

CAROLINE BOUCHARD

**RÉGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DU GPR84, UN  
NOUVEAU RÉCEPTEUR COUPLÉ AUX PROTÉINES G  
EXPRIMÉ PAR LA MICROGLIE DANS DES CONDITIONS  
INFLAMMATOIRES**

Mémoire présenté  
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval  
dans le cadre du programme de maîtrise en physiologie-endocrinologie  
pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DE MÉDECINE  
UNIVERSITÉ LAVAL  
QUÉBEC

2007

## *Résumé*

Nous avons identifié le gène GPR84 comme étant exprimé par la microglie, c'est-à-dire les macrophages du système nerveux central. Il code pour un récepteur couplé aux protéines G dont le ligand endogène, la fonction et la régulation demeurent inconnus. Dans cette étude, nous avons testé l'hypothèse que l'augmentation de la transcription du gène GPR84, dans la microglie, soit associée à des processus inflammatoires. Pour ce faire, nous avons induit une réaction inflammatoire systémique à la lipopolysaccharide (LPS) chez des souris normales ou déficientes en l'une ou l'autre des cytokines IL-1 et TNF. Par la combinaison des techniques d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie, il a été montré que, suite à une injection systémique de LPS ou intraparenchymale de TNF, les cellules microgliales et les macrophages du cerveau expriment fortement l'ARNm du gène GPR84. Cette activation est quasi-absente chez les souris normales. Finalement, nous avons démontré que la production du GPR84 par la microglie se présentait non seulement durant la phase aigüe de l'endotoxémie, mais également durant l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), un modèle de la sclérose en plaques. Nos résultats illustrent donc que le GPR84, nouveau marqueur, sensible, de l'activation microgliale, pourrait jouer un rôle important dans la régulation des processus neuroinflammatoires.

## *Avant-propos*

Il y a cinq ans, je quittais l'univers du marché du travail pour entreprendre un défi fabuleusement stimulant, parfois parsemé d'embûches, découlant d'un projet personnel qui allait certes me faire progresser et me permettre d'exercer une profession fortement valorisante dans le domaine des sciences biologiques. Plus tard, c'est en m'intéressant à un sujet qui me tient à cœur, les maladies neurodégénératives, que je décidai de poursuivre mes études graduées. Mon destin me dirigea au sein d'une équipe en neuroimmunologie.

Au cours de mes deux années de maîtrise, j'ai approfondi mes connaissances en immunologie et acquis des notions fondamentales de neuroanatomie et de neuroinflammation. Ce fût une expérience des plus enrichissantes. Je ne pourrais conclure cette magnifique aventure sans exprimer ma gratitude envers toutes les personnes qui m'ont soutenue.

Mes remerciements s'adressent tout d'abord à mon directeur de recherche, Dr Luc Vallières, qui m'a donné la chance, en m'accueillant dans son laboratoire, de me réaliser et de progresser non seulement dans mon cheminement académique mais également sur le plan professionnel et personnel. Évoluer sous sa direction a été un réel plaisir et un moment privilégié. Il a su par ses conseils me guider, m'éclairer et m'apprendre sur le merveilleux monde de la recherche. Sa grande disponibilité, son travail, son écoute, sa rigueur, sa motivation sans limites et son humour me permettent d'affirmer qu'il est un directeur exceptionnel.

Également, je remercie chaleureusement l'équipe du laboratoire : Pierrot Tremblay, Alma Posvandzic, Jérôme Villeneuve, Hugo Galarneau, Julie Audoy et Julie Pagé, Andréanne Bédard, Marie-Josée Beaudet, de même que Nicolas Turrin. Ils m'ont offert une aide précieuse, des conseils judicieux et une écoute attentive. En prime, de belles amitiés ont vu le jour. Merci à vous mes chers collègues; travailler avec vous, au quotidien, a été une aventure des plus agréables. Merci pour votre contribution et tous ces bons moments.

Je ne pourrais avoir réussi ces études sans le soutien de ma tante, Margaret, qui m'a inculqué le goût d'apprendre et qui a toujours su m'encourager et me reconforter, de même que mon oncle André, qui m'a permis de cheminer et d'aller au bout de mes ambitions. Je ne trouverai pas les mots pour vous remercier, mais je vous serai toujours reconnaissante. Si je me suis rendue aussi loin, c'est que j'ai suivi votre exemple. Je remercie également mes parents, mon père, qui m'a enseigné la persévérance et ma mère, pour sa grande générosité. Un merci bien spécial à mon conjoint, David, pour son appui tout au long de mes études. Je souligne son optimisme et sa grande patience. Merci d'être à mes côtés et de m'encourager sans relâche.

Merci également au Dr Steve Lacroix et au Dr Jasna Kriz qui ont eu la gentillesse d'accepter de prendre de leur précieux temps pour lire et corriger ce mémoire. Merci à tous mes collaborateurs, les membres de l'équipe du Dr Serge Rivest, du Dr Steve Lacroix, les employés de l'animalerie du bloc T qui m'ont offert temps et conseils. Le projet a été financé par les Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC) et la Société Canadienne de Sclérose en plaques. J'aimerais de plus, exprimer ma reconnaissance envers le département d'Endocrinologie Moléculaire du Centre Hospitalier de l'Université Laval qui m'a supporté financièrement en m'accordant une bourse d'étude du programme génomique des IRSC.

Merci...

