récepteur. Selon le modèle classique, une proportion des récepteurs est en interaction avec la protéine G et l'autre partie est exempte de protéine G à l'état de base (en absence d'agoniste). Nous devrions donc obtenir un signal BRET qui correspond au rapprochement de la luciférase et de la GFP pour la faible proportion de la population de récepteur lié à une protéine G. En d'autre terme, une faible proportion des protéines G se trouve a une distance connue donc à proximité du récepteur et le reste des protéines G se trouve à une distance infinie du récepteur, donc incapable de générer un transfert d'énergie. L'addition d'un agoniste change le rapport entre les populations de protéine G à une distance connue (lié au récepteur) et celle qui est à une distance infinie en faveur de la population où la distance est connue. Ce qui rapproche de nouvelles protéines G des récepteurs et forme de nouvelles interactions. La présence d'un agoniste sur le récepteur devrait créer un recrutement de la protéine G et le rapprochement de nouvelles protéines G au récepteur devrait se refléter par l'augmentation du signal BRET mesuré. Pour le récepteur du GABA, la présence d'un agoniste ne modifie pas le signal BRET mesuré. Par conséquent, il ne semble pas y avoir de formation complexe récepteur-protéine G supplémentaire. Dans ce contexte, il est difficile de réconcilier ces résultats avec le modèle classique d'activation de la protéine G, où la formation de nouveaux complexes augmenterait le signal BRET. Ce résultat argumente donc plutôt pour un changement au sein d'un pré-complexe de signalisation suite à la stimulation d'un récepteur par un agoniste.

Un deuxième argument vient soutenir l'hypothèse de changement de conformation du récepteur. Cet argument vient de l'analyse des courbes de titrations obtenues avec le récepteur V2 en présence et en absence d'un agoniste. Théoriquement, ce type de courbe nous permet de calculer l'affinité relative entre deux protéines en mesurant le BRET₅₀ (valeur de GFP/Luc obtenu à 50% du signal BRET maximal mesuré). Comme les deux courbes proviennent des mêmes populations cellulaires, seul l'addition ou non d'un agoniste différencie les deux conditions, il est possible de comparer directement les BRET₅₀ obtenus. Pour le cas de l'effet d'agoniste du récepteur V2 (voir figure 18), les BRET₅₀ mesurés sont similaires pour les deux conditions (en présence ou non d'AVP). Pour un recrutement de la protéine G, nous nous serions attendu à voir un déplacement du BRET₅₀ vers la gauche en présence d'agoniste, reflétant une augmentation d'affinité du récepteur pour la protéine G. Ceci n'est pas le cas pour l'interaction de la protéine G avec le récepteur V2.

En plus de nécessiter la formation d'un dimère, l'interaction de la protéine G semble être constitutive sans stimulation du récepteur. Si l'addition d'un agoniste n'est pas le moteur de la formation d'une interaction entre la protéine G hétérodimérique et le récepteur, cette interaction doit être pré-formée quelque part dans la cellule. La question naissant de ces résultats est, où peut bien être formée ce complexe de signalisation constitué de récepteurs et de protéines G? À la surface cellulaire ou hâtivement lors de la maturation du récepteur?

Interaction précoce entre RCPG et protéine G

En regardant les courbes de titration obtenues pour les interactions entre le récepteur $GABA_B R1b$ et des différentes sous unités de la protéine G, en présence de $GABA_B R2$, il est possible de remarquer une différence significative pour les sous unité $G\gamma$ et $G\beta$ comparativement à la sous unité $G\alpha$ (figure 14 et 15). La différence témoigne d'une interaction différente de ces sous unités avec le récepteur $GABA_B R1b$. Si le récepteur interagissait de la même façon avec les trois sous unités, les courbes de titration entre les récepteur du GABA et les sous unités de la protéine G devraient être comparables.

Pour l'interaction de la sous unité $G\alpha$, la courbe de titration prend la forme d'une courbe de saturation classique en hyperbole. Cette interaction semble dépendre uniquement de l'affinité relative de chacun des protéines pour l'autre. À l'inverse, la courbe de titration entre le récepteur $GABA_B R1b$ et le dimère $G\beta\gamma$ prend la forme d'une sigmoïde et il est possible d'imaginer que leur interaction ne dépend pas uniquement de leur affinité respective, mais qu'un phénomène de coopérativité entre en jeu, comme par exemple la formation d'un hétérodimère $GABA_B R1b/GABA_B R2$. Pour l'instant, les causes de cette courbe en sigmoïde pour l'interaction entre $GABA_B R1$ et le dimère $G\beta\gamma$ ne sont pas clairement établies. Par contre, certaines hypothèses, qui demandent à être vérifiées, peuvent être mises de l'avant. Un modèle classique d'interaction formant une courbe en sigmoïde est l'interaction de l'oxygène sur l'hémoglobine. Cette protéine de transport d'oxygène est en mesure de fixer quatre molécules et cette coopérativité est due à un changement d'affinité de l'hémoglobine provoqué suite à la liaison de la première molécule d'oxygène. La fixation de la première molécule d'oxygène modifie légèrement la structure de la protéine, ce qui favorise l'entrée d'une deuxième molécule d'oxygène, et ainsi de suite. La transposition de ce mécanisme de coopérativité est difficile à faire pour l'interaction du récepteur du GABA avec la protéine G sans introduire certains concepts qui ne sont pas démontrés à ce jour comme par exemple le concept d'oligomère de récepteur. La coopérativité n'est qu'un exemple possible pour expliquer la formation d'une courbe de titration sigmoïde. Toutefois, de cette analyse des courbes de titration de $GABA_B R1b$, il est possible de mettre en évidence une interaction différente des sous

unités de la protéine G (alpha versus beta/gamma) pour le récepteur GABA_BR1, qui pourrait être attribués à des interactions séquentielles.

Selon le modèle établi par le groupe du Dr Philips, les deux sous unités G β et G γ sont traduites dans le cytoplasme, puis, après la prénylation de G γ , le dimère se dirige vers le RE (Michaelson *et al*, 2002). Une fois dans le RE, la maturation de G γ est achevée par une méthylation protéolytique de son C-terminal. Le dimère G $\beta\gamma$ peut alors poursuivre son cheminement vers le Golgi où il interagira avec la sous unité G α . Cette dernière est également synthétisée dans le cytosol, puis acheminée vers le Golgi pour être palmitoylé et/ou myristoylé selon la sous unité. Dans le Golgi, l'hétérotrimère de la protéine G est formé et est prêt à être dirigé à la membrane plasmique.

