

2m 11.3354.10

Université de Montréal

Dimérisation du récepteur de chimiokine CXCR4

Par Yamina A. Berchiche

Département de biochimie  
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise en biochimie

31 août 2005

© Yamina A. Berchiche (2005)



W

4

U58

Zook

V.031

## 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 :

Dimérisation du récepteur de chimiokine CXCR4

Présenté par :

Yamina A. Berchiche

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Michel Bouvier

.....

Président-rapporteur

Dr Nikolaus Heveker

.....

Directeur de recherche

Dr Jean-Luc Parent

.....

Membre du jury

**RÉSUMÉ :**

L'existence des RCPGs sous forme dimérique est un concept largement accepté. Toutefois, des questions concernant l'organisation du dimère restent en suspens. Le rôle de la dimérisation dans l'activation du récepteur ainsi que la dimérisation constitutive ou induite par le ligand sont à évaluer.

Grâce au BRET (*Bioluminescence Resonance Energy Transfer*), nous amenons des preuves que les récepteurs CXCR4 et CCR2 forment des homo- et hétérodimères de façon constitutive (indépendante du ligand) et que les ligands induisent des changements conformationnels au sein des dimères sans promouvoir l'association ou la dissociation des protomères. La modulation du signal BRET est propre à chacun des ligands ce qui indique qu'ils stabilisent différentes conformations du récepteur. En utilisant des peptides dérivés des domaines transmembranaires (TM) de CXCR4, qui peuvent bloquer de façon non compétitive la fonction du récepteur, nous montrons que les changements conformationnels du dimère induits par le ligand sont étroitement liés avec la fonction du récepteur.

Les résultats préliminaires concernant des mutants CXCR4, suggèrent l'existence de différentes conformations donnant lieu à des activités distinctes du récepteur. En effet, dans des conditions saturantes, différents ligands induisent des changements conformationnels distincts d'un mutant à un autre. Aussi, il semble y avoir une corrélation entre le signal BRET mesuré et la capacité des mutants à inhiber l'activité de l'adénylate cyclase suite à la stimulation avec une concentration saturante de SDF-1.

**Mots-clés :** RCPG, récepteurs de chimiokine CXCR4 et CCR2, BRET, dimérisation constitutive ou ligand-dépendante, peptides TM de CXCR4, changement de conformation et fonction du récepteur.

**ABSTRACT:**

Over the years, GPCR dimerization has become an accepted concept that raised questions about the molecular details and functional consequences of such receptor assembly. The questions whether dimerization is constitutive or ligand-induced and the role of dimerization in the activation of the receptor are still debated.

Using BRET, we show that chemokine receptors CXCR4 and CCR2 exist as constitutive homo- and heterodimers and that ligands induce conformational changes within the dimers without promoting receptor dimer formation or disassembly. Ligands yielded different BRET modulations indicating the stabilisation of distinct receptor conformations. We also found that peptides derived from the transmembrane domains (TM) of CXCR4 inhibit receptor function in a non-competitive way by preventing ligand-induced conformational changes within the dimer.

Our preliminary results obtained with the CXCR4 mutants suggest that saturating excess of the different ligands induce distinct mutant receptor conformational changes. We also find that SDF-1-induced BRET signal modulation and inhibition of adenylyl cyclase activity by the mutants seem to be linked. This data suggests that different receptor conformations give rise to different receptor activities.

**Keywords:** GPCR, chimiokine receptors CXCR4 and CCR2, BRET, constitutive or ligand induced dimerization, TM peptides of CXCR4, conformational changes, receptor activity

**TABLE DES MATIÈRES :**

RÉSUMÉ	iii
ABSTRACT	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
Liste des tableaux	viii
Liste des figures	ix
Liste des abréviations	xi
REMERCIEMENTS	xiv
<b>1. INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
1.1 LES RÉCEPTEURS COUPLÉS AUX PROTÉINES G	2
1.1.1 CLASSIFICATION DES RCPGs	2
1.1.2 LES PROTÉINES G	4
1.1.3 INTERACTION LIGAND-RÉCEPTEUR	5
1.1.4 ACTIVATION DES RCPGs	7
1.1.5 RELATION STRUCTURE-FONCTION	12
1.2 DIMÉRISATION DES RCPGs	17
1.2.1 HISTORIQUE	17
1.2.2 TRANS-COMPLÉMENTATION FONCTIONNELLE	18
1.2.3 MUTANTS DOMINANTS NÉGATIFS	20
1.2.4 CO-IMMUNOPRÉCIPITATION DES RCPGs	21
1.2.5 DÉTECTION DE DIMÈRES DANS LES CELLULES VIVANTES	24
1.2.5.1 TRANSFERT D'ÉNERGIE PAR RESONANCE DE FLUORESCENCE (FRET)	24
1.2.5.2 TRANSFERT D'ÉNERGIE PAR RESONANCE DE BIOLUMINESCENCE (BRET)	25
1.3 IMPORTANCE DE LA DIMÉRISATION	30
1.3.1 LA DIMÉRISATION DANS LE <i>CHAPERONING</i> ET LE TRANSPORT	30
1.3.2 DIMÉRISATION ET SIGNALISATION CELLULAIRE	32
1.3.3 DIMÉRISATION ET DIVERSITÉ PHARMACOLOGIQUE	33
1.4 DIMÉRISATION CONTITUTIVE OU LIGAND-DÉPENDANTE?	34

1.5 LA DIMÉRISATION COMME CIBLE PHARMACOLOGIQUE?	35
1.6 LES CHIMIOKINES ET LEURS RÉCEPTEURS	38
1.6.1 HISTORIQUE	38
1.6.2 CHIMIOKINES ET DIMÉRISATION	39
1.6.3 LES RÉCEPTEURS DE CHIMIOKINES	41
1.6.4 SIGNALISATION ET SPÉCIFICITÉ DES RÉCEPTEURS DE CHIMIOKINES	42
1.7 LE RÉCEPTEUR DE CHIMIOKINE CXCR4	45
1.7.1 RÔLES DU RÉCEPTEUR DE CHIMIOKINE CXCR4	45
1.7.2 SIGNALISATION DU RÉCEPTEUR CXCR4	47
1.8 LE RÉCEPTEUR DE CHIMIOKINE CCR2	48
1.9 OLIGOMÉRISATION DES RÉCEPTEURS DE CHIMIOKINES	49
1.10 BUTS ET OBJECTIF	52
<b>2. ARTICLE PERCHERANCIER Y., BERCHICHE     Y.A. ET AL</b>	<b>53</b>
<b>3. RÉSULTATS ADDITIONNELS</b>	<b>85</b>
3.1 MATÉRIELS ET MÉTHODES	87
3.1.1 PLASMIDES, RÉACTIFS, CULTURE CELLULAIRE, TRANSFECTION, MESURES DE BRET ET PRODUCTION D'AMPC	87
3.1.2 MUTAGENÈSE DIRIGÉE	87
3.1.3 CYTOMÉTRIE DE FLUX	87
3.2 DESCRIPTION ET DISCUSSION DES RÉSULTATS ADDITIONNELS	88
3.2.1 EXPRESSION DES MUTANTS DU RÉCEPTEUR CXCR4	88
3.2.2 ANALYSE BRET DES MUTANTS CXCR4	89
3.2.3 EFFETS DES LIGANDS SUR LE BRET DES MUTANTS CXCR4	90
3.2.4 SIGNALISATION DES MUTANTS CXCR4	92
3.3 FIGURES ADDITIONNELLES	94
<b>4. DISCUSSION</b>	<b>100</b>
4.1 HOMO- ET HÉTÉRODIMÉRISATION CONSTITUTIVE DE CXCR4 ET CCR2	101

4.2 CHANGEMENTS CONFORMATIONNELS INDUITS DANS LES HOMO- ET HÉTÉRODIMÈRES CXCR4/CCR2	102
4.3 LES LIGANDS STABILISENT DIFFÉRENTES CONFORMATIONS DE RÉCEPTEUR	104
4.4 EFFET DES PEPTIDES TM CXCR4 SUR L'HOMO- ET L'HÉTÉRODIMÈRE CXCR4/CCR2	105
4.5 CARACTÉRISATION DES MUTANTS CXCR4	107
<b>5. CONCLUSION</b>	<b>111</b>
<b>6. BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>112</b>

**LISTE DES TABLEAUX :**

Tableau I.I	Classification des sous-unités de protéines G et leurs effecteurs primaires	5
-------------	---	---

**LISTE DES FIGURES :**

Figure 1.1	Représentation schématique de la classification des RCPGs	3
Figure 1.2	Effets des divers ligands sur l'activation des RCPGs	6
Figure 1.3	Modèles pharmacologiques classiques de l'activation des RCPGs	8
Figure 1.4	Modèle de liaison séquentiel et de la sélection Conformationnelle	?
Figure 1.5	Structure de la rhodopsine	10
Figure 1.6	Modèles de dimérisation des RCPGs	15
Figure 1.7	Représentation schématique du BRET	22
Figure 1.8	Courbe théorique de saturation BRET	24
Figure 1.9	Rôle de la dimérisation des RCPGs dans le transport	27
Figure 1.10	Schéma de classification des chimiokines et leurs récepteurs	34
Figure 1.11	Représentation schématique de certaines voies de signalisation activées par les récepteurs de chimiokines	37
Figure 2.1	A)Light emission BRET spectra for CXCR4 Homodimerization / B)CXCR4 expression of transfected and primary cells	74
Figure 2.2	Ligand effect on CXCR4 homodimers expressed at physiological levels in HEK293T cells	75
Figure 2.3	TC14012 and AMD3100 competition of SDF-1 $\alpha$ induced changes in CXCR4 homodimerisation BRET signal	75
Figure 2.4	MCP-1 effect on CCR2 homodimers	76
Figure 2.5	SDF-1, TC14012 and MCP-1 effects on CXCR4-CCR2 heterodimers	76
Figure 2.6	Effects of CXCR4 TM peptides on CXCR4 homodimers	77
Figure 2.7	Effects of CXCR4 TM peptides on CCR2-CXCR4 heterodimers	77
Figure 3.1	Représentation schématique du récepteur de chimiokine CXCR4	86
Figure 3.2	Expression des mutants du récepteur CXCR4	87

Figure 3.3	Analyse BRET des mutants CXCR4	88
Figure 3.4	Effet des ligands sur les mutants CXCR4	89
Figure 3.5	Inhibition de la production d'AMPc par CXCR4	90
Figure 3.6	Inhibition de la production d'AMPc par les mutants CXCR4	91

**LISTE DES ABRÉVIATIONS:**

A	Alanine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
BRET	Bioluminescence Resonance Energy Transfer
CFP	Cyan fluorescent protein
CHO	Chinese hamster ovaries
C-terminale	Carboxy-terminale
CTX	Cholera toxin
D	Acide aspartique
DC	Dendritic cell
DSS	Disuccinimidyl suberate
E	Acide glutamique
EGFR	Epidermal growth factor receptor
F	Phenylalanine
FGFR	Fibroblast growth factor receptor
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
G	Glycine
GABA	$\gamma$ -aminobutyric acid
GDP	Guanosine diphosphate
GFP	Green fluorescent protein
GPCR	G protein-coupled receptor
GTP	Guanosine triphosphate
HEK293	Human embryonic kidney
HHV8	Human herpes virus 8
HTR-FRET	Homogenous time resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer
IP <sub>3</sub>	Inositols triphosphates
JAK	Janus kinase
K	Lysine
L	Leucine
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MIP-1 $\alpha$	Macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$
MMP	Matrix metalloprotease
N	Asparagine

NFκB	Nuclear factor κB
NK	Natural killer
NOD	Non-obese
N-terminale	Amino-terminale
pbFRET	Photobleaching fluorescence resonance energy transfer
PBS	Phosphate saline buffer
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PI3K	Phosphatidylinositol 3'-kinase
PKB	Protein kinase B
PKC	Protein kinase C
PLC	Phospholipase C
PTX	Pertussis toxin
Q	Glutamine
R	Arginine
RANTES	Regulated on activation normal T cell expressed and secreted
RCPG	Récepteur couple aux protéines G
RE	Reticulum endoplasmique
Rluc	Renilla luciférase
S	Sérine
SCID	Severe combined immunodeficiency
SDF-1	Stromal cell-derived factor 1
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodécyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
Src	Steroid receptor coactivator
STAT	Signal transducer and activator of transcription
SVF	Sérum de veau foetal
Tat	Transactivator of transcription
TM	Transmembranaire
TRH	Thyrotropin-releasing hormone receptor
V2R	Récepteur vasopressine 2
VIH	Virus d'immunodéficience humaine
Y	Tyrosine
YFP	Yellow fluorescent protein

$\gamma$ IP10

$\gamma$  interferon inducible protein 10

**REMERCIEMENTS :**

Mille mercis à ma famille, petits et grands, pour la présence, le support constant et les encouragements. Un gros merci à mes amis, en particulier Meriem, Levi, Foci, Robi, Bea, Laura, qui pour la plupart ne savent toujours pas sur quoi portent mes travaux précisément mais qui ont toujours été présents.

Je tiens à remercier mes collègues et amis Isabelle et Sébastien pour le support technique et moral ainsi que pour les précieux conseils.

J'aimerais aussi remercier mon directeur de recherche, Nikolaus Heveker, qui a été disponible pour répondre à mes questions et qui m'a supervisé depuis les tout débuts et ce jusqu'à la fin!

Merci aussi à toutes les personnes qui ont contribué de loin ou de près au bon déroulement de ma formation, en particulier Yann Percherancier, Andreas Breit, tous les membres du laboratoire de Michel Bouvier, Chantal Dagenais et enfin un énorme merci à la Fondation de l'Hôpital Sainte-Justine pour le support financier.

.

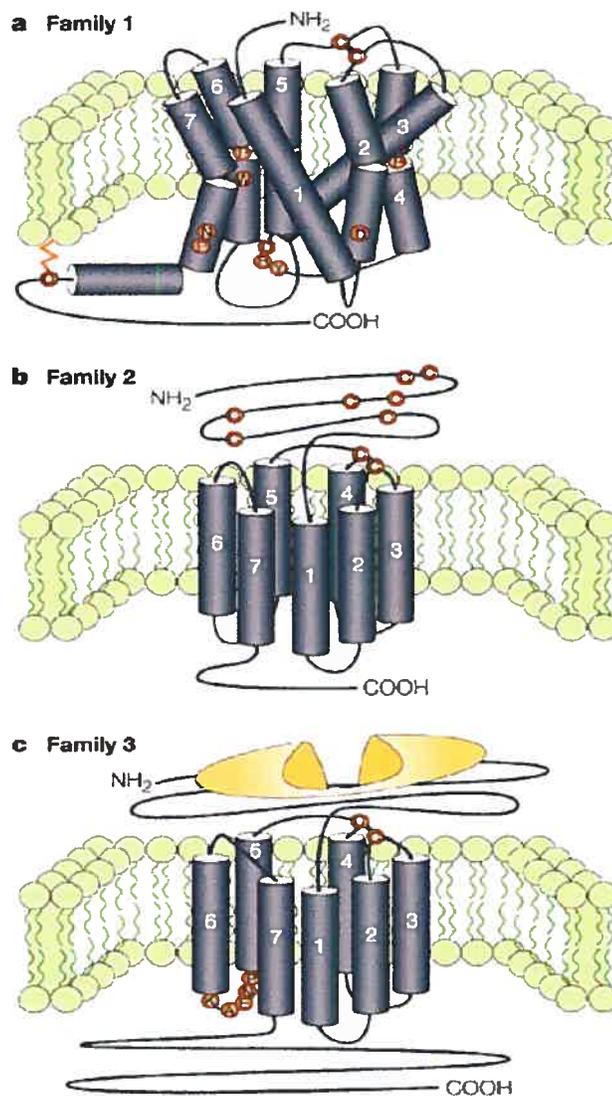
## **1. INTRODUCTION**

## 1.1 LES RÉCEPTEURS COUPLÉS AUX PROTÉINES G (RCPGs):

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs), constituent l'une des plus grandes cibles pharmacologiques de l'industrie du médicament (1). Ces protéines à 7 domaines transmembranaires (TM), sont en fait 1 seul peptide traversant la membrane plasmique 7 fois donnant ainsi lieu à 7 hélices alpha hydrophobes de 20 à 25 acides aminés séparés par des boucles intra- et extracellulaires hydrophiles (2, 3). Il existe plus de 1000 gènes humains identifiés codant pour des RCPGs (1). Ces récepteurs sont responsables de la reconnaissance et la transduction de signaux d'une grande variété de molécules telles que : les acides aminés ; les nucléotides ; les hormones, les peptides ; la lumière ; les odeurs, et même le calcium (1, 2, 4, 5).

### 1.1.1 CLASSIFICATION DES RCPGs :

Les RCPGs sont regroupés dans trois grandes classes (**Figure 1.1**) dont les membres respectifs possèdent au moins 20 % d'identité de séquence (6). La plus grande et la plus étudiée de ces classes est la classe A aussi appelée *rhodopsine/ $\beta_2$ -adrenergic-like receptors* (3) dont les récepteurs adrénergiques, dopamine, de chimiokines et les récepteurs des opioïdes font partie. Ces récepteurs ont en commun des motifs conservés tel que le motif DRY et leur partie C-terminale est souvent palmytoylée (3). Les RCPGs de la classe B, les *glucagon/calcitonine-like receptors*, sont caractérisés comme ayant une longue partie N-terminale riche en résidus cystéines formant des ponts disulfure. Enfin, la classe C, *metabotropic/glutamate-like receptors*, regroupe les récepteurs du glutamate ainsi que ceux de GABA ( $\gamma$ -aminobutyric acid) et de calcium (3). Les récepteurs appartenant à cette classe possèdent une très longue extrémité N-terminale, très structurée, qui constitue probablement le site de liaison des ligands (7).



Nature Reviews | Drug Discovery

**Figure 1.1:** Représentation schématique de la classification des RCPGs. Les familles 1, 2 et 3 désignent respectivement les classes A, B et C de RCPGs. Tiré de George, S. R. et al. (8).

La multitude d'informations acquises au sujet de la structure et de la fonction des RCPGs est le résultat d'études approfondies sur la rhodopsine (9, 10) et des récepteurs adrénergiques (7, 11-14). Bien que plusieurs études ont montré la capacité de certains RCPGs à activer diverses voies de signalisation indépendamment des protéines G (*GTP binding protein*) (15-18), ces récepteurs ont comme caractéristique

commune cette capacité d'activer la signalisation cellulaire en impliquant les protéines G hétérotrimériques. Ces dernières sont constituées de la sous-unité  $G\alpha$  (38-52 kDa) qui à l'état inactif est liée au GDP et des sous-unités  $G\beta$  (35 kDa) et  $G\gamma$  (8-10 kDa) qui forment un complexe  $G\beta\gamma$  (19-24).

### 1.1.2 LES PROTÉINES G:

Induits par le ligand, les changements conformationnels du RCPG vont permettre l'activation de la protéine G hétérotrimérique. L'activation se traduit par l'échange de la molécule de GDP pour une molécule de GTP dans la sous-unité  $\alpha$  de la protéine G ce qui mène à la dissociation des sous-unités  $G\alpha$  et  $G\beta\gamma$ . Ainsi, elles peuvent interagir avec les multiples effecteurs intracellulaires ou membranaires qui sont des enzymes comme la phospholipase C ou des canaux ioniques tels que les canaux potassium (7). Grâce à l'activité GTPase de la sous-unité  $G\alpha$ , le GTP est hydrolysé en GDP, ce qui permet un changement conformationnel de cette sous-unité, augmentant son affinité pour les sous-unités  $G\beta\gamma$  et le retour à l'état inactif de la protéine G sous forme hétérotrimérique (3, 22, 24).

La classification des protéines G dans les différentes sous-classes se fait par rapport à la sous-unité  $G\alpha$  à cause de sa prédominance dans le cycle de la protéine G. Il existe ainsi 4 grandes sous-familles de protéines G hétérotrimériques soit les classes  $G_s$ ,  $G_{i/o}$ ,  $G_{q/11}$  et  $G_{12/13}$  (6, 7). Étant donné la variété des sous-unités (23  $\alpha$ , 6  $\beta$  et 12  $\gamma$ ), différentes combinaisons donnent lieu à des protéines G hétérotrimériques ayant divers effecteurs, bien que certaines combinaisons ne soient que théoriques (**Tableau I.I**) (7). L'appartenance d'une protéine G à l'une des sous-familles dépend de ses caractéristiques fonctionnelles. Par exemple, l'activation de la protéine  $G_s$  stimule l'adénylate cyclase et la production d'AMPc tandis que les protéines  $G_{ai}$  inhibent l'activité de l'adénylate cyclase (7).

La sélectivité d'un récepteur pour une seule classe voir une protéine G spécifique a été acceptée pendant longtemps (5). Le meilleur exemple est celui des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques qui activent l'adénylate cyclase grâce à la protéine  $G_s$ . Aussi, le couplage d'un récepteur à plus qu'une protéine G a été suggéré. Des études ont montré que la signalisation des RCPGs via les protéines G n'est inhibée que

partiellement suite au traitement avec la pertussis toxine (PTX), qui interfère dans le couplage des protéines  $G_{\alpha i/o}$  avec leurs récepteurs respectifs, ou avec la choléra toxine (CTX), qui stimule la signalisation via les protéines  $G_{\alpha s}$  (7). L'inhibition partielle de la signalisation intracellulaire suite au traitement avec ces toxines a permis de suggérer que les RCPGs pourraient être couplés à plus d'une protéine G (7). En effet, les expériences menées dans des systèmes de cellules exprimant des protéines recombinantes ont montré que des récepteurs tels le récepteur  $\beta$  et  $\alpha_2$ -adrénergique peuvent activer les protéines  $G_{\alpha s}$  et  $G_{\alpha i}$  (25, 26). Quant au récepteur du glutamate métabotrope  $1\alpha$ , ce dernier peut activer les protéines  $G_{\alpha s}$ ,  $G_{\alpha i}$  et même des protéines de la famille  $G_{\alpha q/11}$  (7). Toutefois, cette capacité à activer diverses protéines G est discutable étant donné que dans la plupart des systèmes utilisés les RCPGs sont surexprimés dans les cellules et l'activation pourrait être due à l'importante densité des récepteurs à la surface cellulaire (7, 27).

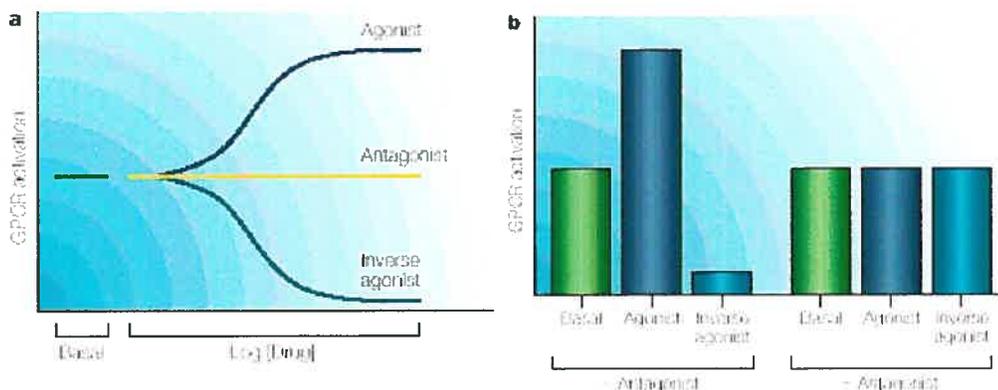
Subunit	Family	Main subtypes	Primary effector
$\alpha$	$\alpha_s$	$G_{\alpha_s}, G_{\alpha_{olf}}$	Adenylate cyclase $\uparrow$
		$G_{\alpha_{i,1}}, G_{\alpha_{i,2}}, G_{\alpha_{i,3}}$	Adenylate cyclase $\downarrow$
	$\alpha_{20}$	$G_{\alpha_{aA}}, G_{\alpha_{aB}}$	$K^+$ channels $\uparrow$
		$G_{\alpha_{11}}, G_{\alpha_{12}}$	$Ca^{2+}$ channels $\downarrow$
		$G_{\alpha_2}$	Cyclic GMP phosphodiesterase $\uparrow$
$\alpha_{\psi/11}$	$G_{\alpha_q}, G_{\alpha_{11}}, G_{\alpha_{14}}, G_{\alpha_{15}}, G_{\alpha_{16}}$	Phospholipase C $\uparrow$	
	$\alpha_{12}$	$G_{\alpha_{12}}, G_{\alpha_{13}}$	?
$\beta$	$\beta_1$ (67)	Different assemblies of $\beta$ - and $\gamma$ -subunits	Adenylate cyclase $\uparrow/\downarrow$ Phospholipases $\uparrow$ Phosphatidylinositol 3-kinase $\uparrow$
$\gamma$	$\gamma_{1-11}$ (129)		Protein kinase C $\uparrow$ Protein kinase D $\uparrow$ GPCR kinases $\uparrow$ $Ca^{2+}, K^+$ (and $Na^+$ ) channels

**Tableau I.I :** Classification des principales sous-unités des protéines G et leurs effecteurs primaires. Tiré de Hermans, E. (7).

### 1.1.3 INTERACTION LIGAND-RÉCEPTEUR :

Les ligands des RCPGs peuvent avoir différents effets sur leurs récepteurs respectifs (Figure 1.2). Un agoniste est défini comme étant un ligand qui suite à son interaction

avec le récepteur  $\gamma$  induit un changement conformationnel menant à une réponse biologique qui augmente l'activité du récepteur (28). Un agoniste est considéré comme étant complet lorsqu'il est capable d'induire une réponse maximale dans le système cellulaire ou tissulaire dans lequel il est utilisé. Par contre, un agoniste partiel a un effet moins important que l'agoniste complet agissant sur le même récepteur dans des conditions identiques. L'effet de l'agoniste partiel est inférieur à celui de l'agoniste complet même lorsque la concentration de l'agoniste partiel est élevée de façon à occuper tous les récepteurs à la surface cellulaire. Un agoniste peut être considéré comme étant complet dans un système mais partiel dans un autre système cellulaire (28). En outre, un agoniste inverse est un ligand qui réduit le nombre de récepteurs existant dans une conformation active. Ce phénomène est observé dans le cas où une fraction de récepteurs adoptent une conformation active en absence de leur agoniste. Un ligand peut aussi être un antagoniste qui réduit ou empêche l'effet d'un agoniste (28).



**Figure 1.2 :** Effets des divers ligands sur l'activation des RCPGs. **(a)** L'agoniste augmente l'activité du récepteur menant à une réponse biologique, tandis que l'agoniste inverse la diminue et réduit la proportion des récepteurs actifs en absence de ligand. **(b)** L'antagoniste réduit l'effet des autres ligands. Tiré de *The State of GPCR Research in 2004* (29)

Les sites d'interaction entre le récepteur activé (suite à la liaison du ligand) et la protéine G restent mal caractérisés. Pour certains RCPGs de la classe A, les études suggèrent que le ligand s'installe dans les régions extracellulaires du récepteur (1, 3). Par contre, le site de liaison du ligand est situé dans les tiers supérieurs des domaines

TM dans le cas de récepteurs de la classe A tels que la rhodopsine (1-3, 29). La partie C-terminale ainsi que la troisième boucle intracellulaire du récepteur sont impliqués dans l'interaction avec la protéine G (1, 3). Afin d'en apprendre davantage sur les sites d'interaction entre le récepteur et le ligand, des études de mutagenèse ont été effectuées. La mutagenèse dirigée des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergique et muscarinique suggère que les domaines TM 3 et TM6 jouent un rôle important dans la transition conformationnelle du récepteur vers la forme active (3, 30, 31). La liaison du ligand induirait un pivotement des domaines TM ainsi qu'un mouvement des domaines intracellulaires et de la partie C-terminale du récepteur, ce qui permettrait l'exposition de résidus important pour l'interaction avec la protéine G non accessibles en absence de ligand (6).

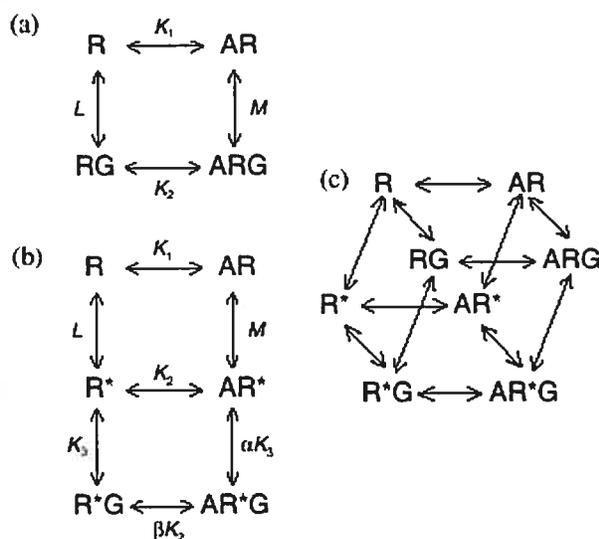
#### 1.1.4 ACTIVATION DES RCPGs :

Le processus d'activation des RCPGs est un phénomène mal documenté. Différents modèles pharmacologiques ont été proposés pour expliquer les résultats des différentes études de mutagenèse (6). Les modèles pharmacologiques classiques sont basés sur l'existence de 2 conformations du récepteur; soit une conformation inactive et une active (27). Ce modèle a été établi afin de pouvoir répondre à des exigences théoriques comme la nécessité d'adopter la conformation active pour que le couplage et l'activation de la protéine G soient possibles (**Figure 1.3**) (6).

Dans les années 1980, le modèle du complexe ternaire (*Ternary complex model*) proposé par De Lean et al. a été accepté par les experts dans le domaine (32). Dans ce dernier, le récepteur, la protéine G ainsi que les effecteurs sont des entités séparées qui diffusent librement dans la membrane. L'activation de la protéine G dépendrait de la fréquence de collisions entre le complexe agoniste-récepteur avec les protéines G (**Figure 1.3**) (6, 32).

Le modèle De Lean et al. a été modifié par Samama et al., afin de tenir compte de l'activité dite constitutive des récepteurs à l'état basal (sans stimulation avec l'agoniste) qui est détectée dans des systèmes cellulaires recombinants (**Figure 1.3b**) (33). Dans le cas du récepteur de l'angiotensine I, c'est en mesurant l'accumulation des inositols phosphates médiée par le récepteur mutant L305Q en comparaison avec

celui de type sauvage que l'activité ligand-indépendante du mutant a été mise en évidence. En absence de ligand et contrairement au récepteur de l'angiotensine I de type sauvage, la quantité d'inositols phosphates accumulés est directement proportionnelle à la quantité des récepteurs mutants L305Q exprimés dans les cellules (34). Enfin, le modèle modifié par Samama et al. (33) a été mis à jour par Weiss et al. afin d'inclure la possibilité de couplage du récepteur à la protéine G en absence du ligand, phénomène observé dans certains cas (Figure 1.3c) (35)



**Figure 1.3 :** Modèles pharmacologiques classiques de l'activation des RCPGs. (a) Le modèle du complexe ternaire proposé par De Lean et al.(32).  $R$  représente le récepteur qui en présence de l'agoniste mène au complexe  $AR$  capable d'interagir avec la protéine G afin de former les complexes ternaires  $ARG$  actifs. (b) Modifications apportées au modèle du complexe ternaire par Samama et al. (33). La conformation active  $R^*$  du récepteur  $R$  est favorisée par le ligand. L'adoption de la conformation  $R^*$  permet l'interaction avec la protéine G. (c) Extension du modèle modifié par Samama et al. afin d'inclure le couplage des récepteurs à la protéine G en absence de ligand (35). Les constantes d'équilibre de dissociation sont désignées par les lettres  $K1$ ,  $K2$ ,  $L$  et  $M$ . Tiré de Vauquelin, G. et al. (6).

Ces modèles classiques suggèrent qu'il n'existe que deux conformations que le récepteur peut adopter. La modification du modèle pharmacologique classique a aussi permis d'expliquer le concept de l'agoniste inverse, qui inhibe l'activité constitutive de façon dose dépendante (27, 36). L'inhibition de l'activité constitutive du récepteur par l'agoniste inverse suggère qu'il existe une forme active et inactive du récepteur en absence de ligand et aussi que l'agoniste inverse favoriserait la

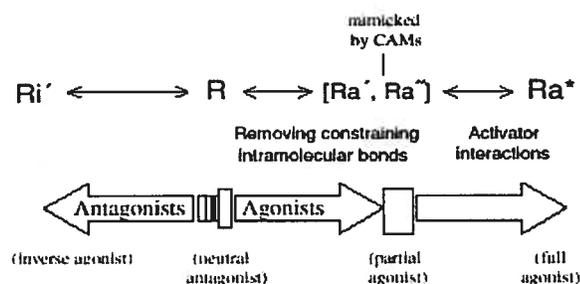
conformation inactive (6). Il est envisageable que différents états conformationnels intermédiaires existent (27). En effet, la caractérisation de récepteurs mutés dans lesquels le résidu d'origine a été remplacé par un petit acide aminé non polaire (souvent une alanine) a permis de mieux cerner les processus moléculaires ayant lieu durant l'activation des RCPGs (6). Certaines mutations ponctuelles donnent lieu à un récepteur constitutivement actif soulignant l'importance des résidus d'origine qui serviraient à établir des interactions intra-récepteur permettant de maintenir le récepteur dans un état conformationnel inactif (3, 31, 37). Par exemple, la substitution du résidu A293 par les 19 autres acides aminés dans la 3<sup>e</sup> boucle intracellulaire du récepteur  $\alpha_{1B}$ -adrénergique rend le récepteur constitutivement actif (38). Le degré d'activité constitutive dépend de la substitution et peut atteindre jusqu'à 50 % de l'activité du récepteur sauvage suite à une stimulation avec l'agoniste (38).

En ce qui concerne le récepteur de l'angiotensine II, les études montrent qu'il y a une interaction intramoléculaire entre le résidu N111 dans le domaine TM3 de ce récepteur et des résidus encore mal caractérisés du domaine TM7 qui servent à maintenir le récepteur dans une conformation inactive (39, 40). Lorsque le résidu N111 est muté, le récepteur de l'angiotensine II acquiert une faible activité constitutive. Toutefois, ce mutant peut être activé suite à une stimulation par l'agoniste et cette activité est presque équivalente à celle du récepteur de type sauvage après stimulation (39, 40). La faible activité constitutive du mutant N111 suggère qu'il ne suffit pas de défaire par mutagenèse les interactions intramoléculaires au sein du récepteur pour permettre l'activation de ce dernier, mais que l'agoniste est nécessaire pour induire le changement conformationnel menant à l'activation du récepteur (34). Ces observations permettent d'envisager qu'il existe plusieurs états conformationnels menant à la conformation active du récepteur et que le mutant N111 du récepteur de l'angiotensine II ayant une faible activité constitutive aurait une conformation pré-active en comparaison avec le récepteur sauvage (6).

Étant donné qu'il est très difficile d'étudier les RCPGs pré-activés par l'agoniste, l'utilisation de récepteurs mutés ayant une activité constitutive permet d'en apprendre plus sur les processus moléculaires durant l'activation des RCPGs. Par contre, il faut prendre en considération le fait que la structure primaire d'un récepteur

muté est différente de la forme sauvage. Aussi, la stimulation d'un récepteur mutant et celle d'un récepteur sauvage pourrait donner lieu à des effets différents (6, 41).

Des expériences de spectroscopie de fluorescence en temps réel ont permis de montrer qu'en présence d'agoniste, des RCPGs peuvent subir plusieurs changements conformationnels successifs. Ces études de spectroscopie ont contribué à l'établissement du modèle de liaison séquentielle et de la sélection conformationnelle (*sequential binding and conformational selection model*) (**Figure 1.4**) (6). Selon ce dernier, les RCPGs adoptent spontanément des conformations actives et inactives et l'activation du récepteur par un agoniste serait un processus séquentiel (3, 42). En effet, suite à l'interaction initiale entre le récepteur et un groupe fonctionnel de l'agoniste, toutes les interactions subséquentes stabiliseraient un ou plusieurs domaines TM du récepteur donnant lieu à différentes conformations intermédiaires menant à l'activation. En considérant ce modèle, des récepteurs de conformations intermédiaires/préactivées favoriseraient la liaison d'un agoniste, ce qui augmenterait la probabilité que les récepteurs subissent une isomérisation spontanée menant à l'état pleinement actif (42). Ce modèle permet aussi d'envisager qu'il existe des conformations inactives distinctes et permet d'expliquer des résultats expérimentaux tels que la capacité d'agonistes inverses à protéger les récepteurs  $\beta$ 2-adrénergiques contre la protéolyse et la dénaturation due à l'augmentation de la température (43, 44).



**Figure 1.4 :** Modèle de liaison séquentielle et de la sélection conformationnelle. Ce modèle suggère que les RCPGs peuvent adopter spontanément des conformations actives et inactives. L'activation du récepteur suite à la liaison de l'agoniste serait séquentiel (3, 45).  $R$  correspond au récepteur à l'état basal stabilisé par des antagonistes neutres,  $Ra^*$  représente l'état actif tandis que les états intermédiaire/préactivés sont représentés par  $Ra'$  et  $Ra''$ . Les mutants constitutivement actifs se trouveraient dans les états  $Ra'$  et  $Ra''$  et pourraient être stabilisés par des agonistes partiels leur permettant d'adopter la conformation  $Ra^*$ .  $Ri'$  représente les conformations inactives du récepteurs qui sont stabilisées par des agonistes inverses. Tiré de Vauquelin, G. et al. (6).

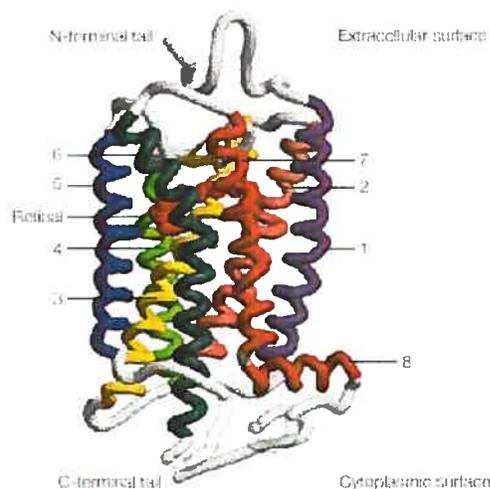
Swaminath et al. (46) ont étudié par spectroscopie de fluorescence les changements conformationnels induits par les catecholamines sur des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques purifiés. Cette équipe a montré que suite à la liaison d'agonistes tels que la norépinephrine, les récepteurs subissent des changements conformationnels menant à deux états (rapide et lent) conformationnels cinétiquement distinguables. L'utilisation de dérivés chimiques apparentés aux catéchols a permis d'identifier les groupements chimiques donnant lieu aux changements conformationnels rapides et lents des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques. Ainsi, les anneaux aromatiques et les groupements hydroxyls des catéchols ainsi que les groupements amines présents dans la dopamine et la norépinephrine seraient associés à des changements conformationnels rapides. Par contre, les  $\beta$ -hydroxyls retrouvés dans la norépinephrine seraient associés aux changements conformationnels lents. Les effets des ligands sur la signalisation des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques a aussi été investigué. La stimulation des récepteurs avec la dopamine, qui ne semble induire que des changements conformationnels rapides, permet d'activer la protéine  $G\alpha_s$  mais n'induit pas l'internalisation des récepteurs tandis que le traitement des récepteurs avec la norépinephrine et l'épinephrine, menant aux changements

conformationnels rapides et lents, induit l'activation des protéines G $\alpha$ s ainsi que l'internalisation des récepteurs. Ces résultats sont en accord avec le modèle de liaison séquentiel et de la sélection conformationnelle (**Figure 1.4**) selon lequel l'interaction entre le récepteur et certains groupes chimiques de l'agoniste stabiliseraient des états conformationnels du récepteurs menant à des réponses cellulaires distinctes.