## *Table des matières*

<i>Résumé</i> .....	<i>ii</i>
<i>Avant-Propos</i> .....	<i>iii</i>
<i>Table des matières</i> .....	<i>v</i>
<i>Liste des figures</i> .....	<i>viii</i>
<i>Liste des tableaux</i> .....	<i>ix</i>
<i>Liste des abréviations</i> .....	<i>x</i>
<b>CHAPITRE 1: INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
1.1 GÉNÉRALITÉ, STRUCTURE ET CLASSIFICATION DES GPCRS .....	2
1.1.1 Généralités.....	2
1.1.2 Structure et classification .....	3
1.2 LES PROTÉINES G.....	9
1.2.1 Caractéristiques structurales .....	9
1.2.2 Classification.....	11
1.2.3 Récepteurs à sept domaines transmembranaires indépendants des protéines G .....	12
1.3 MÉCANISMES D'ACTIVATION DES GPCRS .....	13
1.3.1 La liaison ligand-récepteur.....	14
1.3.2 Oligomérisation.....	15
1.3.3 Le couplage et l'activation des protéines G hétérotrimériques .....	17
1.4 SIGNALISATION INTRACELLULAIRE DES GPCRS .....	20
1.4.1 Via les cascades enzymatiques.....	20
1.4.1.1 Voie de l'AMP cyclique .....	20
1.4.1.1.1 La protéine kinase A .....	20
1.4.1.1.2 Régulation de la transcription (CREB) .....	21
1.4.1.1.3 Autres voies d'action de l'AMPc .....	24

1.4.1.2	Voies des phosphoinositides .....	23
1.4.1.2.1	Inositol triphosphate.....	24
1.4.1.2.1	Diacylglycérol et protéine kinase.....	24
1.4.1.3	Les GPCRs et les MAP kinases .....	26
1.4.2	Via les canaux ioniques.....	26
1.4.2.1	Régulation direct des canaux ioniques.....	27
1.4.2.2	Régulation indirect des canaux ioniques.....	27
1.4.3	La diversité et la complexité de la signalisation intracellulaire des GPCRs.....	28
1.5	MÉCANISMES DE RÉTRO-CONTRÔLE DES GPCRS .....	30
1.5.1	La désensibilisation.....	31
1.5.2	L'internalisation.....	32
1.5.3	La régulation négative.....	36
1.6.	LES GPCRS DANS LA BIOLOGIE DES MACROPHAGES ET DES CELLULES MICROGLIALES	
1.6.1	Les macrophages et la microglie .....	38
1.6.2	Le rôle des GPCRs dans les fonctions des macrophages et des cellules microgliales .....	41
1.6.3	Le GPR84.....	50
1.7.	OBJECTIFS DES TRAVAUX.....	53

## **CHAPITRE 2: G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR 84, A MICROGLIA ASSOCIATED PROTEIN EXPRESSED IN NEUROINFLAMMATORY**

<b>CONDITIONS.....</b>	<b>54</b>	
2.1	RÉSUMÉ.....	54
2.2	ABSTRACT .....	55
2.3	INTRODUCTION.....	55
2.4	MATERIALS AND METHODS .....	56
2.4.1	Animals .....	56
2.4.2	Intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LPS).....	57
2.4.3	Intravenous injection of TNF .....	57
2.4.4	Intracerebral injection of TNF .....	57
2.4.5	EAE induction.....	57

2.4.6 Tissue preparation .....	58
2.4.7 cDNA cloning .....	58
2.4.8 In situ hybridization .....	59
2.4.9 Combined immunohistochemistry and in situ hybridization .....	59
2.4.10 Volumetric analysis.....	60
2.4.11 Cell counting .....	60
2.4.12 Imaging .....	60
2.4.13 Optical densitometry .....	60
2.4.14 Cell culture .....	61
2.4.15 Real-time quantitative RT-PCR (qRT-PCR) .....	61
2.4.16 Statistical analysis .....	62
2.5 RESULTS .....	62
2.5.1 Microglia express GPR84 during endotoxemia .....	62
2.5.2 Peripheral monocytic cells express GPR84 in response to LPS .....	63
2.5.3 Proinflammatory cytokines induce GPR84 expression in cultured microglia through a dexamethasone-insensitive mechanism .....	65
2.5.5 TNF and IL-1 partially mediate the induction of GPR84 expression in microglia by LPS.....	66
2.5.6 Microglia express GPR84 during EAE .....	66
2.6 DISCUSSION.....	67
<b>CHAPITRE 3: CONCLUSION .....</b>	<b>77</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>84</b>

## *Liste des figures*

### CHAPITRE I : INTRODUCTION

<b>Figure 1</b>	Structure typique des récepteurs couplés aux protéines G.....	4
<b>Figure 2</b>	Les sites d'interaction entre les sous-unités $G\alpha$ , $G\beta/\gamma$ et le récepteur.....	10
<b>Figure 3</b>	L'activation d'un récepteur couplé aux protéines G par son ligand.....	14
<b>Figure 4</b>	Représentation schématique du ligand induisant une hétérodimérisation .....	16
<b>Figure 5</b>	Le couplage et l'activation des protéines G hétérotrimériques .....	19
<b>Figure 6</b>	Voie de l'AMP cyclique et CREB.....	22
<b>Figure 7</b>	Voie de la PLC/PKA.....	25
<b>Figure 8</b>	Schéma représentant différentes voies de signalisation intracellulaire.....	28
<b>Figure 9</b>	Diversité et complexité de la signalisation des GPCRs .....	30
<b>Figure 10</b>	Représentation schématique de la désensibilisation et de la resensibilisation d'un GPCR après activation par l'agoniste .....	35
<b>Figure 11</b>	Mécanismes possibles de la régulation négative des GPCRs .....	38
<b>Figure 12</b>	Dendogramme des récepteurs présentant certaines similarités de séquence en relation avec le GPR84.....	52