Comme le protomère GABA_BR1 est retenu au RE lorsque transfecté seul, s'il avait une affinité pour le dimère G $\beta\gamma$, un signal BRET aurait dû être observé, car le dimère G $\beta\gamma$ se retrouve également dans le RE. Comme l'addition de GABA_BR2 change la localisation du récepteur GABA_BR1, nous avons cherché au autre modèle de récepteur qui pouvait être retenu dans le RE et interagir avec le dimère G $\beta\gamma$.

Le récepteur CRLR répond aux mêmes critères que GABA_BR1 en ce qui concerne la nécessité d'un co-récepteur, une protéine à un seul passage transmembranaire (RAMP), pour sa localisation à la membrane plasmique. L'avantage de ce modèle est que la protéine RAMP, même si elle seulement requise pour l'acquisition de la pharmacologie et le transport de CRLR, ne semble pas requise pour l'interaction avec la protéine G. Selon le type de RAMP co-exprimé, CRLR peut devenir un récepteur au peptide CGRP (RAMP1) ou un récepteur au peptide ADM (RAMP2 et RAMP3). La protéine RAMP1 semble être directement impliquée dans l'interaction avec les agonistes, car cette dernière a été liée au peptide CGRP lors d'étude de 'cross-linking'.

Au cours de notre étude de mesure d'interaction précoce entre les RCPG et la protéine G, nous avons remarqué que, selon la co-expression ou non de RAMP, le profil d'interaction entre le récepteur CRLR et la protéine G hétérotrimérique était modifié.

Sans RAMP dans le système, le récepteur CRLR peut interagir avec le dimère $G\beta\gamma$ mais pas avec la sous unité $G\alpha$. Toutefois, la présence de RAMP n'influence pas l'interaction entre le récepteur et de dimère $G\beta\gamma$. Cette observation met en évidence la nécessité de RAMP dans l'interaction de récepteur CRLR avec $G\alpha$ alors qu'il semble non essentiel pour l'interaction avec $G\beta\gamma$.

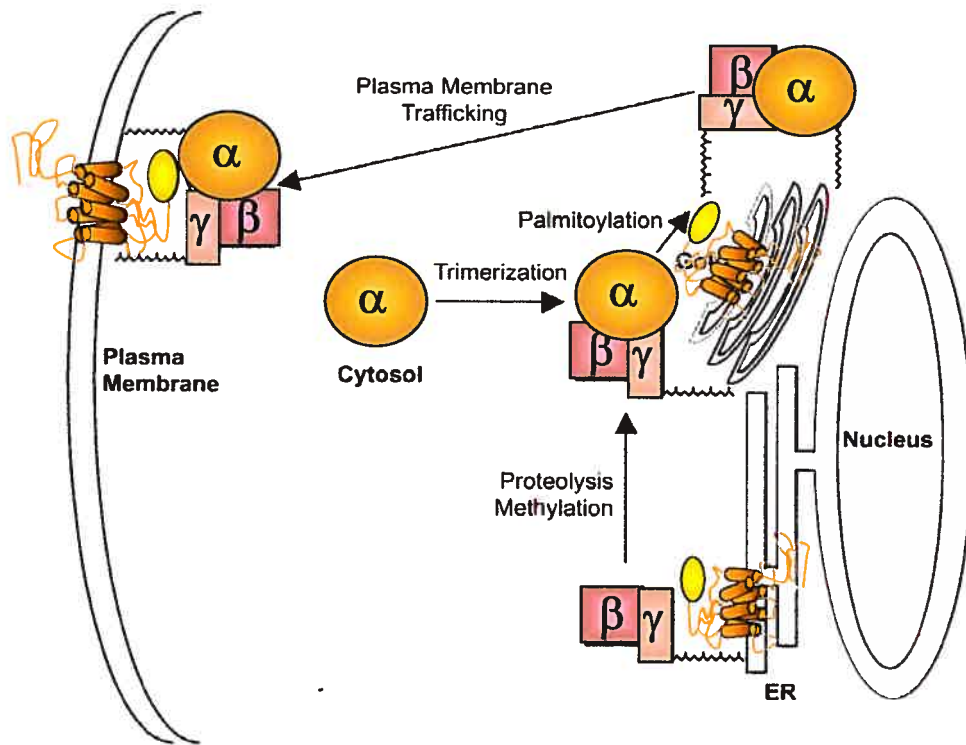
À la lumière de ces résultats, une interaction basale avec le dimère $G\beta\gamma$ semble possible très tôt dans la maturation du récepteur, car sans la présence de RAMP, le récepteur CRLR est retenu dans le RE. Suite à leur synthèse, les sous unité $G\beta\gamma$ sont acheminées vers le RE. Par conséquent, il est possible de retrouver le récepteur ainsi que le dimère $G\beta\gamma$ dans un même compartiment avant d'être expédiés à la membrane plasmique. Du fait que le récepteur est retenu dans le RE, il nous est possible de conclure que la mesure de signal BRET effectuée en l'absence de RAMP provient du ER et que l'interaction récepteur/ $G\beta\gamma$ est précoce.

Ces résultats ouvrent la voie à plusieurs nouvelles questions. Si cette interaction précoce est réelle, quelle est son utilité physiologique? Théoriquement, il est possible de concevoir des modèles qui nécessitent une interaction précoce de la protéine G pour former, avant son acheminement à la membrane plasmique, des complexes de signalisation fonctionnelle spécifique afin que la cellule puisse ajouter un mode de contrôle supplémentaire à la signalisation. Cette interaction précoce de la protéine G pourrait jouer un rôle dans la spécificité d'interaction récepteur-protéine G. Le récepteur rhodopsine active la protéine Gt en présence de lumière. Cette protéine Gt est composé par la sous unité $G\alpha_t$, $G\beta_2$ et $G\gamma_2$. Afin de permettre une signalisation par le récepteur de la rhodopsine, la sous unité $G\beta_2$ peut s'apparier avec $G\gamma_2$, mais elle ne peut pas avec $G\gamma_1$ (Clapham et Neer, 1997). De nombreuses combinaisons de dimère $G\beta\gamma$ sont possibles dues au nombre élevée de sous unités, soit cinq $G\beta$ et douze $G\gamma$. Par contre, toutes ces possibilités ne sont pas physiologiquement viables. Par exemple, pour le récepteur α_2 adrénergique, le dimère $G\beta\gamma$ permettant une signalisation optimal est $G\beta_4\gamma_2$ avec un EC_{50} de 1,3 nM pour un agoniste spécifique. Pour d'autres possibilité de complexe, soit $G\beta_1\gamma_2$,