#### 1.1.5 RELATION STRUCTURE-FONCTION :

Aucune structure tridimensionnelle des RCPGs humains n'est connue. Les études concernant la relation entre structure et la fonction des récepteurs de la classe A sont basées sur la structure tridimensionnelle de la rhodopsine bovine dans son état inactif (**Figure 1.5**) (47-49).

La rhodopsine est un RCPG de la famille A sensible aux photons. La particularité de ce récepteur est que son ligand, le 11-cis-rétinal, est lié aux domaines TM de la rhodopsine de façon covalente (50). Cette interaction permet au 11-cis-rétinal d'agir comme un agoniste inverse maintenant le récepteur dans sa conformation inactive. Suite à une stimulation avec un photon, le 11-cis-rétinal isomérisé et devient du trans-rétinal. Ce dernier, agit comme un agoniste et induit les changements conformationnels menant à l'activation de la rhodopsine (50).



**Figure 1.5:** Structure de la rhodopsine. Tiré de *The State of GPCR Research in 2004* (29).

L'utilisation des modèles tridimensionnels, basés sur la structure tridimensionnelle de la rhodopsine bovine dans son état inactif, en plus des études biochimiques et biophysiques ont permis d'identifier des motifs clé importants dans le mécanisme d'activation des RCPGs tels que les motifs E/DRY et NPxxY qui sont conservés à travers la classe A (50). Aussi, le motif N(L/F)YSS présent dans le domaine TM3 est très conservé à travers les récepteurs de chimiokine CXC et le résidu asparagine serait important lors du couplage du récepteur à la protéine G $\alpha$  suite à l'activation par le ligand (64). La caractérisation de récepteurs dont ces motifs sont mutés permet de mieux comprendre le lien entre la structure et la fonction des RCPGs étant donné leur implication dans des phénomènes physiologiques ainsi que dans de graves pathologies.

L'un des motifs importants dans l'activation des RCPGs est le motif E/DRY situé à la frontière cytosolique du domaine TM3. Il constitue le motif connu comme étant important dans le maintien de la conformation inactive du récepteur qui agit comme un "cadenas ionique" (*ionic lock*) (50). Le résidu arginine du motif E/DRY, le résidu adjacent D/E ainsi que le résidu D/E partiellement conservé du domaine TM6 semblent être impliqués dans la stabilisation du récepteur dans sa conformation inactive (51). Dans le cas du récepteur  $\alpha$ 1B-adrénérgique, un pont salin entre l'arginine du motif E/DRY et un résidu glutamate présent dans la sixième hélice serait impliqué dans le maintien du récepteur dans sa conformation inactive (52). Le changement de la charge d'un de ces résidus D/E donne lieu à des récepteurs constitutivement actifs, entre autres, dans le cas des récepteurs rhodopsine et adrénérgiques (53-57). La substitution du résidu arginine affecte dans la plupart des cas le couplage à la protéine G (60) tandis que le résidu tyrosine du motif serait un site de phosphorylation important pour la signalisation du récepteur (58),

Le résidu Y139 du motif E/DRY du récepteur de chimiokine CCR2 est important dans la signalisation du récepteur (58). En effet, Mellado et al. ont montré que le mutant CCR2 Y139F est exprimé à la surface cellulaire et possède une affinité pour l'agoniste semblable au récepteur de type sauvage. Toutefois, le mutant ne peut pas être phosphorylé au niveau de la tyrosine du motif E/DRY, il est incapable d'interagir avec la protéine G $\alpha$ i et ne peut induire la mobilisation du calcium dans les

cellules en plus d'être inapte à activer la voie JAK2/STAT3 suite à la stimulation avec l'agoniste (58).

Un autre exemple montrant l'importance du motif E/DRY dans l'activation du récepteur est celui des mutations introduites dans ce motif du récepteur Histamine H<sub>2</sub> (59). Lorsque le récepteur de type sauvage est exprimé dans des cellules CHO de façon stable il montre une activité constitutive. Dans leur étude, Alewijse et al. ont remplacé les résidus D115 et R116 par un résidu alanine ou asparagine (59). La mutation du résidu D115 confère une plus grande affinité pour l'agoniste, une activité constitutive ainsi que des propriétés de signalisation plus importantes au récepteur Histamine H<sub>2</sub> mutant. Par contre, les mutants du résidu R116 donnent lieu à un récepteur avec une capacité de signalisation réduite malgré l'augmentation de l'affinité pour l'agoniste et de l'activité constitutive en comparaison avec le récepteur de type sauvage. Ces résultats montrent l'importance des résidus D et R du motif E/DRY dans le maintien de la conformation inactive et l'activation du récepteur (59).

Le résidu arginine du motif E/DRY est, à quelques exceptions près, très conservé à travers les RCPGs de la classe A. La mutation du résidu R de ce motif affecte le couplage du récepteur à sa protéine G (60). Le mutant R137H du récepteur vasopressine 2 (V2R) est impliqué dans le diabète néphrogénique insipide (61). Ce mutant ne peut être couplé à la protéine G à cause de son interaction constitutive avec la  $\beta$ -arrestine ce qui influence grandement sa capacité à activer la production d'AMPc dans la cellule. Aussi, ce récepteur V2R muté est constitutivement phosphorylé (en absence d'agoniste), se retrouve dans les vésicules d'endocytose et non à la membrane plasmique a été caractérisé comme étant constitutivement désensibilisé. La conséquence physiologique de cette mutation est la perte d'eau des patients souffrant du diabète néphrogénique insipide (61).

La substitution du résidu arginine en histidine dans le motif E/DRY du récepteur vasopressine 2 donne lieu à un mutant constitutivement désensibilisé et soulève des questions quant au phénotype conféré par la même mutation à d'autres RCPGs. À cet effet, Wilbanks A.M. et al. ont étudié l'effet de la mutation du résidu arginine du motif

E/DRY sur la signalisation, la localisation et la désensibilisation des récepteurs  $\alpha_1B$ -adrénergique et de l'angiotensine II de type 1A (60). La mutation du résidu arginine donne souvent lieu à des mutants dont l'expression à la surface cellulaire est affectée (62). Les auteurs montrent que le mutant R143E du récepteur  $\alpha_1B$ -adrénergique est beaucoup moins présent à la membrane plasmique des cellules HEK293 en comparaison avec le récepteur de type sauvage (60). Le récepteur  $\alpha_1B$ -adrénergique est couplé à une protéine  $G\alpha_q$  et sa stimulation avec l'agoniste (norépinephrine) mène à l'activation de la phospholipase C (PLC) et à l'accumulation d'inositols triphosphates ( $IP_3$ ) dans la cellule. Les mutants  $\alpha_1B$ -adrénergique R143A, R143E, R143H et R143N ne peuvent induire la production d' $IP_3$  suite à la stimulation avec l'agoniste contrairement au récepteur de type sauvage et au mutant R143K. Ces mutants sont présents en grande partie dans les vésicules d'endocytose des cellules en absence de ligand et leur distribution dans les endosomes est accentuée suite au traitement avec l'agoniste comme ce qui a été observé avec le mutant R137H du récepteur vasopressine 2 constitutivement désensibilisé (61). La faible proportion des mutants R143K présents à la membrane plasmique suite au traitement avec l'agoniste reste toutefois plus importante en comparaison avec les autres mutants de ce récepteur.

Wilbanks et al. ont aussi étudié l'influence des mutants sur la distribution de la  $\beta$ -arrestine étant donné son implication dans le phénomène de désensibilisation des RCPGs suite à la stimulation avec l'agoniste (63). La grande affinité des mutants pour la  $\beta$ -arrestine en absence de stimulation avec l'agoniste explique sa présence à la membrane plasmique et sa re-localisation vers les endosomes suite au traitement des récepteurs avec l'agoniste. Donc, ces mutants sont faiblement présents à la membrane plasmique, ils sont incapables d'induire la signalisation, à l'exception du mutant R143K, et leur affinité pour la  $\beta$ -arrestine affecte sa distribution cellulaire en absence de stimulation des récepteurs par l'agoniste. La caractérisation du mutant R126H du récepteur de l'angiotensine II de type 1A, a permis de montrer que la substitution du résidu arginine seul n'est pas suffisant pour abolir la signalisation via ce récepteur. Toutefois, la capacité de ce mutant à coupler à la protéine  $G\alpha_q$  et d'induire l'accumulation des  $IP_3$  est réduite. Aussi, ce mutant est principalement localisé dans les endosomes et il est fortement associé à la  $\beta$ -arrestine en absence

d'agoniste. Le phénotype mis en évidence suite à la substitution du résidu arginine du motif E/DRY des récepteurs  $\alpha_1B$ -adrénergique et de l'angiotensine II de type 1A est tel que les récepteurs sont désensibilisés constitutivement et ces récepteurs peuvent perdre ou garder leur capacité à induire la production de seconds messagers suite à stimulation avec l'agoniste (60). Wilbanks et al. montrent que le phénotype des récepteurs étudiés suite à la substitution du résidu arginine du motif DRY est semblable ce qui montre l'importance de résidu pour la localisation du récepteur et pour son activité (60).

Par ailleurs, Zhang et al. ont montré que le résidu N 119 situé dans le domaine TM3 du récepteur de chimiokine CXCR4 est important dans l'activation de ce récepteur (64). La liaison du ligand au récepteur induit un changement conformationnel tel que les domaines hydrophobes et cytoplasmiques adoptent une orientation permettant de former un complexe ternaire de grande affinité avec la protéine  $G\alpha$  (65). En considérant la structure cristalline de la rhodopsine, ce résidu serait orienté vers le centre hydrophobe du récepteur (47). Le résidu N119 de CXCR4 serait à distance égale des parties extracellulaires et cytoplasmiques du domaine TM3 de CXCR4. Le motif N(L/F)YSS est très conservé à travers les récepteurs de chimiokine CXC et le résidu asparagine serait important dans les changements conformationnels permettant au récepteur d'interagir avec la protéine  $G\alpha$  (64). La substitution du résidu N119 pour une alanine ou une sérine donne lieu à un récepteur CXCR4 constitutivement actif, tandis que la substitution avec un résidu lysine ou un résidu acide aspartique donnent respectivement lieu à un récepteur incapable de signaler ou de phénotype sauvage. Suite à la stimulation avec le l'agoniste SDF-1, la mobilisation de calcium dans les cellules exprimant les mutants constitutivement actifs (N119S, N119A) est faible par rapport au récepteur sauvage CXCR4 (64). Le récepteur de type sauvage est internalisé suite à la stimulation avec SDF-1, tandis les mutants constitutivement actifs N119A et N119S sont continuellement présents à la surface cellulaire et dans les inclusions cytoplasmiques même en absence de ligand ce qui suggère l'internalisation constitutive de ces mutants. Le mutant N119K quant à lui ne signale pas et n'est pas internalisé suite à une stimulation avec SDF-1, bien qu'il ait conservé une affinité appréciable pour le ligand (64). Aussi, les mutants constitutivement actifs possèdent des affinités différentes de celles du récepteur sauvage et cela pour l'agoniste SDF-1 ainsi que dans le cas de l'agoniste partiel

AMD3100 et l'agoniste inverse T140. Ces résultats montrent l'importance du résidu N119 du domaine TM3 de CXCR4 pour la conformation de base du récepteur ainsi que pour son réarrangement conformationnel menant à son l'activation (64).

Toutes ces études suggèrent que l'activation des RCPGs requière l'interruption d'interactions intramoléculaires qui favoriseraient une conformation inactive du récepteur (59, 64). La liaison de l'agoniste permettrait de défaire les liens intramoléculaires dans le récepteur et stabiliserait une conformation permettant l'activation du récepteur. Lorsque les résidus gardant le récepteur dans une conformation inactive sont mutés le récepteur acquiert une activité constitutive qui peut aussi être associée à des pathologies dans le cas de mutations naturelles (66). Il est envisageable que les récepteurs adoptent spontanément des conformations actives et inactives et que le ligand interagisse de façon préférentielle avec une conformation donnée du récepteur (3, 6, 45).

## **1.2 DIMÉRISATION DES RCPGs :**

### **1.2.1 HISTORIQUE :**

Le concept de dimérisation a été accepté comme étant important dans le fonctionnement des divers récepteurs transmembranaires des facteurs de croissance tels que le *epidermal growth factor receptor* (EGFR), *platelet-derived growth factor receptor* (PDGFR), le *fibroblast growth factor receptor* (FGFR) ainsi que les récepteurs d'hormones de croissance (67). Ces récepteurs possèdent un seul domaine transmembranaire et sont désignés comme étant des récepteurs tyrosine kinases puisqu'ils possèdent un domaine de liaison à l'agoniste extracellulaire et un domaine intracellulaire tyrosine kinase (67). L'interaction avec l'agoniste induit dans la plupart des cas la dimérisation de ces récepteurs, suivie de la phosphorylation croisée des résidus tyrosines du domaine tyrosine kinase ce qui permet d'augmenter l'activité kinase du récepteur. Lorsque les résidus tyrosines situés à l'extérieur du domaine tyrosine kinase sont phosphorylés, l'affinité et l'interaction avec les effecteurs cellulaires, tels que la phospholypase C $\gamma$  et la tyrosine kinase cytoplasmique Src, sont augmentées (67).

Ce n'est que dans les années 1970 que les premières observations pharmacologiques suggérant l'existence de dimères de RCPGs ont été effectuées. Les courbes de saturation complexes montrant une coopérativité négative (ex. récepteur  $\beta$ -adrénergique) ou positive obtenues suite au traitement des récepteurs avec leurs agonistes et antagonistes respectifs pouvaient être interprétés comme étant des interactions "site-site" entre récepteurs dans un complexe dimérique voir multimérique (68-71). Par ailleurs, les propriétés de liaison non-classiques d'antagonistes comme le  $^3\text{H}$ -Spiperone du récepteur dopaminergique, qui ne détecte que la moitié des sites de liaison pouvant être occupés par la famille d'agonistes des benzamides, ont aussi été interprétés comme étant dû à la dimérisation de ces récepteurs (72, 73). D'autres données biochimiques ont mis en évidence la possibilité que la dimérisation soit un phénomène courant dans la famille des RCPGs. Par exemple, le marquage par photo-affinité des récepteurs muscariniques a permis d'observer des états de haute et basse affinité pouvant être expliqués par la dimérisation (74). La détermination de la taille des récepteurs gonadotropine, dopamine ainsi que  $\alpha$  et  $\beta$ -adrénergiques en utilisant des techniques comme le *crosslinking* et la chromatographie par immunoaffinité ont aussi permis de détecter des complexes moléculaires de tailles importantes ce qui suggère que ces récepteurs forment des dimères (74-77).

La dimérisation des RCPGs n'a été ré-investiguée qu'au début des années 1990 lorsque des études biochimiques et de trans-complémentation ont permis de montrer que cette interaction avait lieu (72).

### 1.2.2 TRANS-COMPLÉMENTATION FONCTIONNELLE :

La complémentation est caractérisée par le fait que la contribution d'un seul de deux protomères est suffisante lors de la fixation du ligand ou de la signalisation. Elle indiquerait alors que la dimérisation entre mutants défectueux peut mener à un dimère fonctionnel.

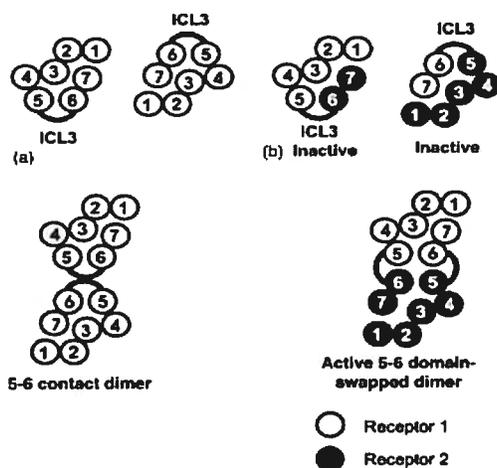
Les résultats de Maggio et al. ont permis de rouvrir le débat sur la dimérisation des RCPGs (78). En utilisant les récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergique et M3-muscarinique, ils ont

donné lieu à 2 récepteurs chimériques composés d'une part des 5 premiers domaines TM du récepteur  $\alpha_2$ -adrénergique et des 2 derniers domaines TM du récepteur M3-muscarinique et d'autre part des 5 premiers domaines TM du récepteur M3-muscarinique et les 2 derniers domaines TM du récepteur  $\alpha_2$ -adrénergique. Lorsque les chimères sont exprimées seules dans les cellules et stimulées par un des agonistes des récepteurs étudiés, la liaison des agonistes et l'activation de la signalisation cellulaire n'ont pas lieu. Toutefois, la co-expression des chimères permet de restaurer la capacité d'interaction avec les agonistes et suite à cette stimulation la signalisation cellulaire est enclenchée. Ces résultats montrent que les deux récepteurs sont nécessaires pour former une unité fonctionnelle (72, 78).

D'autres exemples de trans-complémentation fonctionnelle montrent que l'interaction intermoléculaire entre les récepteurs mutants permet de rétablir la capacité de liaison de l'agoniste ainsi que la signalisation subséquente et cela grâce à la formation d'un complexe dimérique des deux récepteurs défectueux (72). La co-expression de deux mutants du récepteur de l'angiotensine II incapables de lier l'agoniste permet de rétablir l'interaction avec l'angiotensine II (79). Dans le cas de mutants inactifs du récepteur à calcium, la co-expression dans la même cellule ne permet de restaurer la signalisation induite par l'agoniste que partiellement (80, 81). Cela suggère que les deux mutations détruisent la même fonction du récepteur empêchant de former une unité fonctionnelle par trans-complémentation.

Des modèles de dimérisation ont été proposés, notamment le modèle de dimérisation par contact (**Figure 1.6a**) (50). Dans ce cas, chaque polypeptide du dimère se replie indépendamment adoptant une structure semblable à celle de la rhodopsine. Les polypeptides peuvent interagir avec les autres unités grâce aux domaines TM tels que TM5 et TM6 (50). Suite à des observations comme celles décrites par Maggio et al. (65), le modèle de dimérisation *domain swapping* a été proposé (**Figure 1.6b**) (50). Selon ce dernier, chaque unité fonctionnelle du dimère est composée des 5 premiers domaines TM d'un polypeptide et des 2 derniers domaines TM de l'autre polypeptide. Dans ce modèle, les 3<sup>e</sup> boucles intracellulaires des protomères constituent la région impliquée dans l'interaction entre les deux unités fonctionnelles (78, 79, 82). Les résultats obtenus avec les chimères des récepteurs M3-muscarinique

et  $\alpha_2$ -adrénergique montrent que les dimères existent et agissent comme unité fonctionnelle. Par contre, elles ne permettent pas de montrer que la dimérisation entre récepteurs de type sauvage a lieu selon le modèle *domain swapping* (50). Notamment, les expériences essayant de montrer le phénomène du *domain swapping* dans le cas d'autres récepteurs ont échoué, ce qui rend le modèle difficilement généralisable (72).



**Figure 1.6:** Modèles de dimérisation des RCPGs. (a) Modèle de la dimérisation par contact. (b) Dimérisation par *domain swapping*. Tiré de Springael, J-Y. et al.(50)

### 1.2.3 MUTANTS DOMINANTS NÉGATIFS :

L'existence de dimères de RCPGs a été mise en évidence suite à l'identification de mutants dominants négatifs. Un dominant négatif est un mutant inactif capable de former un complexe avec le récepteur de type sauvage et lui impose son phénotype ce qui élimine l'activité du récepteur de type sauvage (72).

Le récepteur de chimiokine CCR5 est un co-récepteur nécessaire à l'entrée du VIH dans les cellules cibles. La délétion de 32 acides aminés de la 2<sup>e</sup> boucle extracellulaire de ce RCPG donne lieu à un récepteur dominant négatif (83, 84). En effet, il a été montré que le mutant CCR5 $\Delta$ 32 ne s'exprime pas à la surface cellulaire

et lorsque co-exprimé avec le récepteur de type sauvage, ce dernier est retenu dans le réticulum endoplasmique (RE). Cela suggère que la dimérisation pourrait être requise pour l'adressage de CCR5 à la surface cellulaire. En 2001, Chelli et al. ont montré que cet effet dominant négatif du mutant impliquerait une interaction entre le domaine TM3 de CCR5 et le domaine TM4 de CCR5 $\Delta$ 32 (84).

Le phénotype du mutant CCR5 $\Delta$ 32 est cliniquement important puisque cette délétion naturelle a été montrée comme étant capable de conférer une résistance à l'infection par le VIH-1 (85-87). Benkirane et al. ont proposé que la rétention du dimère CCR5 $\Delta$ 32/CCR5 dans le RE serait la cause du ralentissement de la progression du SIDA chez les patients hétérozygotes infectés par le VIH-1 (83). Toutefois, d'autres groupes suggèrent que la diminution de l'expression du récepteur CCR5 à la surface de leucocytes purifiés à partir d'échantillons sanguins d'individus hétérozygotes puisse être due uniquement au dosage du gène CCR5, et que l'effet dominant négatif de CCR5 $\Delta$ 32 ne serait pas en cause (50).

#### 1.2.4 CO-IMMUNOPRÉCIPITATION DES RCPGs :

Les études de trans-complémentation et de mutants dominants négatifs indiquent que les RCPGs peuvent former des dimères. Toutefois, il a été objecté qu'il pouvait s'agir d'un phénomène propre aux récepteurs mutants. À cet effet, des expériences permettant de détecter directement les interactions protéine-protéine ont été mises au point (72). Il a été montré par co-immunoprécipitation que plusieurs autres RCPGs peuvent dimériser dont les récepteurs GABAB (88-90), métabotrope glutamate 5 (mGluR<sub>5</sub>) (91),  $\delta$ -opioïde(92), calcium (93) et M3-muscarinique (94).

La co-immunoprécipitation du récepteur  $\beta_2$ -adrénergique en utilisant des étiquettes immunologiques différentes a permis de montrer son homodimérisation dans les cellules d'insectes Sf9 (13). L'immunobuvardage de type western du récepteur c-myc- $\beta_2$ -adrénergique exprimé dans les cellules Sf9 a permis d'observer la forme monomérique du récepteur (43-50 kDa) mais aussi une forme du récepteur dont la taille moléculaire correspond au double de celle du monomère (85-95 kDa). Cela suggère l'existence d'un dimère de récepteur résistant au traitement au sodium

dodécyl sulfate (SDS) (13). Ce dimère est aussi observé dans les préparations de membranes solubilisées avec la digitonine et même suite à la purification des récepteurs par affinité sur des colonnes alprénolol-sépharose. Aussi, le crosslinking avec l'agent BASED (bis[ $\beta$ -(4 azidosalicylamido)ethyl] disulfide) a permis d'augmenter la quantité de dimères détectés par rapport à celle des monomères du récepteur  $\beta_2$ -adrénergique en stabilisant cette forme du récepteur. Cela suggère l'existence des dimères avant la lyse cellulaire (13).

Dans cette même étude, Hébert et al. ont co-exprimé les récepteurs HA- $\beta_2$ -adrénergique et c-myc- $\beta_2$ -adrénergique dans des cellules Sf9. L'immuno-réactivité de l'épitope HA dans les fractions cellulaires immunoprécipitées avec un anticorps anti-c-myc ainsi que l'immunoprécipitation avec un anticorps anti-HA suivie d'un immunobuvardage avec l'anticorps anti-c-myc a permis de détecter la forme monomérique ainsi que la forme dimérique du récepteur (13). Ces résultats indiquent que les récepteurs HA- $\beta_2$ -adrénergique et c-myc- $\beta_2$ -adrénergique sont co-immunoprécipités et forment un complexe avant la lyse cellulaire. Ces résultats montrent qu'il y a une interaction intermoléculaire entre les protomères  $\beta_2$ -adrénergiques, les protomères étant définis comme étant des sous-unités identiques dans un complexe oligomérique. Comme contrôle négatif, aucune co-immunoprécipitation entre le récepteur c-myc-M2-muscarinique et HA- $\beta_2$ -adrénergique n'a été observée (13).

Par ailleurs, le récepteur vasopressine V2 est important dans la régulation de la rétention de l'eau dans les reins. Certaines mutations du récepteur, telle que l'absence d'une portion de sa partie C-terminale à partir du résidu 337, ont été identifiées chez des patients atteints de diabète néphrogénique insipide congénital (13). Il a été montré par Hébert et al. que le récepteur vasopressine V2 ainsi que le mutant tronqué peuvent homodimériser. Leur expression transitoire dans des cellules mammifères COS-7 suivie d'une immunoprécipitation ainsi qu'un immunobuvardage de type western ont permis de détecter la forme monomérique du récepteur de type sauvage (64-69 kDa) et du mutant (55-58 kDa) mais aussi la forme dimérique de ces derniers dont les poids moléculaires sont respectivement 120-135 kDa et 89-100 kDa (13).

La co-immunoprécipitation et l'analyse par immunobuvardage de type western ont permis d'apporter plusieurs éléments de réponse quant à la dimérisation des RCPGs (72). Toutefois, la co-immunoprécipitation requiert la solubilisation des récepteurs et les dimères observés pourraient constituer un artéfact suite à la solubilisation. Les RCPGs possèdent 7 domaines transmembranaires hydrophobes et suite à une solubilisation incomplète leur agrégation peut, de façon erronée, être interprétée comme étant une dimérisation (72). Par contre, la détection d'une bande de taille 2 fois supérieure à celle du monomère pourrait aussi s'expliquer par le fait que les dimères de RCPGs montrent une résistance au pouvoir dénaturant du SDS à cause des interactions intermoléculaires hydrophobes au sein du dimère (88-94). Ce phénomène n'est pas unique aux RCPGs et a été observé dans les cas de plusieurs autres protéines (72) ce qui permet d'envisager que les des dimères détectés sont spécifiques.

Notamment, les expériences décrites précédemment ont été réalisées dans des systèmes d'expression hétérologues dans lesquels les récepteurs d'intérêt ont été surexprimés (88-90). Il a donc été considéré que les dimères seraient non-spécifiques et résulteraient plutôt de la surexpression des récepteurs dans les cellules. Toutefois, la dimérisation des RCPGs a aussi été montrée dans des cellules exprimant les récepteurs de façon endogène (90, 95, 96). Ciruela et al. ont détecté par co-immunoprécipitation des monomères (39 kDa) et des dimères (74 kDa) du récepteur adénosine A1 présents dans des cellules du cortex cérébrale de cochon. L'existence de dimères (90 kDa) du récepteur de la dopamine D2 a été suggérée suite à la co-immunoprécipitation des récepteurs provenant de tissus humains. L'existence de dimères du récepteur de chimiokine CCR5 dans les cellules monoculaires périphériques du sang (97), du récepteur CCR2 dans des cellules monocytaires humaines de type Mono Mac 1 (98), ainsi que du récepteur CXCR4 dans des cellules T humaines (99) a été observé.

### 1.2.5 DÉTECTION DE DIMÈRES DANS LES CELLULES VIVANTES :

Les méthodes biophysiques de transfert d'énergie par résonance sont des outils de choix pour étudier la dimérisation des RCPGs dans les cellules vivantes. Ces méthodes sont basées sur un transfert non-radiatif d'énergie entre les dipôles électromagnétiques d'un donneur d'énergie à un accepteur. Il est primordial que le spectre d'émission du donneur et le spectre d'excitation de l'accepteur se recoupent et que le donneur et l'accepteur soient à proximité l'un de l'autre (72).

La fusion de l'un des protomères au donneur et l'autre protomère à l'accepteur permet d'observer leur dimérisation des RCPGs dans les cellules vivantes puisque que le transfert d'énergie a lieu lorsque les partenaires d'interaction sont à une distance de moins de 100 Å. L'efficacité du transfert d'énergie par résonance dépend de l'orientation et de la distance séparant le donneur et l'accepteur. En effet, l'efficacité du transfert d'énergie varie en fonction de la puissance 6 de la distance qui sépare les partenaires du transfert d'énergie (100). La variation du transfert d'énergie par résonance dépend de la distance initiale entre l'accepteur et le donneur. Dans le cas d'un dimère constitutif de RCPGs dont les partenaires de transfert d'énergie sont extrêmement à proximité, le transfert d'énergie atteindrait presque son seuil maximal. Les changements conformationnels induits par un ligand ne pourraient être que faiblement observés étant donné que la variation du transfert d'énergie de résonance serait faible. Toutefois, sachant que (1) l'efficacité du transfert d'énergie varie inversement avec la puissance 6 de la distance entre les fluorophores et que (2) dans le cas où la distance entre le donneur et l'accepteur couplés à leurs RCPGs respectifs donne lieu à environ 50% du transfert d'énergie maximal, de petits changements dans la distance séparant le donneur et l'accepteur se traduiraient par une variation importante dans le transfert d'énergie par résonance (100). Cette caractéristique rend les méthodes de RET des techniques de choix pour étudier les interactions protéine-protéine.

#### 1.2.5.1 TRANSFERT D'ÉNERGIE PAR RÉSONANCE DE FLUORESCENCE (FRET) :

Dans le FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*), le donneur (ex.CFP, *Cyan Fluorescent Protein*) et l'accepteur (YFP, *Yellow Fluorescent Protein*) sont des molécules fluorescentes. En fusionnant les protomères RCPGs au donneur et à

l'accepteur, cette méthode permet d'examiner leur dimérisation puisque s'il y a interaction entre les protomères le FRET a lieu (72). L'énergie initiale est procurée au donneur fluorescent grâce à une source de lumière (101). L'émission de fluorescence de l'accepteur ainsi que le *quenching* de la fluorescence du donneur peuvent servir à quantifier le transfert d'énergie. Notamment, il est possible de coupler des anticorps dirigés contre le récepteur (102) ou des ligands (103) à des fluorophores et de regarder leur interaction avec le récepteur fusionné à un autre fluorophore constituant ainsi un couple FRET. Des variations de la méthode de FRET sont le pbFRET (*photobleaching FRET*) (102) et le HTR-FRET (*homogenous time-resolved FRET*) qui dépendent du temps (104). L'efficacité du transfert d'énergie dans le pbFRET est calculée indirectement suite à la mesure du temps de "photobleaching" du donneur d'énergie excité par une source de lumière en présence et en absence de l'accepteur d'énergie (105). Quant au HTR-FRET mesuré en fonction du temps il permet de faire des mesures de FRET décalée dans le temps en utilisant des fluorophores dont la fluorescence est maintenue durant une période de temps plus importante. Cela permet de réduire le bruit de fond causé par l'autofluorescence des cellules (105). L'utilisation du FRET a permis de montrer l'homodimérisation de RCPGs tels que les récepteurs SSTR5-somatostatine (102) et  $\delta$ -opioïde (104).

#### 1.2.5.2 TRANSFERT D'ÉNERGIE PAR RÉSONANCE DE BIOLUMINESCENCE (BRET) :

Le BRET (*Bioluminescence Resonance Energy Transfer*) est un phénomène naturel ayant lieu dans les animaux marins comme la *Renilla reniformis* (106). Le principe est le même que dans le cas du FRET à la différence que le donneur est une protéine luminescente, plus spécifiquement une enzyme appelée luciférase (RLuc). L'oxydation du substrat (coelentérazine) par la luciférase permet de produire la luminescence qui peut être transférée à l'accepteur fluorescent (YFP) lorsque ces deux molécules sont à une distance de moins de 100 Å l'une de l'autre (Figure 1.7) (72).

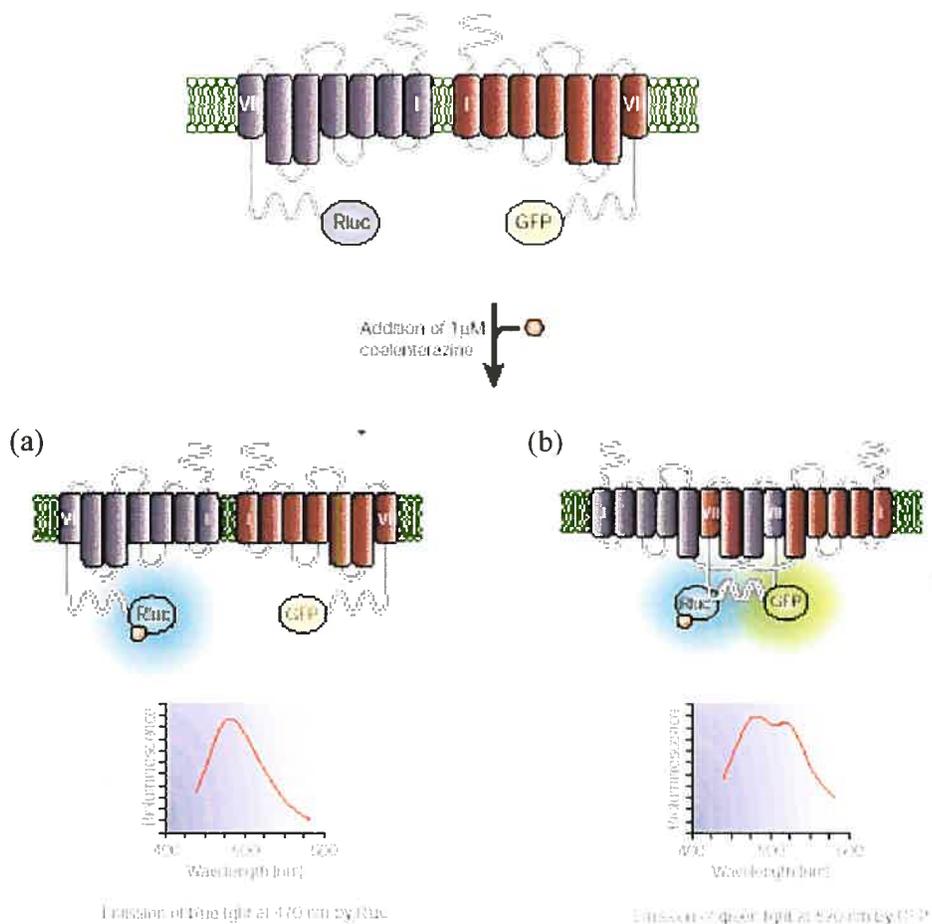
La méthode de BRET est un système de choix pour l'étude de la dimérisation des RCPGs dans les cellules vivantes qui permet aussi d'observer les changements conformationnels d'une protéine (107). Il s'agit dans un premier temps de fusionner

la partie C-terminale du RCPG d'une part à la Rénilla luciférase (Rluc) et l'autre partenaire d'interaction à la YFP et de co-exprimer les protéines de fusion dans les cellules. En absence de dimérisation, suite à l'addition de la coelentérazine H, un signal de bioluminescence ayant un pic à 470 nm devrait être obtenu et correspond à celui de la Rluc seule (107). Dans le cas d'une dimérisation, l'énergie produite suite à l'oxydation de la coelentérazine H par la Rluc est transférée à l'accepteur YFP étant donné leur proximité. Le deuxième signal apparaît et correspond à la fluorescence caractéristique de la YFP ayant un pic à 530 nm (108) (Figure 1.7).

L'un des avantages du FRET est qu'il permet, grâce à un microscope, la visualisation de l'interaction protéine-protéine dans les compartiments de la cellule, ce qui est impossible avec le BRET à cause de la faible intensité de lumière émise par la luciférase (107). Le HTR-FRET requiert l'utilisation de constructions conjuguées à des anticorps et ces derniers ne peuvent pas traverser la membrane plasmique. Cela permet la détection exclusive de dimères à la surface cellulaire, contrairement au BRET où la dimérisation est détectée dans tous les compartiments cellulaires (50).

Toutefois, plusieurs désavantages du FRET ont permis au BRET de devenir la méthode de choix permettant de visualiser la dimérisation dans les cellules vivantes. Le fluorophore donneur dans la méthode du FRET requiert une excitation par une lumière monochromatique qui peut aussi exciter directement l'accepteur. L'interprétation des résultats devient alors compliquée puisque les spectres d'absorption et d'émission des mutants GFP disponibles se recourent (107). Aussi, l'excitation par une lumière peut induire le *photobleaching* du fluorophore donneur ce qui peut mener à la perte du signal en fonction du temps en plus de causer l'auto-fluorescence des cellules et augmenter le bruit de fond (72).

Par contre, l'excitation à l'aide d'une source d'énergie extérieur n'est pas nécessaire dans le BRET. La quantification du transfert d'énergie par résonance est facilitée par rapport au FRET (109).



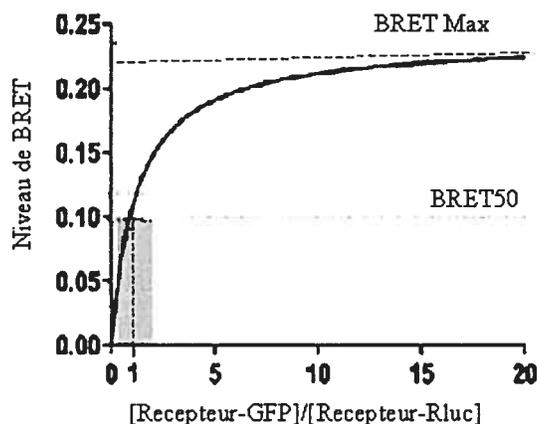
**Figure 1.7:** Représentation schématique du BRET. Suite à l'ajout de la coelentérazine H, le substrat du donneur Rluc (a) aucun transfert d'énergie n'a lieu si le donneur et l'accepteur fusionnés aux partenaires d'interaction investigués sont séparés par une distance supérieure à 100 Å. (b) Un signal BRET est mesuré si les protéines fusionnées au donneur et à l'accepteur interagissent et réduisent la distance entre donneur et accepteur à 100 Å ou moins. Tiré et modifié à partir de Bouvier, M. (72).

Les méthodes biophysiques de RET permettent de regarder la dimérisation des RCPGs dans leur environnement. Plusieurs équipes ont montré l'existence d'homou ou d'hétérodimères de RCPGs tels que les récepteurs  $\beta$ 1 et  $\beta$ 2-adrénériques (108, 110, 111), le récepteur dopamine D2 (111), le récepteur de la somatostatine SSTR5 (111), le récepteur TRH (112),  $\delta$  et  $\kappa$ -opioïdes (104, 113), les récepteurs de chimiokines CXCR4 et CCR5 (114), et les récepteurs de la mélatonine MT1 et MT2 (115) dans les cellules (116, 117).

Mercier et al. ont montré l'homo- et hétérodimérisation des récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_2$ -adrénergiques par BRET (110). Cette étude a aussi permis pour la première fois d'estimer l'affinité des protomères  $\beta_1$  et  $\beta_2$ -adrénergiques à homo- et hétérodimériser ainsi que d'évaluer l'effet de la densité des récepteurs sur leur capacité à former des dimères détectés par BRET (110). Les récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_2$ -adrénergiques possèdent une grande identité de séquence dans les domaines transmembranaires qui pourraient être les sites d'interactions entre les protomères (13). Notamment, les récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_2$ -adrénergiques sont co-exprimés de façon endogène dans plusieurs types cellulaires tels que les cellules transitionnelles et mi-nodales du nœud atrio-ventriculaire ainsi que dans les cellules vasculaires du muscle lisse du rein (118, 119). Le fait que ces deux récepteurs sont retrouvés aussi dans le foie, les poumons ainsi que les tissus adipeux (120) permet d'envisager leur hétérodimérisation (110).

Dans le cadre de l'étude de Mercier et al., la partie C-terminale des récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_2$ -adrénergiques ont été fusionnés d'une part avec le donneur Rluc et d'autre part avec l'accepteur GFP. L'équipe a montré que l'affinité des protéines de fusion pour l'antagoniste cyanopindolol et l'agoniste isoprotérénol est comparable à celle des protéines non fusionnées. Aussi, la capacité des protéines de fusion à stimuler l'adénylate cyclase est identique à celle des récepteurs sans fusion (110).