### CHAPITRE II : G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR 84, A MICROGLIA ASSOCIATED PROTEIN EXPRESSED IN NEUROINFLAMMATORY CONDITIONS

<b>Figure 13</b>	GPR84 is strongly expressed by microglia during endotoxemia.....	71
<b>Figure 14</b>	GPR84 is expressed by peripheral macrophages and, to a lesser extent, monocytes upon stimulation with LPS .....	72
<b>Figure 15</b>	GPR84 expression is induced by proinflammatory molecules in cultured microglia through a dexamethasone-insensitive mechanism.....	73
<b>Figure 16</b>	GPR84 expression is induced after intracerebral injection of TNF .....	74
<b>Figure 17</b>	Reduced expression of GPR84 in mice deficient in TNF and/or IL-1 .....	75
<b>Figure 18</b>	GPR84 is expressed in the CNS during EAE.....	76



## *Liste des tableaux*

### **CHAPITRE 1: INTRODUCTION**

<b>Tableau 1</b>	Classification des GPCRs en fonction de leur séquence primaire et du site de liaison chez les mammifères .....	6
<b>Tableau 2</b>	Principales sous-unités de protéines G et leurs effecteurs primaires chez les mammifères .....	12
<b>Tableau 3</b>	Les GPCRs connus apparentés à la famille Rhodopsine et exprimés par la lignée des monocytes .....	43

## *Liste des abréviations*

<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ADP</b>	Adénosine diphosphate
<b>AEA</b>	Anandamine
<b>2-AG</b>	2-arachidonylglycerol
<b>AMPc</b>	Hormone adénocorticotrope
<b>AP-1</b>	Activating protein-1
<b>APP</b>	Protéine précurseur amyloïde
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ARNm</b>	Acide ribonucléique messenger
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>BAI</b>	Brain-specific angiogenesis inhibitor
<b>BHE</b>	Barrière hémato-encéphalique
<b>BV</b>	Blood vessel
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calcium
<b>CER</b>	Cerebellum
<b>Cor</b>	Cerebral cortex
<b>CC</b>	Corpus callosum
<b>CP</b>	Caudoputamen
<b>CCR</b>	Récepteur de chimiokines C-C
<b>CMH</b>	Complexe majeur d'histocompatibilité
<b>CRE</b>	cAMP response element
<b>CRF</b>	Corticotrophin releasing factor
<b>CVO</b>	Circoventricular organ
<b>D3V</b>	Dorsal third ventricle
<b>EAE</b>	Experimental autoimmune encephalomyelitis
<b>EC</b>	External capsule
<b>EGF</b>	Endothelial growth factor
<b>fMLP</b>	fmet-leu-phe (N-formylated peptide)
<b>GABA</b>	Acide g-aminobutyrique
<b>GAP</b>	G activating protein

<b>GDP</b>	Guanosine diphosphate
<b>GEF</b>	Guanosine exchange factor
<b>GIP</b>	Gastric inhibitory polypeptide
<b>GH-RH</b>	Growth hormone-releasing hormone
<b>GLPR</b>	Glucagons-like peptide receptor
<b>GMP</b>	Guanosine monophosphate
<b>GPCR</b>	G protein-coupled receptor
<b>GIRK</b>	Canaux à courant potassique rectifiant activé par les protéines G
<b>GRK</b>	G-protein receptor kinases
<b>GrDG</b>	Granule cell layer of the dentate gyrus
<b>GRP</b>	G-protein coupled receptor phosphatase
<b>GTP</b>	Guanosine triphosphate
<b>Hip</b>	Hippocampus
<b>hsp</b>	Heat-shock protein
<b>Lep</b>	Leptomeninge
<b>LPC</b>	Lysophosphatidylcholine
<b>LTB<sub>4</sub></b>	Leucotriène B <sub>4</sub>
<b>5-HT</b>	5-hydroxytryptamine
<b>IL</b>	Interleukine
<b>iNOS</b>	Inducible nitric oxide synthase
<b>ip</b>	Intrapéritonéale
<b>IRAK</b>	Interleukin-1 receptor-associated kinase
<b>IRF</b>	Interferon-regulatory factor
<b>K<sup>+</sup></b>	Potassium
<b>KO</b>	Knock-out
<b>LBP</b>	Lippopolysaccharide-binding protein
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide
<b>LPA</b>	Acide lysophosphatidique
<b>LV</b>	Lateral ventricle.
<b>MAPK</b>	Mitogen-associated protein kinase

<b>mGluR</b>	Glutamate receptor
<b>MoDG</b>	Molecular layer of the dentate gyrus
<b>MyD88</b>	Myeloid differentiation primary response gene 88
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Nuclear factor $\kappa$ B
<b>PACAP</b>	Pituitary adenylate cyclase activating peptide
<b>PAF</b>	Platelet-activating factor
<b>PAMPs</b>	Pathogen-associated molecular patterns
<b>PDE</b>	Phosphodiesterase
<b>PI</b>	Phosphatidylinositol
<b>PI3K</b>	Phosphatidylinositol 3-kinases
<b>PIP<sub>2</sub></b>	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
<b>PLC</b>	Phospholipase C
<b>PoDG</b>	Polymorphic layer of the dentate gyrus
<b>POMC</b>	Peptides dérivés de la pro-opiomélanocortine
<b>PTH</b>	Parathyroid hormone
<b>PTH-RP</b>	Parathyroid hormone-related peptide
<b>R7TM</b>	Récepteur à sept domaines transmembranaires
<b>RGS</b>	Regulator of G proteins signalling
<b>RP</b>	Red pulp
<b>SNC</b>	Système nerveux central
<b>SP1</b>	Sphingosine 1-phosphate
<b>SPC</b>	Sphingosylphosphatidylcholine
<b>TAS1</b>	Taste receptor 1
<b>Tha</b>	Thalamus
<b>TM</b>	Transmembranaire
<b>TNF</b>	Tumor necrosis factor
<b>TLR</b>	Toll-like receptor
<b>VDCC</b>	Voltage-dependent calcium channel
<b>VIP</b>	Vasoactive intestinal peptide
<b>WP</b>	White pulp.