$G\beta_2\gamma_2$, $G\beta_3\gamma_2$ et $G\beta_5\gamma_2$, les EC_{50} sont de 15,7 nM, 5,7nM, 5,9 nM et 232 nM, respectivement (McIntire *et al*, 2001). Ceci démontre que les différents dimères $G\beta\gamma$ n'ont pas la même capacité à transmettre le signal suite à l'activation d'un récepteur avec le même agoniste. Les changements de conformations induis par des agonistes sur un récepteur ne peuvent être transmis de la même façon selon les sous unités de la protéine G présent dans le complexe. Afin de contrôler ces interactions, il est possible d'imaginer qu'une interaction précoce du dimère $G\beta\gamma$ dans le RE permet une première sélectivité. Par conséquent, seuls les complexes récepteurs-protéine G fonctionnelles pourront poursuivre leur déplacement vers la membrane plasmique et les autres seront retenus dans le RE pour que la protéine G soit remplacé par une autre qui permet une association fonctionnelle. Une notion de contrôle de la qualité peut être ainsi attribuée à cette interaction précoce du récepteur avec la protéine G.

Le récepteur CRLR est retenu dans le RE, sans la présence de RAMP, où l'interaction avec le dimère $G\beta\gamma$ est rendue possible (voir figure 25). Il est possible de spéculer que cette interaction puisse servir de point de contrôle de la maturation des récepteurs. Si un récepteur ne réussit pas à adopter une conformation permissive pour l'interaction avec le dimère $G\beta\gamma$, ce dernier pourrait être identifié hâtivement comme non fonctionnel puis éliminé. Les complexes CRLR-RAMP-dimère $G\beta\gamma$ se dirigent par la suite vers le Golgi. À cet endroit, ils sont en mesure de poursuivre leur maturation en signalosome par une fixation d'une sous unité $G\alpha$ spécifique permettant d'identifier définitivement le complexe récepteur-protéine G comme étant fonctionnel et prêt à être transporté à la membrane plasmique. Bien entendu, ce modèle est purement spéculatif et plusieurs autres expériences devront être entreprises pour le démontrer, mais les résultats présentés avec le récepteur CRLR pointent dans cette direction. Il est difficile d'étudier cette question de contrôle de qualité directement, car des mutants de récepteur avec des défaillances dans leur repliement sont rapidement dégradés, donc de voir leur interaction avec la protéine G semble utopique. Les caractéristiques du récepteur CRLR sont qu'en l'absence de RAMP le récepteur est présente sous la forme dimérique, donc peut effectuer une interaction avec la protéine G, et qu'il est retenu dans le RE. Ces caractéristiques font que ce

récepteur CRLR semble un outil de choix pour la mise en évidence et l'étude de l'interaction précoce des RCPG avec la protéine G.



Adaptation de Mol Biol Cell. 2002 Sep;13(9):3294-302.

Figure 25: Modèle d'interaction précoce entre la protéine G hétérotrimérique et les RCPG

Suite à leur synthèse dans le cytoplasme, le dimère G $\beta\gamma$ est acheminé au réticulum endoplasmique (ER). À cette endroit le récepteur interagi avec le dimère G $\beta\gamma$. Le complexe récepteur-G $\beta\gamma$ peut ensuite quitter le ER pour se diriger vers le Golgi où la sous unité G α rejoint le complexe pour former un nouveau complexe à cinq protéines (un dimère de récepteur plus trois sous unité de la protéine G. Ce complexe récepteur-G α -G $\beta\gamma$ peut finalement être dirigé vers la surface de la cellule.

Conclusion

Les résultats obtenus dans cette étude semblent indiquer que les récepteurs peuvent interagir rapidement dans leur maturation avec la protéine G hétérotrimérique. Également, la dimérisation semble avoir un rôle majeur dans l'élaboration d'une interaction efficace avec la protéine G. Afin de pouvoir conclure que ces interactions précoces mesurées en BRET ainsi que la nécessité de la dimérisation pour l'interaction du récepteur avec la protéine G hétérotrimérique, il sera important de confirmer ces observations par l'élaboration de nouvelles expériences qui viseraient à localiser spécifiquement les premières interactions entre les sous unités de la protéine G et les récepteurs RCPG. Le développement de nouvelles méthodes d'analyse pour l'étude de la formation de complexes protéiques ouvrira la porte à une meilleure compréhension des étapes de régulation de la signalisation par les RCPG. Pour réaliser ces études, le présent mémoire donne une ébauche sur l'utilisation des deux générations de BRET dans un même essai. Les résultats obtenus sont encourageants, mais demandent des investigations supplémentaires. Également, le développement de nouvelles techniques tel que le couplage du PCA avec le BRET augmentera les possibilités d'analyse de complexe à multiples partenaires.

Les résultats obtenus dans cette étude permettent l'étude de la complexité de signalisation des RCPG. Comme mentionné précédemment, les récepteurs ont la capacité d'activer différentes voies de signalisation et ce par divers mécanismes. Le BRET mesuré entre les RCPG et la protéine G, tel qu'illustré dans ce mémoire, et l'utilisation des deux générations de BRET permettront l'élaboration de multiples expériences dans le but de raffiner la compréhension des interactions entre ces partenaires. Par exemple, en introduisant deux sous unités $G\alpha$ différentes en présence d'un RCPG capable d'activer ces protéines $G\alpha$, il serait possible de suivre et de comparer les cinétiques d'activation de chacune des protéines G au cours du temps. Finalement, dans le cas de récepteur orpholin, il serait utile d'utiliser cette méthode de mesure d'interaction de la protéine G pour déterminer le type de signalisation que ces récepteurs peuvent engendrer.

Liste de références

Amico C, Marchetti C, Nobile M, Usai C. Pharmacological types of calcium channels and their modulation by baclofen in cerebellar granules. *J Neurosci.* 1995 Apr;15(4):2839-48.