Afin que les résultats BRET puissent être considérés comme étant quantitatifs, le ratio donneur Rluc/accepteur GFP doit être un paramètre contrôlé. Le transfert d'énergie par BRET pour une même concentration de donneur Rluc devrait augmenter lorsque la concentration en accepteur GFP augmente (110). En atteignant un plateau, toutes les molécules de donneurs transfèrent leur énergie à l'accepteur GFP ce qui permet de tracer une courbe de saturation. Le niveau maximum de BRET ( $BRET_{max}$ ) devrait dépendre du nombre de dimères formés ainsi que de la distance séparant le donneur de l'accepteur dans les dimères. Le  $BRET_{50}$  est défini comme étant la concentration des accepteurs GFP donnant lieu à 50% du transfert d'énergie. Cette valeur devrait refléter l'affinité relative de la protéine fusionnée à l'accepteur pour la protéine fusionnée au donneur (110) (**Figure 1.8**).



**Figure 1.8:** Courbe théorique de saturation BRET. Le signal BRET représenté en fonction des fusions du donneur-GFP/accepteur-Rluc permet de considérer les mesures comme étant quantitatives uniquement si la fluorescence et la luminescence sont respectivement proportionnelles à la concentration des récepteurs-GFP et récepteurs-Rluc. Le  $BRET_{Max}$  devrait refléter le nombre de dimères. Le  $BRET_{50}$  devrait correspondre au nombre de fusions -Rluc donnant lieu à 50% du transfert d'énergie et refléterait l'affinité relative du protomère-GFP pour le protomère-Rluc. Tiré et adapté à partir de Mercier, J.F. et al. (110).

En tenant compte des considérations théoriques établies précédemment, Mercier et al. ont confirmé l'existence d'homo- et d'hétérodimères  $\beta_1$  et  $\beta_2$ -adrénergiques par BRET (110). Les courbes de saturations ont été tracées suite à la co-transfection des cellules HEK293 avec une quantité constante de récepteur ( $\beta_1$  ou  $\beta_2$ -adrénergique) fusionné au donneur Rluc et des concentrations croissantes de récepteur  $\beta_1$  ou  $\beta_2$ -adrénergique fusionné à l'accepteur GFP. Le signal BRET exprimé en fonction du niveau de fluorescence (par rapport au niveau basal de fluorescence) permet d'obtenir les courbes de saturation sous forme d'hyperbole. Toutefois, afin de pouvoir interpréter de façon quantitative les résultats montrant l'homo- et l'hétérodimérisation des récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_2$ -adrénergiques, il est impératif que les mesures de luminescence et de fluorescence soient directement proportionnelles à la quantité de récepteur (110).

Les auteurs ont confirmé la relation linéaire entre la luminescence et la fluorescence des protéines de fusion par rapport à la densité des récepteurs. Mercier et al.

montrent qu'en illustrant le BRET en fonction du ratio récepteur-GFP/récepteur-Rluc donne aussi lieu à une hyperbole qui atteint un seuil maximal (**Figure 1.8**). Les valeurs de BRET<sub>50</sub> obtenues à partir des courbes de saturation BRET, pour les homo- et hétérodimères  $\beta_1$  et  $\beta_2$ -adrénergiques, sont similaires et suggèrent que l'affinité relative des protomères  $\beta_1$  et  $\beta_2$ -adrénergiques les un pour les autres est semblable. Ainsi, dans les cellules exprimant les 2 sous-types de récepteurs de façon endogène l'hétérodimérisation serait aussi probable que l'homodimérisation. Dans le cas où le BRET détecté n'aurait pas été spécifique mais plutôt le résultat de collisions aléatoires entre récepteurs-Rluc et -GFP, le signal BRET aurait donné lieu à une droite aussi désigné le *bystander BRET* (110). Enfin, l'équipe a montré que le BRET ne varie pas lorsque la densité des récepteurs est augmentée tout en gardant le ratio récepteur-Rluc/récepteur-GFP équivalent à 1:1 montrant que le signal BRET détecté est spécifique et indépendant de la densité des récepteurs (110).

### 1.3 IMPORTANCE DE LA DIMÉRISATION :

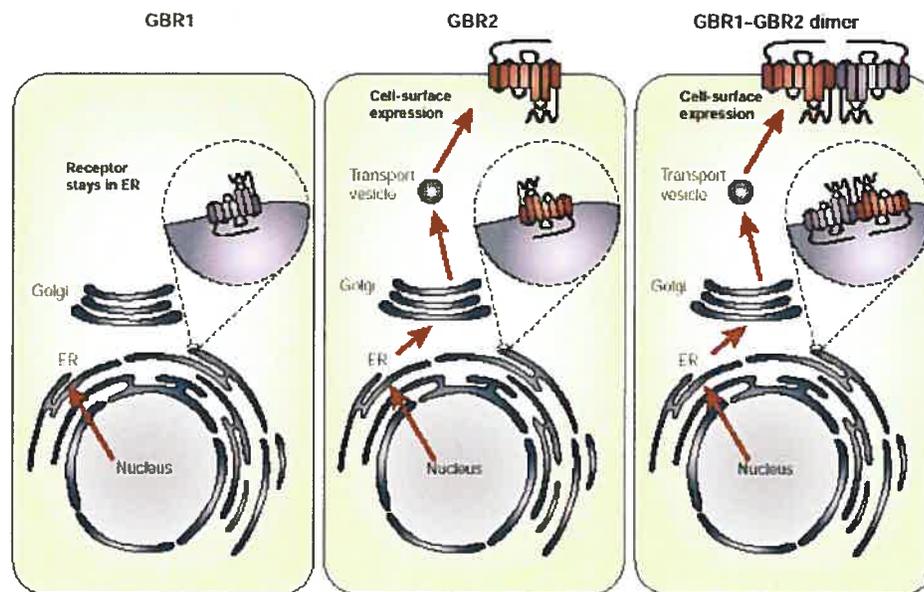
Les différentes méthodes décrites précédemment ont permis de montrer l'existence d'interactions intermoléculaires entre les protomères de RCPGs. La dimérisation des RCPGs est importante dans différents aspects de leur biosynthèse et fonction. Étant donné que ces récepteurs sont la plus importante cible pharmacologique des médicaments, l'acquisition d'informations à leur sujet pourrait avoir de grandes implications dans le développement et le criblage de nouvelles drogues (50).

#### 1.3.1 LA DIMÉRISATION DANS LE *CHAPERONING* ET LE TRANSPORT :

La dimérisation semble être importante dans le repliement et le transport adéquat des RCPGs à la surface cellulaire et l'étude du récepteur métabotropique GABAB est un exemple qui illustre cette importance (72). Plusieurs travaux simultanés réalisés par des équipes indépendantes ont montré que l'expression à la surface cellulaire d'un récepteur GABAB fonctionnel requiert la co-expression des protomères GBR1 (GABABR1) et GBR2 (GABABR2) (88-90). L'expression de l'isoforme GBR1 seul, dans les cellules de mammifères, donne lieu à un récepteur retenu dans le RE. Lorsque GBR2 est exprimé seul dans les cellules, il est retrouvé à la surface

cellulaire. Toutefois, cet isoforme est incapable de lier l'agoniste GABA et d'activer la signalisation cellulaire (88-90). La co-expression de GBR1 et GBR2 permet aux deux protomères d'atteindre la surface cellulaire en tant que protéines matures et capables d'induire la signalisation cellulaire suite au traitement avec l'agoniste. À la lumière de ces résultats, cette hétérodimérisation semble être requise pour l'expression à la surface cellulaire d'un récepteur GABAB fonctionnel (88-90).

L'interaction protéine-protéine entre GBR1 et GBR2 a été montrée par co-immunoprécipitation dans un système d'expression hétérologue et dans des cellules de cerveau exprimant les protomères de façon endogène, ce qui souligne l'importance physiologique de l'hétérodimérisation du récepteur GABAB (88-90). L'isoforme GBR2 pourrait être considéré comme une chaperone moléculaire qui est définie comme étant une protéine qui assiste de façon non covalente à l'assemblage d'un complexe protéique. En effet, il a été montré que GBR2 est essentiel au bon repliement, au transport à la surface cellulaire de GBR1 ainsi qu'à la formation d'un récepteur fonctionnel (88-90). La fonction de GBR2 en tant que chaperone moléculaire est renforcée par l'étude de Margeta-Mitrovic et al. qui a permis d'identifier le signal de rétention de GBR1 dans le RE, situé dans la partie C-terminale de GBR1 (121). Il a été proposé que l'hétérodimérisation GBR1-GBR2 a lieu grâce à une interaction de type *coiled-coil* dans la partie C-terminale des protomères. Cette dernière permet de masquer le signal de rétention de GBR1 dans le RE, menant ainsi au ciblage du dimère à la surface cellulaire (121).



**Figure 1.9:** Rôle de la dimérisation des RCPGs dans le transport. La co-expression des isoformes GBR1 et GBR2 est nécessaire afin que GBR1 soit transporté à la membrane plasmique. L'isoforme GBR2 exprimé seul est retrouvé à la membrane plasmique, incapable de lier l'agoniste GABA, il ne peut activer les voies de signalisation. L'hétérodimère GBR1/GBR2 atteint la surface cellulaire et forme un récepteur GABAB fonctionnel. Tiré de Bouvier, M. (72).

L'importance de la dimérisation dans la maturation et le transport des récepteurs est aussi observée dans le cas de mutants tronqués dominants négatifs du récepteur vasopressine V2. Ces derniers, lorsque co-exprimés avec le récepteur de type sauvage, le séquestrent empêchant son ciblage à la surface cellulaire (122).

### 1.3.2 DIMÉRISATION ET SIGNALISATION CELLULAIRE :

Le rôle des RCPGs dans la transduction des signaux en tant que dimère est illustré à travers les travaux portant sur le récepteur GABAB (121). Il a été montré que la mutation du motif de rétention de GBR1 dans le RE permet son export à la surface cellulaire. Toutefois, suite à la stimulation par l'agoniste, la signalisation n'a lieu que lorsque GBR1 et GBR2 sont co-exprimés. Cela suggère que l'unité fonctionnelle essentielle à la signalisation, induite par l'agoniste, est le dimère GBR1/GBR2. Le

protomère GBR2 est plus qu'une chaperone moléculaire, puisqu'elle assure le couplage à la protéine G (121).

Dans le cas du récepteur  $\beta_2$ -adrénergique, l'utilisation des peptides des domaines TM du récepteur a permis de souligner l'importance de la dimérisation pour la signalisation. Hébert et al. ont montré l'existence de dimères du récepteur  $\beta_2$ -adrénergique par co-immunoprécipitation (13). Le traitement chimique du récepteur avec des agents tels que le  $\beta$ -mercaptoethanol, dithiothreitol et des dénaturants (ex. urée) suivi d'une analyse par immunobuvardage de type western, n'a pas permis de défaire le dimère  $\beta_2$ -adrénergique. Les peptides TM ont interrompu la dimérisation et la signalisation via le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique ce qui suggère un lien entre la dimérisation et la signalisation du récepteur (13).

### 1.3.3 DIMÉRISATION ET DIVERSITÉ PHARMACOLOGIQUE :

L'homodimérisation d'un récepteur soulève des questions au sujet des mécanismes moléculaires de reconnaissance des effecteurs et la transduction des signaux. L'hétérodimérisation entre deux RCPGs, quant à elle, permet d'envisager une importante possibilité de combinaison de récepteurs augmentant la diversité pharmacologique et le signalisation croisée entre les diverses voies de signalisation cellulaire (72).

En 1999, Jordan et al. ont montré que l'hétérodimérisation entre deux récepteurs différents est possible. Il a été montré que les récepteurs  $\kappa$ -opioïde et  $\delta$ -opioïde fusionnés respectivement aux épitopes immunologiques c-myc- et Flag co-immunoprécipitent (92). Par contre, aucune interaction n'est détectée entre le récepteur  $\kappa$ -opioïde et  $\mu$ -opioïde. Notamment, lorsque co-exprimés dans la même cellule, les récepteurs  $\kappa$ - et  $\delta$ -opioïdes possèdent des propriétés pharmacologiques différentes que lorsque exprimés seuls (92). L'hétérodimère  $\kappa$ - $\delta$  opioïde aurait une affinité plus importante pour des ligands partiellement sélectifs que pour les agonistes et antagonistes répertoriés pour les récepteurs d'intérêt. Les ligands sélectifs, quant à eux, se lient à l'hétérodimère de façon synergique et ont un effet stimulant et additif sur la voie des MAPK (92). Ces observations permettent

d'envisager que l'hétérodimérisation entre les sous-types des récepteurs d'opioïdes augmente la diversité pharmacologique et permettent d'expliquer l'existence de sous-types de récepteurs d'opioïdes identifiés pharmacologiquement pour lesquels aucun gène n'a pu être cloné (92).

L'hétérodimérisation des récepteurs dopamine D2 et somatostatine SSTR5, qui sont colocalisés dans les neurones corticaux, a été observée par FRET (111). Les diverses études montrant l'interaction fonctionnelle entre le système dopaminergique et celui de la somatostatine ont permis d'envisager l'existence d'hétérodimères dopamine D2- somatostatine SSTR5. Le mutant de délétion  $\Delta 318$  du récepteur somatostatine SSTR5, est incapable de signaler, mais reste apte à lier la somatostatine (111). La stimulation avec la somatostatine du mutant SSTR5- $\Delta 318$  co-exprimé avec le récepteur dopamine D2 permet d'inhiber l'activité de l'adénylate cyclase par trans-complémentation. L'activité de l'adénylate cyclase est rétablie lorsque l'on ajoute au système un antagoniste du récepteur dopamine D2, montrant ainsi qu'il y a complémentation et que les récepteurs d'intérêt formeraient un hétérodimère fonctionnel. Il a aussi été observé que la dopamine et la somatostatine lient de façon synergique (effet additif) les récepteurs dopamine D2 et somatostatine SSTR5 de type sauvage lorsque co-exprimés dans la même cellule (111).

#### **1.4 DIMÉRISATION CONSTITUTIVE OU LIGAND-DÉPENDANTE ?**

L'importance du ligand dans la dimérisation des RCPGs a pendant longtemps été sujet de débats. Certains ont suggéré que la dimérisation était induite suite à la stimulation avec l'agoniste ce qui constituerait une étape importante dans l'activation du récepteur. C'est le cas de Mellado et al. qui ont étudié la dimérisation des récepteurs de chimiokine CCR2, CCR5 et CXCR4 (97-99, 123) dont le cas sera discuté en détail plus loin. En ce qui concerne le récepteur de la somatostatine SSTR5, il a été observé que le signal de pbFRET augmente lorsque l'agoniste est ajouté dans le système suggérant que la dimérisation pourrait être induite (102). Par contre, beaucoup d'études ont montré que les dimères sont préformés et que la dimérisation des RCPGs est indispensable lors de l'adressage à la membrane cellulaire et pour la fonction du récepteur (ex. le récepteur GABAB) (88-90). Mandrika et al. ont récemment montré par BRET que les récepteurs de

mélanocortine humains 1 et 3 pouvaient former des homo- et hétérodimères et que la dimérisation était ligand indépendante (124). Grâce à la grande variété des techniques biochimiques, la dimérisation ligand-indépendante de plusieurs RCPGs tels que les récepteurs dopamine D2, vasopressine V1 et V2, adénosine A2 a été montrée (125), ce qui rend le concept de dimérisation constitutive des RCPGs largement accepté.

### 1.5 LA DIMÉRISATION COMME CIBLE PHARMACOLOGIQUE ?

L'importance de la dimérisation dans la fonction du récepteur a été débattue longtemps. Les différentes expériences ont permis de montrer qu'une telle interaction pouvait être importante au moins pour certains récepteurs tels que le récepteur GABA<sub>B</sub> (88-90). Dans le cas où la dimérisation serait un pré-requis pour la fonction des RCPGs, elle pourrait constituer une cible pharmacologique importante étant donné le rôle physiologique essentiel de cette famille de récepteurs.

Plusieurs équipes ont essayé d'identifier la surface de dimérisation des RCPGs. Il a été proposé que le résidu G83 du domaine TM du récepteur de la glycophorine A (GpA) et plus spécifiquement le motif <sup>75</sup>LIXXGVXXG<sup>83</sup>VXXT est essentiel pour la dimérisation de ce récepteur à un seul domaine TM (126-129). La substitution de ce résidu par des acides aminés hydrophobes ou par de larges résidus polaires interfère avec la dimérisation. En se basant sur ces résultats ainsi que sur l'analyse des séquences des domaines TM du récepteur β<sub>2</sub>-adrénergique, le groupe de Hébert et al. ont identifié le motif <sup>272</sup>LKTLGIIMGTFTL<sup>284</sup> riche en glycine dans le domaine TM6 du récepteur. Ce dernier est semblable à celui retrouvé dans le cas du récepteur GpA, ce qui suggère qu'il pourrait être important dans la dimérisation du récepteur β<sub>2</sub>-adrénergique (13).

Suite à la synthèse d'un peptide comprenant les résidus 276 à 296 du domaine TM6, l'équipe a testé l'effet du peptide TM6 sur la dimérisation ainsi que sur la signalisation du récepteur β<sub>2</sub>-adrénergique. Suite au traitement avec le peptide TM 6 la quantité de dimères β<sub>2</sub>-adrénergiques détectés à la surface des cellules est diminuée et cela en fonction du temps de traitement avec le peptide TM6 et de façon

dose dépendante. Ce peptide a aussi un effet inhibiteur sur la signalisation du récepteur  $\beta_2$ -adrénergique. En présence du peptide et malgré la stimulation avec l'agoniste, la capacité du récepteur à activer l'adénylate cyclase est grandement affectée (13). Les peptides TM6 dans lequel les résidus glycine sont remplacé par des alanines et le peptide TM7 du récepteur dopamine D2 servant de contrôles n'ont eu aucun effet ni sur la dimérisation ni sur la signalisation du récepteur  $\beta_2$ -adrénergique. Notamment, l'effet du peptide TM6 est spécifique au récepteur étant donné qu'il n'a eu aucun effet sur la production d'AMPc stimulée par le NaF ou la forskoline. Ces résultats suggèrent fortement l'importance de la dimérisation dans l'activation du récepteur et suggèrent l'implication des résidus du domaine TM6 dans la dimérisation du récepteur  $\beta_2$ -adrénergique (13). Par contre, ces résultats seuls ne permettent pas d'affirmer que la dimérisation est requise pour l'activation du récepteur. Il est possible que le peptide interfère dans les interactions intramoléculaires dans les protomères et que la perte de la dimérisation est une conséquence et non la cause de l'activation du récepteur  $\beta_2$ -adrénergique (72).

Par ailleurs, la mutation des résidus du motif riche en glycine <sup>276</sup>GIIMGTFTL<sup>284</sup> présents dans le domaine TM6 du récepteur  $\beta_2$ -adrénergique a permis d'interrompre la dimérisation et de montrer qu'elle est importante dans le transport des récepteurs à la membrane plasmique (130). La mutation du résidu L284 (L284Y, L284G, G280L/L284Y et G276L/G280L/L284Y) a affecté la capacité des récepteurs à dimériser étant donné qu'une diminution de 40 à 50 % du signal BRET par rapport au récepteur de type sauvage a été observé (130). La courbe de titration BRET du triple mutant HA- $\beta_2$ -adrénergique G276L/G280L/L284Y en comparaison avec celle du récepteur de type sauvage a permis d'observer décalage vers la droite qui se traduit par une diminution de la propension des mutants à dimériser. Notamment, les mutants dont la dimérisation est effectuée arrivent à la membrane plasmique avec moins de 50% d'efficacité que le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique non muté. L'inhibition de la dimérisation mène à la rétention des récepteurs dans le RE ce qui indique un blocage dans leur biosynthèse (130). Salahpour et al. ont montré que l'homodimérisation du récepteur  $\beta_2$ -adrénergique est indispensable à son transport adéquat à la membrane plasmique. L'homodimérisation aurait un rôle important dans

la biosynthèse et le transport à la surface cellulaire des RCPGs et constituerait un mécanisme de contrôle de qualité lors la synthèse des récepteurs (130).

Par ailleurs, Tarasova et al. ont montré que des peptides correspondant au TM2, 4, 6 et 7 du récepteur de chimiokine CXCR4, peuvent bloquer les fonctions du récepteur. L'hypothèse étant que l'ajout d'un peptide correspondant à un domaine TM d'un RCPG aurait un effet sur la fonction du récepteur puisqu'il interfère dans l'association adéquate des domaines TM (131). Cette équipe a caractérisé les peptides dérivant des domaines TM de CXCR4 en testant leur capacité à inhiber la mobilisation de calcium induite suite à la stimulation de cellules exprimant CXCR4 avec l'agoniste SDF-1. Les peptides correspondant aux domaines TM2, 4, 6 et 7 de CXCR4 ont un effet antagoniste sur l'activité du récepteur puisqu'ils inhibent la mobilisation de calcium intracellulaire induite suite à l'interaction de CXCR4 avec son agoniste SDF-1. La concentration de peptides TM2 et TM6 permettant l'inhibition totale de l'activité de CXCR4 est respectivement  $5 \pm 1 \mu\text{M}$  et  $10 \pm 1 \mu\text{M}$ . Par contre, pour que l'effet antagoniste des peptides TM4 et TM7 soit complet la concentration des peptides requise est respectivement supérieure à  $50 \mu\text{M}$  et  $100 \mu\text{M}$ . L'effet antagoniste du peptide TM2 a été montré comme étant indépendant de la densité des récepteurs présents à la surface cellulaire et de la concentration de SDF-1 dans un intervalle de 50nM à 300nM ( $K_d$  SDF-1 = 6nM). Quant aux peptides TM6 et TM7, leur combinaison donne lieu à un effet synergique d'antagonisme sur la signalisation de CXCR4 induite par SDF-1 et cela en comparaison avec l'effet des peptides lorsque utilisés séparément. Cette synergie pourrait être causée par une augmentation de l'affinité des deux peptides pour le récepteur (131).

Étant donné l'importance de CXCR4 dans l'entrée du VIH-1 dans les cellules cibles, l'effet antagoniste des peptides TM2, 4, 6 et 7 sur la réplication du VIH-1<sub>RF</sub> a été étudié (131). Des cellules CEM-SS infectées par la souche RF du VIH-1, qui cause la mort cellulaire en absence d'un inhibiteur, ont été utilisées. La viabilité de ces cellules a été testée suite à leur traitement avec les peptides TM de CXCR4. Ainsi, les peptides TM2, TM4 et TM7 ont un effet antagoniste sur la fonction de CXCR4 et peuvent inhiber l'infection des CEM-SS par le VIH-1<sub>RF</sub>. Les auteurs proposent que cet effet des peptides est causé par leur compétition pour l'interaction avec les

domaines TM du récepteur. Dans le cas d'un excès de peptides, la majorité des récepteurs sont inactifs étant donné que les domaines TM n'interagissent pas ensemble mais plutôt avec les peptides TM de CXCR4. L'effet antagoniste des peptides peut dépendre de l'interaction avec le récepteur mais aussi de sa capacité à s'intégrer dans la membrane plasmique et la faible activité antagoniste de certains peptides peut être expliquée par leur incapacité à s'intégrer dans la membrane (131).

Hernanz-Falcon et al. ont montré qu'en mutant simultanément les deux résidus I52V/V150A situés dans les domaines TM 1 et TM 4 du récepteur de chimiokine CCR5, ce dernier est non fonctionnel. En effet, la stimulation du double mutant avec l'agoniste CCL5, contrairement au récepteur sauvage, ne permet pas d'observer de mobilisation de calcium, ni de migration cellulaire et aucune activation de la voie Jak/Stat. La dimérisation des mutants est aussi interrompue. Aussi, lorsque le récepteur CCR5 de type sauvage est mis en présence de peptides correspondant aux domaines TM1 et TM4 mutés, l'homodimérisation du récepteur CCR5 sauvage ainsi que son activation sont empêchés. Cela suggère que la dimérisation serait importante pour la fonction du récepteur (132).

## 1.6 LES CHIMIOKINES ET LEURS RÉCEPTEURS :

### 1.6.1 HISTORIQUE :

Les chimiokines sont des cytokines chimiotactiques qui possèdent entre 60 et 80 acides aminés. Elles font partie des ligands les plus complexes à cause de leur grand nombre et leur spécificité croisée pour leurs récepteurs. En effet, 50 différentes cytokines chimiotactiques (chimiokines) ont été identifiées jusqu'à présent (50). La première a été identifiée en 1977 par Walz et al., qui ont séquencé le *native platelet factor 4*, un facteur angiostatique et procoagulant retrouvé dans les  $\alpha$ -granules des plaquettes (133). D'autres équipes s'intéressant à l'identification de gènes impliqués dans la différenciation et l'activation cellulaire ont cloné les ADN complémentaire de chimiokines telles que RANTES (*regulated on activation normal T cell expressed and secreted*), MIP-1 $\alpha$  (*Macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$* ) et  $\gamma$ -IP10 ( *$\gamma$ -interferon inducible protein-10*) avant même d'en connaître la fonction (133).

L'interleukine 8 (IL-8) est la première chimiokine dont l'activité chemoattractante a été mise en évidence. Suite à ces travaux, il a aussi été montré que MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*), RANTES et l'eotaxine sont respectivement les chemoattractants de cellules monocytaires, cellules T et d'éosinophiles (133).

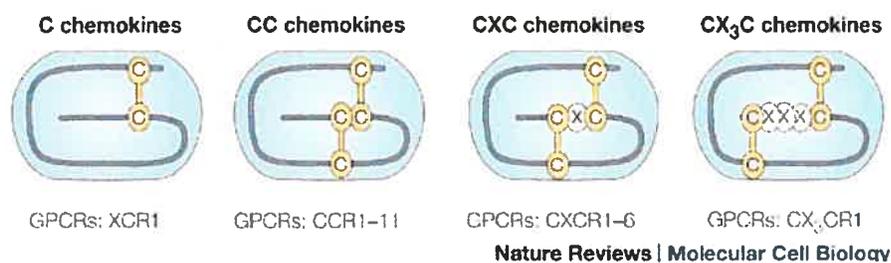
Les récepteurs de chimiokine sont définis comme étant des RCPGs capables de signaler suite à l'interaction avec une ou plusieurs chimiokines (133). Dix-neuf protéines humaines peuvent être décrites comme étant des récepteurs de chimiokine (**Figure 1.10**) (50). Les chimiokines et leurs récepteurs permettent aux cellules du système immunitaire de communiquer entre elles. Elles sont importantes dans, entre autres, l'homéostasie ainsi que dans la réponse immune innée et acquise. Tous les processus impliquant le déplacement des cellules du système immunitaire dépendent des chimiokines et de leurs récepteurs. Le mauvais fonctionnement du système de chimiokines/récepteurs de chimiokines peut donner lieu à des pathologies graves telles que l'arthrite rhumatoïde, l'asthme ainsi que plusieurs maladies immunitaires (133).

Étant donné l'importance des chimiokines et de leurs récepteurs dans la réponse immunitaire plusieurs virus comme les herpes et poxvirus ont développé des moyens de perturber cette fonction (134, 135). En effet, ces virus possèdent soit des protéines servant d'antagonistes aux récepteurs de chimiokines soit codant pour des récepteurs de chimiokines viraux dont l'activité est altérée mais pouvant interagir avec les chimiokines produites par l'hôte (136-138). Par exemple, le poxvirus *Molluscum contagiosum* et le HHV8 (*human herpes virus 8*) produisent respectivement les chimiokines virales MC148R et MIP-II, des antagonistes de large spectre, ce qui suggère l'importance des récepteurs de chimiokine dans la défense contre les pathogènes (134, 135). Les othopoxvirus quant à eux codent pour des récepteurs de chimiokine solubles qui peuvent compétitionner avec les récepteurs de l'hôte pour les chimiokines telles que l'interféron  $\gamma$  (136-138).

#### I.6.2 CHIMIOKINES ET DIMÉRISATION :

Les chimiokines sont classées dans 4 grandes familles selon les acides aminés séparant les résidus cystéine conservés dans la partie N-terminale de la chimiokine.

Ainsi, ces cytokines chimiotactiques sont réparties dans les familles CXC, CC, C et CX<sub>3</sub>C où la lettre X désigne un acide aminé quelconque (133). Les chimiokines des familles CXC, CC et C possèdent 4 résidus cystéines conservés contrairement à celles de la famille C qui ne possèdent que 2 cystéines conservées. Les chimiokines d'une sous-classe de la famille CC possèdent 6 cystéines conservées. La plupart des chimiokines appartiennent soit à la famille CXC ou CC des chimiokines. La lymphotactine humaine  $\alpha$  et  $\beta$  ainsi que la fractalkine font partie des rares chimiokines appartenant respectivement aux familles C et CX<sub>3</sub>C (50, 133) (**Figure 1.10**).



**Figure 1.10:** Schéma de classification des chimiokines et leurs récepteurs. Tiré de Sodhi, A. et al. (139).

Les chimiokines des familles CC et CXC ont des structures semblables (133). Il a été montré que leur partie N-terminale possède une structure désordonnée tandis que la partie C-terminale suivant le dernier résidu cystéine est une hélice  $\alpha$ . Notamment, des ponts disulfure entre le premier et le quatrième résidu cystéine ainsi qu'entre la deuxième et troisième cystéine sont indispensables pour la structure de la protéine et la formation des 3 feuillets- $\beta$  séparés par de courtes boucles (50).

La plupart des structures de chimiokines suggèrent qu'elles sont sous forme dimérique (140). La surface de contact entre les chimiokines de la famille CC est différente de celles de la famille CXC. La dimérisation des chimiokines CC implique leur partie N-terminale qui s'intercale dans les feuillets- $\beta$  du protomère avec lequel elle interagit (50). Quant aux chimiokines CXC, la surface d'interaction est constituée du feuillet- $\beta$ 1 et rend accessible la partie N-terminale de la chimiokine

(140). Des études de mutagenèse ont montré que cette partie N-terminale serait indispensable pour l'interaction avec le récepteur menant à son activation. Le fait de tronquer la partie N-terminale de la chimiokine donne lieu dans la plupart des cas à des antagonistes ou des agonistes partiels (133). Certaines chimiokines telles que CXCL8/CXCL4 peuvent hétérodimériser (141, 142) et les chimiokines CCL3 et CCL4, quant à elles, sont sécrétées sous forme hétérodimérique (142). Ces cytokines chimiotactiques peuvent aussi interagir avec les glycosaminoglycanes, ce qui favoriserait leur agrégation permettant d'accroître leur concentration locale à la surface cellulaire (143, 144). Ainsi, l'oligomérisation pourrait être un phénomène favorisé *in vivo* même dans le cas de faibles concentrations de chimiokines. D'autres études suggèrent l'absence de la dimérisation entre certaines chimiokines (ex. la chimiokine MCP-3) (145).

La dimérisation des chimiokines peut être considérée comme étant un phénomène général qui a lieu dans des conditions physiologiques précises (50). Toutefois, le fait d'interrompre la dimérisation des chimiokines n'affecte pas leur capacité à interagir ni même d'activer leur récepteur ce qui suggère que la forme active est la forme monomérique (50, 133). Malgré les effets synergiques de certaines chimiokines, telles que CXCL8 et CCL8 (MCP-3) (146) ainsi que CXCL11 et CXCL12 (SDF-1), sur le chimiotactisme des cellules exprimant leurs récepteurs, ce phénomène serait dû à des événements post-récepteurs et ne serait pas causé par la dimérisation des chimiokines (50).

### 1.6.3 LES RÉCEPTEURS DE CHIMIOKINES :

Les récepteurs de chimiokines sont des RCPGs classés selon la ou les chimiokines qu'ils lient. En effet, il existe 6 membres de la famille CXCR, 11 membres de la famille des récepteurs CCR, 1 membre dans chacune des familles XCR et CX3CR (la lettre R désigne le récepteur) (50, 133). Ils ne sont pas exclusifs aux cellules leucocytaires et peuvent être exprimés à la surface des cellules endothéliales, épithéliales, de neurones ainsi qu'à la surface des cellules microgliales du cerveau (133). Ces RCPGs possèdent entre 25 et 80 % d'identité de séquence et ils ont en commun plusieurs caractéristiques. En effet, les récepteurs de chimiokine possèdent entre 340 et 370 acides aminés, un segment N-terminal acide, une séquence

*DRYLAIIVHA* (ou son équivalent) dans leur seconde boucle intracellulaire et une courte troisième boucle intracellulaire basique en plus d'un résidu cystéine dans chacune des 4 boucles extracellulaires (133).

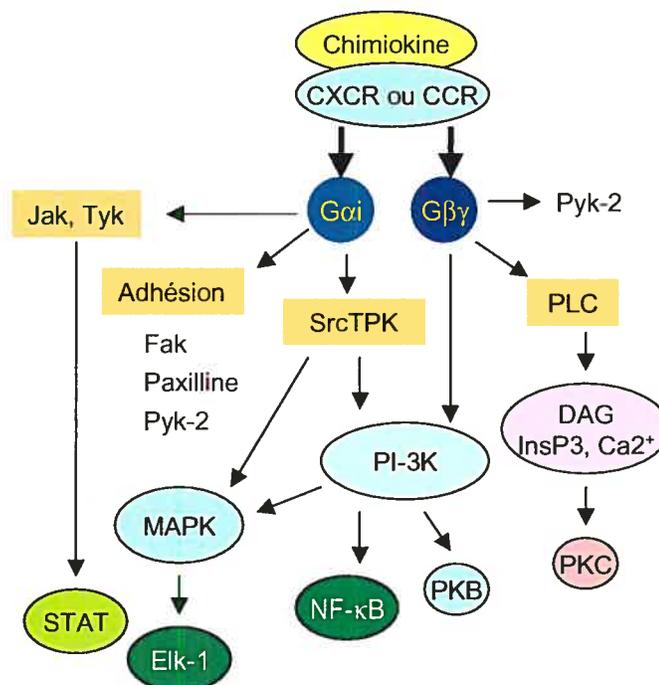
Les résidus cystéines permettent la formation de ponts disulfure entre respectivement la première et deuxième boucle extracellulaire ainsi qu'entre la troisième boucle extracellulaire et la partie N-terminale du récepteur. Ces ponts disulfures sont importants dans le bon repliement de la protéine, l'interaction avec le ligand et/ou la capacité d'activer les voies de signalisation intracellulaires (147-149). La partie N-terminale ainsi que les boucles extracellulaires des récepteurs de chimiokine jouent un rôle important dans l'interaction avec les chimiokines. La deuxième boucle extracellulaire des récepteurs tels que CCR2 et CCR5 semble jouer un rôle important dans la spécificité de l'interaction avec les chimiokines de la famille CC (148, 150, 151). Des anticorps monoclonaux dirigés contre cette boucle inhibent la liaison des ligands (150). Par ailleurs, lorsque la partie N-terminale de CXCR1 est remplacée par celle de CXCR2 et vice versa, la spécificité des ligands est échangée (152). Cela montre l'importance des résidus de la partie N-terminale des récepteurs CXCR1 et CXCR2 dans l'affinité de liaison de la chimiokine (50). Les expériences de mutagenèse dirigée ont permis de montrer la complexité du site d'interaction du récepteur avec la chimiokine puisqu'il est composé de plusieurs domaines non contigus et d'au moins 2 sites d'interaction. La première interaction avec la partie N-terminale du récepteur permet l'établissement de la seconde, c'est-à-dire celle de la chimiokine avec les boucles extracellulaires ainsi que l'extrémité des domaines TM menant à l'activation du récepteur (150, 153, 154).

#### 1.6.4 SIGNALISATION ET SPÉCIFICITÉ DES RÉCEPTEURS DE CHIMIOKINES :

La signalisation via les récepteurs de chimiokines est diversifiée même si la plupart d'entre eux sont couplées à une protéine G $\alpha$ i sensible à la PTX (**Figure 1.11**). Lors de l'activation de la protéine G, il a été montré que les sous-unités G $\beta\gamma$  sont responsables du mouvement dirigé des cellules (chémotactisme) (133). Cet effet de la chimiokine est dû à une distribution asymétrique des effecteurs intracellulaires comme le protéine kinase B (PKB) et non au grand nombre de récepteurs présents à la surface cellulaire (133).

Suite à la stimulation du récepteur par sa chimiokine et à l'activation de la protéine G, la sous-unité  $G\beta\gamma$  active les phospholipases C  $\beta_2$  et  $\beta_3$  phosphoinositides spécifiques. Ces dernières vont permettre la formation d'inositols-1,4,5-triphosphates (IP3) et de diacylglycérols. L'augmentation de la concentration intracellulaire des IP3 permet d'augmenter la concentration de calcium intracellulaire important pour le chimiotactisme (155). Le calcium n'est pas nécessaire pour le mouvement dirigé et les changements de forme des cellules en mouvement, mais il est indispensable dans le milieu extracellulaire puisqu'il assure la réversibilité des interactions entre les molécules d'adhésion et la surface sur laquelle la cellule se déplace. L'activation des phospholipases permet la formation des IP3 mais aussi des diacylglycérols qui activent la protéine kinase C (PKC). Cette kinase contribue à la phosphorylation du récepteur menant à sa désensibilisation et l'inhibition de la signalisation (155). La sous-unité  $G\beta\gamma$  active aussi la 1B-phosphatidylinositol kinase 3  $\gamma$  (PI3K $\gamma$ ) et la production de phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate permettant l'activation de la PKB (155) et de la voie des MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) (156-159). La PI3K $\gamma$  permet aussi l'activation de facteurs de transcription comme NF $\kappa$ B (*nuclear factor  $\kappa$ B*) (160).

L'activation de la sous-unité  $G\alpha_i$  suite à l'interaction du récepteur avec sa chimiokine, permet de stimuler la signalisation via les kinases de la famille Src (Steroid receptor coactivator) (155). L'activation des petites GTPases telles que Rho, Rac et cdc42 est important dans les réarrangements du cytosquelette des cellules lors du chimiotactisme (161-163). Aussi, la signalisation via les récepteurs de chimiokines permet d'activer les kinases Jak (*Janus kinase*) qui peuvent recruter et phosphoryler les facteurs de transcription STAT (*signal transducer and activator of transcription*) et ainsi induire l'expression de gènes cibles (160).



**Figure 1.11:** Représentation schématique de certaines voies de signalisation activées par les récepteurs de chimiokines. La liaison de la chimiokine à son récepteur permet de stimuler plusieurs voies de signalisation de façon protéine G dépendante. Adapté à partir de Thelen, M. (155).

La signalisation induite suite à l'interaction des récepteurs de chimiokines avec leurs ligand est importante pour la prolifération, l'expression des molécules d'adhésion ainsi que le chimiotactisme (133). Par ailleurs, la diversité dans la signalisation des récepteurs de chimiokines peut être due au fait que plusieurs récepteurs spécifiques pouvant lier une même chimiokine sont co-exprimés dans la même cellule (164). Aussi, une même voie de signalisation peut être induite par plusieurs couples chimiokine/récepteur (165) et un récepteur peut stimuler plusieurs voies de signalisation (166). Il a été montré que les récepteurs de chimiokines comme CCR5, CXCR4 et CCR2 peuvent homo- ou hétérodimériser ce qui permettrait aussi d'augmenter la diversification de la signalisation (83, 98, 114, 132, 167-169).

## 1.7 LE RÉCEPTEUR DE CHIMIOKINE CXCR4 :

CXCR4, aussi dénommé 'fusin', est le premier récepteur de chimiokine identifié comme étant un co-récepteur à l'entrée du VIH-1 dans les cellules cibles (170). Bleul et al. et Oberlin et al. ont établi la spécificité de CXCR4 pour la chimiokine SDF-1 (aussi appelée CXCL12) (171). Ce polypeptide de 352 acides aminés est exprimé à la surface d'une grande variété de cellules. En effet, CXCR4 est retrouvé à la surface de la plupart des cellules hématopoïétiques, incluant neutrophiles, monocytes, lymphocytes T, lymphocytes B et leurs précurseurs, les cellules progénitrices CD34+ du sang et de la moelle osseuse ainsi que les cellules dendritiques dérivées du sang. Il est aussi présent à la surface des cellules de Langerhans, de macrophages, et des cellules T matures et immatures dans le thymus (165, 172, 173). CXCR4 est retrouvé à la surface des cellules endothéliales vasculaires et des neurones dans le système nerveux central et périphérique en plus des microglies et des astrocytes (174).