# CHAPITRE I

## INTRODUCTION

On a longtemps considéré que la barrière hémato-encéphalique restreignait les dialogues entre le système nerveux central et le système immunitaire. Pourtant, le cerveau peut être le siège d'une robuste réaction inflammatoire. Cette réponse, initiée à partir des structures dépourvues d'une protection de la barrière hémato-encéphalique et du réseau microvasculaire cérébral, s'étend progressivement à l'ensemble du cerveau au cours de l'infection systémique. Les interactions entre les différentes populations de cellules immunitaires, les neurones et les cellules gliales du système nerveux sont complexes et restent encore à être élucidées. Différents types de macrophages résident à l'intérieur du SNC, notamment la microglie et les cellules périvasculaires. Ces phagocytes mononucléaires agissent en tant que cellules effectrices et jouent des rôles critiques dans les maladies du SNC, telle que la sclérose en plaques. Dans ces cellules activées, la transcription de gènes codant pour des protéines et des médiateurs de la réponse immunitaire innée est fortement stimulée lors de perturbations environnementales. Cette réponse à double tranchant contribue d'une part à la neurodégénération mais, d'autre part, est bénéfique et nécessaire pour protéger et restituer l'homéostasie devant tout envahisseur. De ce fait, l'élucidation des voies de signalisation gouvernant la formation, l'activation et les fonctions biologiques de la microglie est une étape importante qui nous mènera vers une meilleure compréhension des processus neuroinflammatoires, ce qui aidera au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques plus spécifiques et moins dommageables.

Dans le cadre d'un projet d'étude visant à identifier de nouvelles molécules (marqueurs) spécifiques à la microglie chez la souris, notre laboratoire a découvert le gène GPR84 comme étant inductible dans la microglie en réponse à divers stimuli inflammatoires. L'intérêt d'étudier ce nouveau gène, repose sur le fait qu'il code pour une

protéine membranaire et, plus spécifiquement, un récepteur couplé aux protéines G, dont la fonction et le ligand endogène sont inconnus. Essentiellement, les récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs) semblent être des protéines clés dans la transmission de signaux extracellulaires à la cellule. Parce qu'ils sont cruciaux pour l'ensemble des grandes fonctions physiologiques, de nombreux GPCRs connus sont des cibles moléculaires très attrayantes dans le domaine pharmaceutique. Toutefois, le développement de drogues plus efficaces dans le traitement des désordres du CNS requière des études plus approfondies au niveau de la régulation de l'expression, mais aussi dans la caractérisation de nouveaux récepteurs orphelins, dont la fonction et le ligand sont inconnus. La découverte de ces derniers aspects représenterait une clé importante dans le déploiement de nouveaux médicaments plus spécifiques (Wilson 2000) par l'utilisation de ligand ne modulant qu'une seule voie de signalisation.

## **1.1 Généralité, structure et classification des GPCRs**

### **1.1.1 Généralité**

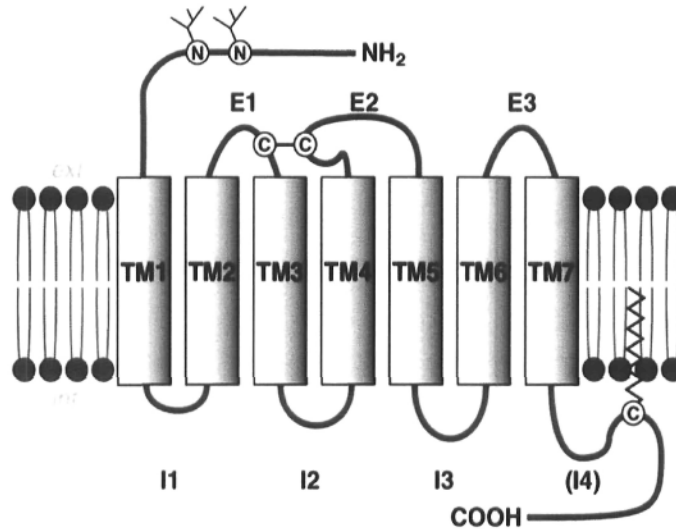
Les réponses biologiques pour lesquelles les GPCRs sont impliqués en général incluent la transmission et la régulation neuronale, l'immunité cellulaire, les réponses sensorielles et tactiles, de même que celles régulant le stress, la croissance et la reproduction. Par ailleurs, le nombre de familles de récepteurs est faible par rapport au nombre de familles de ligands existants. Ainsi, des médiateurs de structures aussi diverses que le calcium, les amines biogéniques, les hormones glycoprotéiques, les neurotransmetteurs, les nucléotides, les lipides, les peptides, les phéromones, les odeurs et les photons possèdent des récepteurs de la même famille, celle des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G (R7TM ou GPCR). Ces récepteurs sont phylogénétiquement très anciens puisqu'ils existent déjà chez les bactéries et ont connu un grand succès évolutif. Jusqu'à aujourd'hui plus de 800 gènes, de la famille des GPCRs ont