Angers S, Salahpour A, Joly E, Hilairat S, Chelsky D, Dennis M, Bouvier M. Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Mar 28;97(7):3684-9.

Baneres JL, Parello J. Structure-based analysis of GPCR function: evidence for a novel pentameric assembly between the dimeric leukotriene B4 receptor BLT1 and the G-protein. *J Mol Biol.* 2003 Jun 13;329(4):815-29.

Bettler B, Kaupmann K, Mosbacher J, Gassmann M. Molecular structure and physiological functions of GABA(B) receptors. *Physiol Rev.* 2004 Jul;84(3):835-67.

Blahos J 2nd, Mary S, Perroy J, de Colle C, Brabet I, Bockaert J, Pin JP. Extreme C terminus of G protein alpha-subunits contains a site that discriminates between Gi-coupled metabotropic glutamate receptors. *J Biol Chem.* 1998 Oct 2;273(40):25765-9.

Blank JL, Brattain KA, Exton JH. Activation of cytosolic phosphoinositide phospholipase C by G-protein beta gamma subunits *J Biol Chem.* 1992 Nov 15;267(32):23069-75.

Bourne HR. How receptors talk to trimeric G proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 1997 Apr;9(2):134-42.

Bouvier M, OLIGOMERIZATION OF G-PROTEIN-COUPLED TRANSMITTER RECEPTORS, *Nature Reviews Neuroscience* 2001 2, 274 - 286

Bowery NG. GABAB receptor pharmacology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1993;33:109-47.

Brown JT, Gill CH, Farmer CE, Lanneau C, Randall AD, Pangalos MN, Collingridge GL, Davies CH. Mechanisms contributing to the exacerbated epileptiform activity in hippocampal slices of GABAB1 receptor subunit knockout mice. *Epilepsy Res.* 2003 Dec;57(2-3):121-36.

Bunemann M, Lee KB, Pals-Rylaarsdam R, Roseberry AG, Hosey MM. Desensitization of G-protein-coupled receptors in the cardiovascular system *Annu Rev Physiol.* 1999;61:169-92.

Bunemann M, Frank M, Lohse MJ. Gi protein activation in intact cells involves subunit rearrangement rather than dissociation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Dec 23;100(26):16077-82.

Calver AR, Robbins MJ, Cosio C, Rice SQ, Babbs AJ, Hirst WD, Boyfield I, Wood MD, Russell RB, Price GW, Couve A, Moss SJ, Pangalos MN. The C-terminal domains of the GABA(b) receptor subunits mediate intracellular trafficking but are not required for receptor signaling. *J Neurosci*. 2001 Feb 15;21(4):1203-10.

Cardullo RA, Parpura V. Fluorescence resonance energy transfer microscopy: theory and instrumentation. *Methods Cell Biol*. 2003;72:415-30

Carlson KE, Brass LF, Manning DR. Thrombin and phorbol esters cause the selective phosphorylation of a G protein other than Gi in human platelets *J Biol Chem*. 1989 Aug 5;264(22):13298-305.

Chakravarty P, Suthar TP, Coppock HA, Nicholl CG, Bloom SR, Legon S, Smith DM. CGRP and adrenomedullin binding correlates with transcript levels for calcitonin receptor-like receptor (CRLR) and receptor activity modifying proteins (RAMPs) in rat tissues. *Br J Pharmacol*. 2000 May;130(1):189-95.

Chang W, Chen TH, Pratt S, Shoback D. Amino acids in the second and third intracellular loops of the parathyroid Ca²⁺-sensing receptor mediate efficient coupling to phospholipase C. *J Biol Chem*. 2000 Jun 30;275(26):19955-63.

Chen CA, Manning DR. Regulation of G proteins by covalent modification. *Oncogene*. 2001 Mar 26;20(13):1643-52.

Christopoulos A, Christopoulos G, Morfis M, Udawela M, Laburthe M, Couvineau A, Kuwasako K, Tilakaratne N, Sexton PM. Novel receptor partners and function of receptor activity-modifying proteins. *J Biol Chem*. 2003 Jan 31;278(5):3293-7.

Christopoulos G, Perry KJ, Morfis M, Tilakaratne N, Gao Y, Fraser NJ, Main MJ, Foord SM, Sexton PM. Multiple amylin receptors arise from receptor activity-modifying protein interaction with the calcitonin receptor gene product. *Mol Pharmacol*. 1999 Jul;56(1):235-42.

Clapham DE, Neer EJ. G protein beta gamma subunits. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1997;37:167-203.

Clapham DE. The G-protein nanomachine. *Nature*. 1996 Jan 25;379(6563):297-9.

Clarke S. Protein isoprenylation and methylation at carboxyl-terminal cysteine residues. *Annu Rev Biochem*. 1992;61:355-86.

Conti E, Franks NP, Brick P. Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Structure*. 1996 Mar 15;4(3):287-98.

Cormack B.P, Valdivia R, Falkow S. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP) 1996 *Gene*;173:33-38

Couve A, Kittler JT, Uren JM, Calver AR, Pangalos MN, Walsh FS, Moss SJ. Association of GABA(B) receptors and members of the 14-3-3 family of signaling proteins. *Mol Cell Neurosci*. 2001 Feb;17(2):317-28.

Couve A, Moss S, Pangalos M, GABAB Receptors : A New Paradigm in G Protein Signaling, *Mol. Cell. Neuroscience* 2000 ;16 :296-312

Couve A, Calver AR, Fairfax B, Moss SJ, Pangalos MN. Unravelling the unusual signalling properties of the GABA(B) receptor. *Biochem Pharmacol*. 2004 Oct 15;68(8):1527-36.

Cueille C, Garel JM. RAMPs and G protein coupled receptors *Med Sci (Paris)*. 2004 Aug-Sep;20(8-9):773-8

Daniel-Issakani S, Spiegel AM, Strulovici B. Lipopolysaccharide response is linked to the GTP binding protein, Gi2, in the promonocytic cell line U937. *J Biol Chem*. 1989 Dec 5;264(34):20240-7.

Duthey B, Caudron S, Perroy J, Bettler B, Fagni L, Pin JP, Prezeau L. A single subunit (GB2) is required for G-protein activation by the heterodimeric GABA(B) receptor. *J Biol Chem*. 2002 Feb 1;277(5):3236-41. Epub 2001 Nov 15.