La chimiokine SDF-1 possède deux variants suite à un épissage alternatif. Ainsi, SDF-1 $\alpha$  et SDF-1 $\beta$  diffèrent par une extension de 4 acides aminés dans la partie C-terminale de SDF-1 $\beta$  (175). Ces deux variants sont les seuls ligands et agonistes endogènes de CXCR4 et leur effet sur le récepteur n'est pas distinguable. Les 2 variants SDF-1 induisent l'augmentation de la concentration du calcium intracellulaire et le chimiotactisme dans les cellules transfectées ainsi que dans les cellules primaires in vitro (133).

### 1.7.1 RÔLES DU RÉCEPTEUR DE CHIMIOKINE CXCR4 :

CXCR4 et son unique ligand SDF-1 jouent un rôle important dans le développement embryonnaire. Les souris CXCR4<sup>-/-</sup> ou SDF-1<sup>-/-</sup> possèdent le même phénotype (176-178) ce qui suggère l'exclusivité de la chimiokine pour son récepteur et vice-versa. Ces souris CXCR4<sup>-/-</sup> ou SDF-1<sup>-/-</sup> meurent durant la période périnatale puisqu'elles ont des défauts de formation des *septum* ventriculaires du coeur, de la vascularisation gastrique, du développement du cerveau, de la myélopoïèse dans la moelle osseuse, de la maturation des cellules B et de la lymphopoïèse. Par contre, le rôle de CXCR4 chez l'adulte reste mal compris. Une étude réalisée par Peled et al. a toutefois

suggéré que CXCR4 régule l'ancrage des cellules souches humaines transplantées dans des souris NOD/SCID (179).

CXCR4 et SDF-1 sont impliqués dans plusieurs phénomènes physiologiques qui ne sont que partiellement compris. Toutefois, leur implication dans l'adressage des leucocytes dans la moelle osseuse et la transmigration endothéliale (179, 180) ainsi que la néovascularisation (181) a été montrée. En plus de son rôle important dans plusieurs phénomènes physiologiques, CXCR4 est aussi impliqué dans plusieurs pathologies. Il est l'un des co-récepteurs à l'entrée du VIH-1 dans les cellules cibles. La glycoprotéine gp120 de l'enveloppe du VIH-1 peut interagir avec CXCR4 en présence du récepteur CD4 (167). Aussi, la glycoprotéine gp120 purifiée est neurotoxique puisqu'elle induit l'apoptose des cellules neuronales humaines hNT de manière CXCR4-dépendante, ce qui est conséquent avec le fait que les chimiokines peuvent réguler la signalisation des cellules neuronales de l'hippocampe. La gp120 peut aussi induire le chimiotactisme des monocytes (133).

Afin de bloquer l'entrée du VIH-1 dans les cellules cibles, plusieurs anticorps anti-CXCR4 comme le prototype 12G5 (182) ainsi que d'autres molécules comme les peptides dérivés de SDF-1 (183, 184), les peptides synthétiques T134 et T140 (185) et le bicyclame AMD3100 (105, 186, 187) ont été développés. Il a été montré que ces molécules ne sont pas sélectives et bloquent l'activité de CXCR4 en plus de sa fonction de co-récepteur.

CXCR4 ainsi que plusieurs autres récepteurs de chimiokines (ex. CCR2, CXCR2) et leurs ligands respectifs sont impliqués dans des maladies inflammatoires telles que l'arthrite rhumatoïde, l'asthme bronchial et l'athérosclérose. Lors d'une inflammation chronique ou d'une maladie auto-immune l'induction des chimiokines est probablement semblable à celle observée dans le cas d'invasions par des pathogènes. Le système immunitaire est incapable de distinguer entre un pathogène et une inflammation chronique et les chimiokines recrutent les leucocytes qui grâce à leur fonction effectrice perpétuent l'inflammation en endommageant le tissu tout en gardant le signal d'inflammation constant (133). La propagation des métastases dans les cancers épithéliaux comme les cancers du poumon et du sein implique CXCR4 et SDF-1. Müller et al. ont montré que les cellules mammaires d'une tumeur primaire

surexpriment CXCR4. Ces cellules migrent de la tumeur primaire vers les sites de métastases grâce à un gradient de SDF-1. La chimiokine SDF-1 est produite par les organes métastatiques tel que le foie, la moelle osseuse ainsi que les poumons en ce qui concerne le cancer du sein (188).

#### 1.7.2 SIGNALISATION DU RÉCEPTEUR CXCR4 :

La stimulation de CXCR4 avec la chimiokine SDF-1 permet d'induire divers signaux, qui varient d'un type cellulaire à un autre. Comme la plupart des récepteurs de chimiokine, CXCR4 est couplé à une protéine G $\alpha$ i (189) et peut être couplé à une protéine G $\alpha$ q (190). CXCR4 peut activer, suite à son interaction avec SDF-1, la voie de la PI3-kinase (*phosphatidylinositol 3'-kinase*), l'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire ainsi que des kinases intracellulaires telles de Pyk-2 (proline-rich kinase 2) et des kinases apparentées à la famille src (191, 192). L'effet de la signalisation de CXCR4 sur la cytosquelette est médiée par des petites GTPases telles que Rho, Rac et cdc42 qui permettent l'activation de différentes cascades de kinases comme la Janus kinase 2 et la LIM kinase 1 respectivement impliquées dans la migration des cellules hématopoïétiques progénitrices et le chimiotactisme des cellules T (161, 163, 193). Notamment, SDF-1 peut induire l'activation transcriptionnelle de gènes cibles en stimulant les voies des MAPK, NF $\kappa$ B et JAK/STAT (99, 161). En effet, il a été montré que la signalisation SDF-1/CXCR4 a des effets anti-apoptotiques sur les cellules souches hématopoïétiques CD34<sup>+</sup> (194, 195) et permet d'augmenter l'expression des métalloprotéases MMP (matrix metalloprotease) dans plusieurs types cellulaires (133). Ces observations sont pertinentes étant donné le rôle suggéré de CXCR4 et SDF-1 dans le cancer.

La désensibilisation du récepteur de chimiokine CXCR4, implique sa phosphorylation qui a lieu au moins au niveau de sa partie intra-cytoplasmique C-terminale (196). La désensibilisation de CXCR4 peut être induite en stimulant d'autres récepteurs de chimiokine tel que le récepteur CCR5 (133). De plus, il a été montré qu'il existe un *crossstalk* fonctionnel entre les récepteurs d'opioïdes et les récepteurs de chimiokine CXCR4 et CCR5 (197-199).

## 1.8 LE RÉCEPTEUR DE CHIMIOKINE CCR2 :

Le récepteur de chimiokine CCR2 joue un rôle important dans l'inflammation et de ce fait dans diverses pathologies inflammatoires comme l'athérosclérose et l'asthme (133). Il existe deux variants de ce récepteur obtenu par épissage alternatif. En effet, CCR2a et CCR2b possèdent respectivement 360 et 374 résidus dont les séquences sont identiques jusqu'au résidu 313 situé dans la partie intracellulaire C-terminale de la protéine. Ces deux variants ont des propriétés semblables et leurs ARNs respectifs sont détectables dans les monocytes, les cellules DC et NK dérivés du sang ainsi que dans les lymphocytes T (133). Dans les neutrophiles et éosinophiles, la forme CCR2b est celle prédominante (133).

CCR2 peut lier plusieurs chimiokines inflammatoires telles que MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein*), MCP-2, MCP-3, MCP4 ainsi que MCP-5 murin (133) et cela avec des affinités élevées et semblables. Seule la chimiokine MCP-1 est sélective envers les récepteurs avec lesquels elle interagit. Notamment, la protéine Tat du VIH est un agoniste de CCR2, ce qui peut constituer un mécanisme de recrutement des cellules cibles aux sites d'infections par le VIH (200). Le récepteur CCR2 murin possède 80% d'identité avec son équivalent humain (201) Des expériences de neutralisation de chimiokine dans les souris, ont permis de montrer que des formes aiguës et la rechute d'encéphalomyélites auto-immunes expérimentales sont régulées par l'expression différentielle des chimiokines MIP-1 $\alpha$  et JE/MCP-1 (202, 203). Ces observations impliquent directement le récepteur CCR2 dans la rechute de diverses formes d'encéphalomyélites (133).

Les souris CCR2<sup>-/-</sup> se développent normalement. Toutefois, lorsqu'une inflammation péritonéale est induite chez ces souris aucun recrutement des macrophages n'est possible. Notamment, suite à une injection intraveineuse de  $\beta$ -glucan de levure, les souris CCR2<sup>-/-</sup> possèdent des granulomes plus petits et une production d'interféron  $\gamma$  moins importante dans les ganglions lymphatiques est observée (133). Cela suggère l'implication de CCR2 dans l'immunomodulation et le recrutement des monocytes et macrophages au site d'inflammation. Ces souris présentent aussi un défaut quant à l'hyperactivité bronchiale normale induite par un allergène (133).

Le récepteur CCR2 et sa chimiokine MCP-1 jouent un rôle important dans le développement des plaques athérosclérotiques humaines (202). Les souris apolipoprotéine E<sup>-/-</sup> sont spontanément hypercholestérolémiques et développent de l'athérosclérose sévère. Les souris CCR2<sup>-/-</sup>/apolipoprotéine E<sup>-/-</sup> sont aussi hypercholestérolémiques mais la taille des lésions athérosclérotiques est diminuée de 50% par rapport aux lésions développées par des souris apolipoprotéine E<sup>-/-</sup>. Cela indique que CCR2 est impliqué dans la formation de plaques athérosclérotiques (204).

Le récepteur CCR2, comme la majorité des récepteurs de chimiokine, est couplé à une protéine G $\alpha$ i. La signalisation via CCR2 permet la mobilisation de calcium, le chimiotactisme ainsi que l'activation de la transcription de gènes cibles grâce à la voie Jak 2/ STAT3 (58).

### **1.9 OLIGOMÉRISATION DES RÉCEPTEURS DE CHIMIOKINES :**

Les expériences de co-immunoprécipitation, de FRET ainsi que de BRET ont permis de montrer que les récepteurs de chimiokine CCR2, CCR5, CXCR1, CXCR2 et CXCR4 peuvent former des homo- et hétérodimères (83, 98, 114, 123, 132, 168, 169).

Rodriguez-Frade et al. ont montré par co-immunoprécipitation que le récepteur CCR2 homodimérise (98). En effet, les récepteurs c-myc-CCR2 et YSK-CCR2 co-transfectés dans des cellules HEK293 co-précipitent. Les dimères CCR2 sont détectés uniquement après stimulation avec un anticorps anti-CCR2 agoniste ou avec l'agoniste naturel MCP-1. Aussi, les auteurs soutiennent que l'homodimère est fonctionnel puisque la stimulation avec l'agoniste induit la dimérisation et l'activation de CCR2 soit la mobilisation de calcium, la transmigration des cellules exprimant CCR2 à travers une membrane reconstituée et l'activation de la voie Jak2/Stat3. Le mutant CCR2 Y139F a été montré comme étant capable de dimériser, toutefois suite à la stimulation avec les agonistes il n'y a pas de mobilisation de calcium ni de transmigration des cellules exprimant le mutant CCR2 Y139F (98). Notamment, ce mutant aurait un effet dominant négatif sur la signalisation du récepteur CCR2 sauvage avec lequel il peut dimériser. Dans ces expériences, le

dimère CCR2 est détecté suite à une co-immunoprécipitation suivie d'un immunobuvardage de type western uniquement après le traitement des cellules exprimant CCR2 avec un agoniste (anticorps anti-CCR2 ou MCP-1). À cet effet, les auteurs postulent que l'homodimérisation de CCR2 a lieu suite à la stimulation avec un agoniste et que cette dimérisation induite par le ligand fait partie du processus d'activation de la signalisation du récepteur (98).

Cette même équipe a obtenu des résultats semblables pour les récepteurs CXCR4 et CCR5 (97, 99, 132). Vila-Coro et al. ont montré l'existence d'homodimères CXCR4 suite à un *crosslinking* avec le disuccinimidyl suberate (DSS) suivie d'une immunoprécipitation (99). Comme dans le cas de CCR2, l'équipe n'a pu constater l'existence de l'homodimère CXCR4 que suite au traitement des cellules avec l'agoniste SDF-1 et ont conclu que la dimérisation était induite par le ligand. Les auteurs ont montré que la stimulation avec SDF-1 induisait son homodimérisation qui serait nécessaire à la stimulation de multiples voies de signalisation (99). En stimulant des cellules exprimant de façon endogène le récepteur CXCR4 avec l'agoniste naturel SDF-1, il y a mobilisation de calcium et transmigration cellulaire. Ces effets stimulants de SDF-1 sur son récepteur sont protéine G $\alpha$ i-dépendants puisqu'en traitant les cellules avec la PTX, l'agoniste n'entraîne ni la mobilisation de calcium ni la transmigration cellulaire. Aussi, Vila-Coro et al. ont montré que suite à une stimulation de CXCR4 avec SDF-1, la voie Jak/STAT est activée. Les kinases Jak 2 et Jak 3 ainsi que les facteurs de transcription STAT 2, 3 et 5 sont recrutés, phosphorylés et les facteurs STAT sont transloqués au noyau (99). Grâce à l'immunoprécipitation, Vila-Coro et al. ont aussi montré l'existence de dimères CCR5 uniquement suite au traitement avec l'agoniste RANTES (97).

L'intérêt pour les récepteurs de chimiokines a grandi suite à l'identification des récepteurs CXCR4 et CCR5 comme étant des co-récepteurs à l'entrée du VIH-1 dans les cellules cibles (205). Une meilleure compréhension du fonctionnement et de la dimérisation des récepteurs de chimiokine est importante pour le développement de médicaments visant à empêcher l'entrée virale, sa propagation ainsi que la progression du SIDA. L'étude de certaines mutations survenues dans certains récepteurs de chimiokines a montré qu'elles confèrent une résistance lors de l'entrée virale ou ralentissent la propagation du SIDA. Le mutant de délétion  $\Delta$ 32 du

récepteur CCR5 donne lieu à un récepteur retenu dans le RE et les individus homozygotes présentent une résistance importante à l'infection par le VIH (205). La mutation V64I dans le domaine TM 1 du récepteur CCR2 a été associée à un ralentissement de la propagation du SIDA. Il a été proposé que ce phénomène pourrait être dû au fait que le mutant CCR2 V64I hétérodimérise avec les récepteurs CXCR4 et CCR5 (206) et la dimérisation pourrait constituer un phénomène qui permet de bloquer l'entrée virale (97). Les auteurs ont montré qu'un anticorps anti-CCR2 et les agonistes respectifs de CXCR4 et CCR5 peuvent induire l'hétérodimérisation de CCR2 avec CXCR4 et CCR5. Suite à cette hétérodimérisation, l'infectivité des cellules exprimant ces récepteurs de chimiokine par le VIH-1 est bloquée (205). Les auteurs observent les dimères uniquement suite à la stimulation avec l'anticorps anti-CCR2 ou les chimiokines SDF-1 et CCL5 et postulent encore une fois que la dimérisation a lieu uniquement suite à l'ajout des chimiokines (97, 205, 206).

Par ailleurs, l'influence du ligand sur l'activation et la dimérisation du récepteur a pendant longtemps été un sujet de débat. Toutefois, les nouvelles méthodes (telles que le BRET) permettent la détection des dimères et suggèrent que le phénomène serait indépendant des ligands. Mellado et al. ainsi que Vila-Coro et al. ont suggéré que la dimérisation de CCR2 ainsi que celle de CCR5 était ligand-dépendante (97, 206). Par contre, d'autres équipes de recherche ont montré que cette oligomérisation était ligand-indépendante (114, 168). En effet, l'analyse par BRET de fractions cellulaires a permis de montrer que l'homodimère CCR5 est formé peu de temps après la synthèse des protomères dans le RE (114). Deux études ont aussi montré que la dimérisation de CXCR4 était ligand-indépendante (114, 169). Étant donné la divergence des résultats concernant les récepteurs de chimiokine, il est nécessaire d'apporter des réponses quant à l'organisation des dimères et les implications de la dimérisation dans la fonction des récepteurs.

### 1.10 BUTS ET OBJECTIFS :

Dans le but de comprendre le rôle de la dimérisation dans l'activation du récepteur CXCR4 et de déterminer si la dimérisation est un phénomène dynamique ou non, plusieurs objectifs devront être atteints. Le **premier objectif** de mon projet est de déterminer si les récepteurs CXCR4 et CCR2 forment des homo- et/ou des hétérodimères constitutifs ou si la liaison du ligand est nécessaire. Le **deuxième objectif** consiste à étudier l'effet des ligands sur la structure et la fonction des récepteurs en présence de peptides inhibiteurs de l'activité CXCR4 correspondant aux domaines TM 2, 4, 6 et 7 de CXCR4. Il a été montré que ces peptides dérivant des domaines TM de CXCR4 s'associent rapidement au récepteur et l'empêchent de signaler en plus de bloquer ses fonctions de co-récepteur à l'entrée du VIH-1 dans les cellules cibles (131). Nous voulons déterminer si l'effet inhibiteur des peptides TM réside en leur association à l'interface des protomères au sein du dimère, interférant ainsi avec la dimérisation de CXCR4 et avec son activité. Ce mode d'action de peptides TM a été suggéré suite à la caractérisation du peptide TM 6 du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique qui semble interférer avec la dimérisation ce RCPG (13). Il a aussi été proposé que de tels peptides interfèrent avec l'assemblage des domaines TM induisant la distorsion du récepteur (207). Enfin, le **troisième objectif** de mon projet est d'étudier l'influence de mutations introduites dans CXCR4, qui changent son activité, sur sa conformation.

La dimérisation des récepteurs CXCR4 et CCR2, l'effet des ligands ainsi que des peptides TM sur la structure des récepteurs sera suivie par BRET. Par ailleurs, les récepteurs CXCR4 et CCR2 sont couplés à des protéines G $\alpha$ i et l'activation de la signalisation via ces protéines G permet d'inhiber la production d'AMPc par l'adénylate cyclase. L'AMPc produit par les cellules peut être quantifié. Les effets des peptides et des ligands sur la fonction des récepteurs seront évalués suite à la quantification de l'AMPc produit suite au traitement des cellules exprimant les récepteurs CXCR4 et/ou CCR2 avec les ligands et/ou les peptides TM CXCR4.

**2. ARTICLE PERCHERANCIER Y, BERCHICHE Y.A ET AL.**

Grâce au BRET nous avons montré que les récepteurs de chimiokine CXCR4 et CCR2 forment des dimères constitutifs (en absence de ligand). Les ligands n'induisent pas l'association ou la dissociation des dimères mais plutôt des changements conformationnels au sein des homo- et hétérodimères CXCR4 et CCR2 constitutifs. Aussi, nous avons montré que les différents ligands (agoniste, agoniste partiel et agoniste inverse) stabilisent différentes conformations des récepteurs. Les peptides TM CXCR4 n'inhibent pas la dimérisation et ne causent pas de distorsions majeures des conformations initiales des récepteurs. Toutefois, les peptides semblent figer les récepteurs dans leur conformation à l'état basal ce qui empêche les changements conformationnels induits par les ligands et inhibe la fonction des récepteurs.

J'ai appris à maîtriser la technique de BRET ainsi que la méthode d'extraction et de quantification des AMPc produits suite à la stimulation des récepteurs avec leur agoniste en assistant Yann Percherancier lors de la réalisation des diverses expériences. J'ai repris les expériences de titration de BRET des homodimères CXCR4 en absence et en présence de BSA afin de déterminer son effet sur les  $EC_{50}$  déterminés pour les ligands de CXCR4. J'ai réalisé les constructions des fusions du récepteur CCR2 aux fluorophores Rluc et YFP. Aussi, j'ai déterminé le niveau d'expression des récepteurs à la surface cellulaire grâce à l'analyse par cytométrie de flux des cellules transfectées dans le cadre des expériences de BRET et de l'analyse fonctionnelle des récepteurs. Notamment, mon analyse par cytométrie de flux a permis de montrer que le niveau d'expression des récepteurs CXCR4 détectés dans des cellules transfectées lors des expériences BRET est comparable au niveau d'expression du récepteur endogène détecté dans des cellules PBMC.

**BIOLUMINESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER REVEALS LIGAND-INDUCED  
CONFORMATIONAL CHANGES IN CXCR4 HOMO- AND HETERODIMERS**

**Yann Percherancier<sup>1</sup>, Yamina Berchiche<sup>1,2</sup>, Isabelle Slight<sup>1,2</sup>, Rudolf Volkmer-Engert<sup>3</sup>, Hirokazu Tamamura<sup>4</sup>, Nobutaka Fujii<sup>4</sup>, Michel Bouvier<sup>1</sup>, Nikolaus Heveker<sup>1,2</sup>**

From the <sup>1</sup>Department of Biochemistry, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada, the <sup>2</sup>Research Centre/Hôpital Sainte-Justine, Montréal, Canada, the <sup>3</sup>Institute for Medical Immunology, Humboldt Universität Berlin, Germany, <sup>4</sup>Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Japan

Correspondance :

Nikolaus Heveker  
Centre de Recherche, #6737  
Hôpital Sainte-Justine  
3175 Chemin de la Côte Sainte-Catherine  
Montréal (Québec)H3T 1C5  
Canada  
phone: (514) 345-4931 ext. 4190  
Fax: (514) 345-4801  
email: [REDACTED]

## Summary

Homo- and heterodimerization have emerged as prominent features of G-protein coupled receptors (GPCR) with possible impact on the regulation of their activity. Using a sensitive bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system, we investigated the formation of CXCR4 and CCR2 chemokine receptor dimers. We found that both receptors exist as constitutive homo- and heterodimers and that ligands induce conformational changes within the pre-formed dimers without promoting receptor dimer formation or disassembly. Ligands with different intrinsic efficacies yielded distinct BRET modulations, indicating the stabilization of distinct receptor conformations. We also found that peptides derived from the transmembrane domains of CXCR4 inhibited activation of this receptor by blocking the ligand-induced conformational transitions of the dimer. Taken together, our data support a model in which chemokine receptor homo- and heterodimers form spontaneously and respond to ligand binding as units that undergo conformational changes involving both protomers even when only one of the two ligand binding sites is occupied.

## **I Introduction**

Through recent years, the concept of GPCR dimerization raised questions about the molecular details and functional role of such oligomeric assembly (for a recent review see (1)). Given the clinical interest of GPCRs, insights into the structural and functional organization of the receptor complexes have the potential to facilitate the design of new drug candidates with increased efficacy and selectivity. Resonance Energy Transfer (RET) techniques have emerged as methods of choice to study receptor dimerization in living cells. Although most RET studies indicate that many if not all GPCR exist as dimers or higher oligomers under basal conditions, apparent contradictions exist concerning their potential dynamic regulation upon ligand binding. Whereas numerous authors did not find any effects of ligands on constitutive RET signals in their systems (2-8), others observed ligand-promoted increases or decreases that were interpreted as either the formation (9-11) or the dissociation (12-15) of GPCR dimers in response to receptor activation. Conformational changes within pre-existing constitutive dimers have also been proposed as alternative explanations for agonist or antagonist-induced changes in RET (16-18).

Chemokine receptors, such as CCR2 and CXCR4, have been reported to form homo- and heterodimers (3,4,19-24). In early co-immunoprecipitation studies, Vila-Coro *et al.* proposed that the dimerization of CXCR4 is induced upon activation by its chemokine ligand SDF-1 (21). In contrast, data obtained with RET techniques revealed that CXCR4 homo-dimers form spontaneously in the absence of ligand (3,4,24). In one study, no significant effect of SDF-1 was observed on the constitutive energy transfer (4), while a small but reproducible increase was detected by others (24). Like for CXCR4, agonist stimulation of CCR2 was found to promote the formation of dimers as revealed by chemical cross-linking followed by immunoprecipitation suggesting that receptor dimerization and activation are interconnected processes (19). Heterodimerization between CXCR4 and CCR2 has initially been proposed to occur only in the case of a frequent genetic variant of CCR2, termed CCR2V64I but not for the wild type form of CCR2 (20). Given that CCR2V64I was associated with delayed AIDS progression (25-27), such specific heterodimerization pattern could have important pathophysiological consequences. Indeed, it was speculated that the AIDS-

protective phenotype of the variant could be due to its blocking HIV entry via CXCR4 (20). In line with this proposition, the same authors proposed that the antiviral properties of a monoclonal anti-CCR2 antibodies resulted from its ability to force the heterodimerization of CCR2 with CXCR4 (23).

Taken together, the results summarized above raise a number of questions concerning the dynamic nature of the homo- and heterodimerization processes regulating GPCR function. Among these, the question of whether receptor ligands can induce homo- or heterodimer association or dissociation, or if they promote conformational changes within preformed dimers that remain stable through the activation cycle is still highly debated. The potential role of CXCR4/CCR2 heterodimerization in inhibiting HIV entry makes it a particularly relevant model to study this question. In addition to their role in HIV infection, these chemokine receptors have been shown to be involved in cancer metastasis as well as in various aspects of inflammatory diseases including the directed migration of leukocytes during acute immune responses and homing (28-34). Therefore, understanding the dynamics of CXCR4/CCR2 homo- and heterodimerization following ligand binding takes a particular importance when considering their potential as drug targets for numerous disease states

In the present study, we took advantage of bioluminescence resonance energy transfer (BRET) approaches to study CXCR4/CCR2 homo- and heterodimers in the course of receptor activation. We found that CXCR4 and CCR2 exist as constitutive homo- and heterodimer and that different ligands promote distinct conformational rearrangements of preformed stable oligomers. Our data also indicate that peptides derived from CXCR4 transmembrane domains block receptor activation by preventing the agonist-promoted conformational rearrangement of both CXCR4 homo- and CXCR4/CCR2 heterodimers.

### **Experimental procedures:**

#### **Plasmids**

The cloning of CXCR4-YFP and CXCR4-RLuc have been described previously (3). CCR2-YFP and CCR2-RLuc were constructed by ligating the coding sequence of

CCR2, following its amplification by PCR, into the pGFP-N1-Topaze (Perkin Elmer Life Sciences) and (hRLuc)-N3 (BioSignal) backbones of the CXCR4-YFP and -RLuc using the *HinDIII* and *AgeI* or *HinDIII* and *BamHI* sites, respectively. The constructs were sequenced to ensure the absence of unwanted mutations. The 64V and 64I variants were obtained by site-directed mutagenesis using the Kunkel method. The amino acid sequence of the fusion linker regions between the terminal receptor residue and the initiator methionine of either YFP or RLuc were as follows: CXCR4-YFP: FHSSKPVATMVSKG, CXCR4-RLuc: FHSSKPGDPPARATMTSKV, CCR2-YFP: SAGLGVPATMVSKG, and CCR2-RLuc: SAGLGDPPARATMTSKV. The sequences of the linker regions and of the mutated residues were verified by direct sequencing.

### Reagents

SDF-1 and MCP-1 were purchased from PeproTech and AMD3100 was obtained from the NIH AIDS Research & Reference Reagent Program. TC14012, a T140 analogue with similar biological properties was synthesized as previously described (35). The sequences of the CXCR4 transmembrane domain-derived peptides as described in Tarasova *et al.* (36) were synthesized using Fmoc solid phase synthesis as described before (37), purified to >95% purity and characterized by MALDI-TOF mass spectrometry. The sequences of the peptides are as follows: CXCR4-TMII: LLFVITLPFWAVDAVANWYFGNDD-OH, CXCR4-TMIV: VYVGWIPALLLTIPDFIFANDD-OH, CXCR4-TMVI: VILILAFFACWLPYYIGISID-OH, CXCR4-TMVII: DDEALAFFHCCLNPILYAFL-NH<sub>2</sub>.  $\beta$ 2AR-TMVI-1 (NH<sub>2</sub>-GIIMGFTFTLCWLPFFIVNIVH-COOH) and  $\beta$ 2AR-TMVI-2 (NH<sub>2</sub>-AIIMATFTACWLPFFIVNIVH-COOH) were described in (38). They were dissolved as 10mM stocks in DMSO and used freshly diluted at indicated concentrations.

### Cell culture and transfection

HEK293T cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 units/ml penicillin and streptomycin, 2 mM L-glutamine (all from Wisent). 24h before transfection, cells were seeded at a density of

500 000 cells per well in 6-well dishes. Transient transfections were performed using the FuGENE-6 transfection reagent (Roche) in Optimem medium (Gibco BRL.) Usually 0,1 $\mu$ g CXCR4-RLuc or CCR2-RLuc was transfected alone or with increasing quantities of YFP- tagged CXCR4 or CCR2. Total amount of DNA transfected in each well was completed to 2 $\mu$ g with empty vector. Following overnight incubation, transfection medium was replaced with fresh Dulbecco's modified Eagle's medium for three hours to allow cell recovery. Transfected cells were then seeded in 96 wells white plates with clear bottom pre-treated with poly-D-lysine and left in culture for 24h before being processed for BRET assay.

### **Flow cytometry**

Transfected HEK293T cells were detached with phosphate-buffered saline (PBS) containing 1mM EDTA 24h after cotransfection with CXCR4-RLUC and CXCR4-YFP as indicated. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated on a Ficoll (Amersham) gradient from whole blood. The cells were stimulated with 10 $\mu$ g/ml Phytohemagglutinin (PHA) and cultured for seven days in RPMI containing 10% fetal bovine serum and 50IU/ml IL-2. For CXCR4 staining, the cells were incubated 45 minutes at 4°C in PBS containing 2% fetal bovine serum with anti-CXCR4 phycoerythrin (PE)-conjugated 12G5 monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, CA). They were then washed 3 times with PBS and cell surface expression of CXCR4 was quantified by flow cytometry on a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences).

### **BRET Assays**

For routine BRET measurements, cells were washed once with PBS 36 to 48 hours after transfection and Coelenterazine H (Nanolight Technology) added to a final concentration of 5  $\mu$ M in PBS. Readings were then collected using a multi-detector plate reader MITHRAS LB940 (Berthold) allowing the sequential integration of the signals detected in the 480 $\pm$ 20 nm and 530 $\pm$ 20 nm windows, for Luciferase and YFP light emissions respectively. The BRET signal is determined by calculating the ratio of the light intensity emitted by the Receptor-YFP over the light intensity emitted by the Receptor-RLuc. The values were corrected by subtracting the background BRET signal

detected when the Receptor-RLuc constructs was expressed alone. To assess the effects of ligands, SDF-1, AMD3100, TC14012 and MCP-1 were added at the indicated concentration and incubated at 37°C for five minutes before the addition of coelenterazine H and BRET reading. When indicated, ligands were added in presence of 0,1% BSA (Sigma). For experiments with transmembrane peptides, the cells were pre-incubated with the different peptides in PBS for 15 minutes at 37°C before agonist exposure.

For acquisition of full BRET spectra, cells were transfected as described above with different amount of CXCR4-YFP for a given quantity of CXCR4-RLuc (0,1µg). Cells were detached and resuspended in PBS containing 0,1% w/v glucose. 200 000 cells were seeded in 100µl PBS in 96 well with clear bottom (corning) and BRET scan was performed in a Flex-station 2 (Molecular devices) by reading luminescence between 400nM and 600nM immediately after the addition of coelenterazine for cells expressing different [acceptor]/[donor] ratios.

For BRET titration experiments, net BRET ratios were expressed as a function of the [acceptor]/[donor] ratio (39). Total fluorescence and luminescence were used as a relative measure of total expression of the acceptor and donor proteins, respectively. Total fluorescence was determined with MITHRAS using an excitation filter at 485nM and an emission filter at 535nM. Total luminescence was measured in the MITHRAS, 10 minutes after the addition of coelenterazine and the reading taken in the absence of emission filter.

### **cAMP production**

To determine cAMP accumulation, HEK293T cells were seeded in 24-well microplates at  $10^5$  cells/well (coated with 0.1% poly-D-lysine) 24h prior to the experiment and labelled for 2-3h in DMEM without FBS containing 2 µCi/ml of [ $^3$ H]-adenine (NEN). Since CXCR4 is coupled to Gi proteins, the relative efficacy of SDF-1 to inhibit forskolin-induced cAMP production was monitored in different conditions. Cells were stimulated in presence of 20µM forskolin (Sigma) alone or 20µM forskolin and 1nM SDF-1 for 30 min at 37 °C in DMEM containing 50mM Hepes, pH 7.4; 0,1% BSA, 1 mM IBMX (Sigma) and supplemented or not with 10µM of each of the CXCR4

TM peptides. The reaction was terminated by removing the DMEM / IBMX / ligand solution and the addition of ice-cold 5% trichloroacetic acid. [<sup>3</sup>H]cAMP was purified by sequential chromatography (Dowex resin/aluminum oxide).

### **Binding assays**

SDF-1 binding to CXCR4 was assessed indirectly by flow cytometry as previously published (40) Briefly, the ability of SDF-1 to compete for the binding of the monoclonal anti-CXCR4 antibody 12G5 to CEM cells was used to determine SDF-1 binding. SDF-1 was co-incubated at 4°C for 30 minutes with the antibody and SDF binding determined by the loss of 12G5 labelling, as determined by flow cytometry. To test whether CXCR4 TM peptides interfered with SDF-1 binding to CXCR4, the peptides were incubated with the cells 15 minutes prior to addition of SDF-1 and 12G5. Control tubes were incubated with peptides and 12G5, without SDF-1.

For T14012 binding assay, CXCR4-expressing HEK293T cells were detached with 5mM EDTA, washed twice in binding buffer (50 mmol/L Hepes pH 7.4, 1 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.5% BSA) and resuspended at final concentration of 5x10<sup>5</sup> cells/ml. Total SDF-1 binding was measured with 0.1 nM <sup>125</sup>I-SDF-1 (2200 Ci/mmol, NEN) as tracer, and TC14012 competition assay were performed with 100nM TC14012 in the presence or absence of 10µM of each CXCR4 peptide. The samples were incubated for 90 minutes at 20°C and binding was terminated by rapid filtration through glass fiber (GF/C) filters (Whatman, Maidstone, UK) using ice-cold PBS containing 0,5M NaCl. The retained radioactivity was counted in a gamma counter (1271 RIAGamma Counter, LKB Wallac).

### **Data analysis**

Data obtained in BRET assays were analyzed using Prism 3.0. Statistical significance of the differences between the different conditions were calculated using one-way ANOVA analysis of variance with a Bonferroni post-test for p value less than 0,05.

## **Results**

### *Constitutive CXCR4 dimers revealed by BRET*

The existence of constitutive CXCR4 dimers was probed by monitoring the occurrence of intermolecular interactions among CXCR4 molecules under basal conditions using a proximity-based BRET assay. For this purpose, a constant amount of CXCR4-RLuc expression vector was cotransfected with increasing amounts of CXCR4-YFP encoding plasmid. The entire emission spectrum between 400 and 600 nm was then analyzed for various CXCR4-YFP/CXCR4-RLuc (energy acceptor/energy donor) ratios following the addition of the luciferase substrate coelenterazine. As shown in Fig.2.1, increasing the expression level of CXCR4-YFP led to a progressive increase in the amount of light emitted in the 510-550 nm region that resulted from the transfer of energy from the luciferase to the YFP with the ensuing emission of light by the latter (Fig. 2.1A). The occurrence of BRET between RLuc and YFP was further illustrated by the reduction in emission observed in the 450-510 nm part of the spectrum that correspond to the region of overlap between RLuc (energy donor) emission and YFP (energy acceptor) excitation wavelengths allowing the energy transfer. The basal BRET observed in the absence of any receptor ligand indicates, in agreement with previous reports (3,4,24) that CXCR4 exist as constitutive homodimers. For all subsequent BRET experiments, the emission of light was measured only in the 460-500 nm and 510-550 nm windows corresponding to the RLuc and YFP emission peaks respectively and the BRET defined as the ratio of light detected in these two channels following coelenterazine addition. As can be seen in Fig. 2.2A, the BRET signal increased as a hyperbolic function of the CXCR4-YFP/CXCR4-RLuc ratio. The saturation of the BRET titration curve is indicative of a specific protein-protein interaction, since random molecular collisions that would give rise to bystander BRET would be expected to increase nearly linearly over a wide range of YFP/RLuc (39,41). The selectivity of the observed signal is further supported by the fact that co-expression of CXCR4-RLuc with an unrelated GPCR, GBR2-YFP, led to marginal signal that progressed linearly over the same range of energy acceptor /donor. The positive BRET signal did not result from a non-physiological over-expression of the receptors, since CXCR4 immunostaining followed by flow cytometry analysis revealed that the highest expression levels reached

in transfected HEK293T cells (1 $\mu$ g CXCR4-YFP + 0.1 $\mu$ g CXCR4-RLuc) was still lower than those observed in activated peripheral blood mononuclear cells (Fig 2.1B).

*Ligand-induced modulation of the CXCR4 homodimer BRET signal*

To assess the effect of ligand binding on the BRET signal observed for the CXCR4 homodimer, full BRET titration curves were obtained in the presence and absence of the CXCR4 agonist, SDF-1, or the polyphemusin II-derived inverse agonists peptide analogue, TC14012 (35). As can be seen in Fig. 2.2A, the addition of SDF-1 increased while TC14012 decreased the maximal BRET signal (BRET<sub>max</sub>) observed. Interestingly, neither compound affected the shape of the curve so that the concentration of CXCR4-YFP needed to reach 50% of the BRET<sub>max</sub> (BRET<sub>50</sub>) remained unaffected by the treatments. Since the BRET<sub>50</sub> represents the propensity of the protomers to interact with one another (ie: their relative affinity), our data indicate that the ligand treatments did not change the number of complexes. Rather, the BRET<sub>max</sub> increase most likely reflects conformational changes, within preformed receptor dimers, that affect the distance between the energy donor and acceptor. SDF-1 was without effect on the marginal signal observed between CXCR4-RLuc and the unrelated GBR2-YFP confirming the selectivity of the effect.

The dose-dependence of the ligand effect is illustrated in Fig. 2.2B. In cell expressing a given CXCR4-RLuc/CXCR4-YFP ratio, the agonist SDF-1 and inverse agonist TC14012 dose-dependently increase and decrease the basal BRET signal, respectively. Interestingly, the bicyclam weak partial agonist AMD3100 (42) increase the BRET signal albeit to lower extent than the full agonist SDF-1. The unrelated, CCR2 selective, chemokine MCP-1 was without effect on the BRET signal confirming that ligand interaction with CXCR4 is required to promote BRET changes. The dose-response curves were carried out both in the absence and presence of the carrier protein BSA (0.1%). As can be seen in the table inset, the presence of BSA significantly increased the apparent potency of the compounds indicating the occurrence of non-specific adsorption or inactivation of the diluted ligands in the absence of carrier. The EC<sub>50</sub> determined for SDF-1 in the presence of BSA was well within the range of K<sub>d</sub>s previously reported for SDF-1 binding to CXCR4 (4nM to 85 nM)(43-47)) whereas the

EC50 for TC14012 and AMD3100 are comparable to the IC50s obtained in binding competition experiments using [<sup>125</sup>I]-SDF-1 as the radio-ligand (42).

The pharmacological selectivity of the ligand-promoted BRET changes was further demonstrated by the competitive nature of the effects. Indeed, as shown in Fig. 2.3., TC14012 dose-dependently blocked the ability of 100nM SDF-1 to increase the BRET signal and eventually reverse this increase revealing the inhibitory action of the inverse agonist (Fig. 2.3A.). Similarly, increasing concentration of the partial agonist AMD3100 progressively blocked the SDF-1-promoted BRET increase until it reached the modestly elevated level corresponding to the partial agonistic activity of AMD3100 (Fig. 2.3B). Taken together, these results indicate that three compounds with different intrinsic efficacies led to distinct conformational changes of the CXCR4 dimer.