été identifiés chez l'humain (Fredriksson et Lagerstrom 2003; Vassilatis 2003). Certains de ces gènes sont dépourvus d'introns, alors que d'autres comprennent de un à une dizaine d'exons (Takeshita *et al.* 1992; Matre *et al.* 1993; Minegishi *et al.* 1993). De plus, la diversité entre leur séquence se reflète par leur patron d'expression, lequel démontre que chaque transcrite à une distribution unique. Cette diversité entre les séquences géniques et la distribution se reflète hautement dans le SNC, qui de plus dispose manifestement de la majorité de ces récepteurs (Menalas et Davies 2002). Notamment, environ 1,5% du nombre total des gènes de notre espèce codent pour ces récepteurs, et de ce nombre plus de 90% sont exprimés dans le cerveau (Vassilatis 2003). Il s'agit en effet de la plus grande superfamille de protéines chez les vertébrés (Menalas et Davies 2002; Combarous 2004; Wettschureck 2005).

Les mécanismes moléculaires de couplage fonctionnel des RT7M à des enzymes membranaires ou sous-membranaires sont similaires et impliquent des protéines G hétérotrimériques sous-membranaires. C'est d'ailleurs pourquoi les RT7M sont aussi appelés GPCR (*G protein-Coupled Receptor*). Ces protéines et leurs effecteurs forment des complexes macromoléculaires efficaces dans l'établissement de voies de signalisation sensibles et spécifiques.

### 1.1.2 Structure et classification

Les GPCRs sont des protéines monomériques et intramembranaires de quelques centaines d'acides aminés (300 à 1200 résidus environ) dont la caractéristique majeure est leur organisation en sept segments hydrophobes transmembranaires (TM1 à TM7, fig.1) connectés par des boucles, alternativement, extra- (E1, E2 et E3) et intracellulaires (I1, I2 et I3). Les boucles E1 et E2 sont généralement connectées entre elles par un pont disulfure entre des cystéines sur chacune d'elles. L'extrémité amino-terminale (N-terminale) est extracellulaire alors que l'extrémité carboxy-terminale (C-terminale) est intracellulaire. La longueur de ces extrémités, de même que celle des boucles, varie selon le récepteur.



**Figure 1.** Structure typique des GPCRs. Les sept domaines sont transmembranaires. On peut observer 3 boucles extracellulaires (nommées E1, E2 et E3) et 3 boucles intracellulaires (I1, I2 et I3). Ces protéines peuvent être sujettes à des modifications post-traductionnelles, de type N-glycosylation (acylation par des composés lipidiques formant parfois une pseudo-quatrième boucle intracellulaire) (I4). Il y a formation de ponts disulfures entre les chaînes latérales de 2 résidus de cystéine des E1 et E2.

Selon leur homologie de séquence et la nature de leurs ligands, les GPCRs sont classés en plusieurs familles et sous-familles. Chez les vertébrés, les GPCRs clonés peuvent être répartis en 5 classes (Wess 1996; Hermans 2003; Elefsinioti *et al.* 2004), dont les plus connues sont la classe A et B. Le site de liaison et le mode d'activation ou encore le couplage aux protéines G des récepteurs des classes D, E et F reste encore à confirmer pour la plupart d'entre eux.

**La classe A** regroupe 90% des GPCRs et sont tous apparentés au récepteur de la rhodopsine (molécule nécessaire au processus de captation de la lumière présente dans les cellules photoréceptrices de la rétine), le premier à être cloné et le seul dont on connaît la structure exacte. Cette famille est connue sous l'appellation *rhodopsin-like family* et est de loin la mieux étudiée. Le seul acide aminé conservé chez tous les membres de cette classe est une arginine présente généralement dans la séquence Asp-Arg-Tyr (DRY) à l'extrémité cytoplasmique du troisième segment transmembranaire. On pense de plus que cet arginine



serait essentiel pour former les interactions intramoléculaires qui contraignent les récepteurs dans leur conformation inactive ou activée (Rosenkilde *et al.* 2005). Le motif DRY est ainsi impliqué autant dans la structure dynamique du récepteur qui mène à une conformation active, que dans le couplage des protéines G (Cohen *et al.* 1993; Rasmusson 1999). En effet, les nombreuses études de mutagenèse ont prouvé que la chaîne latérale de résidus aspartate règle l'activation de récepteur et de la signalisation des protéines G (Scheer *et al.* 1996; Wess 1998; Ballesteros *et al.* 2001). De ces trois résidus, la tyrosine est la moins conservée (67%) (Mirzadegan *et al.* 2003) et n'est généralement pas importante pour la fonction du récepteur (Wess 1998). De plus, des modifications post-traductionnelles, comme la N-glycosylation et la palmitoylation C-terminale, sont aussi des points importants pour le mécanisme d'activation de cette classe (Richard *et al.* 2004). L'extrémité N-terminale est quant à elle relativement courte (Richard *et al.* 2004). Cette famille est classée par sous-familles, tel qu'illustré dans le tableau 1, selon la structure du site de liaison. Ces récepteurs de petits ligands endogènes possèdent un site de liaison profondément enfoui dans l'épaisseur de la membrane plasmique et limité par le troisième domaine transmembranaire.

**La classe B** rassemble les récepteurs de certaines hormones peptidiques, ainsi que ceux pour l'hormone diurétique, auxquels se rattachent les récepteurs de type EGF-TM7 récemment identifiés (Mcknight et Gordon 1996). Le motif DRY est absent dans cette famille qui, par contre, possède une région extracellulaire N-terminale d'environ 100 acides aminés contenant plusieurs cystéines formant probablement un ensemble complexe de ponts disulfures. Le domaine de liaison ne semble pas impliquer de cavité du corps central, mais exclusivement les domaines extracellulaires (domaine N-terminal et boucles extracellulaires). Typiquement, ces récepteurs peuvent se lier à plus d'une protéine G et leurs fonctions physiologiques sont généralement inconnues.