El Far O, Betz H. G-protein-coupled receptors for neurotransmitter amino acids: C-terminal tails, crowded signalosomes. *Biochem J*. 2002 Jul 15;365(Pt 2):329-36.

Ellis C, THE STATE OF GPCR RESEARCH IN 2004 *Nature Reviews Drug Discovery* 2004 3, 577 - 626

Evanko DS, Thiyagarajan MM, Siderovski DP, Wedegaertner PB. Gbeta gamma isoforms selectively rescue plasma membrane localization and palmitoylation of mutant Galphas and Galphaq. *J Biol Chem*. 2001 Jun 29;276(26):23945-53. Epub 2001 Apr 09.

Ernst OP, Meyer CK, Marin EP, Henklein P, Fu WY, Sakmar TP, Hofmann KP. Mutation of the fourth cytoplasmic loop of rhodopsin affects binding of transducin and peptides derived from the carboxyl-terminal sequences of transducin alpha and gamma subunits. *J Biol Chem*. 2000 Jan 21;275(3):1937-43

Evanko DS, Thiyagarajan MM, Wedegaertner PB. Interaction with Gbetagamma is required for membrane targeting and palmitoylation of Galpha(s) and Galpha(q). *J Biol Chem*. 2000 Jan 14;275(2):1327-36.

Evans BN, Rosenblatt MI, Mnayer LO, Oliver KR, Dickerson IM. CGRP-RCP, a novel protein required for signal transduction at calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin receptors. *J Biol Chem.* 2000 Oct 6;275(40):31438-43

Fields TA, Casey PJ. Phosphorylation of Gz alpha by protein kinase C blocks interaction with the beta gamma complex. *J Biol Chem.* 1995 Sep 29;270(39):23119-25.

Filipek S, Krzysko KA, Fotiadis D, Liang Y, Saperstein DA, Engel A, Palczewski K. A concept for G protein activation by G protein-coupled receptor dimers: the transducin/rhodopsin interface. *Photochem Photobiol Sci.* 2004 Jun;3(6):628-38.

Fitzsimmons TJ, Zhao X, Wank SA. The extracellular domain of receptor activity-modifying protein 1 is sufficient for calcitonin receptor-like receptor function. *J Biol Chem.* 2003 Apr 18;278(16):14313-20

Fletcher JE, Lindorfer MA, DeFilippo JM, Yasuda H, Guilnard M, Garrison JC. The G protein beta5 subunit interacts selectively with the Gq alpha subunit *J Biol Chem.* 1998 Jan 2;273(1):636-44.

Fotiadis D, Liang Y, Filipek S, Saperstein DA, Engel A, Palczewski K. Atomic-force microscopy: Rhodopsin dimers in native disc membranes. *Nature.* 2003 Jan 9;421(6919):127-8.

Francesconi A, Duvoisin RM. Role of the second and third intracellular loops of metabotropic glutamate receptors in mediating dual signal transduction activation. *J Biol Chem.* 1998 Mar 6;273(10):5615-24.

Fritschy JM, Meskenaite V, Weinmann O, Honer M, Benke D, Mohler H. GABAB-receptor splice variants GB1a and GB1b in rat brain: developmental regulation, cellular distribution and extrasynaptic localization *Eur J Neurosci.* 1999 Mar;11(3):761-8.

Galarneau A, Primeau M, Trudeau LE, Michnick SW. Beta-lactamase protein fragment complementation assays as in vivo and in vitro sensors of protein protein interactions. *Nat Biotechnol.* 2002 Jun;20(6):619-22.

Galés C, Rebois V, Hogue M, Trieu P, Breit A, Hébert TE, Bouvier M, Real-time monitoring of receptor and G-protein interactions in living cells 2005 *Nature Methods* 2, 177 - 184

Galvez T, Duthey B, Kniazeff J, Blahos J, Rovelli G, Bettler B, Prezeau L, Pin JP. Allosteric interactions between GB1 and GB2 subunits are required for optimal GABA(B) receptor function. *EMBO J.* 2001 May 1;20(9):2152-9.

Galvez T, Pin JP. How do G-protein-coupled receptors work? The case of metabotropic glutamate and GABA receptors *Med Sci (Paris).* 2003 May;19(5):559-65.

Gassmann M, Shaban H, Vigot R, Sansig G, Haller C, Barbieri S, Humeau Y, Schuler V, Muller M, Kinzel B, Klebs K, Schmutz M, Froestl W, Heid J, Kelly PH, Gentry C, Jatton AL, Van der Putten H, Mombereau C, Lecourtier L, Mosbacher J, Cryan JF, Fritschy JM, Luthi A, Kaupmann K, Bettler B, Redistribution of GABAB(1) protein and atypical GABAB responses in GABAB(2)-deficient mice. *J Neurosci*. 2004 Jul 7;24(27):6086-97.

Gelb MH, Scholten JD, Sebolt-Leopold JS. Protein prenylation: from discovery to prospects for cancer treatment *Curr Opin Chem Biol*. 1998 Feb;2(1):40-8.

Gilman AG. G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem*. 1987;56:615-49.

Ginham RL, Blein S, Barlow P, White JH, McIlhinney RAJ: Interaction of 'Sushi' domain of GABA_BR1a subunit with the extracellular matrix protein, fibulin. *FENS Abstr* 2002;1:144.6.

Grunewald S, Schupp BJ, Ikeda SR, Kuner R, Steigerwald F, Kornau HC, Kohr G. Importance of the gamma-aminobutyric acid(B) receptor C-termini for G-protein coupling. *Mol Pharmacol*. 2002 May;61(5):1070-80.

Hamm HE. The many faces of G protein signaling. *J Biol Chem*. 1998 Jan 9;273(2):669-72

Hamm HE. How activated receptors couple to G proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Apr 24;98(9):4819-21.

Havlickova M, Prezeau L, Duthey B, Bettler B, Pin JP, Blahos J. The intracellular loops of the GB2 subunit are crucial for G-protein coupling of the heteromeric gamma-aminobutyrate B receptor. *Mol Pharmacol*. 2002 Aug;62(2):343-50.

Hebert TE, Moffett S, Morello JP, Loisel TP, Bichet DG, Barret C, Bouvier M. A peptide derived from a beta2-adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation. *J Biol Chem*. 1996 Jul 5;271(27):16384-92.