#### *CCR2 homo- and heterodimers*

CXCR4 has been previously demonstrated to form heterodimers with CCR2, but it remained unclear whether these heterodimers are spontaneously formed or induced by the presence of one or both receptor ligands (20,23,48). In order to clarify this issue, we first investigated the formation of constitutive CCR2 homodimers and their modulation by the CCR2 selective agonist MCP-1. As can be seen in Fig. 2.4A, saturating hyperbolic BRET titration curves revealed the spontaneous formation of CCR2 homodimer. Similarly to what was observed for the constitutive CXCR4 homodimer, the selective agonist increased the maximal BRET signal without affecting the BRET<sub>50</sub> indicating that the conformation and not the number of dimers was affected by the ligand binding. The pharmacological selectivity of the effects was again confirmed by the fact that the CXCR4 selective agonist SDF-1 was without effect on the CCR2 dimer BRET signal (Fig. 2.4B).

As was the case for each of the receptors expressed individually, co-expression of CCR2 and CXCR4 led to the formation of constitutive heterodimers revealed by specific basal BRET signals and hyperbolic saturating BRET titration curves between CCR2-RLuc and CXCR4-YFP as well as in the reverse orientation (between CXCR4-RLuc and CCR2-YFP) (Fig. 2.5A). Interestingly, the selective binding of ligands to a single protomer was sufficient to promote heterodimer BRET changes for the two BRET

orientations. However, the pattern of ligand effects was different from that observed for each of the homodimers. In addition, the BRET pair orientation influenced the ligand response pattern. When considering the CXCR4-RLuc/CCR2-YFP orientation, the addition of the CCR2 agonist MCP-1 led, as was the case for the CCR2 homodimer, to an increase of the heterodimer BRET signal. In contrast, the CXCR4 agonist SDF-1, which promoted an increase of the CXCR4 homodimer BRET, decreased the BRET signal originating from the heterodimer. The CXCR4 inverse agonist TC14012 for its part had similar effect on the homo- and heterodimer leading to a decrease in the BRET signal (Fig. 2.5B, left panel). When the reverse BRET partner orientation (CCR2-RLuc/CXCR4-YFP) was investigated, the CXCR4 ligands SDF-1 and TC14012 retained their inhibitory effect on the heterodimer BRET signal. However, MCP-1, which increased the BRET observed between CXCR4-RLuc and CCR2-YFP, led to a dramatic reduction of the BRET signal obtained for the CCR2-RLuc/CXCR4-YFP pair (Fig. 2.5B, right panel). Taken together, these results clearly indicate that the orientation of the ligand-promoted BRET changes cannot be used as a direct reflection of the intrinsic ligand efficacy. Rather, it appears to be dependant on both the nature of the ligand and the BRET pairs considered, both the identity of the receptor protomers and the relative position of the energy donor and acceptor within the dimers influencing the responses observed.

The observation that MCP-1 can either increase or decrease the BRET signal emanating from the CXCR4/CCR2 heterodimer depending on the relative RLuc/YFP orientation can hardly be reconciled with the hypothesis that BRET changes reflect ligand-induced dimer association or dissociation. Indeed, the same ligand should not lead to opposite effects on the same receptor heterodimer. Given that both the distance and the orientation between the energy donor and acceptor determine the BRET efficacy, the distinct BRET modulations observed most likely reflect conformational rearrangements that change either the distance or the relative orientation between the fluorophores. Since these parameters are affected by the initial relative position of the RLuc and YFP within the dimers, it is to be expected that the same conformational switch imposed by a ligand could result in very different BRET changes when different BRET configurations are considered.

A previous study suggested that CXCR4/CCR2 heterodimers could be formed only with the CCR2V64I variant form of the receptor and not with the wild-type CCR2 (20). Given that the CCR2 64I variant is associated with delayed AIDS onset in HIV-infected individuals, the finding was suggestive that the phenotype of the 64I variant could be mediated by an inhibition of CXCR4 usage by HIV as a result of its heterodimerization (26) (23). To reassess this possibility, we systematically used both CCR2 variants to measure both basal and ligand-modulated BRET signals generated by homo- and hetero-dimers but failed to detect any significant difference between them (data not shown). Therefore, the mechanism for the observed protective phenotype against AIDS progression of CCR2V64I is not related to its ability to heterodimerize with CXCR4.

*Effects of peptides derived from the CXCR4 transmembrane domains on both CXCR4 homo- and heterodimers*

Previous work had found that peptides derived from CXCR4 transmembrane domains are rapidly associating with the receptor, blocking its signalling as well as its HIV-1 coreceptor function (36). We asked whether these effects could result from the dissociation of constitutive CXCR4 dimers, a mechanism that had been suggested for the effect of a peptide derived from TMVI of the  $\beta$ -adrenergic receptor (38). For this purpose, the effect of four peptides derived from TMII, IV, VI and VII was assessed on the basal CXCR4 homodimer BRET signal. As shown in Fig. 6A, none of the peptides affected the constitutive BRET signal as shown by the unaltered BRET titration curves ruling out peptide-promoted dissociation as the basis of their functional inhibitory action. However, all peptides blocked the SDF-1-induced BRET increase, TMII and IV being the most efficacious (Fig. 2.6B) indicating that inhibition of the agonist-promoted conformational change could underlie the mechanism of action of the peptides. Interestingly, the efficacies of the peptides in the BRET assay was similar their relative ability to block SDF-1 promoted inhibition of adenylyl cyclase activity (Fig 2.6D). Indeed, whereas TMII and TMIV acted as complete inhibitors in both assays, TMVI and TMVII acted as partial blockers at 10 $\mu$ M. When considering the inverse-agonist TC14012, only TMII significantly attenuated the ligand-promoted BRET reduction,

TMIV, VI and VII leading only to marginal inhibition that did not reach statistical significance (Fig. 2.6B). The inhibitory action of the peptides appears to be directly linked to the inhibition of the activation process and not of the ligand binding to the receptor since neither SDF-1 nor TC14012 binding to CXCR4 was affected by the peptides (data not shown). The differential effect of the peptides on the agonist- and inverse agonist-promoted changes further confirmed that the two ligands promoted distinct conformational changes that are differentially affected by the peptides. The effect was specific for CXCR4 since the peptides did not interfere with the MCP-1-induced increase of the CCR2 homodimer BRET signal (Fig. 2.6C). In addition, two peptides derived from the  $\beta$ 2-adrenergic receptor TMVI (38) were without effect on the SDF-1 promoted increase in BRET between CXCR4-Rluc and CXCR4-YFP (data not shown).

We then examined the effect of the CXCR4-derived peptides on the CXCR4/CCR2 heterodimer. In the absence of ligands, similarly to what was observed for the CXCR4 homodimer, the four peptides were without effect on the basal heterodimer BRET signal obtained between CCR2-Rluc and CXCR4-YFP (Fig. 2.7A). However, all four peptides blocked, albeit to different extents, the SDF-1-promoted BRET change while only TMII significantly affected the TC14012-induced BRET reduction (Fig. 2.7B). This pattern of inhibition, which is similar to that observed for the CXCR4 homodimer suggests that comparable CXCR4 conformational changes occur upon ligand binding whether the receptor is part of an homodimer or within a CXCR4/CCR2 heterodimer. Interestingly, a modest (around 25%) but statistically significant reduction of the heterodimer BRET response to the CCR2 selective agonist MCP-1 was also observed upon treatment with the CXCR4 derived TMII, TMIV and TMVI peptides (Fig. 2.7B). This observation suggests that the heterodimer conformational changes induced by ligand binding to a single receptor protomer may not only involve changes within the ligand-bound receptor. Instead, trans-receptor conformational reorganisation may be transmitted to the CXCR4 protomer upon ligand binding to the CCR2 protomer, and these transmitted conformational changes could be blocked by the CXCR4-derived peptides. Alternatively, the observed effects may be due

to the capacity of the CXCR4-bound peptides to reduce CCR2 movements within the heterodimer.

### **Discussion:**

Recent appreciation that GPCRs exist as dimers has raised a number of questions regarding the molecular dynamics and functional role of such oligomeric organization. Among these, whether dimerization is a constitutive phenomenon or is promoted by ligand binding remains highly debated. The role of dimerization in the receptor activation process also remains poorly understood. In this paper we present evidence indicating that at least for CXCR4 and CCR2, receptors exist as constitutive homo- and heterodimers and that ligand binding induce conformational changes within pre-existing complexes without promoting the formation or dissociation of dimers. Taking advantage of CXCR4-derived peptides that can non-competitively block receptor function, we also show that ligand promoted changes in dimer conformations are intimately linked with receptor function.

Previous studies have led to conflicting interpretations concerning the dynamic nature of GPCR dimers. In particular, while many authors interpreted ligand-promoted changes in Resonance Energy Transfer signals between GPCR protomers as evidence for receptor dimer formation or dissociation, (9,12-14,48), others concluded to conformational changes within constitutive receptor dimers (16,17,41).

When considering CXCR4 and CCR2, early co-immunoprecipitation studies suggested that dimers only formed following stimulation with chemokines (20-22). Later work using either fluorescence or bioluminescence resonance energy transfer methods revealed the existence of spontaneous CXCR4 dimers (3,4,24). In two of these studies, the effect of the agonist SDF-1- was assessed on the basal RET signals. Whereas a modest increase that did not reach statistical significance was observed in one study (4), a reproducible increase was observed in the other (24). However, the data obtained did not allow to determine whether the RET augmentation represented an increase in dimer formation or a conformational change within the preformed dimers.

In the present study, in addition to confirming the existence of constitutive CXCR4 homodimers, our BRET results demonstrate that both CCR2 homodimers and

CXCR4/CCR2 heterodimers can form spontaneously. Three lines of evidence supported that the basal BRET signals observed truly represent specific constitutive dimerization, and are not simply non-specific “bystander BRET” that would result from tight random-packing of monomeric receptors: 1) BRET titration experiments gave rise to saturating hyperbolic curves that are characteristic of specific protein-protein interactions and not random molecular collisions (39), 2) No specific BRET signal could be detected between either CXCR4 or CCR2 and the unrelated GABA<sub>B</sub>R2, 3) Receptor occupancy resulted in either ligand-specific increases or decreases of the BRET signal; such a result would not be expected if the basal BRET signal resulted from non-specific random collisions. In addition, the receptor expression levels of the transfected cells used in this study are similar to those observed in primary lymphocytes, thereby excluding that dimerization is a result of receptor overexpression.

Our study also provides a conclusive demonstration that ligand-promoted modulation of CXCR4 and CCR2 homo- and heterodimer BRET signals does not result from changes in dimer numbers, but rather from the rearrangements of preformed dimers. First, the BRET titration curves revealed that the BRET<sub>50s</sub>, which would be expected to change if the propensity to form dimers was affected (39,49) were unaltered in the presence of an agonist or an inverse agonist suggesting that the ligands did not affect the apparent affinity of the receptor protomers for one another. Changes in BRET<sub>max</sub> in the absence of apparent altered affinity is best explained by conformational changes that change the distance and/or orientation between the energy donor and acceptor affecting the energy transfer efficacy. Second, the dependence of the MCP-1-promoted change in BRET signal on the orientation of the CXCR4/CCR2 heterodimer BRET partners (ie: MCP-1 increased the BRET signal for the CXCR4-RLuc/CCR2-YFP pair while it decreased it for the CCR2-RLuc/CXCR4-YFP) is hardly compatible with ligand-promoted dimer formation or dissociation. In fact, that the fluorophore fusion orientation alone would determine whether MCP-1 induces dimer association or dissociation seems highly unlikely. Rather, the dependence of the BRET changes (ie: increase or decrease) on the BRET pair configuration probably reflects structural particularities of the respective pairs studied. Indeed, the specific initial structural state determined by the particular combination of a receptor C-terminal fused

to either the energy donor or acceptor could greatly influence how the same conformational switch is sensed by the BRET partners.

When considering the extent of the BRET changes promoted by various ligands for the CXCR4 homodimer, our results seem to contradict the previously reported CXCR4 model proposed by Trent *et al.* (50). In this model, the inverse agonist T140 is predicted to induce only minor rearrangements while more important changes are expected from the binding of the weak agonist AMD3100. It should, however, be pointed out that the model only considered the monomeric form of the receptor and maybe more importantly that the initial state was assimilated to a fully inactive conformation (based on the available rhodopsin structure (51)) Taking into account the previous report that CXCR4 displays a level of spontaneous activity that can be inhibited by TC14012 but is almost not affected by AMD3100 in cells (42), one could propose that the average basal dimer conformation detected by BRET represents a partially activated conformation that resembles the one stabilized by AMD3100. It follows that AMD3100 would not promote important conformational changes thus only marginally affecting the basal BRET signal while the stabilization of a fully inactive conformation by TC1402 would be translated in considerable BRET changes which is what we observed in living cells.

In the case of the CXCR4 and CCR2 homodimers, ligand-induced changes in BRET signals nicely parallel the intrinsic efficacy of the ligands; agonists promoting signal increases (a full agonist yielding a greater response than a partial agonist) while an inverse agonist decrease the signal. It would therefore be tempting to speculate that the direction of the BRET changes reflects specific conformational changes that can be directly linked to the signalling efficacy. However, the data obtained with the CXCR4/CCR2 heterodimer questions such direct relationship. Indeed, the CCR2 agonist MCP-1, either increased or decreased the BRET signal depending on the BRET partner orientation used (see above) demonstrating that the direction of ligand-induced BRET signal inflection may depend on C-terminal structural constraints, and thus differ in different systems. It would thus be prudent to conclude that different BRET changes reflect distinct ligand-stabilized receptor conformations but cannot be used to predict

intrinsic efficacies. Similar conclusions had already been suggested by other authors (16).

Although no direct relationship between the direction of the BRET changes induced by ligands and their intrinsic efficacies can be strictly established, our data with the CXCR4-derived TM peptides strongly suggest that the conformational changes detected are linked to receptor activity. The original underlying rationale for testing the effect of the inhibitory peptides developed by Tarasova *et al.* (36) was that TM-derived peptides could bind to the protomer interface within dimers, thereby interfering with dimerization and inhibiting receptor activities. Indeed, the activity of a similar peptide has been suggested to result from the disruption of the  $\beta$ 2-adrenergic receptor dimers (38), an interpretation that is in line with the proposed roles of TM domains in other GPCR dimer interfaces (52,53). Hernanz-Falcon *et al.* recently reported that simultaneous mutation of two residues located in the first and fourth TM domains abolished CCR5 dimerization, and that small peptides corresponding to these regions had the same effect (48). Alternatively, it has been proposed that TM-peptides can act by interfering with intramolecular TM packing, and thus inducing receptor distortion (54). Our finding that CXCR4 TM-derived peptides did not affect basal BRET levels indicate that they did not function by inhibiting dimerization or by causing major distortion in the initial conformation since both of these should have caused detectable BRET changes. Our data rather suggest that peptide binding stabilizes the initial conformation hampering the occurrence of any ligand-promoted conformational changes. Given the anti-HIV activity of these peptides ((36) and N.H. data not shown), this interpretation has important implications for the role of CXCR4 in HIV entry, as it suggests that the peptides could block envelope-induced conformational changes of CXCR4 that are mandatory for viral entry. Whether the apparently different efficacy of the various peptides to inhibit both function and ligand-promoted conformational changes reflects the respective importance of specific TM domains in the dimerization process remains to be investigated.

The observation that CXCR4-derived TM peptides could block the conformational rearrangement of the CXCR4/CCR2 heterodimer promoted by the selective CCR2 agonist MCP-1 provides some clues about the functional organization of

chemokine receptor dimers. Indeed, these results demonstrate that the presence of only one selective chemokine is sufficient to change the conformation of the heterodimer. In addition, it is tempting to speculate that conformational changes could be transmitted in *trans* from one protomer to the other. Such inter-protomer transmission of conformational changes would suggest that the activity of one receptor could be affected by ligand binding to the other. This type of transactivation has been previously shown for the metabotropic GABA<sub>B</sub> receptor where agonist binding to the GABABR1 protomer lead to the functional engagement of the heterotrimeric G protein by the GABABR2 protomer (55,56). The occurrence of trans-dimer conformational rearrangements could have great impact on the therapeutic use of receptor ligands since they may not only impinge on the activity of their cognate receptor, but also on that of the heterodimer partner. Alternatively, however, our results could also be explained by the capacity of the CXCR4-derived peptides to interfere with CCR2 movements within the heterodimer.

The fact that CXCR4/CCR2 heterodimers are conformationally responsive to selective ligands of either receptor could have potentially important physiological implications. Cell migration frequently involves several chemokines, and the mechanisms leading to the integration of these multiple signals is poorly understood (57-59). Since many chemokine receptors are co-expressed in the same cell types, and can be involved together in a single migration process, a role for heterodimers in integrating the multiple signals could be envisioned. For example, CCR2 and CXCR4 have been shown to both contribute to accumulation of activated/memory T-cells in lymph node (60). Whether they play sequential roles or are simultaneously activated, possibly by the intermediate of receptor heterodimers, will require further investigations.

**Footnotes:**

This work was supported in part by the Canadian Institutes of Health Research, the Fonds de la Recherche en Santé du Québec, the Canadian Foundation for Innovation, and the Fondation de l'Hôpital Sainte Justine. Y.P. was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM, France) and the Canadian Institutes of Health Research.

**Acknowledgements:**

We thank Paulo Cordeiro for excellent technical assistance and Marc Parmentier for technical advice.

**References :**

1. Terrillon, S., and Bouvier, M. (2004) *EMBO Rep* **5**, 30-34
2. McVey, M., Ramsay, D., Kellett, E., Rees, S., Wilson, S., Pope, A. J., and Milligan, G. (2001) *J Biol Chem* **276**, 14092-14099
3. Issafras, H., Angers, S., Bulenger, S., Blanpain, C., Parmentier, M., Labbe-Jullie, C., Bouvier, M., and Marullo, S. (2002) *J Biol Chem*
4. Babcock, G. J., Farzan, M., and Sodroski, J. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 3378-3385
5. Terrillon, S., Durroux, T., Mouillac, B., Breit, A., Ayoub, M. A., Taulan, M., Jockers, R., Barberis, C., and Bouvier, M. (2003) *Mol Endocrinol* **17**, 677-691
6. Canals, M., Marcellino, D., Fanelli, F., Ciruela, F., de Benedetti, P., Goldberg, S. R., Neve, K., Fuxe, K., Agnati, L. F., Woods, A. S., Ferre, S., Lluis, C., Bouvier, M., and Franco, R. (2003) *J Biol Chem* **278**, 46741-46749
7. Gazi, L., Lopez-Gimenez, J. F., Rudiger, M. P., and Strange, P. G. (2003) *Eur J Biochem* **270**, 3928-3938
8. Dinger, M. C., Bader, J. E., Kobor, A. D., Kretschmar, A. K., and Beck-Sickinger, A. G. (2003) *J Biol Chem* **278**, 10562-10571
9. Kroeger, K. M., Hanyaloglu, A. C., Seeber, R. M., Miles, L. E., and Eidne, K. A. (2001) *J Biol Chem* **276**, 12736-12743
10. Cornea, A., Janovick, J. A., Maya-Nunez, G., and Conn, P. M. (2001) *J Biol Chem* **276**, 2153-2158
11. Wurch, T., Matsumoto, A., and Pauwels, P. J. (2001) *FEBS Lett* **507**, 109-113
12. Berglund, M. M., Schober, D. A., Esterman, M. A., and Gehlert, D. R. (2003) *J Pharmacol Exp Ther* **307**, 1120-1126
13. Grant, M., Collier, B., and Kumar, U. (2004) *J Biol Chem*
14. Cheng, Z. J., and Miller, L. J. (2001) *J Biol Chem* **276**, 48040-48047

15. Latif, R., Graves, P., and Davies, T. F. (2002) *J Biol Chem* **277**, 45059-45067
16. Ayoub, M. A., Couturier, C., Lucas-Meunier, E., Angers, S., Fossier, P., Bouvier, M., and Jockers, R. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 21522-21528
17. Ayoub, M. A., Levoye, A., Delagrangé, P., and Jockers, R. (2004) *Mol Pharmacol*
18. Tateyama, M., Abe, H., Nakata, H., Saito, O., and Kubo, Y. (2004) *Nat Struct Mol Biol* **11**, 637-642
19. Rodriguez-Frade, J. M., Vila-Coro, A. J., de Ana, A. M., Albar, J. P., Martinez, A. C., and Mellado, M. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3628-3633
20. Mellado, M., Rodriguez-Frade, J. M., Vila-Coro, A. J., de Ana, A. M., and Martinez, A. C. (1999) *Nature* **400**, 723-724
21. Vila-Coro, A. J., Rodriguez-Frade, J. M., Martin De Ana, A., Moreno-Ortiz, M. C., Martinez, A. C., and Mellado, M. (1999) *Faseb J* **13**, 1699-1710
22. Mellado, M., Rodriguez-Frade, J. M., Vila-Coro, A. J., Fernandez, S., Martin de Ana, A., Jones, D. R., Toran, J. L., and Martinez, A. C. (2001) *Embo J* **20**, 2497-2507
23. Rodriguez-Frade, J. M., Del Real, G., Serrano, A., Hernanz-Falcon, P., Soriano, S. F., Vila-Coro, A. J., De Ana, A. M., Lucas, P., Prieto, I., Martinez, A. C., and Mellado, M. (2004) *Embo J* **23**, 66-76
24. Toth, P. T., Ren, D., and Miller, R. J. (2004) *J Pharmacol Exp Ther* **310**, 8-17
25. Lee, B., Doranz, B. J., Rana, S., Yi, Y., Mellado, M., Frade, J. M., Martinez, A. C., O'Brien, S. J., Dean, M., Collman, R. G., and Doms, R. W. (1998) *J Virol* **72**, 7450-7458
26. Smith, M. W., Dean, M., Carrington, M., Winkler, C., Huttley, G. A., Lomb, D. A., Goedert, J. J., O'Brien, T. R., Jacobson, L. P., Kaslow, R., Buchbinder, S., Vittinghoff, E., Vlahov, D., Hoots, K., Hilgartner, M. W., and O'Brien, S. J. (1997) *Science* **277**, 959-965
27. Tang, J., Shelton, B., Makhatadze, N. J., Zhang, Y., Schaen, M., Louie, L. G., Goedert, J. J., Seaberg, E. C., Margolick, J. B., Mellors, J., and Kaslow, R. A. (2002) *J Virol* **76**, 662-672

28. Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E., and Berger, E. A. (1996) *Science* **272**, 872-877
29. Murphy, P. M. (2001) *N Engl J Med* **345**, 833-835
30. Nanki, T., Hayashida, K., El-Gabalawy, H. S., Suson, S., Shi, K., Girschick, H. J., Yavuz, S., and Lipsky, P. E. (2000) *J Immunol* **165**, 6590-6598
31. Lukacs, N. W., Berlin, A., Schols, D., Skerlj, R. T., and Bridger, G. J. (2002) *Am J Pathol* **160**, 1353-1360
32. Salcedo, R., and Oppenheim, J. J. (2003) *Microcirculation* **10**, 359-370
33. Lapidot, T. (2001) *Ann NY Acad Sci* **938**, 83-95
34. Charo, I. F., and Peters, W. (2003) *Microcirculation* **10**, 259-264
35. Tamamura, H., Omagari, A., Hiramatsu, K., Gotoh, K., Kanamoto, T., Xu, Y., Kodama, E., Matsuoka, M., Hattori, T., Yamamoto, N., Nakashima, H., Otaka, A., and Fujii, N. (2001) *Bioorg Med Chem Lett* **11**, 1897-1902
36. Tarasova, N. I., Rice, W. G., and Michejda, C. J. (1999) *J Biol Chem* **274**, 34911-34915
37. Heveker, N., Tissot, M., Thuret, A., Schneider-Mergener, J., Alizon, M., Roch, M., and Marullo, S. (2001) *Mol Pharmacol* **59**, 1418-1425
38. Hebert, T. E., Moffett, S., Morello, J. P., Loisel, T. P., Bichet, D. G., Barret, C., and Bouvier, M. (1996) *J Biol Chem* **271**, 16384-16392
39. Mercier, J. F., Salahpour, A., Angers, S., Breit, A., and Bouvier, M. (2002) *J Biol Chem* **277**, 44925-44931
40. Brelot, A., Heveker, N., Montes, M., and Alizon, M. (2000) *J Biol Chem* **275**, 23736-23744
41. Couturier, C., and Jockers, R. (2003) *J Biol Chem* **278**, 26604-26611
42. Zhang, W. B., Navenot, J. M., Haribabu, B., Tamamura, H., Hiramatu, K., Omagari, A., Pei, G., Manfredi, J. P., Fujii, N., Broach, J. R., and Peiper, S. C. (2002) *J Biol Chem* **277**, 24515-24521
43. Gupta, S. K., Pillarisetti, K., Thomas, R. A., and Aiyar, N. (2001) *Immunol Lett* **78**, 29-34
44. Hesselgesser, J., Liang, M., Hoxie, J., Greenberg, M., Brass, L. F., Orsini, M. J., Taub, D., and Horuk, R. (1998) *J Immunol* **160**, 877-883

45. Haribabu, B., Richardson, R. M., Fisher, I., Sozzani, S., Peiper, S. C., Horuk, R., Ali, H., and Snyderman, R. (1997) *J Biol Chem* **272**, 28726-28731
46. Di Salvo, J., Koch, G. E., Johnson, K. E., Blake, A. D., Daugherty, B. L., DeMartino, J. A., Sirotina-Meisher, A., Liu, Y., Springer, M. S., Cascieri, M. A., and Sullivan, K. A. (2000) *Eur J Pharmacol* **409**, 143-154
47. Doranz, B. J., Orsini, M. J., Turner, J. D., Hoffman, T. L., Berson, J. F., Hoxie, J. A., Peiper, S. C., Brass, L. F., and Doms, R. W. (1999) *J Virol* **73**, 2752-2761
48. Hernanz-Falcon, P., Rodriguez-Frade, J. M., Serrano, A., Juan, D., del Sol, A., Soriano, S. F., Roncal, F., Gomez, L., Valencia, A., Martinez, A. C., and Mellado, M. (2004) *Nat Immunol* **5**, 216-223
49. Ramsay, D., Kellett, E., McVey, M., Rees, S., and Milligan, G. (2002) *Biochem J* **365**, 429-440
50. Trent, J. O., Wang, Z.-x., Murray, J. L., Shao, W., Tamamura, H., Fujii, N., and Peiper, S. C. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 47136-47144
51. Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Le Trong, I., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., Yamamoto, M., and Miyano, M. (2000) *Science* **289**, 739-745
52. Overton, M. C., and Blumer, K. J. (2002) *J Biol Chem* **277**, 41463-41472
53. Guo, W., Shi, L., and Javitch, J. A. (2003) *J Biol Chem* **278**, 4385-4388
54. George, S. R., Lee, S. P., Varghese, G., Zeman, P. R., Seeman, P., Ng, G. Y. K., and O'Dowd, B. F. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 30244-30248
55. Galvez, T., Duthy, B., Kniazeff, J., Blahos, J., Rovelli, G., Bettler, B., Prezeau, L., and Pin, J. P. (2001) *Embo J* **20**, 2152-2159
56. Kniazeff, J., Galvez, T., Labesse, G., and Pin, J. P. (2002) *J Neurosci* **22**, 7352-7361
57. Foxman, E. F., Campbell, J. J., and Butcher, E. C. (1997) *J Cell Biol* **139**, 1349-1360
58. Foxman, E. F., Kunkel, E. J., and Butcher, E. C. (1999) *J Cell Biol* **147**, 577-588
59. Moser, B., Wolf, M., Walz, A., and Loetscher, P. (2004) *Trends Immunol* **25**, 75-84

60. Yopp, A. C., Fu, S., Honig, S. M., Randolph, G. J., Ding, Y., Krieger, N. R., and Bromberg, J. S. (2004) *J Immunol* 173, 855-865

**Figure legends:**

**Fig 2.1. A): Light emission BRET spectra for CXCR4 homodimerisation.** Spectra of HEK293T cells coexpressing a fix amount of BRET donor (CXCR4-RLuc) and various levels of acceptor (CXCR4-YFP). Net BRET signals and BRET spectra were determined in parallel. Results are expressed as % of the maximum signal obtained when CXCR4-RLuc is transfected alone. **B): CXCR4 expression of transfected and primary cells:** Relative CXCR4 expression in transiently transfected HEK293T cells (0.1  $\mu$ g CXCR4-Luc and 1  $\mu$ g CXCR4-YFP) and in activated peripheral mononuclear blood cells (PBMC) by flow cytometry using the anti-CXCR4-PE antibody.

**Fig 2.2. Ligand effect on CXCR4 homodimers expressed at physiological levels in HEK293T cells.** HEK293T cells were transiently transfected with 0,1  $\mu$ g of CXCR4-RLuc and different amounts ranging from 0,03 to 1  $\mu$ g (A) or 1  $\mu$ g (B) of CXCR4-YFP. **A):** Saturation-curves with and without ligands (700nM SDF-1 or 500nM TC14012). Saturation curves were obtained by plotting net BRET as a function of the [Acceptor]/[Donor] ratio (for more detail see methods section). As a control of specificity, CXCR4-RLuc BRET was also monitored with increasing quantities of GBR2-YFP in presence ( $\circ$ ) or absence ( $\diamond$ ) of 700nM SDF-1. Result represents one experiment out of 5 giving similar results. BRET<sub>50</sub> measured without ligand or in presence of SDF-1 or TC14012 are respectively 45,8 $\pm$ 3; 46 $\pm$ 4,7 and 57,2 $\pm$ 5,2. **B):** Dose-response of ligand induced change in CXCR4/CXCR4 homodimerisation BRET. 48 hours following transfections, cells were activated for 5 min at 37°C with increasing concentration of SDF-1, AMD3100, MCP-1 or TC14012 before BRET measurement. The inset compares the EC50s (in nM) found for SDF-1, TC14012 and AMD3100 in the presence or absence of 0.1% BSA used as carrier protein. The results represent the average  $\pm$  S.E.M. of four independent experiments done in duplicate. For all panels,  $\blacktriangle$ : SDF-1,  $\blacktriangledown$ : TC14012,  $\blacklozenge$ : AMD3100,  $\blacksquare$ : MCP-1,  $\bullet$ : no ligand.

**Fig 2.3. TC14012 and AMD3100 competition of SDF-1 $\alpha$  induced changes in CXCR4 homodimerisation BRET signal.** HEK293T cells were transfected with 0,1 $\mu$ g CXCR4-RLuc and a saturating quantity (1,0  $\mu$ g) of CXCR4-YFP plasmids. Ligands were added either alone (100 nM SDF-1, 500nM TC14012 or 2 $\mu$ M AMD3100 ), or 100nM SDF-1 was mixed with increasing quantities of TC14012 or AMD3100 . Results are the average of three independent experiments performed in duplicates.

**Fig 2.4. MCP-1 effect on CCR2 homodimers. A):** HEK293T cells were transfected with 0,1 $\mu$ g CCR2-RLuc and increasing quantities (from 0,01 to 1,0 $\mu$ g) of either CCR2-YFP (●;▲) or GBR2-YFP (○) vectors. Net BRET measured in presence (▲) or absence (●;○) of 200nM MCP-1 is plotted as a function of the [Acceptor]/[Donor] ratio as in Figure 2. BRET<sub>50</sub> measured for CCR2 homodimer in absence and presence of MCP-1 were respectively 84,2 $\pm$ 11,1 and 61,8 $\pm$ 5,8 . **B):** Cells transfected with 0,1 $\mu$ g CCR2-RLuc and a saturating excess (1,0  $\mu$ g) of CCR2-YFP plasmids were stimulated with 200nM MCP-1 or 200nM SDF-1. Results are the average of three independent experiments performed in triplicate.

**Fig 2.5. SDF-1, TC14012 and MCP-1 effects on CXCR4-CCR2 heterodimers.** HEK293T cells were transfected with 0,1 $\mu$ g of either CXCR4-RLuc or CCR2-RLuc and different amounts ranging from 0,03 to 1,0  $\mu$ g (A) or saturating excess (1,0  $\mu$ g)(B) of CCR2-YFP or CXCR4-YFP expression vectors. **A):** CCR2-RLuc/CXCR4-YFP and CXCR4-RLuc/CCR2-YFP saturation curves were obtained by plotting net BRET as a function of the [Acceptor]/[Donor] ratio as explained in material and methods. **B):** HEK293T cells transfected either with CXCR4-RLuc/CCR2-YFP (left panel) or CCR2-RLuc/CXCR4-YFP (right panel) were stimulated with either 200nM SDF-1 $\alpha$ , 500nM TC14012 or 200nM MCP-1 for 5 min at 37°C before BRET measurement.

**Fig 2.6. Effects of CXCR4 TM peptides on CXCR4 homodimers. A):** Saturation-curve of CXCR4 homodimers in the presence and absence of CXCR4 TM peptides.

Transiently transfected cells were incubated for 15min at 37°C in presence or absence of 10µM of CXCR4 TM 2, 4, 6 or 7 before BRET measurement. Longer peptide incubation times (1h to overnight) yielded identical results (not shown). **B)** Cells transfected with 0,1µg CXCR4-RLuc and saturating excess (1,0 µg) of CXCR4-YFP were incubated with 10µM of CXCR4 TMII, TMIV, TMVI or TMVII as in A) before being stimulated with 200nM SDF-1 or 100nM TC14012. Asteriks indicates signification of the difference between the TM treated condition and control condition (vehicle alone, black bar) with \*\*\*:  $p < 0,001$  \*\*:  $p < 0,01$  \*:  $p < 0,05$ . Absence of asterisk means that  $p > 0,05$ . **C)**: Cells transfected with 0,1µg CCR2-RLuc and saturating excess (1,0 µg) of CCR2-YFP were left untreated or were treated with 10µM of each CXCR4 TM peptides as in (B), but were activated with 200nM MCP-1. **D)**: HEK293T cells transfected with CXCR4-Luc and CXCR4-YFP were stimulated for 30min at 37°C with 20µM forskolin alone or 20µM forskolin plus 1nM SDF-1 in the presence of the vehicle (control) or 10µM of each CXCR4 TM peptides. The cAMP production was assessed by measuring the accumulation of [<sup>3</sup>H]-cAMP in cells pre-labelled with [<sup>3</sup>H]-adenine and expressed as % of the maximal SDF-mediated inhibition in the absence of peptide. Results are expressed as the mean ±S.E.M of 3–5 independent experiments carried out in triplicate.

**Fig 2.7. Effects of CXCR4 TM peptides on CCR2-CXCR4 heterodimers. A):** Saturation-curve of CCR2-CXCR4 heterodimers in the presence and absence of CXCR4 TM peptides. HEK293T cells transfected with 0,1 µg CCR2-Luc and increasing quantities of CXCR4-YFP were incubated for 15min at 37°C in presence or absence of 10µM of CXCR4 TMII, TMIV, TMVI or TMVII before BRET measurement. **B):** HEK293T cells transfected with 0,1 µg CCR2-RLuc and a saturating excess (1,0 µg) of CXCR4-YFP were treated with 10µM of each CXCR4 TM peptides and stimulated with either 200nM SDF-1, 100nM TC14012 or 200nM MCP-1. Results are expressed as the mean ±S.E.M of 5 independent experiments carried out in triplicate. Asteriks indicate statistical significance of the difference between the TM treated condition and control condition (vehicle alone, black bar) with \*\*\*:  $p < 0,001$  \*\*:  $p < 0,01$  \*:  $p < 0,05$ . Absence of asterisk means that  $p > 0,05$ .