**La classe C**, la moins représentée, est composée des huit sous-types de récepteurs métabotropiques de l'acide glutamique associés au récepteur des glandes parathyroïdes, le

récepteur sensible aux ions  $\text{Ca}^{2+}$  et celui de l'acide g-aminobutyrique ou GABA-B (Kaupmann *et al.* 1997). Bien que leurs ligands soient généralement de petites tailles, la famille III est identifiée par d'énormes domaines extracellulaires (>500 acides aminés). Quelques études suggèrent que la présence de protéine G n'est pas toujours nécessaire pour le recrutement de molécules signalétiques à certain récepteur de ce groupe (Kunishima *et al.* 2000). En effet, la présence d'un domaine intracellulaire riche en proline permettrait l'interaction directe via des protéines contenant un motif SH2/SH3.

La classe D, E et F comprend les récepteurs de phéromones, de l'AMPC (bactéries) et les récepteurs *Frizzled* de Wnt et *Smoothed* de Hedgehog respectivement. À titre d'information, les protéines sécrétées des familles Hedgehog et Wnt/Wingless interviennent dans l'induction et l'organisation de nombreux tissus au cours de l'embryogenèse.

Le Tableau suivant présente la classification des différentes familles de GPCRs en fonction de leurs ligands respectifs.

**Tableau 1.** Classification des GPCRs en fonctions de leur séquence primaire et du site de liaison chez les mammifères.

CLASSE	SOUS-CLASSE	LIGAND/RÉCEPTEUR
A) Récepteur de la rhodopsine	Amines	Acétylcholine
		Adrénaline
		Catécholamine,
		Histamine
Mélatonine		
Noradrénaline		
Dopamine		
$\beta$ -Phényléthylamine		
Octopamine		
Sérotonine		
Tryptamine		
Tyramine		
	Nucléosides	Adénosine
	Nucléotides	ATP, ADP, UTP, UDP
	Lipides	LPA, SIP, SPC

		Leukotriène
CLASSE	SOUS-CLASSE	LIGAND/RÉCEPTEUR
	Lipides (suites)	Platelet Activating Factor Prostaglandines Thromboxane A2 Cannabinoïdes: anandamine, 2-arachidonoyl-glycérol
	Peptides endogènes	Adrénomédulline Amyline Angiotensine II Apéline, Bradykinine Cholécystokinine Endothéline Galanine, Kallidine Mélanocortine, Motiline Neurokine B Neuromédine B, N, U Neuropeptide AF, FF, Y, YY Neurotensine Nociceptine Ocytocine , Oréxine A, B POMC Somatostatine  Molécules olfactives Molécules gustatives Opsines: bleues, vertes, rouges
	Composés de l'immunité	Chimiokines Anaphylatoxines C3a et C5a Peptides N-formylés Antigène Duffy Sécrétagogues de la GH Hormones protéiques Récepteurs viraux
<b>B) Récepteur sécrétion /adhésion</b>	Peptides endogènes	Calcitonine CRF GH-RH GIP Glucagon et GLPR PACAP

**Tableau 1.** Classification des GPCRs en fonctions de leur séquence primaire et du site de liaison chez les mammifères (suite).

CLASSE	SOUS-CLASSE	LIGAND/RÉCEPTEUR
<b>B) Récepteur sécrétion /adhésion (suite)</b>	EGF-TM7	PTH et PTH-RP Sécrétine Vasopressine VIP Urotensine II F4/80 EMR2 et EMR3 CD97 Cadhérine <i>EGF LAG seven- pass-G-type receptor</i> Lectomédine Latrophiline BAI
<b>C) Récepteur du glutamate</b>	Métabotropiques	Methuselah-like proteins (MTH) (drosophile) Acide glutamique Récepteurs GABA-B Calcium TAS1
<b>D) Récepteurs des phéromones</b>		Phéromones
<b>E) Récepteurs impliqués dans l'embyogénèse</b>		<i>Frizzle</i> de Wnt <i>Smoothened</i> de Hedgehog

Offermans S, 2003; Vassilatis Dk, 2003; Wettschurck N and Offermanns S, 2005

Finalement, la dernière catégorie rassemble les GPCRs dits "orphelins", ceux dont on ignore encore le ligand endogène et la fonction. Jusqu'ici, près de 200 GPCRs orphelins, excluant les récepteurs olfactifs, ont été découverts (Bresnick 2003; Menalas et Davies 2002). Habituellement, l'étendue des connaissances concernant l'homologie des séquences et des sites de liaison est insuffisante pour assigner ces récepteurs dans un des sous-groupes des principales familles. Toutefois, le criblage traditionnel de molécules pour les GPCRs a permis d'utiliser de petites molécules qui interfèrent avec le site liaison du ligand naturel et par conséquent de leur assigner une catégorie.