Heim R, Prasher DC, Tsien RY. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Dec 20;91(26):12501-4.

Hepler JR, Gilman AG. G proteins. *Trends Biochem Sci*. 1992 Oct;17(10):383-7.

Herlitze S, Garcia DE, Mackie K, Hille B, Scheuer T, Catterall WA. Modulation of Ca²⁺ channels by G-protein beta gamma subunits *Nature*. 1996 Mar 21;380(6571):258-62.

Hermans E. Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther*. 2003 Jul;99(1):25-44.

Herzog M, Scherer EQ, Albrecht B, Rorabaugh B, Scofield MA, Wangemann P. CGRP receptors in the gerbil spiral modiolar artery mediate a sustained vasodilation via a transient cAMP-mediated Ca²⁺-decrease. *J Membr Biol*. 2002 Oct 1;189(3):225-36

Hohenegger M, Mitterauer T, Voss T, Nanoff C, Freissmuth M. Thiophosphorylation of the G protein beta subunit in human platelet membranes: evidence against a direct phosphate transfer reaction to G alpha subunits. *Mol Pharmacol*. 1996 Jan;49(1):73-80.

Hu CD, Chinenov Y, Kerppola TK. Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell*. 2002 Apr;9(4):789-98.

Huang W, Wang L, Yuan M, Ma J, Hui Y. Adrenomedullin affects two signal transduction pathways and the migration in retinal pigment epithelial cells *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004 May;45(5):1507-13.

Innis RB, Aghajanian GK. Pertussis toxin blocks 5-HT_{1A} and GABA_B receptor-mediated inhibition of serotonergic neurons. *Eur J Pharmacol*. 1987 Nov 10;143(2):195-204

Jones KA, Borowsky B, Tamm JA, Craig DA, Durkin MM, Dai M, Yao WJ, Johnson M, Gunwaldsen C, Huang LY, Tang C, Shen Q, Salon JA, Morse K, Laz T, Smith KE, Nagarathnam D, Noble SA, Branchek TA, Gerald C. GABA(B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA(B)R1 and GABA(B)R2. *Nature*. 1998 Dec 17;396(6712):674-9.

Jones MB, Siderovski DP, Hooks SB. The G{beta}{gamma} DIMER as a NOVEL SOURCE of SELECTIVITY in G-Protein Signaling: GGL-ing AT CONVENTION. *Mol Interv*. 2004 Aug;4(4):200-214.

Juaneda C, Dumont Y, Quirion R. The molecular pharmacology of CGRP and related peptide receptor subtypes. *Trends Pharmacol Sci*. 2000 nov;21(11):432-8.

Kajikawa Y, Saitoh N, Takahashi T. GTP-binding protein beta gamma subunits mediate presynaptic calcium current inhibition by GABA(B) receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jul 3;98(14):8054-8. Epub 2001 Jun 19.

Katada T, Gilman AG, Watanabe Y, Bauer S, Jakobs KH. Protein kinase C phosphorylates the inhibitory guanine-nucleotide-binding regulatory component and apparently suppresses its function in hormonal inhibition of adenylate cyclase. *Eur J Biochem*. 1985 Sep 2;151(2):431-7.

Klein S, Reuveni H, Levitzki A. Signal transduction by a nondissociable heterotrimeric yeast G protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Mar 28;97(7):3219-23.

Koelle MR. A new family of G-protein regulators - the RGS proteins. *Curr Opin Cell Biol*. 1997 Apr;9(2):143-7.

Kniazeff J, Galvez T, Labesse G, Pin JP. No ligand binding in the GB2 subunit of the GABA(B) receptor is required for activation and allosteric interaction between the subunits. *J Neurosci*. 2002 Sep 1;22(17):7352-61.

Kozasa T, Gilman AG. Protein kinase C phosphorylates G12 alpha and inhibits its interaction with G beta gamma. *J Biol Chem*. 1996 May 24;271(21):12562-7.

Kuner R, Kohr G, Grunewald S, Eisenhardt G, Bach A, Kornau HC. Role of heteromer formation in GABAB receptor function. *Science*. 1999 Jan 1;283(5398):74-7.

Kunishima N, Shimada Y, Tsuji Y, Sato T, Yamamoto M, Kumasaka T, Nakanishi S, Jingami H, Morikawa K. Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature*. 2000 Oct 26;407(6807):971-7.

Lefkowitz RJ G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. *J Biol Chem*. 1998 Jul 24;273(30):18677-80.

Lefkowitz RJ., Historical review: a brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 2004 Aug;25(8):413-22.

Lei Q, Jones MB, Talley EM, Garrison JC, Bayliss DA. Molecular mechanisms mediating inhibition of G protein-coupled inwardly-rectifying K⁺ channels. *Mol Cells*. 2003 Feb 28;15(1):1-9

Li Q, Lau A, Morris TJ, Guo L, Fordyce CB, Stanley EF. A syntaxin 1, Galpha(o), and N-type calcium channel complex at a presynaptic nerve terminal: analysis by quantitative immunocolocalization. *J Neurosci*. 2004 Apr 21;24(16):4070-81.

Little KD, Hemler ME, Stipp CS. Dynamic regulation of a GPCR-tetraspanin-G protein complex on intact cells: central role of CD81 in facilitating GPR56-Galpha q/11 association. *Mol Biol Cell*. 2004 May;15(5):2375-87. Epub 2004 Mar 5.

Liu J, Blin N, Conklin BR, Wess J. Molecular mechanisms involved in muscarinic acetylcholine receptor-mediated G protein activation studied by insertion mutagenesis. *J Biol Chem*. 1996 Mar 15;271(11):6172-8.

Lodish H, Baltimore D, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Darnell J. *Molecular Cell Biology*, 1995, Third Edition Scientific American Book, New York, pp1344

Lohse MJ, Benovic JL, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ. beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science*. 1990 Jun 22;248(4962):1547-50.

Lounsbury KM, Casey PJ, Brass LF, Manning DR. Phosphorylation of Gz in human platelets. Selectivity and site of modification. *J Biol Chem*. 1991 Nov 15;266(32):22051-6.

Luscher C, Jan LY, Stoffel M, Malenka RC, Nicoll RA. G protein-coupled inwardly rectifying K⁺ channels (GIRKs) mediate postsynaptic but not presynaptic transmitter actions in hippocampal neurons. *Neuron*. 1997 Sep;19(3):687-95. Erratum in: *Neuron* 1997 Oct;19(4):following 945.