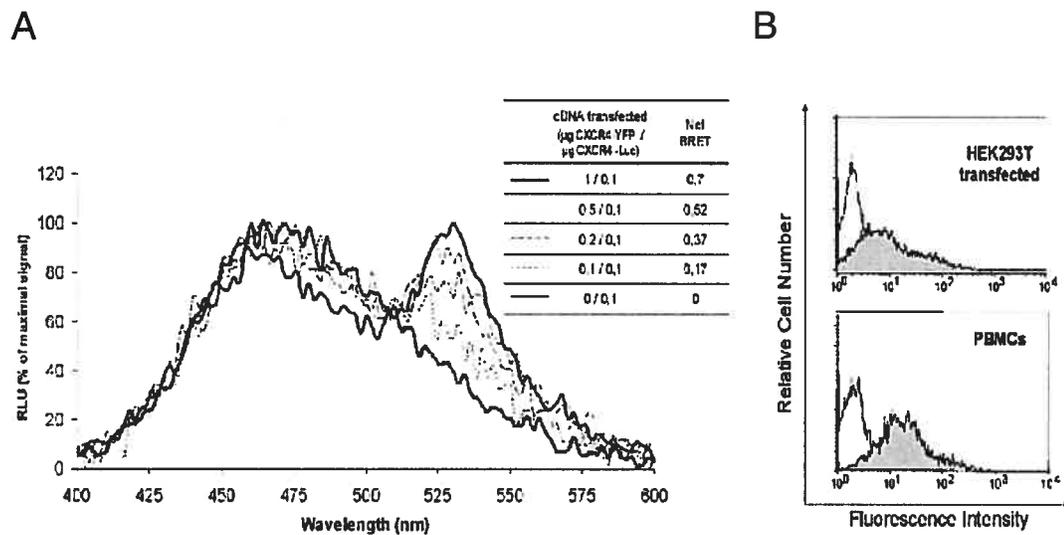


Figure 2.1

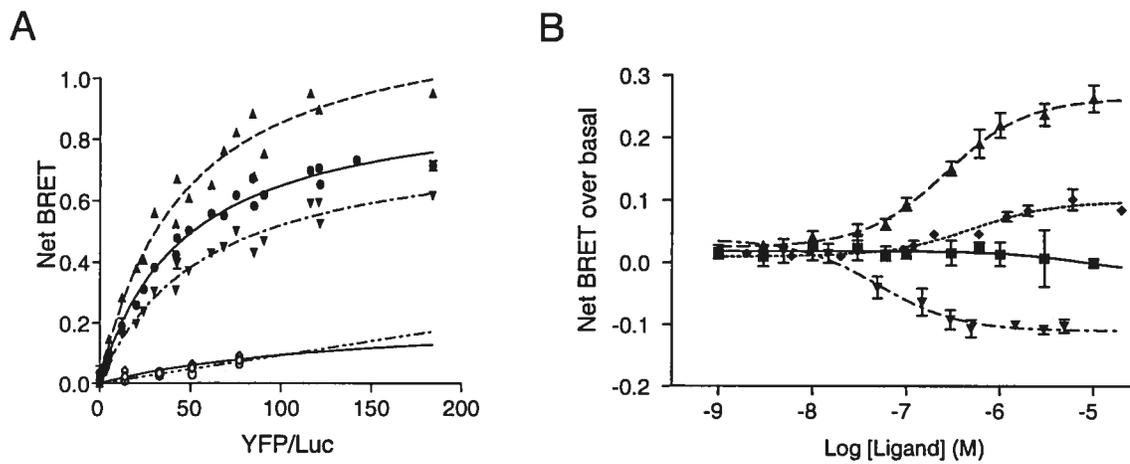


Figure 2.2

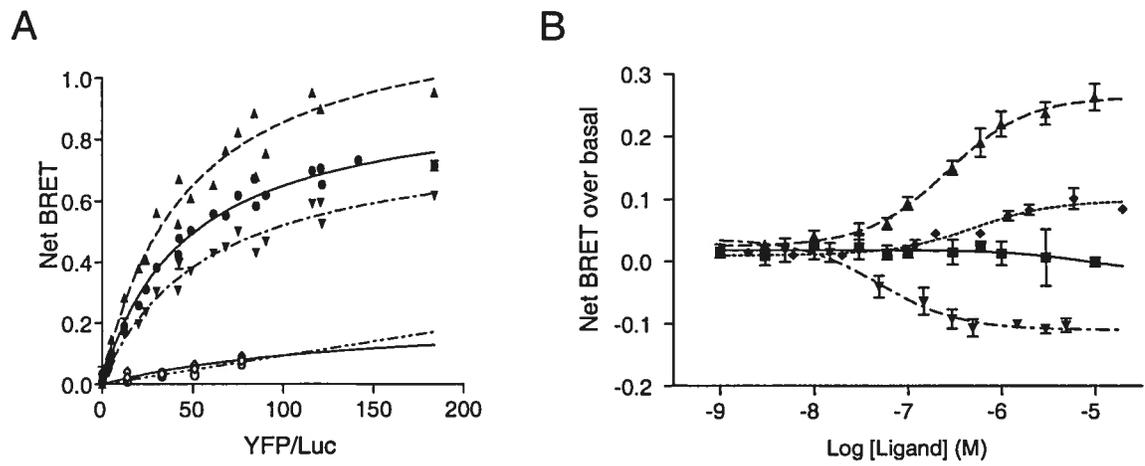


Figure 2.2

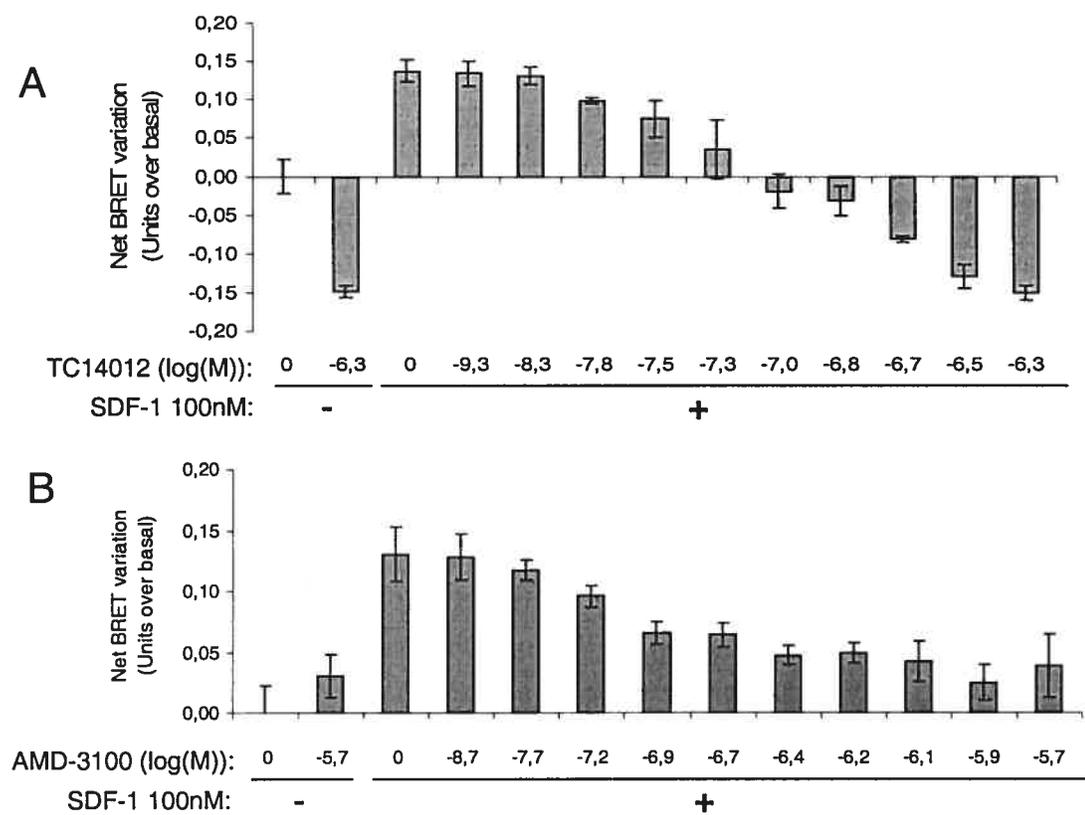


Figure 2.3

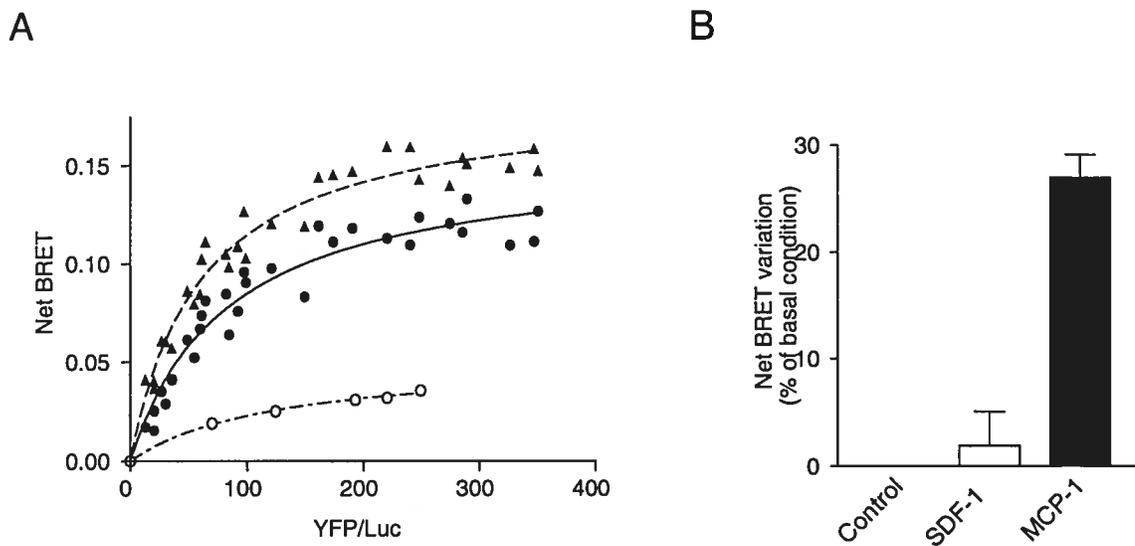


Figure 2.4

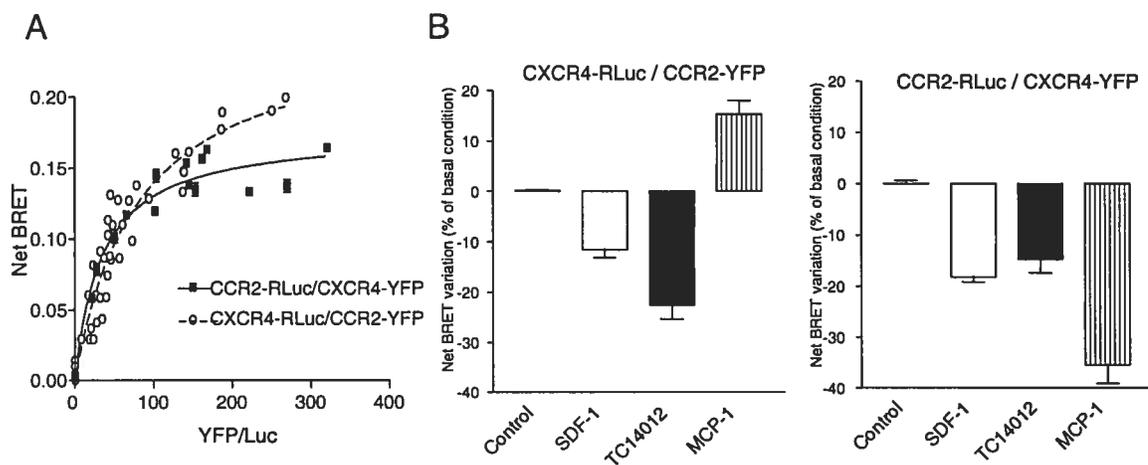


Figure 2.5

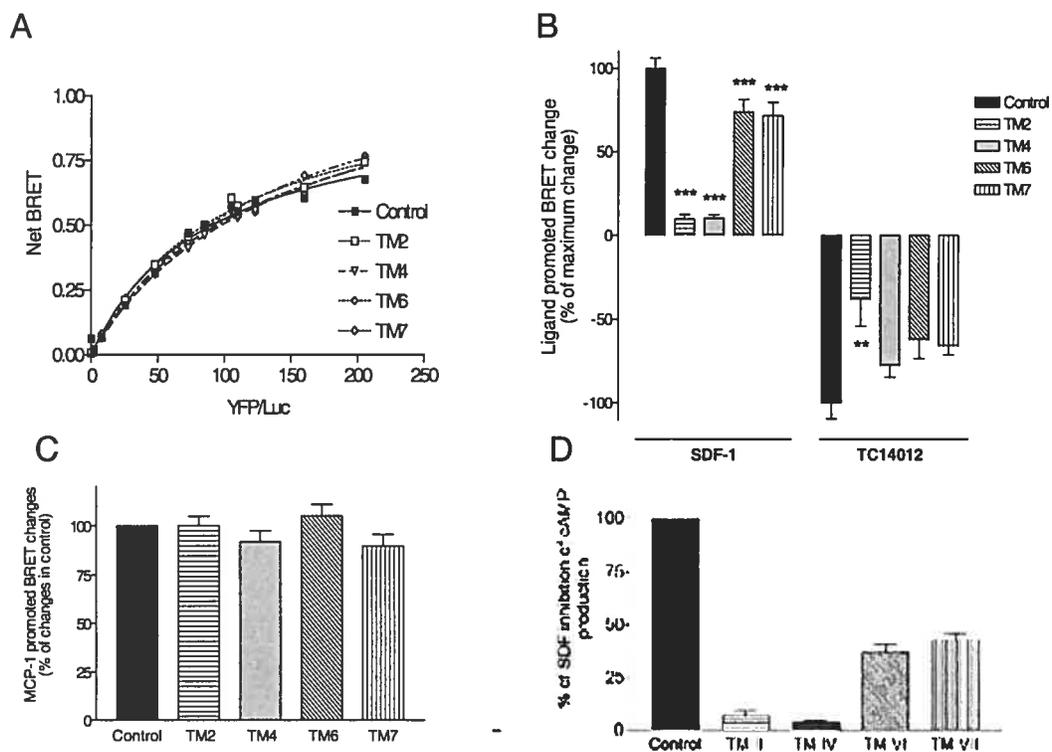


Figure 2.6

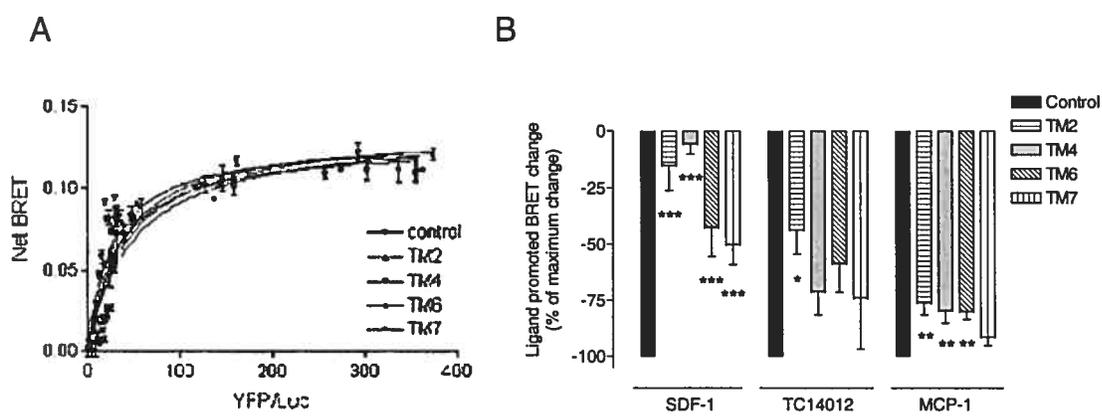


Figure 2.7

### **3. RÉSULTATS ADDITIONNELS**

La technique de transfert d'énergie par résonance de bioluminescence (BRET) est une méthode de choix pour étudier la conformation de dimères de récepteurs dans des cellules vivantes. Le BRET nous a permis de montrer que CXCR4 forme des homo- et hétérodimères constitutifs et que les ligands induisent des changements conformationnels différents qui résultent en des réponses de signalisation distinctes (208). Dans l'objectif d'en apprendre d'avantage sur la relation entre la conformation et la fonction du récepteur CXCR4 nous avons choisi de caractériser par BRET la conformation de récepteurs mutants dont la signalisation est altérée (capacité à inhiber la production d'AMPc). Nous avons introduit des mutations ponctuelles dans le motif DRY, présent dans la deuxième boucle intracellulaire de CXCR4, impliqué dans la transition conformationnelle du récepteur (50, 51, 53-58, 60, 62). Aussi, nous avons muté le résidu N119 présent dans le domaine TM3 de CXCR4 important dans l'activation suite à la liaison du ligand (64).

### 3.1 MATÉRIELS ET MÉTHODES:

#### 3.1.1 PLASMIDES, RÉACTIFS, CULTURE CELLULAIRE, TRANSFECTION, MESURES DE BRET ET PRODUCTION D'AMPC :

Les plasmides, les réactifs, les conditions de culture cellulaire, la méthode transfection, les mesures de BRET ainsi que la méthode de production d'AMPC utilisés afin de réaliser les expériences avec les mutants de CXCR4 correspondent à ceux utilisés dans l'article Percherancier et al. (208).

#### 3.1.2 MUTAGENÈSE DIRIGÉE :

Les mutants CXCR4 ont été obtenus par mutagenèse dirigée grâce à la méthode de Kunkel en utilisant les oligonucléotides de mutagenèse suivants : **D133N**, 5'ATC AGT CTG AAC CGG TAC CTG GCC ATC3', **R134A**, 5'ATC AGT CTA GAC GCC TAC CTG3'; **Y135A**, 5'CTG GAC CGC GCG CTG GCC ATC3'; **N119D**, 5'GAC ACT GTC GTA GAG GTC GAC TGT GTA GAT3'; **N119K**, 5'GAC ACT GCT GTA AAG CTT GAC TGT GTA GAT3'; **N119S**, 5'CAT CTA CAC AGT AAG CTT ATA CAG CAG3'.

#### 3.1.3 CYTOMÉTRIE DE FLUX :

Les cellules HEK293E transfectées sont détachées à l'aide d'une solution de PBS (phosphate-buffered saline) contenant 1mM EDTA 24 heures après transfection. **Marquage des récepteurs CXCR4 à la surface cellulaire** : Les cellules sont incubées pendant 45 minutes à 4°C dans du PBS contenant 2% de sérum de veau fœtal (SVF) en présence d'un anticorps anti-CXCR4 12G5 monoclonal conjugué à la phycoérythrine (Santa Cruz Biotechnology). Les cellules sont lavées 3 fois avec du PBS. **Marquage intracellulaire des récepteurs CXCR4** : Les cellules détachées en utilisant le PBS 2 mM EDTA sont incubées pendant 2 minutes à 4°C avec un tampon acide pH3 contenant 50mM de glycine et 120mM NaCl. Elles sont ensuite lavées 2 fois avec une solution PBS 2% SVF et incubées pendant 10 minutes à température de la pièce avec une solution PBS 2% SVF 0,05% saponine. Ce détergent perméabilise les membranes cellulaires (Sigma Aldrich). Le traitement avec la saponine est suivi d'une incubation avec l'anticorps anti-CXCR4 12G5 monoclonal conjugué à la

phycoérythrine. Enfin, les cellules sont lavées 3 fois avec la solution de PBS 2% SVF 0,05% saponine. L'expression à la surface et celle intracellulaire des récepteurs CXCR4 est quantifiée par cytométrie de flux en utilisant le FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences).

### **3.2 DESCRIPTION ET DISCUSSION DES RÉSULTATS ADDITIONNELS :**

#### **3.2.1 EXPRESSION DES MUTANTS DU RÉCEPTEUR CXCR4 :**

Étant donné l'importance du motif DRY dans la transition conformationnelle des RCPGs (50, 51, 53-58, 60, 62, 209) et du résidu N119 dans la fonction du récepteur CXCR4 (47, 64, 65) nous avons choisi de les muter. Les mutants du récepteur CXCR4 (**Figure 3.1**) ont été obtenus par mutagenèse dirigée en utilisant la méthode de Kunkel. Afin de quantifier leur expression cellulaire par cytométrie de flux, des cellules HEK293E ont été transfectées avec 0,1; 0,5 ou 2  $\mu\text{g}$  d'ADN du récepteur CXCR4 sauvage ou des mutants. Les récepteurs présents à la surface cellulaire sont marqués avec un anticorps anti-CXCR4 monoclonal couplé à un fluorophore (la phycoérythrine). Quant aux récepteurs présents intracellulairement, les membranes des cellules HEK293E transfectées sont perméabilisées avec la saponine, un détergent qui permet de former des brèches dans la membrane plasmique sans induire la lyse cellulaire. Suite à cette perméabilisation, les récepteurs CXCR4 et les mutants sont marqués avec l'anticorps anti-CXCR4 monoclonal couplé à la phycoérythrine. Leur expression cellulaire est déterminée par cytométrie de flux.

La figure 3.2A montre l'expression relative à la surface cellulaire de CXCR4 et des mutants. Ces derniers, sont détectables à la surface des cellules HEK293E transfectées et leurs densités sont comparables avec celle de CXCR4 sauvage lorsque 0,1 ; 0,5 ou 2  $\mu\text{g}$  d'ADN sont transfectés. Le fait d'augmenter la quantité d'ADN transfecté mène à l'augmentation de la densité des récepteurs à la surface cellulaire. Les phénotypes d'expression des mutants restent différenciables lorsque l'on augmente la quantité d'ADN transfecté dans les cellules, ce qui montre que les voies de traduction des protéines ou de transport à la surface cellulaire ne semblent pas être saturées.

La quantification de CXCR4 et des mutants présents dans les cellules a permis d'obtenir le ratio de l'expression relative surface/intracellulaire des récepteurs (**Figure 3.2B**). Le ratio de récepteurs surface/intracellulaire indique si un mutant est bien acheminé à la membrane plasmique ou s'il est constitutivement internalisé. La proportion des récepteurs présents à la surface cellulaire par rapport à celle intracellulaire est comparable entre CXCR4 et les mutants entre eux, ce qui suggère qu'ils ne seraient pas internalisés constitutivement. La proportion de récepteurs mutants-CXCR4 D133N, R134A et Y135A présents à la surface cellulaire est quelque peu inférieure à ce qui est détecté intracellulairement. Ces récepteurs pourraient être internalisés de façon plus importante que CXCR4 sauvage. Il est aussi possible que la mutation entraîne un mauvais acheminement du récepteur à la membrane plasmique. Dans le cas des récepteurs histamine H<sub>2</sub> (59),  $\alpha$ 2-adrénargique (57), muscarinique M1 (210) et le récepteur  $\alpha$ 1B-adrénargique (211), la mutation de l'acide aspartique du motif E/DRY donne lieu à des récepteurs dont l'expression à la membrane plasmique des cellules est inférieure par rapport au récepteur de type sauvage. En ce qui concerne le résidu arginine, le mutant R126N du récepteur de chimiokine CCR5 ne semble pas affecter son expression à la membrane plasmique (209). Par contre, les mutants R143A, R143E, R143H et R143N du récepteur  $\alpha$ 1B-adrénargiques sont moins présents à la membrane plasmique que le récepteur sauvage puisqu'ils sont constitutivement désensibilisés (60). Quant au résidu tyrosine du motif DRY, sa substitution par une phénylalanine dans le récepteur de chimiokine CCR2 donne lieu à un mutant Y139F dont seule la capacité à signaler est altérée (58). La substitution des résidu du motif DRY semble altérer l'expression à la membrane plasmique de bon nombre de récepteurs (57, 59, 210, 211) probablement à cause de l'importance de motif dans la stabilisation du récepteur (52). Cette stabilité serait altérée causant l'internalisation du récepteur ou son mauvais acheminement à la membrane plasmique.

### 3.2.3 ANALYSE BRET DES MUTANTS CXCR4 :

Nous avons montré la dimérisation constitutive à l'état basal du récepteur CXCR4 par BRET (208). En ce qui concerne les mutants CXCR4, nous avons étudié leur capacité à dimériser à l'état basal par BRET. Pour ce faire, une quantité constante de CXCR4 sauvage ou mutant-Rluc est co-transfectée avec respectivement une quantité

constante mais saturante de CXCR4 sauvage ou mutant-YFP. Les mesures de BRET sont effectuées suite à l'addition du substrat de la luciférase, la coelenterazine H. La figure 3.3 présente BRET net à l'état basal mesuré pour les différents mutants en comparaison avec celui de CXCR4 sauvage.

Le phénomène BRET semble avoir lieu dans le cas de tous les mutants CXCR4. La différence d'amplitude dans le signal BRET des mutants D133N et R134A, en comparaison avec le récepteur sauvage pourrait être due au fait que les mutants auraient différentes conformations à l'état basal (**Figure 3.3**). En se basant uniquement sur ces résultats préliminaires il est impossible d'affirmer avec certitude que les conformations de base de ces mutants sont réellement différentes de celle du récepteur sauvage et il est possible que ce que nous observons serait dû à une diminution du nombre de dimères. Afin de pouvoir comparer quantitativement les résultats BRET à l'état basal entre mutants et le récepteur de type sauvage, il est important que le ratio donneur-Rluc/accepteur-YFP soit un paramètre contrôlé. Il est impératif de vérifier que la luminescence et la fluorescence mesurées des protéines de fusion sont directement proportionnelles à la quantité des récepteurs (110). Les expériences visant à contrôler ces paramètres sont en cours.

#### 3.2.4 EFFET DES LIGANDS SUR LE SIGNAL BRET DES MUTANTS CXCR4 :

Dans le but d'approfondir la caractérisation des mutants, nous avons étudié l'effet de l'agoniste SDF-1 et de l'agoniste inverse TC14012 sur leur signal BRET. Nous avons co-transfecté les fusions-Rluc et YFP dans les mêmes conditions que lors de la mesure du BRET à l'état basal. Les cellules HEK293E transfectées sont stimulées avec un excès d'agoniste SDF-1 ou de l'agoniste inverse TC14012 suivie de la lecture BRET.

Le traitement avec SDF-1 semble induire des changements conformationnels menant à l'augmentation du signal BRET par rapport à l'état basal en ce qui concerne CXCR4 sauvage et les mutants, à l'exception de R134A et N119K. En ce qui concerne le mutant N119K, ce résultat semble corrélérer avec ceux obtenus par Zhang et al. lors la caractérisation de ce même mutant de CXCR4 (64). Ce groupe a montré que le mutant N119K est inapte à signaler même s'il est présent à la surface

cellulaire. Son affinité pour SDF-1 est comparable à celle du récepteur sauvage mais le traitement avec l'agoniste n'induit pas l'internalisation du mutant N119K (64). Il est possible que la conformation à l'état basal du mutant N119K soit figée et que l'interaction avec SDF-1 ne puisse pas induire les changements conformationnels nécessaires à l'activation du récepteur.

Quant à CXCR4 N119S, le traitement avec SDF-1 induit une diminution de BRET et suggère que le ligand stabilise une conformation éloignant le donneur et l'accepteur. Nous avons montré dans notre article (208) que le sens de la variation du BRET suite au traitement avec un ligand serait une caractéristique de la paire BRET considérée et qu'il est difficile d'envisager un lien direct entre le sens de la variation du BRET et l'efficacité de signalisation. En effet, ce mutant a été caractérisé par Zhang et al. (64) comme étant constitutivement actif tout en restant inductible suite au traitement avec l'agoniste.

Le traitement avec l'agoniste inverse TC14012 semble induire une diminution du signal BRET d'une amplitude semblable pour CXCR4 sauvage et les mutants à l'exception de CXCR4 R134A. Dans ce cas, aucune variation du signal BRET n'est observée suite au traitement avec les ligands SDF-1 et TC14012. Il est possible que ce mutant soit incapable de subir les changements conformationnels induits par les ligands. Une caractérisation approfondie est nécessaire étant donné que nous ne connaissons pas encore l'affinité de CXCR4 R134A ni celles des autres mutants DRY pour les différents ligands.

Le résidu arginine du motif E/DRY semble être important pour le couplage des RCPGs à la protéine G et la substitution de ce résidu donne lieu à des récepteurs dont la fonction est réduite ou abolie (60, 62, 212, 213). La mutation du résidu arginine au sein du récepteur histamine H2 donne lieu à un récepteur dont la capacité à signaler est réduite (59). Dans le cas du récepteur de la vasopressine V2, le mutant R137H est impliqué dans la perte d'eau des personnes atteintes de diabète néphrogénique insipide. Le mutant R137H a été caractérisé comme étant incapable de coupler à la protéine G $\alpha$ , il est constamment associé à la  $\beta$ -arrestine, ce qui rend le récepteur constitutivement désensibilisé (61). Wilbanks et al. ont montré que la substitution de l'arginine au sein des récepteurs  $\alpha$ 1B-adrénergique et de l'angiotensine II de type 1A

augmente l'affinité des récepteurs pour la  $\beta$ -arrestine et les récepteurs sont constitutivement désensibilisés (60). Dans le cas du récepteur de chimiokine CCR5, le mutant R126N possède une aussi grande affinité pour la  $\beta$ -arrestine. En ce qui concerne le récepteur CXCR4, la mutation du résidu arginine du motif E/DRY semble donner lieu à un récepteur qui ne peut pas changer de conformation suite à la stimulation avec SDF-1. Il est possible que nos observations soient dues au fait que la mutation change l'affinité du récepteur pour SDF-1.

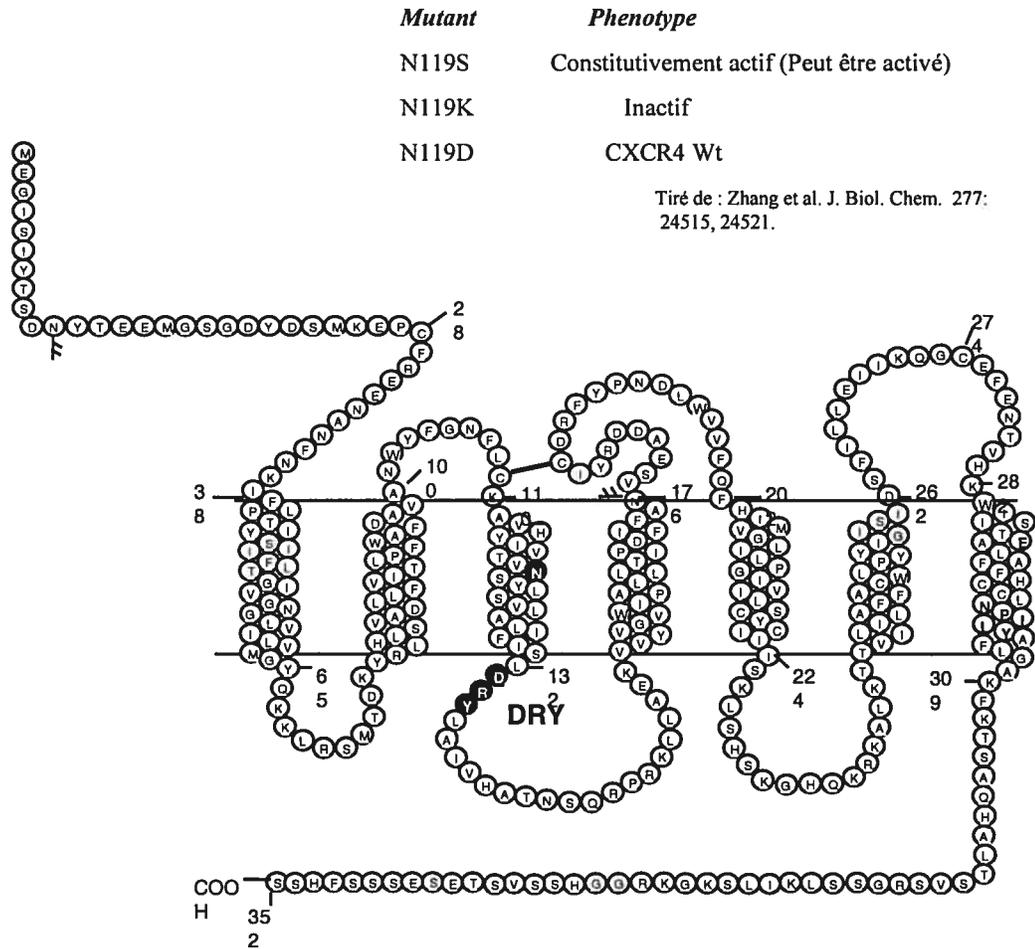
### 3.2.5 SIGNALISATION DES MUTANTS CXCR4 :

La concentration de SDF-1 permettant d'inhiber au maximum la production d'AMPc a été déterminée lors des expériences effectuées pour notre article (208). Nous avons mesuré l'inhibition de la production d'AMPc dans des cellules HEK293E, transfectées avec une quantité constante de CXCR4 sauvage, marquées avec de l'adénine [ $^3$ H]. Les cellules sont stimulées avec différentes concentrations de SDF-1 et les AMPc produits sont quantifiés (**Figure 3.5**). L'augmentation de la concentration de SDF-1 mène à l'inhibition de la production de l'AMPc. La courbe d'inhibition montre qu'à de petites concentrations telles que 1pM et 10pM de SDF-1 aucune inhibition de la production d'AMPc n'est observée. La concentration d'agoniste qui inhibe 50% de la production d'AMPc (IC<sub>50</sub>) est d'environ 1nM SDF-1 et l'effet maximal de l'agoniste est observée suite au traitement des cellules avec une concentration de 100nM SDF-1 (**Figure 3.5**). Nous avons aussi testé la capacité des fusions CXCR4-Rluc et CXCR4-YFP à inhiber la production de l'AMPc dans les mêmes conditions que CXCR4 de type sauvage. Nos résultats montrent que les fusions -Rluc et YFP n'altèrent pas la capacité de CXCR4 à inhiber la production d'AMPc suite au traitement avec SDF-1.

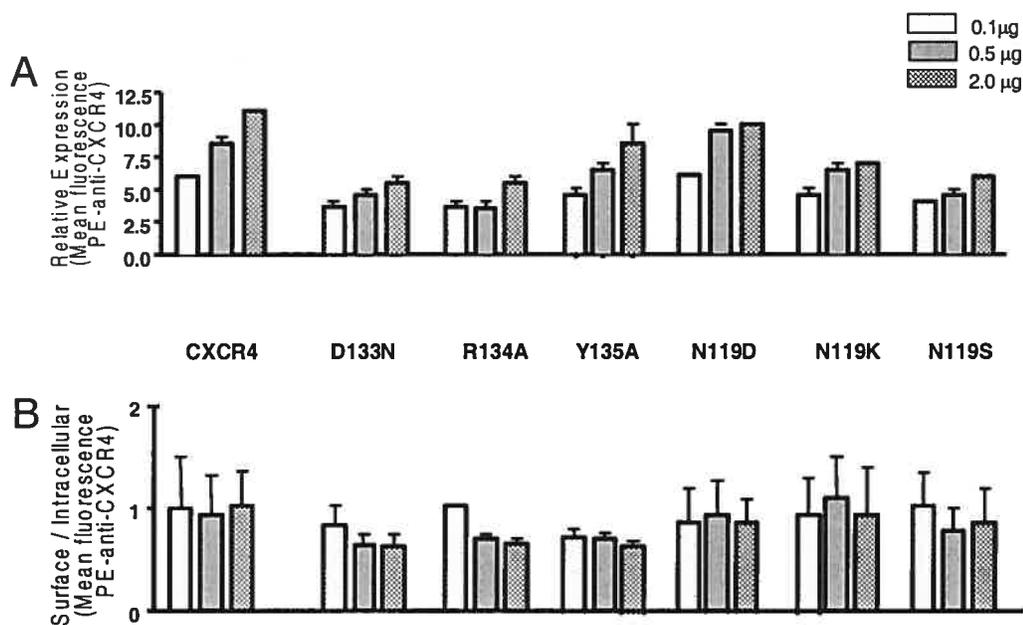
Nous avons étudié, la capacité des mutants à inhiber la production d'AMPc suite à la stimulation avec une concentration de 100nM de SDF-1. De façon semblable les cellules HEK293E sont transfectées avec des quantités constantes de CXCR4 sauvage ou mutants et marquées avec de l'adénine [ $^3$ H]. Suite à la stimulation des cellules avec une concentration saturante pour CXCR4 de type sauvage de SDF-1, l'AMPc produit est quantifié.

La capacité des mutants à inhiber la production d'AMPc suite au traitement avec l'agoniste semble être comparable à celle de CXCR4 sauvage à l'exception des mutants R134A et N119K. Ce résultat était attendu dans le cas du mutant N119K étant donné qu'il a été caractérisé comme étant incapable de signaler mais que son affinité pour le ligand est semblable à celle du récepteur de type sauvage (64). Le mutant CXCR4 R134A semble inhiber très faiblement la production d'AMPc suite à la stimulation avec l'agoniste. Une caractérisation plus approfondie de ce mutant ainsi que des autres mutants du motif DRY est nécessaire. Nous ne pouvons nous prononcer plus en détail quant à leurs capacités à inhiber la production d'AMPc, étant donné que nous n'avons pas encore à notre disposition les courbes d'inhibition de la production d'AMPc suite à la stimulation avec différentes concentrations de SDF-1. Nous ne savons pas si 100nM SDF-1 est une concentration saturante en agoniste puisqu'il est aussi possible que les mutations ont altéré l'efficacité et/ou la puissance de l'interaction avec SDF-1. Dans le cas des mutants N119D, N119K et N119S, Zhang et al. ont montré que les mutants lient SDF-1 avec des valeurs d'IC<sub>50</sub> semblables à celle du récepteur sauvage (64) et la concentration de 100nM SDF-1 utilisée dans nos expériences est saturante pour ces mutants.

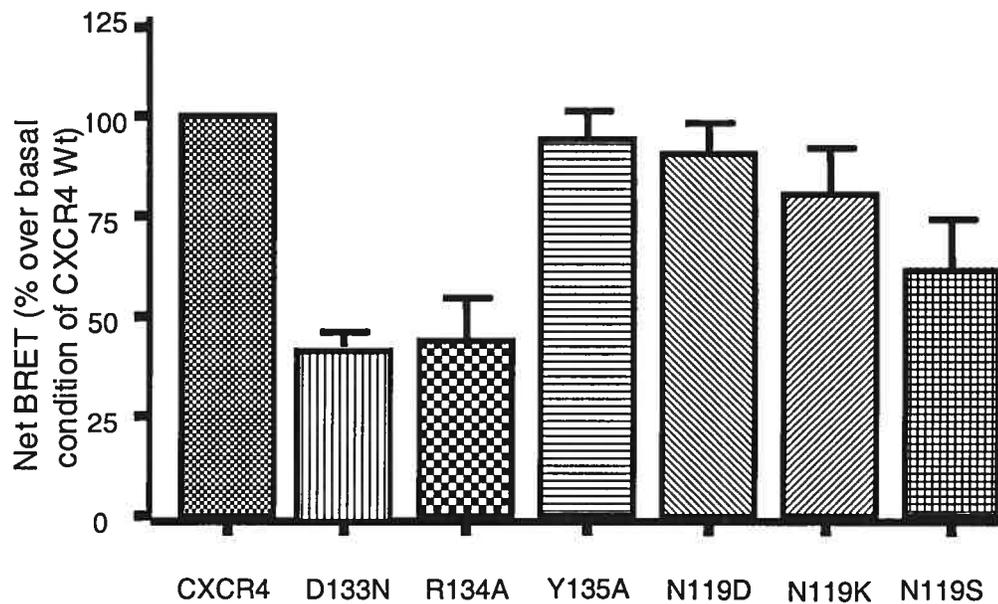
### 3.3 FIGURES ADDITIONNELLES



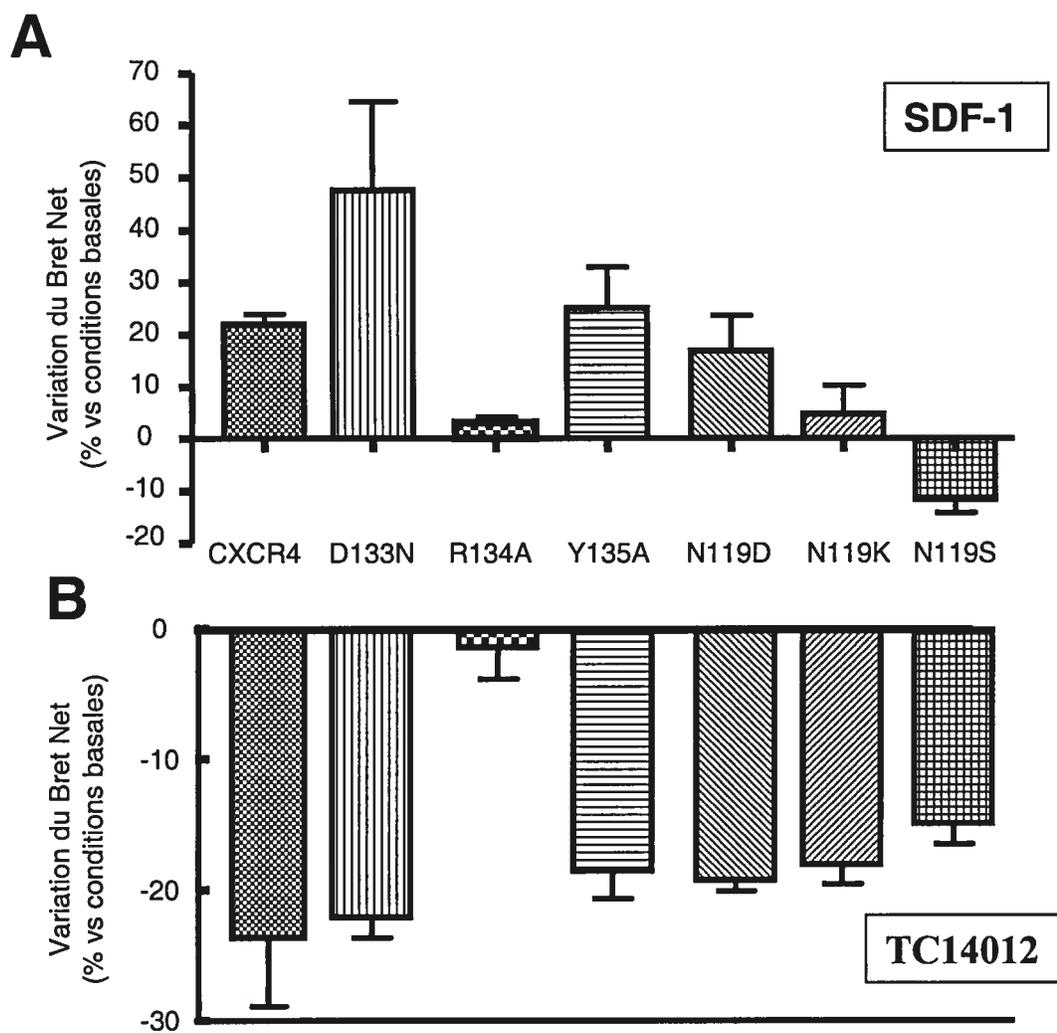
**Figure 3.1 : Représentation schématique du récepteur de chimiokine CXCR4.** Les acides aminés mutés dans la TM3 et dans le motif DRY présent dans la 2<sup>e</sup> boucle intracellulaire sont désignés en rouge. Le pont disulfure entre les boucles extracellulaires 1 et 2 est identifié. Adapté à partir de Brelot et al. J. Biol.Chem 275: 23736-23744



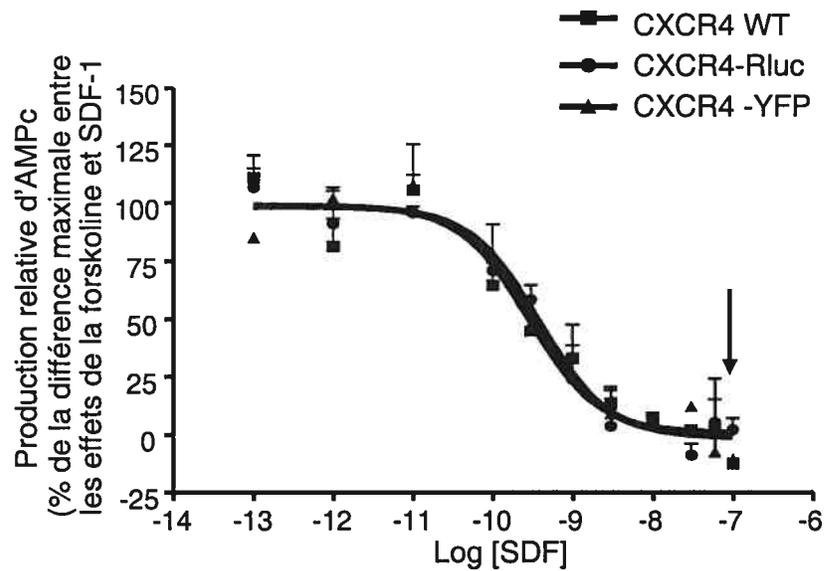
**Figure 3.2 : Expression des mutants du récepteur CXCR4.** Les cellules HEK293E ont été transfectées avec 0,1; 0,5 ou 2µg de CXCR4 sauvage ou mutant. L'expression de CXCR4 et des mutants (A) à la surface cellulaire a été déterminée suite au marquage des récepteurs avec un anticorps anti-CXCR4 PE. Le marquage des récepteurs intracellulaires a nécessité une perméabilisation des membranes plasmiques avec 0,05% saponine précédant le marquage avec l'anticorps anti-CXCR4 PE. La densité des récepteurs a été déterminé grâce à une analyse par cytométrie de flux. (B) Le ratio d'expression surface/intracellulaire est représenté.