## 1.2 Les protéines G

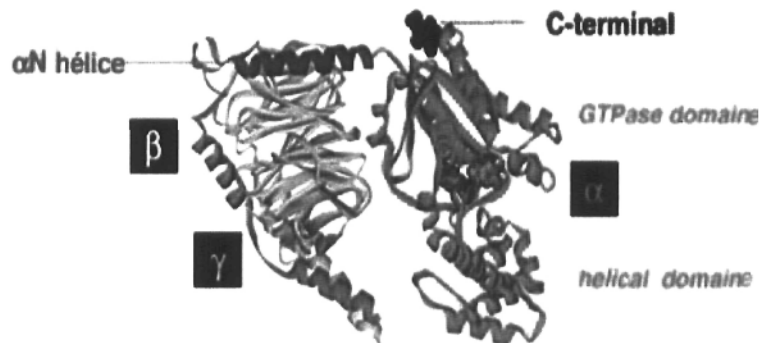
### 1.2.1 Caractéristiques structurales

Les GPCRs agissent par l'intermédiaire des protéines G. De ce fait, ces protéines appartiennent au vaste groupe des GTPases et sont ainsi dénommées car l'équilibre de leur état inactif/actif dépend de leur liaison au GDP ou au GTP respectivement. Les protéines G hétérotrimériques sont constituées des sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  associées entre elles de manière non-covalente en absence de signal. Les poids moléculaires de chacune d'elles sont respectivement d'environ 40-50 KD, 35 KD et 8 KD (Iyengar et Birnbaumer 1990). La combinatoire des isoformes possibles de ces trois sous unités détermine une variante très importante en protéines G, qui n'est toutefois pas aléatoire, car chaque type de sous-unités  $\alpha$  s'associe exclusivement avec certains types de sous-unités  $\beta\gamma$ . Cependant, en général, une protéine G  $\alpha$  s'associe à plusieurs couples  $G\beta\gamma$  différents (Assié 2004). L'expression de la plupart des sous-unités de protéine G est ubiquitaire. Quelques exceptions sont à signaler; il existe des protéines G spécifiquement exprimées dans le cerveau ( $\beta_5$ ,  $\gamma_3$  et  $\gamma_5$ ), d'autres dans les cellules hématopoïétiques ( $\alpha_{15}$ ) (Downes 1999).

Ainsi, les sous-unités  $\alpha$  interagissent non seulement avec le complexe formé des sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$ , mais également avec leur récepteur respectif et leurs effecteurs spécifiques (Combarous 2004; Hermans 2003). Pour certaines sous-unités  $\alpha$ , la myristoylation de leur glycine N-terminale (ou encore une palmitoylation sur le même site s'il ne s'agit pas d'une glycine) entraîne leur interaction irréversible avec la membrane plasmique et augmente par le fait même leur hydrophobicité (Milligan 1995 et 2006). Cet ajout d'acide myristique permet l'ancrage direct de ces sous-unités  $\alpha$  dans la membrane, près du site d'ancrage lipidique de la sous-unité  $\gamma$ , et offre une plus grande probabilité d'association avec le complexe  $G\beta\gamma$ . Le domaine N-terminal de  $G\alpha$  est considéré comme essentiel pour qu'il y ait association au complexe  $G\beta\gamma$ , et son acylation serait de plus

cruciale pour l'interaction entre la protéine G et le récepteur activé (Hermans *et al.* 2006). C'est la région C-terminale des sous-unités  $\alpha$  qui est responsable, une fois les protéines G ancrées, de la reconnaissance spécifique du récepteur et des effecteurs (Gudermann *et al.* 1997; Mody *et al.* 2000). Les sous-unités  $\alpha$  présentent deux domaines distincts très conservés entre lesquels se trouve le site actif d'interaction avec le GDP/GTP. Sous l'activation du récepteur, la liaison du GTP ainsi échangé provoque la dissociation de  $G\alpha$  du complexe  $G\beta\gamma$  (figure 3). La sous-unité  $G\alpha$ -GTP est rapidement dépalmitoylée par une palmitoyléstérase cytosolique et est alors transférée au cytosol. Les deux nouveaux complexes, GTP- $G\alpha$  et  $G\beta\gamma$  peuvent alors interagir individuellement avec les effecteurs intracellulaires ou membranaires. Après l'hydrolyse du GTP en GDP,  $G\alpha$  est recruté par  $G\beta\gamma$ , retourne à la membrane plasmique et devient inactive (Wedegatner et Bourne 1994).

De leur côté, les sous-unités  $\gamma$  sont ancrées à la membrane plasmique de manière stable et elles sont étroitement associées aux sous-unités  $\beta$  par leurs extrémités N-terminales et ne se dissocient jamais en conditions physiologiques. La sous-unité  $\beta$  présente de nombreuses surfaces d'interactions avec les effecteurs, au-dessus, au-dessous et sur ses rebords. Bien qu'on ait considéré à l'origine que le profil d'hydrophobicité du complexe  $\beta/\gamma$  pouvait être suffisant pour son association à la membrane sans qu'aucun changement post-traductionnel ne surviennent, le clivage de 3 acides aminés du segment C-terminal par des peptidases et la carboxyméthylation de la cystéine C-terminale complète la maturation de la sous-unité  $\gamma$ .



*Tiré et adapté: Milligan Graeme et Evi Kostenis, Br J Pharmacol. 2006*

**Figure 2.** Les sites d'interaction entre les sous-unités  $G\alpha$ ,  $G\beta/\gamma$  et le récepteur. La sous-unité  $\alpha$  est représentée en vert, la sous-unité  $\beta$  en jaune et  $\gamma$  en orange. L'hélice N-terminal ( $\alpha N$ ) de la sous-unité  $\alpha$  (rouge) interagit avec le complexe  $\beta/\gamma$ , alors que son extrémité C-terminal (bleu) est la région de contact avec le récepteur. Dans le cas du complexe hétérotrimérique  $G_{i1}$ ,  $\beta_1$ ,  $\gamma_2$ , par exemple, à l'état inactivé, la molécule de GDP est enfouie entre le GTPase et le domaine hélicoïdal de  $G\alpha$ .