Main MJ, Brown J, Brown S, Fraser NJ, Foord SM. The CGRP receptor can couple via pertussis toxin sensitive and insensitive G proteins. *FEBS Lett*. 1998 Dec 11;441(1):6-10.

Malitschek B, Ruegg D, Heid J, Kaupmann K, Bittiger H, Frostl W, Bettler B, Kuhn R. Developmental changes of agonist affinity at GABABR1 receptor variants in rat brain. *Mol Cell Neurosci*. 1998 Sep;12(1-2):56-64.

Margeta-Mitrovic M, Jan YN, Jan LY. A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization. *Neuron*. 2000 Jul;27(1):97-106.

Margeta-Mitrovic M, Jan YN, Jan LY. Function of GB1 and GB2 subunits in G protein coupling of GABA(B) receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Dec 4;98(25):14649-54. Epub 2001 Nov 27.

Martin SC, Russek SJ, Farb DH. Molecular identification of the human GABABR2: cell surface expression and coupling to adenylyl cyclase in the absence of GABABR1. *Mol Cell Neurosci*. 1999 Mar;13(3):180-91.

Marullo S, Nantel F, Strosberg AD, Bouvier M. Variability in the regulation of beta-adrenoceptor subtypes. *Biochem Soc Trans*. 1995 Feb;23(1):126-9.

McElroy WD, DeLuca MA. Firefly and bacterial luminescence: basic science and applications. *J Appl Biochem*. 1983 Jun;5(3):197-209.

McIntire WE, MacCleery G, Garrison JC. The G protein beta subunit is a determinant in the coupling of Gs to the beta 1-adrenergic and A2a adenosine receptors. *J Biol Chem*. 2001 May 11;276(19):15801-9.

McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, Solari R, Lee MG, Foord SM. RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature*. 1998 May 28;393(6683):333-9.

McVey M, Ramsay D, Kellett E, Rees S, Wilson S, Pope AJ, Milligan G. Monitoring receptor oligomerization using time-resolved fluorescence resonance energy transfer and bioluminescence resonance energy transfer. The human delta -opioid receptor displays constitutive oligomerization at the cell surface, which is not regulated by receptor occupancy. *J Biol Chem*. 2001 Apr 27;276(17):14092-9.

Mellon P, Parker V, Gluzman Y, Maniatis T. Identification of DNA sequences required for transcription of the human alpha 1-globin gene in a new SV40 host-vector system. *Cell*. 1981 Dec;27(2 Pt 1):279-88.

Mende U, Schmidt CJ, Yi F, Spring DJ, Neer EJ. The G protein gamma subunit. Requirements for dimerization with beta subunits. *J Biol Chem.* 1995 Jun 30;270(26):15892-8.

Michaelson D, Ahearn I, Bergo M, Young S, Philips M. Membrane trafficking of heterotrimeric G proteins via the endoplasmic reticulum and Golgi. *Mol Biol Cell.* 2002 Sep;13(9):3294-302.

Morishita R, Nakayama H, Isobe T, Matsuda T, Hashimoto Y, Okano T, Fukada Y, Mizuno K, Ohno S, Kozawa O, et al. Primary structure of a gamma subunit of G protein, gamma 12, and its phosphorylation by protein kinase C. *J Biol Chem.* 1995 Dec 8;270(49):29469-75.

Neer EJ, Schmidt CJ, Nambudripad R, Smith TF. The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature.* 1994 Sep 22;371(6495):297-300.

Neves SR, Ram PT, Iyengar R. G protein pathways. *Science.* 2002 May 31;296(5573):1636-9.

Nurse S, Lacaille J-C. Do GABAA and GABAB inhibitory postsynaptic responses originate from distinct interneurons in the hippocampus? *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 75:520

Nicoll RA, Malenka RC, Kauer JA. Functional comparison of neurotransmitter receptor subtypes in mammalian central nervous system. *Physiol Rev.* 1990 Apr;70(2):513-65.

Offermanns S, Hu YH, Simon MI. Galpha12 and Galpha13 are phosphorylated during platelet activation. *J Biol Chem.* 1996 Oct 18;271(42):26044-8.

Ormo M, Cubitt AB, Kallio K, Gross LA, Tsien RY, Remington SJ. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science.* 1996 Sep 6;273(5280):1392-5

Pagano A, Rovelli G, Mosbacher J, Lohmann T, Duthey B, Stauffer D, Ristig D, Schuler V, Meigel I, Lampert C, Stein T, Prezeau L, Blahos J, Pin J, Froestl W, Kuhn R, Heid J, Kaupmann K, Bettler B. C-terminal interaction is essential for surface trafficking but not for heteromeric assembly of GABA(b) receptors. *J Neurosci.* 2001 Feb 15;21(4):1189-202.

Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, Miyano M. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science.* 2000 Aug 4;289(5480):739-45.

Paulmurugan R, Gambhir SS. Monitoring protein-protein interactions using split synthetic renilla luciferase protein-fragment-assisted complementation. *Anal Chem.* 2003 Apr 1;75(7):1584-9

Pfleger KD, Eidne KA. Monitoring the formation of dynamic G-protein-coupled receptor-protein complexes in living cells. *Biochem J.* 2005 Feb 1;385(Pt 3):625-37.

Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002 Sep;3(9):639-50.

Post SR, Hammond HK, Insel PA. Beta-adrenergic receptors and receptor signaling in heart failure. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1999;39:343-60.

Prado MA, Evans-Bain B, Dickerson IM. Receptor component protein (RCP): a member of a multi-protein complex required for G-protein-coupled signal transduction. *Biochem Soc Trans.* 2002 Aug;30(4):460-4.

Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene.* 1992 Feb 15;111(2):229-33

Radhika V, Dhanasekaran N. Transforming G proteins. *Oncogene.* 2001 Mar 26;20(13):1607-14.

Raw AS, Coleman DE, Gilman AG, Sprang SR. Structural and biochemical characterization of the GTPgammaS-, GDP.Pi-, and GDP-bound forms of a GTPase-deficient Gly42 --> Val mutant of G1alpha1. *Biochemistry.* 1997 Dec 16;36(50):15660-9

Remy I, Michnick SW. Mapping biochemical networks with protein-fragment complementation assays. *Methods Mol Biol.* 2004;261:411-26.