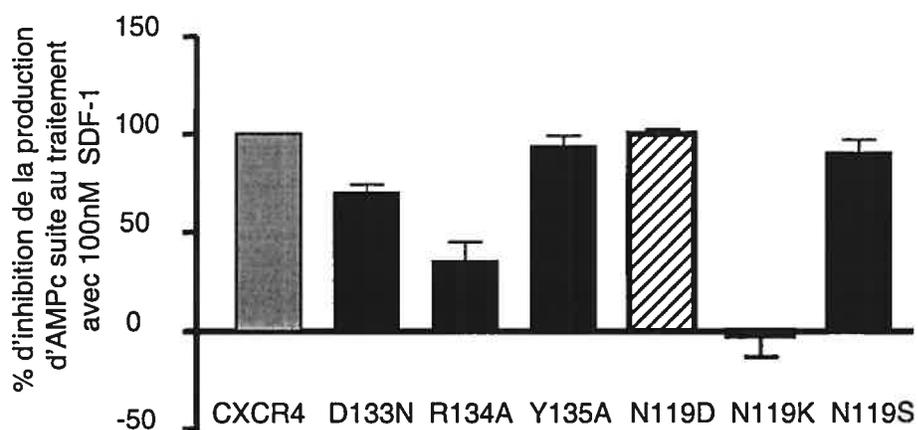
**Figure 3.3 : Analyse BRET des mutants CXCR4.** Des cellules HEK293E transfectées transitoirement avec 0,03  $\mu\text{g}$  de CXCR4 Wt-Rluc et un excès saturant (1 $\mu\text{g}$ ) de CXCR4 WT-YFP ou 0,01  $\mu\text{g}$  de CXCR4 mutant-Rluc et un excès saturant (1 $\mu\text{g}$ ) de CXCR4 mutant-YFP ont été utilisées pour les mesures de BRET. Les résultats représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes réalisées en duplicata. Le pourcentage de BRET Net pour chaque mutant en comparaison avec CXCR4 Wt à l'état basal est représenté.



**Figure 3.4 : Effet des ligands sur les mutants CXCR4.** Des cellules HEK293E transfectées de façon transitoire avec 0,03  $\mu\text{g}$  de CXCR4 Wt-Rluc et un excès saturant (1 $\mu\text{g}$ ) de CXCR4 WT-YFP ou avec 0,01  $\mu\text{g}$  de CXCR4 mutant-Rluc et un excès saturant (1 $\mu\text{g}$ ) de CXCR4 mutant-YFP ont été stimulés avec 200nM SDF-1 (A) ou 1 $\mu\text{M}$  TC14012 (B) pendant 5 min à 37°C précédant les mesures BRET. Les résultats représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes réalisées en duplicata.



**Figure 3.5 : Inhibition de la production d'AMPc par CXCR4.** Des cellules HEK293E transfectées de façon transitoire ont été stimulées pendant 30 min à 37 °C avec 20  $\mu$ M forskoline seule ou 20  $\mu$ M forskoline en présence de plusieurs concentrations de SDF-1. La production d'AMPc est déterminée en mesurant l'accumulation de [3H] AMPc dans des cellules pré-marquées avec [3H]adenine est exprimée en pourcentage de l'effet maximal d'inhibition de SDF-1 via CXCR4 Wt. La flèche indique la concentration saturante à laquelle il y a inhibition totale



**Figure 3.6 : Inhibition de la production d'AMPc par les mutants CXCR4.** Des cellules HEK293E transfectées de façon transitoire ont été stimulées pendant 30 min à 37 °C avec 20 µM forskoline seule ou 20 µM forskoline en présence de 100 nM SDF-1. La production d'AMPc est déterminée en mesurant l'accumulation de [<sup>3</sup>H]AMPc dans des cellules pré-marquées avec [<sup>3</sup>H]adénine est exprimée en pourcentage de l'effet maximal d'inhibition de SDF-1 de CXCR4 Wt.

## **4. DISCUSSION**

#### 4.1 HOMO- ET HÉTÉRODIMÉRISATION CONSTITUTIVE (LIGAND-INDÉPENDANTE) DE CXCR4 ET CCR2 :

Plusieurs études ont essayé de trouver réponse à la question si la dimérisation des RCPGs est induite par le ligand ou constitutive. Des équipes, dont Fernanz-Falcon et al. ont interprété les changements dans le signal de transfert d'énergie par résonance suite au traitement par le ligand comme étant une association ou une dissociation des protomères (112, 132, 214, 215). D'autres ont suggéré que le ligand induit des changements conformationnels au sein du dimère de récepteur pré-formé (115, 216, 217).

Nos résultats BRET montrent que les homodimères CXCR4 (**Figure 2.2**) sont constitutifs tout comme les homodimères CCR2 (**Figure 2.4**) ainsi que les hétérodimères CCR2/CXCR4 (**Figure 2.5**). Le signal BRET détecté en absence de ligand correspond à celui de la dimérisation ligand-indépendante des récepteurs d'intérêt et n'est pas le résultat de collisions aléatoires non spécifiques qui pourraient être causées par l'importante densité de récepteurs monomériques. Les courbes de titration BRET ont donné lieu à des courbes de saturation hyperbolique qui sont caractéristiques de celles obtenues dans le cas d'interactions protéine-protéine spécifiques (110) et aucun signal BRET n'a été observé entre CXCR4 ou CCR2 et le récepteur GABABR2 non apparenté. Les ligands de CCR2 et/ou CXCR4 ont induit une baisse ou une augmentation du signal BRET qui n'aurait pas eu lieu dans le cas d'un signal BRET non spécifique à l'état basal. Ces éléments viennent à l'appui de nos conclusions concernant les dimères constitutifs formés par CXCR4 et CCR2. Notamment, le niveau d'expression des récepteurs transfectés est comparable à celui observé dans les lymphocytes primaires, ce qui permet d'exclure le fait que la dimérisation observée à l'état basal soit causée par une densité trop importante des récepteurs transfectés (**Figure 2.1A**).

Les premières études de co-immunoprécipitation des récepteurs CXCR4 et CCR2 ont suggéré que les dimères sont induits suite au traitement avec leurs chimiokines respectives (99, 123, 206). Ces équipes ont utilisé la méthode de *crosslinking* avant la co-immunoprécipitation. Les résultats de ce groupe peuvent, à la lumière de nos

propres études, s'expliquer de la façon suivante : il est possible que la stimulation des dimères préformés avec leurs ligands induit des changements conformationnels qui augmentent la capacité de *crosslinking* ce qui favorise la détection des dimères par co-immunoprécipitation uniquement suite au traitement avec les ligands. Cela aurait mené à la conclusion des auteurs, selon laquelle la dimérisation des récepteurs étudiés serait ligand-dépendante (50). Le groupe de Mellado et al. a étudié la dimérisation du récepteur CCR5 par FRET et ils ont été dans l'incapacité de reproduire les résultats qu'ils ont obtenus par *crosslinking* suivi de l'immunoprécipitation de ce récepteur. En utilisant le FRET l'équipe a montré que la dimérisation de CCR5 était ligand-indépendante (97, 132).

Un variant naturel du récepteur CCR2 (CCR2V64I) a été associé au ralentissement de la progression du SIDA (218) même si ce récepteur n'est pas un co-récepteur à l'entrée du VIH-1 dans les cellules cibles. Des études ont montré que seul le mutant CCR2 mais pas le récepteur de type sauvage peut hétérodimériser avec CXCR4 (205, 206). Ces observations ont permis aux auteurs de suggérer que l'interaction de CCR2 V64I avec CXCR4 empêcherait le VIH-1 de se servir de CXCR4 comme co-récepteur lors de l'entrée virale (205, 206). Nos résultats BRET montrent que CXCR4 peut hétérodimériser avec CCR2 de type sauvage ou CCR2 V64I avec la même efficacité (**Figure 2.5**) (208).

#### **4.2 CHANGEMENTS CONFORMATIONNELS INDUITS DANS LES HOMO- ET HÉTÉRODIMÈRES CXCR4/CCR2 :**

Notre étude montre que suite au traitement avec les ligands, les variations observées dans le signal BRET des homo- et hétérodimères CXCR4 et CCR2 sont le résultat de changements conformationnels du dimère et non un changement dans le nombre de dimères de récepteurs (**Figure 2.2-2.4**).

Le BRET<sub>50</sub> correspond à la concentration d'accepteurs YFP donnant lieu à 50% du transfert d'énergie et reflète l'affinité relative des protomères les uns pour les autres. Les valeurs de BRET<sub>50</sub> obtenues à partir des courbes de saturation BRET des homo- et hétérodimères CXCR4 et CCR2 sont inchangées (**Figure 2.2-2.4**). Dans le cas où le traitement avec les ligands changerait le nombre de dimères, les valeurs de

BRET<sub>50</sub> seraient affectées aussi (110). En ce qui concerne les homo et hétérodimères CXCR4 et CCR2, les valeurs de BRET<sub>50</sub> déduites à partir des courbes de titration BRET ne varient pas en présence des agonistes SDF-1 et MCP-1 et de l'agoniste inverse TC14012 en comparaison avec le BRET<sub>50</sub> à l'état basal. Cela suggère que l'affinité des protomères les uns pour les autres n'est pas altérée par les ligands. Les variations du signal BRET maximal, observées suite aux traitements avec les ligands, ne seraient pas causées par un changement dans le nombre de dimères et pourraient être expliquées par les changements conformationnels des dimères. Ces changements conformationnels permettraient de varier la distance et/ou l'orientation du donneur et de l'accepteur affectant ainsi l'efficacité du transfert d'énergie.

Le fait que l'agoniste MCP-1 induit une augmentation de BRET pour la paire BRET CXCR4-Rluc/CCR2-YFP tandis qu'il induit une diminution du BRET sur la paire CCR2-Rluc/CXCR4-YFP montre aussi que les ligands induisent des changements conformationnels dans le dimère mais n'affectent pas le nombre de dimères (**Figure 2.5B**). Les expériences montrant que la variation du signal BRET induite par l'agoniste MCP-1 dépend de l'orientation des partenaires de BRET pour l'hétérodimère CXCR4 et CCR2 viennent à l'encontre de l'idée que les ligands ont la capacité de changer le nombre de dimères suggérant que les dimères sont constitutifs. Il est peu probable que l'orientation des fusions Rluc et YFP détermine à elles seules l'association ou la dissociation des dimères suite au traitement avec MCP-1. Le sens de la variation (augmentation ou diminution) du signal BRET serait une caractéristique des paires BRET considérées. L'orientation à l'état basal du donneur Rluc ou de l'accepteur YFP fusionnés à la partie C-terminale du récepteur CXCR4 ou CCR2 pourrait se traduire par des signaux de BRET différents suite à un même changement conformationnel induit par le ligand.

Des travaux effectués en utilisant les méthodes de transfert d'énergie par résonance comme le FRET et le BRET ont permis de montrer l'existence de dimères constitutifs de CXCR4 (114, 169, 219). L'effet de l'agoniste SDF-1 sur le signal du transfert d'énergie par résonance (RET) a été considéré dans deux études. Babock et al. ont observé une augmentation dans le signal RET suite au traitement avec SDF-1 mais cette variation était statistiquement non significative (169). Quant à Toth et al., ils ont observé une augmentation reproductible du signal RET suite au traitement des

dimères CXCR4 avec l'agoniste (219). Toutefois, ces études n'ont pas permis d'affirmer si l'augmentation du signal BRET était le résultat d'un changement conformationnel ou l'augmentation du nombre de dimères de CXCR4

#### 4.3 LES LIGANDS STABILISENT DIFFÉRENTES CONFORMATIONS DE RÉCEPTEUR :

Les résultats obtenus quant à l'ampleur des variations du signal BRET induit par l'agoniste inverse TC14012 ou l'agoniste partiel AMD3100 de l'homodimère CXCR4 diffèrent du modèle proposé par Trent et al. (220). Ces auteurs ont prédit que l'agoniste inverse TC14012, induirait des changements conformationnels mineurs tandis que l'effet de l'agoniste partiel AMD3100 sur la conformation de CXCR4 serait plus considérable. Toutefois, dans le modèle de Trent et al. c'est uniquement la forme monomérique du récepteur qui a été considérée. Il serait juste de proposer que la conformation moyenne du dimère détectée par BRET à l'état basal pourrait ressembler à celle stabilisée par l'AMD3100 en considérant l'étude ayant montré que CXCR4 possède un niveau d'activité constitutive à l'état basal qui n'est pas affectée par l'agoniste partiel AMD3100 mais peut être inhibé par le TC14012 (64). Cela suggère que l'AMD3100 n'induirait pas de changements conformationnels importants qui se traduit par une faible variation du signal BRET par rapport au signal à l'état basal. Par contre, la stabilisation d'une conformation inactive du dimère par le TC14012 se traduirait par un important changement dans le signal BRET, ce qui coïncide avec nos observations dans les cellules vivantes.

Les divers ligands ont un effet différent sur les homodimères CXCR4 et CCR2 (**Figure 2.2-2.4**). Les agonistes donnent lieu à une augmentation du signal BRET tandis que l'agoniste inverse le diminue. Ces effets sur le BRET correspondent à l'efficacité intrinsèque des ligands, ce qui suggère que le sens de la variation du signal BRET pourrait refléter les changements conformationnels spécifiques aux dimères tout en étant directement lié à l'efficacité de signalisation. Les résultats obtenus dans le cas de l'hétérodimère CXCR4/CCR2 montrent que l'agoniste MCP-1 donne lieu à une augmentation du signal BRET dans le cas de la paire BRET CXCR4-Rluc/CCR2-YFP et à une diminution dans le cas de la paire CCR2-Rluc/CXCR4-YFP. Cela rend difficile d'envisager un lien direct entre le sens de la variation du signal BRET et l'efficacité de signalisation. Le sens de la variation du

signal BRET, induite par le ligand, dépendrait des contraintes structurales de la partie C-terminale des protomères, un paramètre qui varie d'un système BRET à un autre. Ainsi, les variations de BRET pourraient refléter différentes conformations stabilisées par des ligands mais ne peuvent être reliées à l'efficacité intrinsèque des ligands.

#### **4.4 EFFET DES PEPTIDES TM CXCR4 SUR L'HOMO- ET L'HÉTÉRODIMÈRE CXCR4/CCR2 :**

Une étude a montré que des peptides correspondant aux domaines TM de CXCR4 s'associent au récepteur et bloquent sa signalisation ainsi que sa fonction de co-récepteur à l'entrée du VIH dans les cellules cibles (131). Aussi, l'étude de Hébert et al. suggère que la fonction du récepteur  $\beta$ 2-adrénérique est affectée en présence d'un peptide TM6  $\beta$ 2-adrénérique puisqu'il interfère avec la dimérisation du récepteur (13). À cet effet, nous avons voulu déterminer si l'effet des peptides TM CXCR4 résulterait de la dissociation de l'homodimère constitutif.

Le lien direct entre le sens de la variation du signal BRET induit par les ligands et leur efficacité intrinsèque n'a pas pu être établi. Nos résultats obtenus en utilisant des peptides dérivés des domaines TM de CXCR4 suggèrent que les changements conformationnels détectés dans notre système sont directement reliés à l'activité du récepteur (**Figure 2.6-2.7**). Nous pensions que les peptides développés par Tarasova et al. (131) pourraient interagir avec les protomères au sein du dimère, interférer avec la dimérisation et inhiber l'activité des récepteurs.

Les peptides TM CXCR4 n'ont eu aucun effet détectable sur le BRET à l'état basal, suggérant qu'ils n'ont pas inhibé la dimérisation et n'ont pas causé la distorsion des protomères dans leur conformation basale. Par contre, les peptides bloquent l'augmentation du signal BRET induit par SDF-1, indiquant qu'ils empêchent le changement conformationnel du dimère induit par le ligand. Notamment, l'efficacité des peptides à bloquer le changement conformationnel du dimère CXCR4 est comparable à leur efficacité à bloquer l'inhibition de l'activité adénylate cyclase induite par SDF-1. Nos résultats suggèrent que les peptides stabilisent la conformation initiale du dimère et empêchent les changements conformationnels

induits par les ligands étant donné qu'ils n'interfèrent pas avec la liaison de ces derniers. Notamment, ces peptides ont une activité anti-VIH (131) et l'interprétation de nos résultats quant à leur mode d'action a d'importantes implications dans le rôle de CXCR4 dans l'entrée du VIH dans les cellules cibles. Les peptides pourraient bloquer les changements conformationnels essentiels du récepteur induit par l'enveloppe et nécessaires à l'entrée virale.

Le mode d'action de peptides TM utilisés dans plusieurs études ainsi que leurs effets sur la dimérisation des RCPGs soulève des questions. Il a été suggéré que de tels peptides interfèrent dans la formation des dimères (131, 132) et il a aussi été proposé que de tels peptides interfèrent avec l'assemblage des domaines TM induisant la distorsion du récepteur (207).

Tarasova et al. ont supposé que l'ajout d'un peptide correspondant à un TM d'un RCPG aurait un effet sur la fonction du récepteur puisqu'il interfère dans l'association adéquate des domaines TM (131). Cette équipe a donc montré que les peptides TM inhibent la mobilisation de calcium intracellulaire induite par l'agoniste SDF-1 en plus d'inhiber l'activité co-récepteur de CXCR4 à l'entrée du VIH-1 dans les cellules cibles. Les auteurs proposent que cet effet des peptides est causé par leur compétition pour l'interaction avec les domaines transmembranaires du récepteur et dans le cas d'un excès de peptides la majorité des récepteurs sont inactifs étant donné que les domaines transmembranaires n'interagissent pas ensemble mais plutôt avec les peptides TM (131). Dans les expériences de Hébert et al. (13) un peptide a été montré comme étant capable d'interrompre la dimérisation et de ce fait la signalisation du récepteur  $\beta_2$ -adrénergique supportant l'idée que les domaines TM pourraient jouer un rôle important dans la dimérisation d'autres RCPGs (222, 223).

Notamment, Hernanz-Falcon et al. ont montré que le double mutant I52V/V150A CCR5 dont les résidus mutés sont situés dans les domaines TM 1 et TM 4 du récepteur est non fonctionnel. Le double mutant ne peut signaler suite à la stimulation avec l'agoniste CCL5 et ces mutations mènent à l'interruption de la dimérisation du récepteur CCR5. Cette équipe a montré que le traitement des récepteurs CCR5 sauvage avec des peptides correspondants aux domaines TM1 et TM4 dont les résidus I52V/V150A sont mutés affecte la dimérisation et la fonction

du récepteur CCR5 (132). Ces résultats suggèrent que les domaines TM sont importants pour la dimérisation des récepteurs. Les peptides TM semblent interrompre l'interaction entre les protomères CCR5 ce qui affecte aussi la capacité des récepteurs à signaler suite à la stimulation avec leur chimiokine. Nous montrons que les peptides TM CXCR4 n'affectent pas le BRET à l'état basal ce qui suggère qu'ils n'agissent pas en interrompant la dimérisation et qu'ils ne causent pas de distorsion majeure dans la conformation initiale des dimères. Nos résultats suggèrent que les peptides stabilisent la conformation basale des récepteurs et empêchent les changements conformationnels induits pas les ligands (208).

#### 4.5 CARACTÉRISATION DES MUTANTS CXCR4 :

Nous montrons que le récepteur CXCR4 forme des homodimères constitutifs (208). L'utilisation des peptides TM a permis de montrer que ces derniers ne causent pas la dissociation du dimère mais ils agissent plutôt en inhibant les changements conformationnels induits par l'agoniste au sein du dimère de récepteurs. Ces mouvements des protomères semblent nécessaires à l'activation de la signalisation suite au traitement avec l'agoniste (208). Afin d'en apprendre d'avantage sur l'effet de la structure sur la fonction du récepteur CXCR4, nous avons choisi de muter le motif DRY présent dans sa deuxième boucle intracellulaire. Ce motif conservé est important dans le maintien de la conformation inactive des RCPGs et lors de leur activation suite au traitement avec l'agoniste (50, 51, 53-58, 60, 62, 224). Notamment, nous avons aussi muté le résidu N119 présent dans le domaine TM3 de CXCR4 parce qu'il serait important dans les changements conformationnels permettant au récepteur d'interagir avec la protéine  $G\alpha$  (64). La caractérisation de ces mutants devrait nous permettre d'apprendre d'avantage sur l'importance de ces résidus pour la fonction du CXCR4 dont l'importance physiologique est considérable.

Nous avons étudié la conformation des mutants CXCR4 par BRET. En comparaison avec le récepteur de type sauvage, les mutations introduites semblent affecter la conformation du récepteur à l'état basal (sans stimulation avec le ligand). La stimulation des mutants avec l'agoniste SDF-1, induit un changement conformationnel tel que le transfert d'énergie entre la luciférase et la YFP est

augmenté dans le cas de tous les mutants à l'exception de CXCR4 R134A et N119K. Le transfert d'énergie entre les fluorophores est diminué dans le cas du mutant N119S après le traitement avec SDF-1. Ces variations dans le transfert d'énergie suite au traitement avec l'agoniste suggèrent que les récepteurs adoptent des conformations variées par rapport au récepteur de type sauvage. Par contre, le traitement des récepteurs avec l'agoniste inverse TC14012 mène à la diminution du signal BRET dans le cas du récepteur sauvage et des mutants à l'exception de CXCR4 R134A. Ainsi, le traitement avec SDF-1 induirait des changements conformationnels variés d'un mutant à un autre, tandis que l'effet du TC14012 mènerait à des changements dans la conformation de tous les récepteurs en diminuant le transfert d'énergie. Les changements conformationnels observés par BRET semblent se refléter dans les variations de l'activité des mutants, ce qui suggère l'existence de plusieurs conformations du récepteur en accord avec ce qui a été constaté dans le cas de plusieurs RCPGs (6, 221).

Le motif DRY présent au sein des RCPGs (50, 51, 53-58, 60, 62) et le résidu asparagine du domaine TM3 des récepteurs de chimiokines (64) sont importants pour la fonction des récepteurs. Le récepteur CXCR4 est indispensable lors de processus physiologiques comme l'embryogénèse, la maturation et le déploiement des cellules du système immunitaire (176-178). Ce récepteur de chimiokine joue aussi un rôle important dans plusieurs pathologies comme la propagation des métastases dans les cancers épithéliaux et l'entrée du VIH dans les cellules cibles (133). La caractérisation de ces mutants permettra de déterminer leur effet sur la structure et leur importance pour la fonction de CXCR4.

L'affinité des ligands pour les mutants du motif DRY sont à évaluer. Les expériences permettant de tracer les courbes d'inhibition de la production d'AMPc suite au traitement des mutants avec différentes concentrations d'agoniste sont en cours. Ces courbes permettront de déterminer les IC<sub>50</sub> des mutants qui reflètent leur activité et donc leur capacité à inhiber la production d'AMPc. En ce qui concerne les expériences de BRET, il est nécessaire de confirmer que la luminescence et la fluorescence des fusions mesurées sont directement proportionnelles à la quantité des récepteurs (110). Aussi, il serait intéressant de tracer les courbes de saturation BRET

pour les mutants CXCR4 ce qui permettrait d'évaluer leurs BRET50 qui témoigne de l'affinité des protomères les uns pour les autres.

Sachant que la stimulation de CXCR4 permet d'activer plusieurs voies de signalisation menant à diverses réponses cellulaires comme le chimiotactisme et la transcription de gènes cibles (99,161, 163, 193), nous aimerions déterminer si l'adoption d'une conformation particulière favoriserait une réponse cellulaire par rapport à une autre. Ainsi, nous voulons déterminer par BRET l'effet des mutations sur le couplage des récepteurs aux protéines G. La capacité des récepteurs à induire l'échange du GDP pour le GTP au sein de la protéine G servant à son activation sera évalué grâce à des expériences de liaison au [<sup>35</sup>S]GTPγS. Notamment, nous allons étudier par immunobuvardage de type western, la capacité des mutants CXCR4 à activer la voie de signalisation des MAPK suite à leur stimulation avec l'agoniste. L'aptitude des mutants à induire la transcription du gène rapporteur luciférase via l'activation du facteur de transcription Elk-1 ainsi que leur capacité à stimuler le mouvement dirigé des cellules (chimiotactisme) en présence de concentrations croissantes d'agoniste sera aussi estimé.

Il a été suggéré que les récepteurs possèdent uniquement une conformation inactive et que la liaison du ligand permettrait au récepteur d'adopter sa conformation active ce qui mène à l'enclenchement de la signalisation (6, 221). Toutefois, les expériences ainsi que les considérations théoriques qui en résultent ont permis d'envisager l'existence de plusieurs conformations dont certaines peuvent être considérées comme étant actives (6, 221). La technique de spectroscopie de fluorescence a permis, grâce à une molécule fluorescence liée de façon covalente au récepteur β2-adrénérique, de montrer l'existence temporaire de plusieurs conformations du récepteur. Les ligands utilisés induiraient, quant à eux, différentes conformations du récepteur (6, 221). Aussi, l'activité constitutive de certains RCPGSs acquise suite à l'introduction de mutations appuie l'idée qu'il existe plusieurs conformations de récepteurs (38). Ces résultats suggèrent que les récepteurs possèdent différentes conformations actives qui peuvent être ligand-sélectives. L'existence de telles conformations permettrait d'envisager le développement de drogues qui modifieraient sélectivement certaines fonctions du récepteur (6, 221). Étant donné l'importance du récepteur CXCR4 dans l'entrée du VIH-1 dans les cellules cibles, la

mise au point d'antagonistes non-compétitifs permettant d'empêcher le changement conformationnel induit par la liaison du virus constituerait un moyen de stopper l'entrée virale.

## 5. CONCLUSION :

Le BRET (*Bioluminescence Resonance Energy Transfer*) est une technique de choix pour étudier la dimérisation dans les cellules vivantes. Grâce à cette méthode, nous montrons que les récepteurs CXCR4 et CCR2 forment des homo- et hétérodimères de façon constitutive. Les ligands induisent des changements conformationnels au sein des dimères sans promouvoir l'association ou la dissociation des protomères. Les variations de BRET semblent refléter différentes conformations stabilisées par des ligands distincts. En utilisant des peptides dérivés des domaines transmembranaires (TM) de CXCR4, qui peuvent bloquer de façon non compétitive la fonction du récepteur, nous montrons que les changements conformationnels du dimère induits par le ligand sont étroitement liés avec la fonction du récepteur. En effet, ces peptides empêchent les changements conformationnels induits par les ligands au sein du dimère ce qui affecte la fonction des récepteurs (208).

Les mutants de CXCR4 ont été générés dans l'objectif d'en apprendre davantage sur la relation entre la structure et la fonction du récepteur CXCR4 qui est impliqué dans des pathologies telles que l'arthrite rhumatoïde (133), l'asthme (225) et l'entrée du VIH dans les cellules cibles (206). Les résultats préliminaires obtenus grâce au BRET, suggèrent que les différents ligands, induisent des changements conformationnels distincts d'un mutant à un autre. Aussi, il semble y avoir une corrélation entre le signal BRET mesuré et la capacité des mutants à signaler suite à la stimulation avec l'agoniste. Ainsi, différentes conformations du récepteur donneraient lieu à des activités distinctes.

## **6.BIBLIOGRAPHIE**

1. Flower DR: "Modelling G-protein-coupled receptors for drug design". *Biochim Biophys Acta* 1999, 1422:207-234.
2. Muller G: "Towards 3D structures of G protein-coupled receptors: a multidisciplinary approach". *Curr Med Chem* 2000, 7:861-888.
3. Gether U: "Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors". *Endocr Rev* 2000, 21:90-113.
4. Lin SH, Civelli O: "Orphan G protein-coupled receptors: targets for new therapeutic interventions". *Ann Med* 2004, 36:204-214.
5. Wess J: "Molecular basis of receptor/G-protein-coupling selectivity". *Pharmacol Ther* 1998, 80:231-264.
6. Vauquelin G, Van Liefde I: "G protein-coupled receptors: a count of 1001 conformations". *Fundam Clin Pharmacol* 2005, 19:45-56.
7. Hermans E: "Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors". *Pharmacol Ther* 2003, 99:25-44.
8. George SR, O'Dowd BF, Lee SP: "G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery". *Nat Rev Drug Discov* 2002, 1:808-820.
9. Farrens DL, Altenbach C, Yang K, Hubbell WL, Khorana HG: "Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin". *Science* 1996, 274:768-770.
10. Sheikh SP, Zvyaga TA, Lichtarge O, Sakmar TP, Bourne HR: "Rhodopsin activation blocked by metal-ion-binding sites linking transmembrane helices C and F". *Nature* 1996, 383:347-350.
11. Suryanarayana S, von Zastrow M, Kobilka BK: "Identification of intramolecular interactions in adrenergic receptors". *J Biol Chem* 1992, 267:21991-21994.
12. Williams NG, Zhong H, Minneman KP: "Differential coupling of alpha1-, alpha2-, and beta-adrenergic receptors to mitogen-activated protein kinase pathways and differentiation in transfected PC12 cells". *J Biol Chem* 1998, 273:24624-24632.
13. 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, 271:16384-16392.
14. Luttrell LM, Ferguson SS, Daaka Y, Miller WE, Maudsley S, Della Rocca GJ, Lin F, Kawakatsu H, Owada K, Luttrell DK, Caron MG, Lefkowitz RJ: "Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes". *Science* 1999, 283:655-661.
15. Bockaert J, Pin JP: "Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success". *Embo J* 1999, 18:1723-1729.
16. Hall RA, Premont RT, Lefkowitz RJ: "Heptahelical receptor signaling: beyond the G protein paradigm". *J Cell Biol* 1999, 145:927-932.
17. Heuss C, Scanziani M, Gahwiler BH, Gerber U: "G-protein-independent signaling mediated by metabotropic glutamate receptors". *Nat Neurosci* 1999, 2:1070-1077.
18. Hur EM, Kim KT: "G protein-coupled receptor signalling and cross-talk: achieving rapidity and specificity". *Cell Signal* 2002, 14:397-405.
19. Downes GB, Gautam N: "The G protein subunit gene families". *Genomics* 1999, 62:544-552.
20. Hildebrandt JD: "Role of subunit diversity in signaling by heterotrimeric G proteins". *Biochem Pharmacol* 1997, 54:325-339.
21. Morris AJ, Malbon CC: "Physiological regulation of G protein-linked signaling". *Physiol Rev* 1999, 79:1373-1430.
22. Gautam N, Downes GB, Yan K, Kisselev O: "The G-protein betagamma complex". *Cell Signal* 1998, 10:447-455.

23. Vanderbeld B, Kelly GM: "New thoughts on the role of the beta-gamma subunit in G-protein signal transduction". *Biochem Cell Biol* 2000, 78:537-550.
24. Hamm HE: "The many faces of G protein signaling". *J Biol Chem* 1998, 273:669-672.
25. Eason MG, Kurose H, Holt BD, Raymond JR, Liggett SB: "Simultaneous coupling of alpha 2-adrenergic receptors to two G-proteins with opposing effects. Subtype-selective coupling of alpha 2C10, alpha 2C4, and alpha 2C2 adrenergic receptors to Gi and Gs". *J Biol Chem* 1992, 267:15795-15801.
26. Kilts JD, Gerhardt MA, Richardson MD, Sreeram G, Mackensen GB, Grocott HP, White WD, Davis RD, Newman MF, Reves JG, Schwinn DA, Kwatra MM: "Beta(2)-adrenergic and several other G protein-coupled receptors in human atrial membranes activate both G(s) and G(i)". *Circ Res* 2000, 87:705-709.
27. Kenakin T: "The classification of seven transmembrane receptors in recombinant expression systems". *Pharmacol Rev* 1996, 48:413-463.
28. Neubig RR, Spedding M, Kenakin T, Christopoulos A: "International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology". *Pharmacol Rev* 2003, 55:597-606.
29. "The state of GPCR research in 2004". *Nat Rev Drug Discov* 2004, 3:575, 577-626.
30. Sheikh SP, Vilardarga JP, Baranski TJ, Lichtarge O, Iiri T, Meng EC, Nissenson RA, Bourne HR: "Similar structures and shared switch mechanisms of the beta2-adrenoceptor and the parathyroid hormone receptor. Zn(II) bridges between helices III and VI block activation". *J Biol Chem* 1999, 274:17033-17041.
31. Hulme EC, Lu ZL, Ward SD, Allman K, Curtis CA: "The conformational switch in 7-transmembrane receptors: the muscarinic receptor paradigm". *Eur J Pharmacol* 1999, 375:247-260.
32. De Lean A, Stadel JM, Lefkowitz RJ: "A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptor". *J Biol Chem* 1980, 255:7108-7117.
33. Samama P, Cotecchia S, Costa T, Lefkowitz RJ: "A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model". *J Biol Chem* 1993, 268:4625-4636.
34. Parnot C, Miserey-Lenkei S, Bardin S, Corvol P, Clauser E: "Lessons from constitutively active mutants of G protein-coupled receptors". *Trends Endocrinol Metab* 2002, 13:336-343.
35. Weiss JM, Morgan PH, Lutz MW, Kenakin TP: "The cubic ternary complex receptor-occupancy model. III. resurrecting efficacy". *J Theor Biol* 1996, 181:381-397.
36. Milligan G: "Constitutive activity and inverse agonists of G protein-coupled receptors: a current perspective". *Mol Pharmacol* 2003, 64:1271-1276.
37. Parnot C, Bardin S, Miserey-Lenkei S, Guedin D, Corvol P, Clauser E: "Systematic identification of mutations that constitutively activate the angiotensin II type 1A receptor by screening a randomly mutated cDNA library with an original pharmacological bioassay". *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97:7615-7620.
38. Kjelsberg MA, Cotecchia S, Ostrowski J, Caron MG, Lefkowitz RJ: "Constitutive activation of the alpha 1B-adrenergic receptor by all amino acid substitutions at a single site. Evidence for a region which constrains receptor activation". *J Biol Chem* 1992, 267:1430-1433.
39. Le MT, Vanderheyden PM, Szaszak M, Hunyady L, Vauquelin G: "Angiotensin IV is a potent agonist for constitutive active human AT1 receptors. Distinct roles of the N- and C-terminal residues of angiotensin II during AT1 receptor activation". *J Biol Chem* 2002, 277:23107-23110.