Rhee SG. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu Rev Biochem.* 2001;70:281-312.

Robbins MJ, Calver AR, Filippov AK, Hirst WD, Russell RB, Wood MD, Nasir S, Couve A, Brown DA, Moss SJ, Pangalos MN. GABA(B2) is essential for g-protein coupling of the GABA(B) receptor heterodimer. *J Neurosci.* 2001 Oct 15;21(20):8043-52.

Robillard L, Ethier N, Lachance M, Hebert TE. Gbetagamma subunit combinations differentially modulate receptor and effector coupling in vivo. *Cell Signal.* 2000 Oct;12(9-10):673-82.

Sadeghi H, Robertson GL, Bichet DG, Innamorati G, Birnbaumer M. Biochemical basis of partial nephrogenic diabetes insipidus phenotypes. *Mol Endocrinol.* 1997 Nov;11(12):1806-13.

Salahpour A, Angers S, Bouvier M. Functional significance of oligomerization of G-protein-coupled receptors. *Trends Endocrinol Metab.* 2000 Jul;11(5):163-8

Sexton PM, Albiston A, Morfis M, Tilakaratne N. Receptor activity modifying proteins. *Cell Signal*. 2001 Feb;13(2):73-83.

Siaut M, Zaros C, Levivier E, Ferri ML, Court M, Werner M, Callebaut I, Thuriaux P, Sentenac A, Conesa C. An Rpb4/Rpb7-like complex in yeast RNA polymerase III contains the orthologue of mammalian CGRP-RCP. *Mol Cell Biol*. 2003 Jan;23(1):195-205.

Strassheim D, Malbon CC. Phosphorylation of Gi alpha 2 attenuates inhibitory adenylyl cyclase in neuroblastoma/glioma hybrid (NG-108-15) cells. *J Biol Chem*. 1994 May 13;269(19):14307-13.

Steiner S, Muff R, Gujer R, Fischer JA, Born W. The transmembrane domain of receptor-activity-modifying protein 1 is essential for the functional expression of a calcitonin gene-related peptide receptor. *Biochemistry*. 2002 Sep 24;41(38):11398-404.

Takida S, Wedegaertner PB. Heterotrimer formation, together with isoprenylation, is required for plasma membrane targeting of Gbetagamma. *J Biol Chem*. 2003 May 9;278(19):17284-90. Epub 2003 Feb 27.

Tam R, Saier MH Jr. Structural, functional, and evolutionary relationships among extracellular solute-binding receptors of bacteria. *Microbiol Rev*. 1993 Jun;57(2):320-46.

Tateyama M, Abe H, Nakata H, Saito O, Kubo Y. Ligand-induced rearrangement of the dimeric metabotropic glutamate receptor 1alpha. *Nat Struct Mol Biol*. 2004 Jul;11(7):637-42.

Taylor JM, Jacob-Mosier GG, Lawton RG, VanDort M, Neubig RR. Receptor and membrane interaction sites on Gbeta. A receptor-derived peptide binds to the carboxyl terminus. *J Biol Chem*. 1996 Feb 16;271(7):3336-9.

Thiery JP, Chopin D. Epithelial cell plasticity in development and tumor progression. *Cancer Metastasis Rev*. 1999;18(1):31-42

Tsien RY. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:509-44.

Umemori H, Inoue T, Kume S, Sekiyama N, Nagao M, Itoh H, Nakanishi S, Mikoshiba K, Yamamoto T. Activation of the G protein Gq/11 through tyrosine phosphorylation of the alpha subunit. *Science*. 1997 Jun 20;276(5320):1878-81.

Villardaga JP, Bunemann M, Krasel C, Castro M, Lohse MJ. Measurement of the millisecond activation switch of G protein-coupled receptors in living cells. *Nat Biotechnol*. 2003 Jul;21(7):807-12. Epub 2003 Jun 15.

Wade SM, Dalman HM, Yang SZ, Neubig RR. Multisite interactions of receptors and G proteins: enhanced potency of dimeric receptor peptides in modifying G protein function. *Mol Pharmacol*. 1994 Jun;45(6):1191-7.

Wess J. Molecular basis of receptor/G-protein-coupling selectivity. *Pharmacol Ther.* 1998 Dec;80(3):231-64.

White JH, McIllhinney RA, Wise A, Ciruela F, Chan WY, Emson PC, Billinton A, Marshall FH. The GABAB receptor interacts directly with the related transcription factors CREB2 and ATFx. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Dec 5;97(25):13967-72.

White JH, Wise A, Main MJ, Green A, Fraser NJ, Disney GH, Barnes AA, Emson P, Foord SM, Marshall FH. Heterodimerization is required for the formation of a functional GABAB receptor. *Nature.* 1998 Dec 17;396(6712):679-82.

Wieland T, Nurnberg B, Ulibarri I, Kaldenberg-Stasch S, Schultz G, Jakobs KH. Guanine nucleotide-specific phosphate transfer by guanine nucleotide-binding regulatory protein beta-subunits. Characterization of the phosphorylated amino acid. *J Biol Chem.* 1993 Aug 25;268(24):18111-8.

Wieland T, Ronzani M, Jakobs KH. Stimulation and inhibition of human platelet adenylyl cyclase by thiophosphorylated transducin beta gamma-subunits *J Biol Chem.* 1992 Oct 15;267(29):20791-7.

Wilson T, Hastings JW. Bioluminescence. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1998;14:197-230.

Xu Y, Piston DW, Johnson CH. A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: application to interacting circadian clock proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Jan 5;96(1):151-6.

Yamada K. Thermodynamic analyses of calcium binding to troponin C, calmodulin and parvalbumins by using microcalorimetry. *Mol Cell Biochem.* 1999 Jan;190(1-2):39-45.

Yasuda H, Lindorfer MA, Myung CS, Garrison JC. Phosphorylation of the G protein gamma12 subunit regulates effector specificity. *J Biol Chem.* 1998 Aug 21;273(34):21958-65.

Zick Y, Sagi-Eisenberg R, Pines M, Gierschik P, Spiegel AM. Multisite phosphorylation of the alpha subunit of transducin by the insulin receptor kinase and protein kinase C *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 Dec;83(24):9294-7.