40. Le MT, Vanderheyden PM, Szaszak M, Hunyady L, Kersemans V, Vauquelin G: "Peptide and nonpeptide antagonist interaction with constitutively active human AT1 receptors". *Biochem Pharmacol* 2003, 65:1329-1338.
41. Giraldo J: "Agonist induction, conformational selection, and mutant receptors". *FEBS Lett* 2004, 556:13-18.
42. Gether U, Kobilka BK: "G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation". *J Biol Chem* 1998, 273:17979-17982.
43. Kobilka BK: "The role of cytosolic and membrane factors in processing of the human beta-2 adrenergic receptor following translocation and glycosylation in a cell-free system". *J Biol Chem* 1990, 265:7610-7618.
44. Gether U, Ballesteros JA, Seifert R, Sanders-Bush E, Weinstein H, Kobilka BK: "Structural instability of a constitutively active G protein-coupled receptor. Agonist-independent activation due to conformational flexibility". *J Biol Chem* 1997, 272:2587-2590.
45. Gether U, Lin S, Ghanouni P, Ballesteros JA, Weinstein H, Kobilka BK: "Agonists induce conformational changes in transmembrane domains III and VI of the beta2 adrenoceptor". *Embo J* 1997, 16:6737-6747.
46. Swaminath G, Xiang Y, Lee TW, Steenhuis J, Parnot C, Kobilka BK: "Sequential binding of agonists to the beta2 adrenoceptor. Kinetic evidence for intermediate conformational states". *J Biol Chem* 2004, 279:686-691.
47. 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, 289:739-745.
48. Okada T, Sugihara M, Bondar AN, Elstner M, Entel P, Buss V: "The retinal conformation and its environment in rhodopsin in light of a new 2.2 Å crystal structure". *J Mol Biol* 2004, 342:571-583.
49. Li J, Edwards PC, Burghammer M, Villa C, Schertler GF: "Structure of bovine rhodopsin in a trigonal crystal form". *J Mol Biol* 2004, 343:1409-1438.
50. Springael JY, Urizar E, Parmentier M: "Dimerization of chemokine receptors and its functional consequences". *Cytokine Growth Factor Rev* 2005.
51. Ballesteros JA, Jensen AD, Liapakis G, Rasmussen SG, Shi L, Gether U, Javitch JA: "Activation of the beta 2-adrenergic receptor involves disruption of an ionic lock between the cytoplasmic ends of transmembrane segments 3 and 6". *J Biol Chem* 2001, 276:29171-29177.
52. Greasley PJ, Fanelli F, Rossier O, Abuin L, Cotecchia S: "Mutagenesis and modelling of the alpha(1b)-adrenergic receptor highlight the role of the helix 3/helix 6 interface in receptor activation". *Mol Pharmacol* 2002, 61:1025-1032.
53. Montanelli L, Van Durme JJ, Smits G, Bonomi M, Rodien P, Devor EJ, Moffat-Wilson K, Pardo L, Vassart G, Costagliola S: "Modulation of ligand selectivity associated with activation of the transmembrane region of the human follitropin receptor". *Mol Endocrinol* 2004, 18:2061-2073.
54. Cohen GB, Yang T, Robinson PR, Oprian DD: "Constitutive activation of opsin: influence of charge at position 134 and size at position 296". *Biochemistry* 1993, 32:6111-6115.
55. Scheer A, Fanelli F, Costa T, De Benedetti PG, Cotecchia S: "Constitutively active mutants of the alpha 1B-adrenergic receptor: role of highly conserved polar amino acids in receptor activation". *Embo J* 1996, 15:3566-3578.
56. Kim JM, Altenbach C, Thurmond RL, Khorana HG, Hubbell WL: "Structure and function in rhodopsin: rhodopsin mutants with a neutral amino acid at E134 have a

- partially activated conformation in the dark state". *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, 94:14273-14278.
57. Rasmussen SG, Jensen AD, Liapakis G, Ghanouni P, Javitch JA, Gether U: "Mutation of a highly conserved aspartic acid in the beta2 adrenergic receptor: constitutive activation, structural instability, and conformational rearrangement of transmembrane segment 6". *Mol Pharmacol* 1999, 56:175-184.
  58. Mellado M, Rodriguez-Frade JM, Aragay A, del Real G, Martin AM, Vila-Coro AJ, Serrano A, Mayor F, Jr., Martinez AC: "The chemokine monocyte chemotactic protein 1 triggers Janus kinase 2 activation and tyrosine phosphorylation of the CCR2B receptor". *J Immunol* 1998, 161:805-813.
  59. Alewijnse AE, Timmerman H, Jacobs EH, Smit MJ, Roovers E, Cotecchia S, Leurs R: "The effect of mutations in the DRY motif on the constitutive activity and structural instability of the histamine H(2) receptor". *Mol Pharmacol* 2000, 57:890-898.
  60. Wilbanks AM, Laporte SA, Bohn LM, Barak LS, Caron MG: "Apparent loss-of-function mutant GPCRs revealed as constitutively desensitized receptors". *Biochemistry* 2002, 41:11981-11989.
  61. Barak LS, Oakley RH, Laporte SA, Caron MG: "Constitutive arrestin-mediated desensitization of a human vasopressin receptor mutant associated with nephrogenic diabetes insipidus". *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98:93-98.
  62. Scheer A, Costa T, Fanelli F, De Benedetti PG, Mhaouty-Kodja S, Abuin L, Nenniger-Tosato M, Cotecchia S: "Mutational analysis of the highly conserved arginine within the Glu/Asp-Arg-Tyr motif of the alpha(1b)-adrenergic receptor: effects on receptor isomerization and activation". *Mol Pharmacol* 2000, 57:219-231.
  63. Ferguson SS: "Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling". *Pharmacol Rev* 2001, 53:1-24.
  64. Zhang WB, Navenot JM, Haribabu B, Tamamura H, Hiramatu K, Omagari A, Pei G, Manfredi JP, Fujii N, Broach JR, Peiper SC: "A point mutation that confers constitutive activity to CXCR4 reveals that T140 is an inverse agonist and that AMD3100 and ALX40-4C are weak partial agonists". *J Biol Chem* 2002, 277:24515-24521.
  65. Ghanouni P, Steenhuis JJ, Farrens DL, Kobilka BK: "Agonist-induced conformational changes in the G-protein-coupling domain of the beta 2 adrenergic receptor". *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98:5997-6002.
  66. Spiegel AM: "Defects in G protein-coupled signal transduction in human disease". *Annu Rev Physiol* 1996, 58:143-170.
  67. Heldin CH: "Signal transduction: multiple pathways, multiple options for therapy". *Stem Cells* 2001, 19:295-303.
  68. Limbird LE, Meyts PD, Lefkowitz RJ: "Beta-adrenergic receptors: evidence for negative cooperativity". *Biochem Biophys Res Commun* 1975, 64:1160-1168.
  69. Limbird LE, Lefkowitz RJ: "Negative cooperativity among beta-adrenergic receptors in frog erythrocyte membranes". *J Biol Chem* 1976, 251:5007-5014.
  70. Wreggett KA, Wells JW: "Cooperativity manifest in the binding properties of purified cardiac muscarinic receptors". *J Biol Chem* 1995, 270:22488-22499.
  71. Potter LT, Ballesteros LA, Bichajian LH, Ferrendelli CA, Fisher A, Hanchett HE, Zhang R: "Evidence of paired M2 muscarinic receptors". *Mol Pharmacol* 1991, 39:211-221.
  72. Bouvier M: "Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors". *Nat Rev Neurosci* 2001, 2:274-286.
  73. Seeman P, Guan HC, Civelli O, Van Tol HH, Sunahara RK, Niznik HB: "The cloned dopamine D2 receptor reveals different densities for dopamine receptor antagonist

- ligands. Implications for human brain positron emission tomography". *Eur J Pharmacol* 1992, 227:139-146.
74. Avissar S, Amitai G, Sokolovsky M: "Oligomeric structure of muscarinic receptors is shown by photoaffinity labeling: subunit assembly may explain high- and low-affinity agonist states". *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983, 80:156-159.
  75. Fraser CM, Venter JC: "The size of the mammalian lung beta 2-adrenergic receptor as determined by target size analysis and immunoaffinity chromatography". *Biochem Biophys Res Commun* 1982, 109:21-29.
  76. Venter JC, Schaber JS, U'Prichard DC, Fraser CM: "Molecular size of the human platelet alpha 2-adrenergic receptor as determined by radiation inactivation". *Biochem Biophys Res Commun* 1983, 116:1070-1075.
  77. Venter JC, Horne P, Eddy B, Greguski R, Fraser CM: "Alpha 1-adrenergic receptor structure". *Mol Pharmacol* 1984, 26:196-205.
  78. Maggio R, Vogel Z, Wess J: "Coexpression studies with mutant muscarinic/adrenergic receptors provide evidence for intermolecular "cross-talk" between G-protein-linked receptors". *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, 90:3103-3107.
  79. Monnot C, Bihoreau C, Conchon S, Curnow KM, Corvol P, Clauser E: "Polar residues in the transmembrane domains of the type 1 angiotensin II receptor are required for binding and coupling. Reconstitution of the binding site by co-expression of two deficient mutants". *J Biol Chem* 1996, 271:1507-1513.
  80. Bai M, Quinn S, Trivedi S, Kifor O, Pearce SH, Pollak MR, Krapcho K, Hebert SC, Brown EM: "Expression and characterization of inactivating and activating mutations in the human Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor". *J Biol Chem* 1996, 271:19537-19545.
  81. Bai M, Trivedi S, Kifor O, Quinn SJ, Brown EM: "Intermolecular interactions between dimeric calcium-sensing receptor monomers are important for its normal function". *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, 96:2834-2839.
  82. Dean MK, Higgs C, Smith RE, Bywater RP, Snell CR, Scott PD, Upton GJ, Howe TJ, Reynolds CA: "Dimerization of G-protein-coupled receptors". *J Med Chem* 2001, 44:4595-4614.
  83. Benkirane M, Jin DY, Chun RF, Koup RA, Jeang KT: "Mechanism of transdominant inhibition of CCR5-mediated HIV-1 infection by ccr5delta32". *J Biol Chem* 1997, 272:30603-30606.
  84. Chelli M, Alizon M: "Determinants of the trans-dominant negative effect of truncated forms of the CCR5 chemokine receptor". *J Biol Chem* 2001, 276:46975-46982.
  85. Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber CM, Saragosti S, Lapoumeroulie C, Cognaux J, Forceille C, Muyltermans G, Verhofstede C, Burtonboy G, Georges M, Imai T, Rana S, Yi Y, Smyth RJ, Collman RG, Doms RW, Vassart G, Parmentier M: "Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene". *Nature* 1996, 382:722-725.
  86. Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, MacDonald ME, Stuhlmann H, Koup RA, Landau NR: "Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection". *Cell* 1996, 86:367-377.
  87. Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, Allikmets R, Goedert JJ, Buchbinder SP, Vittinghoff E, Gomperts E, Donfield S, Vlahov D, Kaslow R, Saah A, Rinaldo C, Detels R, O'Brien SJ: "Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter

- Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study". *Science* 1996, 273:1856-1862.
88. 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 GABA(B) receptor". *Nature* 1998, 396:679-682.
  89. 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, 396:674-679.
  90. Kaupmann K, Malitschek B, Schuler V, Heid J, Froestl W, Beck P, Mosbacher J, Bischoff S, Kulik A, Shigemoto R, Karschin A, Bettler B: "GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes". *Nature* 1998, 396:683-687.
  91. Romano C, Yang WL, O'Malley KL: "Metabotropic glutamate receptor 5 is a disulfide-linked dimer". *J Biol Chem* 1996, 271:28612-28616.
  92. Jordan BA, Devi LA: "G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function". *Nature* 1999, 399:697-700.
  93. Bai M, Trivedi S, Brown EM: "Dimerization of the extracellular calcium-sensing receptor (CaR) on the cell surface of CaR-transfected HEK293 cells". *J Biol Chem* 1998, 273:23605-23610.
  94. Zeng FY, Wess J: "Identification and molecular characterization of m3 muscarinic receptor dimers". *J Biol Chem* 1999, 274:19487-19497.
  95. Ciruela F, Casado V, Mallol J, Canela EI, Lluís C, Franco R: "Immunological identification of A1 adenosine receptors in brain cortex". *J Neurosci Res* 1995, 42:818-828.
  96. Ng GY, O'Dowd BF, Lee SP, Chung HT, Brann MR, Seeman P, George SR: "Dopamine D2 receptor dimers and receptor-blocking peptides". *Biochem Biophys Res Commun* 1996, 227:200-204.
  97. Vila-Coro AJ, Mellado M, Martín de Ana A, Lucas P, del Real G, Martínez AC, Rodríguez-Frade JM: "HIV-1 infection through the CCR5 receptor is blocked by receptor dimerization". *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97:3388-3393.
  98. Rodríguez-Frade JM, Vila-Coro AJ, de Ana AM, Albar JP, Martínez AC, Mellado M: "The chemokine monocyte chemoattractant protein-1 induces functional responses through dimerization of its receptor CCR2". *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, 96:3628-3633.
  99. Vila-Coro AJ, Rodríguez-Frade JM, Martín De Ana A, Moreno-Ortiz MC, Martínez AC, Mellado M: "The chemokine SDF-1 $\alpha$  triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway". *Faseb J* 1999, 13:1699-1710.
  100. Milligan G, Bouvier M: "Methods to monitor the quaternary structure of G protein-coupled receptors". *Febs J* 2005, 272:2914-2925.
  101. Overton MC, Blumer KJ: "G-protein-coupled receptors function as oligomers in vivo". *Curr Biol* 2000, 10:341-344.
  102. Rocheville M, Lange DC, Kumar U, Sasi R, Patel RC, Patel YC: "Subtypes of the somatostatin receptor assemble as functional homo- and heterodimers". *J Biol Chem* 2000, 275:7862-7869.
  103. Roess DA, Horvat RD, Munnely H, Barisas BG: "Luteinizing hormone receptors are self-associated in the plasma membrane". *Endocrinology* 2000, 141:4518-4523.
  104. 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, 276:14092-14099.
105. Bridger GJ, Skerlj RT, Padmanabhan S, Martellucci SA, Henson GW, Struyf S, Witvrouw M, Schols D, De Clercq E: "Synthesis and structure-activity relationships of phenylenebis(methylene)-linked bis-azamacrocycles that inhibit HIV-1 and HIV-2 replication by antagonism of the chemokine receptor CXCR4". *J Med Chem* 1999, 42:3971-3981.
  106. 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, 96:151-156.
  107. Boute N, Jockers R, Issad T: "The use of resonance energy transfer in high-throughput screening: BRET versus FRET". *Trends Pharmacol Sci* 2002, 23:351-354.
  108. Angers S, Salahpour A, Joly E, Hilairet 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, 97:3684-3689.
  109. Tsien RY: "The green fluorescent protein". *Annu Rev Biochem* 1998, 67:509-544.
  110. Mercier JF, Salahpour A, Angers S, Breit A, Bouvier M: "Quantitative assessment of beta 1- and beta 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer". *J Biol Chem* 2002, 277:44925-44931.
  111. Rocheville M, Lange DC, Kumar U, Patel SC, Patel RC, Patel YC: "Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity". *Science* 2000, 288:154-157.
  112. Kroeger KM, Hanyaloglu AC, Seeber RM, Miles LE, Eidne KA: "Constitutive and agonist-dependent homo-oligomerization of the thyrotropin-releasing hormone receptor. Detection in living cells using bioluminescence resonance energy transfer". *J Biol Chem* 2001, 276:12736-12743.
  113. Ramsay D, Kellett E, McVey M, Rees S, Milligan G: "Homo- and hetero-oligomeric interactions between G-protein-coupled receptors in living cells monitored by two variants of bioluminescence resonance energy transfer (BRET): hetero-oligomers between receptor subtypes form more efficiently than between less closely related sequences". *Biochem J* 2002, 365:429-440.
  114. Issafras H, Angers S, Bulenger S, Blanpain C, Parmentier M, Labbe-Jullie C, Bouvier M, Marullo S: "Constitutive agonist-independent CCR5 oligomerization and antibody-mediated clustering occurring at physiological levels of receptors". *J Biol Chem* 2002, 277:34666-34673.
  115. Ayoub MA, Couturier C, Lucas-Meunier E, Angers S, Fossier P, Bouvier M, Jockers R: "Monitoring of Ligand-independent Dimerization and Ligand-induced Conformational Changes of Melatonin Receptors in Living Cells by Bioluminescence Resonance Energy Transfer". *J. Biol. Chem.* 2002, 277:21522-21528.
  116. Angers S, Salahpour A, Bouvier M: "Dimerization: an emerging concept for G protein-coupled receptor ontogeny and function". *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2002, 42:409-435.
  117. Bai M: "Dimerization of G-protein-coupled receptors: roles in signal transduction". *Cell Signal* 2004, 16:175-186.
  118. Petrecca K, Shrier A: "Spatial distribution of nerve processes and beta-adrenoreceptors in the rat atrioventricular node". *J Anat* 1998, 192 ( Pt 4):517-528.

119. Boivin V, Jahns R, Gambaryan S, Ness W, Boege F, Lohse MJ: "Immunofluorescent imaging of beta 1- and beta 2-adrenergic receptors in rat kidney". *Kidney Int* 2001, 59:515-531.
120. Sano M, Yoshimasa T, Yagura T, Yamamoto I: "Non-homogeneous distribution of beta 1- and beta 2-adrenoceptors in various human tissues". *Life Sci* 1993, 52:1063-1070.
121. Margeta-Mitrovic M, Jan YN, Jan LY: "A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization". *Neuron* 2000, 27:97-106.
122. Zhu X, Wess J: "Truncated V2 vasopressin receptors as negative regulators of wild-type V2 receptor function". *Biochemistry* 1998, 37:15773-15784.
123. Mellado M, Rodriguez-Frade JM, Vila-Coro AJ, Fernandez S, Martin de Ana A, Jones DR, Toran JL, Martinez AC: "Chemokine receptor homo- or heterodimerization activates distinct signaling pathways". *Embo J* 2001, 20:2497-2507.
124. Mandrika I, Petrovska R, Wikberg J: "Melanocortin receptors form constitutive homo- and heterodimers". *Biochem Biophys Res Commun* 2005, 326:349-354.
125. Hansen JL, Sheikh SP: "Functional consequences of 7TM receptor dimerization". *Eur J Pharm Sci* 2004, 23:301-317.
126. Lemmon MA, Treutlein HR, Adams PD, Brunger AT, Engelman DM: "A dimerization motif for transmembrane alpha-helices". *Nat Struct Biol* 1994, 1:157-163.
127. Bormann BJ, Knowles WJ, Marchesi VT: "Synthetic peptides mimic the assembly of transmembrane glycoproteins". *J Biol Chem* 1989, 264:4033-4037.
128. Lemmon MA, Flanagan JM, Treutlein HR, Zhang J, Engelman DM: "Sequence specificity in the dimerization of transmembrane alpha-helices". *Biochemistry* 1992, 31:12719-12725.
129. Lemmon MA, Flanagan JM, Hunt JF, Adair BD, Bormann BJ, Dempsey CE, Engelman DM: "Glycophorin A dimerization is driven by specific interactions between transmembrane alpha-helices". *J Biol Chem* 1992, 267:7683-7689.
130. Salahpour A, Angers S, Mercier JF, Lagace M, Marullo S, Bouvier M: "Homodimerization of the beta2-adrenergic receptor as a prerequisite for cell surface targeting". *J Biol Chem* 2004, 279:33390-33397.
131. Tarasova NI, Rice WG, Michejda CJ: "Inhibition of G-protein-coupled receptor function by disruption of transmembrane domain interactions". *J Biol Chem* 1999, 274:34911-34915.
132. Hernanz-Falcon P, Rodriguez-Frade JM, Serrano A, Juan D, del Sol A, Soriano SF, Roncal F, Gomez L, Valencia A, Martinez AC, Mellado M: "Identification of amino acid residues crucial for chemokine receptor dimerization". *Nat Immunol* 2004, 5:216-223.
133. Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim JJ, Power CA: "International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors". *Pharmacol Rev* 2000, 52:145-176.
134. Damon I, Murphy PM, Moss B: "Broad spectrum chemokine antagonistic activity of a human poxvirus chemokine homolog". *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95:6403-6407.
135. Kledal TN, Rosenkilde MM, Coulin F, Simmons G, Johnsen AH, Alouani S, Power CA, Lutichau HR, Gerstoft J, Clapham PR, Clark-Lewis I, Wells TN, Schwartz TW: "A broad-spectrum chemokine antagonist encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus". *Science* 1997, 277:1656-1659.
136. Graham KA, Lalani AS, Macen JL, Ness TL, Barry M, Liu LY, Lucas A, Clark-Lewis I, Moyer RW, McFadden G: "The T1/35kDa family of poxvirus-secreted proteins bind

- chemokines and modulate leukocyte influx into virus-infected tissues". *Virology* 1997, 229:12-24.
137. Smith CA, Smith TD, Smolak PJ, Friend D, Hagen H, Gerhart M, Park L, Pickup DJ, Torrance D, Mohler K, Schooley K, Goodwin RG: "Poxvirus genomes encode a secreted, soluble protein that preferentially inhibits beta chemokine activity yet lacks sequence homology to known chemokine receptors". *Virology* 1997, 236:316-327.
138. Alcami A, Symons JA, Collins PD, Williams TJ, Smith GL: "Blockade of chemokine activity by a soluble chemokine binding protein from vaccinia virus". *J Immunol* 1998, 160:624-633.
139. Sodhi A, Montaner S, Gutkind JS: "Viral hijacking of G-protein-coupled-receptor signalling networks". *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004, 5:998-1012.
140. Clore GM, Gronenborn AM: "Three-dimensional structures of alpha and beta chemokines". *Faseb J* 1995, 9:57-62.
141. Nesmelova IV, Sham Y, Dudek AZ, van Eijk LI, Wu G, Slungaard A, Mortari F, Griffioen AW, Mayo KH: "Platelet factor 4 and interleukin-8 CXC chemokine heterodimer formation modulates function at the quaternary structural level". *J Biol Chem* 2005, 280:4948-4958.
142. Guan E, Wang J, Norcross MA: "Identification of human macrophage inflammatory proteins 1alpha and 1beta as a native secreted heterodimer". *J Biol Chem* 2001, 276:12404-12409.
143. Hoogewerf AJ, Kuschert GS, Proudfoot AE, Borlat F, Clark-Lewis I, Power CA, Wells TN: "Glycosaminoglycans mediate cell surface oligomerization of chemokines". *Biochemistry* 1997, 36:13570-13578.
144. Proudfoot AE, Handel TM, Johnson Z, Lau EK, LiWang P, Clark-Lewis I, Borlat F, Wells TN, Kosco-Vilbois MH: "Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines". *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100:1885-1890.
145. Kim KS, Rajarathnam K, Clark-Lewis I, Sykes BD: "Structural characterization of a monomeric chemokine: monocyte chemoattractant protein-3". *FEBS Lett* 1996, 395:277-282.
146. Struyf S, Proost P, Lenaerts JP, Stoops G, Wuyts A, Van Damme J: "Identification of a blood-derived chemoattractant for neutrophils and lymphocytes as a novel CC chemokine, Regakine-1". *Blood* 2001, 97:2197-2204.
147. Tournamille C, Le Van Kim C, Gane P, Blanchard D, Proudfoot AE, Cartron JP, Colin Y: "Close association of the first and fourth extracellular domains of the Duffy antigen/receptor for chemokines by a disulfide bond is required for ligand binding". *J Biol Chem* 1997, 272:16274-16280.
148. Blanpain C, Lee B, Vakili J, Doranz BJ, Govaerts C, Migeotte I, Sharron M, Dupriez V, Vassart G, Doms RW, Parmentier M: "Extracellular cysteines of CCR5 are required for chemokine binding, but dispensable for HIV-1 coreceptor activity". *J Biol Chem* 1999, 274:18902-18908.
149. Ai LS, Liao F: "Mutating the four extracellular cysteines in the chemokine receptor CCR6 reveals their differing roles in receptor trafficking, ligand binding, and signaling". *Biochemistry* 2002, 41:8332-8341.
150. Blanpain C, Doranz BJ, Bondue A, Govaerts C, De Leener A, Vassart G, Doms RW, Proudfoot A, Parmentier M: "The core domain of chemokines binds CCR5 extracellular domains while their amino terminus interacts with the transmembrane helix bundle". *J Biol Chem* 2003, 278:5179-5187.
151. Han KH, Green SR, Tangirala RK, Tanaka S, Quehenberger O: "Role of the first extracellular loop in the functional activation of CCR2. The first extracellular loop

- contains distinct domains necessary for both agonist binding and transmembrane signaling". *J Biol Chem* 1999, 274:32055-32062.
152. LaRosa GJ, Thomas KM, Kaufmann ME, Mark R, White M, Taylor L, Gray G, Witt D, Navarro J: "Amino terminus of the interleukin-8 receptor is a major determinant of receptor subtype specificity". *J Biol Chem* 1992, 267:25402-25406.
  153. Monteclaro FS, Charo IF: "The amino-terminal extracellular domain of the MCP-1 receptor, but not the RANTES/MIP-1alpha receptor, confers chemokine selectivity. Evidence for a two-step mechanism for MCP-1 receptor activation". *J Biol Chem* 1996, 271:19084-19092.
  154. Crump MP, Gong JH, Loetscher P, Rajarathnam K, Amara A, Arenzana-Seisdedos F, Virelizier JL, Baggiolini M, Sykes BD, Clark-Lewis I: "Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1". *Embo J* 1997, 16:6996-7007.
  155. Thelen M: "Dancing to the tune of chemokines". *Nat Immunol* 2001, 2:129-134.
  156. Tilton B, Ho L, Oberlin E, Loetscher P, Baleux F, Clark-Lewis I, Thelen M: "Signal transduction by CXC chemokine receptor 4. Stromal cell-derived factor 1 stimulates prolonged protein kinase B and extracellular signal-regulated kinase 2 activation in T lymphocytes". *J Exp Med* 2000, 192:313-324.
  157. Knall C, Young S, Nick JA, Buhl AM, Worthen GS, Johnson GL: "Interleukin-8 regulation of the Ras/Raf/mitogen-activated protein kinase pathway in human neutrophils". *J Biol Chem* 1996, 271:2832-2838.
  158. Huang R, Lian JP, Robinson D, Badwey JA: "Neutrophils stimulated with a variety of chemoattractants exhibit rapid activation of p21-activated kinases (Paks): separate signals are required for activation and inactivation of paks". *Mol Cell Biol* 1998, 18:7130-7138.
  159. Jones SA, Moser B, Thelen M: "A comparison of post-receptor signal transduction events in Jurkat cells transfected with either IL-8R1 or IL-8R2. Chemokine mediated activation of p42/p44 MAP-kinase (ERK-2)". *FEBS Lett* 1995, 364:211-214.
  160. Kucia M, Jankowski K, Reza R, Wysoczynski M, Bandura L, Allendorf DJ, Zhang J, Ratajczak J, Ratajczak MZ: "CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion". *J Mol Histol* 2004, 35:233-245.
  161. Ganju RK, Brubaker SA, Meyer J, Dutt P, Yang Y, Qin S, Newman W, Groopman JE: "The alpha-chemokine, stromal cell-derived factor-1alpha, binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways". *J Biol Chem* 1998, 273:23169-23175.
  162. Zhang XF, Wang JF, Matczak E, Proper JA, Groopman JE: "Janus kinase 2 is involved in stromal cell-derived factor-1alpha-induced tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins and migration of hematopoietic progenitor cells". *Blood* 2001, 97:3342-3348.
  163. Vicente-Manzanares M, Cabrero JR, Rey M, Perez-Martinez M, Ursa A, Itoh K, Sanchez-Madrid F: "A role for the Rho-p160 Rho coiled-coil kinase axis in the chemokine stromal cell-derived factor-1alpha-induced lymphocyte actomyosin and microtubular organization and chemotaxis". *J Immunol* 2002, 168:400-410.
  164. Morohashi H, Miyawaki T, Nomura H, Kuno K, Murakami S, Matsushima K, Mukaida N: "Expression of both types of human interleukin-8 receptors on mature neutrophils, monocytes, and natural killer cells". *J Leukoc Biol* 1995, 57:180-187.
  165. Zaitseva M, Blauvelt A, Lee S, Lapham CK, Klaus-Kovtun V, Mostowski H, Manischewitz J, Golding H: "Expression and function of CCR5 and CXCR4 on human Langerhans cells and macrophages: implications for HIV primary infection". *Nat Med* 1997, 3:1369-1375.

166. Zhang S, Youn BS, Gao JL, Murphy PM, Kwon BS: "Differential effects of leukotactin-1 and macrophage inflammatory protein-1 alpha on neutrophils mediated by CCR1". *J Immunol* 1999, 162:4938-4942.
167. Lapham CK, Zaitseva MB, Lee S, Romanstseva T, Golding H: "Fusion of monocytes and macrophages with HIV-1 correlates with biochemical properties of CXCR4 and CCR5". *Nat Med* 1999, 5:303-308.
168. El-Asmar L, Springael JY, Ballet S, Andrieu EU, Vassart G, Parmentier M: "Evidence for negative binding cooperativity within CCR5-CCR2b heterodimers". *Mol Pharmacol* 2005, 67:460-469.
169. Babcock GJ, Farzan M, Sodroski J: "Ligand-independent dimerization of CXCR4, a principal HIV-1 coreceptor". *J Biol Chem* 2003, 278:3378-3385.
170. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA: "HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor". *Science* 1996, 272:872-877.
171. Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J, Springer TA: "The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry". *Nature* 1996, 382:829-833.
172. Bleul CC, Wu L, Hoxie JA, Springer TA, Mackay CR: "The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes". *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, 94:1925-1930.
173. Zaitseva MB, Lee S, Rabin RL, Tiffany HL, Farber JM, Peden KW, Murphy PM, Golding H: "CXCR4 and CCR5 on human thymocytes: biological function and role in HIV-1 infection". *J Immunol* 1998, 161:3103-3113.
174. He J, Chen Y, Farzan M, Choe H, Ohagen A, Gartner S, Busciglio J, Yang X, Hofmann W, Newman W, Mackay CR, Sodroski J, Gabuzda D: "CCR3 and CCR5 are co-receptors for HIV-1 infection of microglia". *Nature* 1997, 385:645-649.
175. Shirozu M, Nakano T, Inazawa J, Tashiro K, Tada H, Shinohara T, Honjo T: "Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene". *Genomics* 1995, 28:495-500.
176. Ma Q, Jones D, Borghesani PR, Segal RA, Nagasawa T, Kishimoto T, Bronson RT, Springer TA: "Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice". *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95:9448-9453.
177. Tachibana K, Hirota S, Iizasa H, Yoshida H, Kawabata K, Kataoka Y, Kitamura Y, Matsushima K, Yoshida N, Nishikawa S, Kishimoto T, Nagasawa T: "The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract". *Nature* 1998, 393:591-594.
178. Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR: "Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development". *Nature* 1998, 393:595-599.
179. Peled A, Grabovsky V, Habler L, Sandbank J, Arenzana-Seisdedos F, Petit I, Ben-Hur H, Lapidot T, Alon R: "The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34(+) cells on vascular endothelium under shear flow". *J Clin Invest* 1999, 104:1199-1211.
180. Campbell JJ, Hedrick J, Zlotnik A, Siani MA, Thompson DA, Butcher EC: "Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions". *Science* 1998, 279:381-384.
181. Salcedo R, Wasserman K, Young HA, Grimm MC, Howard OM, Anver MR, Kleinman HK, Murphy WJ, Oppenheim JJ: "Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induce expression of CXCR4 on human endothelial

- cells: In vivo neovascularization induced by stromal-derived factor-1alpha". *Am J Pathol* 1999, 154:1125-1135.
182. Endres MJ, Clapham PR, Marsh M, Ahuja M, Turner JD, McKnight A, Thomas JF, Stobenau-Haggarty B, Choe S, Vance PJ, Wells TN, Power CA, Sutterwala SS, Doms RW, Landau NR, Hoxie JA: "CD4-independent infection by HIV-2 is mediated by fusin/CXCR4". *Cell* 1996, 87:745-756.
  183. Loetscher P, Gong JH, Dewald B, Baggiolini M, Clark-Lewis I: "N-terminal peptides of stromal cell-derived factor-1 with CXC chemokine receptor 4 agonist and antagonist activities". *J Biol Chem* 1998, 273:22279-22283.
  184. Heveker N, Montes M, Germeroth L, Amara A, Trautmann A, Alizon M, Schneider-Mergener J: "Dissociation of the signalling and antiviral properties of SDF-1-derived small peptides". *Curr Biol* 1998, 8:369-376.
  185. Tamamura H, Xu Y, Hattori T, Zhang X, Arakaki R, Kanbara K, Omagari A, Otaka A, Ibuka T, Yamamoto N, Nakashima H, Fujii N: "A low-molecular-weight inhibitor against the chemokine receptor CXCR4: a strong anti-HIV peptide T140". *Biochem Biophys Res Commun* 1998, 253:877-882.
  186. Schols D, Este JA, Henson G, De Clercq E: "Bicyclams, a class of potent anti-HIV agents, are targeted at the HIV coreceptor fusin/CXCR-4". *Antiviral Res* 1997, 35:147-156.
  187. Donzella GA, Schols D, Lin SW, Este JA, Nagashima KA, Maddon PJ, Allaway GP, Sakmar TP, Henson G, De Clercq E, Moore JP: "AMD3100, a small molecule inhibitor of HIV-1 entry via the CXCR4 co-receptor". *Nat Med* 1998, 4:72-77.
  188. Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verastegui E, Zlotnik A: "Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis". *Nature* 2001, 410:50-56.
  189. Di Salvo J, Koch GE, Johnson KE, Blake AD, Daugherty BL, DeMartino JA, Sirotina-Meisher A, Liu Y, Springer MS, Cascieri MA, Sullivan KA: "The CXCR4 agonist ligand stromal derived factor-1 maintains high affinity for receptors in both Galpha(i)-coupled and uncoupled states". *Eur J Pharmacol* 2000, 409:143-154.
  190. Rochdi MD, Parent JL: "Galphaq-coupled receptor internalization specifically induced by Galphaq signaling. Regulation by EBP50". *J Biol Chem* 2003, 278:17827-17837.
  191. Fischer AM, Mercer JC, Iyer A, Ragin MJ, August A: "Regulation of CXC chemokine receptor 4-mediated migration by the Tec family tyrosine kinase ITK". *J Biol Chem* 2004, 279:29816-29820.
  192. Ottoson NC, Pribila JT, Chan AS, Shimizu Y: "Cutting edge: T cell migration regulated by CXCR4 chemokine receptor signaling to ZAP-70 tyrosine kinase". *J Immunol* 2001, 167:1857-1861.
  193. Nishita M, Aizawa H, Mizuno K: "Stromal cell-derived factor 1alpha activates LIM kinase 1 and induces cofilin phosphorylation for T-cell chemotaxis". *Mol Cell Biol* 2002, 22:774-783.
  194. Lataillade JJ, Clay D, Dupuy C, Rigal S, Jasmin C, Bourin P, Le Bousse-Kerdiles MC: "Chemokine SDF-1 enhances circulating CD34(+) cell proliferation in synergy with cytokines: possible role in progenitor survival". *Blood* 2000, 95:756-768.
  195. Lataillade JJ, Clay D, Bourin P, Herodin F, Dupuy C, Jasmin C, Bousse-Kerdiles MC: "Stromal cell-derived factor 1 regulates primitive hematopoiesis by suppressing apoptosis and by promoting G(0)/G(1) transition in CD34(+) cells: evidence for an autocrine/paracrine mechanism". *Blood* 2002, 99:1117-1129.
  196. Haribabu B, Richardson RM, Fisher I, Sozzani S, Peiper SC, Horuk R, Ali H, Snyderman R: "Regulation of human chemokine receptors CXCR4. Role of

- phosphorylation in desensitization and internalization". *J Biol Chem* 1997, 272:28726-28731.
197. Szabo I, Chen XH, Xin L, Adler MW, Howard OM, Oppenheim JJ, Rogers TJ: "Heterologous desensitization of opioid receptors by chemokines inhibits chemotaxis and enhances the perception of pain". *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, 99:10276-10281.
  198. Szabo I, Wetzel MA, Zhang N, Steele AD, Kaminsky DE, Chen C, Liu-Chen LY, Bednar F, Henderson EE, Howard OM, Oppenheim JJ, Rogers TJ: "Selective inactivation of CCR5 and decreased infectivity of R5 HIV-1 strains mediated by opioid-induced heterologous desensitization". *J Leukoc Biol* 2003, 74:1074-1082.
  199. Steele AD, Szabo I, Bednar F, Rogers TJ: "Interactions between opioid and chemokine receptors: heterologous desensitization". *Cytokine Growth Factor Rev* 2002, 13:209-222.
  200. Albini A, Ferrini S, Benelli R, Sforzini S, Giunciuglio D, Aluigi MG, Proudfoot AE, Alouani S, Wells TN, Mariani G, Rabin RL, Farber JM, Noonan DM: "HIV-1 Tat protein mimicry of chemokines". *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95:13153-13158.
  201. Kennedy KJ, Karpus WJ: "Role of chemokines in the regulation of Th1/Th2 and autoimmune encephalomyelitis". *J Clin Immunol* 1999, 19:273-279.
  202. Boring L, Gosling J, Monteclaro FS, Lulis AJ, Tsou CL, Charo IF: "Molecular cloning and functional expression of murine JE (monocyte chemoattractant protein 1) and murine macrophage inflammatory protein 1alpha receptors: evidence for two closely linked C-C chemokine receptors on chromosome 9". *J Biol Chem* 1996, 271:7551-7558.
  203. Kurihara T, Bravo R: "Cloning and functional expression of mCCR2, a murine receptor for the C-C chemokines JE and FIC". *J Biol Chem* 1996, 271:11603-11607.
  204. Dawson TC, Kuziel WA, Osahar TA, Maeda N: "Absence of CC chemokine receptor-2 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice". *Atherosclerosis* 1999, 143:205-211.
  205. Rodriguez-Frade JM, del Real G, Serrano A, Hernanz-Falcon P, Soriano SF, Vila-Coro AJ, de Ana AM, Lucas P, Prieto I, Martinez AC, Mellado M: "Blocking HIV-1 infection via CCR5 and CXCR4 receptors by acting in trans on the CCR2 chemokine receptor". *Embo J* 2004, 23:66-76.
  206. Mellado M, Rodriguez-Frade JM, Vila-Coro AJ, de Ana AM, Martinez AC: "Chemokine control of HIV-1 infection". *Nature* 1999, 400:723-724.
  207. George SR, Lee SP, Varghese G, Zeman PR, Seeman P, Ng GY, O'Dowd BF: "A transmembrane domain-derived peptide inhibits D1 dopamine receptor function without affecting receptor oligomerization". *J Biol Chem* 1998, 273:30244-30248.
  208. Percherancier Y, Berchiche Y, Slight I, Volkmer-Engert R, Tamamura H, Fujii N, Bouvier M, Heveker N: "Bioluminescence resonance energy transfer reveals ligand-induced conformational changes in CXCR4 homo- and heterodimers". *J Biol Chem* 2005.
  209. Lagane B, Ballet S, Planchenault T, Balabanian K, Le Poul E, Blanpain C, Percherancier Y, Staropoli I, Vassart G, Oppermann M, Parmentier M, Bachelier F: "Mutation of the DRY motif reveals different structural requirements for the CC chemokine receptor 5-mediated signaling and receptor endocytosis". *Mol Pharmacol* 2005, 67:1966-1976.
  210. Lu ZL, Curtis CA, Jones PG, Pavia J, Hulme EC: "The role of the aspartate-arginine-tyrosine triad in the m1 muscarinic receptor: mutations of aspartate 122 and tyrosine 124 decrease receptor expression but do not abolish signaling". *Mol Pharmacol* 1997, 51:234-241.

211. Scheer A, Fanelli F, Costa T, De Benedetti PG, Cotecchia S: "The activation process of the alpha1B-adrenergic receptor: potential role of protonation and hydrophobicity of a highly conserved aspartate". *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, 94:808-813.
212. Rhee MH, Nevo I, Levy R, Vogel Z: "Role of the highly conserved Asp-Arg-Tyr motif in signal transduction of the CB2 cannabinoid receptor". *FEBS Lett* 2000, 466:300-304.
213. Haskell CA, Cleary MD, Charo IF: "Molecular uncoupling of fractalkine-mediated cell adhesion and signal transduction. Rapid flow arrest of CX3CR1-expressing cells is independent of G-protein activation". *J Biol Chem* 1999, 274:10053-10058.
214. Berglund MM, Schober DA, Esterman MA, Gehlert DR: "Neuropeptide Y Y4 receptor homodimers dissociate upon agonist stimulation". *J Pharmacol Exp Ther* 2003, 307:1120-1126.
215. Cheng ZJ, Miller LJ: "Agonist-dependent dissociation of oligomeric complexes of G protein-coupled cholecystokinin receptors demonstrated in living cells using bioluminescence resonance energy transfer". *J Biol Chem* 2001, 276:48040-48047.
216. Ayoub MA, Levoye A, Delagrangé P, Jockers R: "Preferential formation of MT1/MT2 melatonin receptor heterodimers with distinct ligand interaction properties compared with MT2 homodimers". *Mol Pharmacol* 2004, 66:312-321.
217. Couturier C, Jockers R: "Activation of the leptin receptor by a ligand-induced conformational change of constitutive receptor dimers". *J Biol Chem* 2003, 278:26604-26611.
218. Smith MW, Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Lomb DA, Goedert JJ, O'Brien TR, Jacobson LP, Kaslow R, Buchbinder S, Vittinghoff E, Vlahov D, Hoots K, Hilgartner MW, O'Brien SJ: "Contrasting genetic influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV-1 infection and disease progression. Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC), ALIVE Study". *Science* 1997, 277:959-965.
219. Toth PT, Ren D, Miller RJ: "Regulation of CXCR4 receptor dimerization by the chemokine SDF-1alpha and the HIV-1 coat protein gp120: a fluorescence resonance energy transfer (FRET) study". *J Pharmacol Exp Ther* 2004, 310:8-17.
220. Trent JO, Wang ZX, Murray JL, Shao W, Tamamura H, Fujii N, Peiper SC: "Lipid bilayer simulations of CXCR4 with inverse agonists and weak partial agonists". *J Biol Chem* 2003, 278:47136-47144.
221. Kenakin T: "Ligand-selective receptor conformations revisited: the promise and the problem". *Trends Pharmacol Sci* 2003, 24:346-354.
222. Overton MC, Blumer KJ: "The extracellular N-terminal domain and transmembrane domains 1 and 2 mediate oligomerization of a yeast G protein-coupled receptor". *J Biol Chem* 2002, 277:41463-41472.
223. Guo W, Shi L, Javitch JA: "The fourth transmembrane segment forms the interface of the dopamine D2 receptor homodimer". *J Biol Chem* 2003, 278:4385-4388.
224. Brelot A, Heveker N, Montes M, Alizon M: "Identification of residues of CXCR4 critical for human immunodeficiency virus coreceptor and chemokine receptor activities". *J Biol Chem* 2000, 275:23736-23744.
225. Miller AL, Lukacs NW: "Chemokine receptors: understanding their role in asthmatic disease". *Immunol Allergy Clin North Am* 2004, 24:667-683, vii.