### 1.2.2 Classification

La diversité fonctionnelle du système de signalisation médiée par les protéines G est basée sur le fait qu'il existe de nombreux sous-types des protéines G étroitement apparentées (Morris and Malbon 1999; Hermans 2003; Wettschureck and Offermanns, 2005). Jusqu'à maintenant, pas moins de 23 sous-unités  $\alpha$  dérivées de 17 gènes différents ont été identifiées et réparties à l'intérieur de quatre grandes familles sur la base de leur homologie de séquence et de leur spécialité fonctionnelle :  $G\alpha_{i/o}$ ,  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_{q/11}$ ,  $G\alpha_{12}$  (voir tableau 2). Concernant les sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$ , respectivement 5 et 12 molécules différentes ont été décrites (Vanderbeld et Kelly 2000; Milligan 2006). Il peut de plus y avoir un certain nombre de combinaisons possibles lorsqu'elles s'associent entre elles. Pareillement résumée dans le tableau 2, une grande variété d'effecteurs membranaires et intracellulaires pour les protéines G a été identifiée et cette liste continue de s'élargir. La nature de la protéine G impliquée dans le couplage est probablement critique pour moduler l'efficacité et le pouvoir de la signalisation cellulaire. À l'intérieur d'une classe de protéines G, le sous-type impliqué dans la transduction du signal du récepteur à l'effecteur, dépendra en outre de la disponibilité en protéines G à proximité du récepteur qui peut alors différer d'une cellule à l'autre (Milligan 1995, Ostrom *et al.* 2000).

**Tableau 2.** Principales sous-unités de protéines G et leurs effecteurs primaires chez les mammifères.

Famille	Principales sous-types	Effecteur primaire
$\alpha_s$	$G\alpha_s$ , $G\alpha_{sXL}$ , $G\alpha_{olf}$	Adénylate cyclase $\uparrow$ , Rap1GEF
$\alpha_{i/o}$	$G\alpha_{i-1}$ , $G\alpha_{i-2}$ , $G\alpha_{i-3}$ $G\alpha_{0A}$ , $G\alpha_{0B}$ $G\alpha_{11}$ , $G\alpha_{12}$ $G\alpha_z$ , $G\alpha_{gus}$	Adénylate cyclase $\downarrow$ , Rap1GAG VDCC $\downarrow$ , Canaux $K^+$ $\uparrow$ , GIRK $\uparrow$ , Canaux $Ca^{2+}$ $\downarrow$ , PDE 6 c Adénylate cyclase $\downarrow$ , cGMP, Phosphodiesterase $\uparrow$
$\alpha_{q11}$	$G\alpha_q$ , $G\alpha_{11}$ , $G\alpha_{14}$ , $G\alpha_{15}$ , $G\alpha_{16}$	PLC ( $\beta$ 1-4) $\uparrow$ , $Ca^{2+}$ $\uparrow$ , MAPK, RalA, Pyk2, Ras
$\alpha_{12/13}$	$G\alpha_{12}$ , $G\alpha_{13}$	PLA <sub>2</sub> $\uparrow$ , échangeur de $Na^+$ , PDZ-RhoGEF (Rho, Rac, cdc42), p115-RhoGEF $\uparrow$ , GAP1, HSP90, c- jun, NH2-terminale kinase,
$\beta_{1-5(6)}$ $\gamma_{1-13}$	Différents assemblages des sous- unités $\beta$ et $\gamma$	Adénylate cyclase I $\downarrow$ , II, IV, VII $\uparrow$ Phospholipase C $\uparrow$ PI3-kinase $\uparrow$ Protéine kinase C, D $\uparrow$ GIRK 1-4 $\uparrow$ Canaux $Ca^{2+}$ $\downarrow$ , $K^+$ $\uparrow$ Src kinases $\uparrow$ , p114-RhoGEF $\uparrow$

Hermans 2003; Pangalos et Menelas 2002; Wettschureck et Offermanns 2005; Bhattacharya 2004.

### 1.2.3 Récepteurs à sept domaines transmembranaires indépendants des protéines G

La transduction du signal des GPCRs n'est pas exclusivement due à l'action des protéines G (Kristiansen 2004). En fait, les récepteurs peuvent stimuler certaines cellules par d'autres voies de signalisation qui passent par des interactions directes avec diverses protéines d'échafaudages. Ces dernières sont classées en trois catégories: les protéines à domaine PDZ (PSD95, NHERF), celles sans domaine PDZ (Homer, JAK2/Stat3) et enfin la portion cytoplasmique des récepteurs à activité tyrosine kinase par l'intermédiaire de la  $\beta$ -arrestine/SHC ou de Grb2 associées, qui interagissent majoritairement avec la troisième



boucle intracellulaire des récepteurs transmembranaires (Heuss et Gerber 2000). Les domaines PDZ sont des domaines protéiques d'environ 90 résidus dont la fonction est de reconnaître principalement un motif consensus de cinq acides aminés situé dans la portion C-terminale de certaines protéines (Hall RA, 1998). Les protéines de la famille Homer (sans domaine PDZ) contiennent un domaine N-terminal d'interaction avec certains récepteurs métabotropiques du glutamate; elles sont des éléments essentiels pour la localisation subcellulaire et l'activation de ces récepteurs (Bockaert *et al.* 2003).

Également, certaines protéines G peuvent transduire un signal en absence de son récepteur. En effet, une découverte récente implique une classe additionnelle de protéines accessoires activatrices, les AGS (*Activators of G protein Signaling*). Elles peuvent réguler directement l'activation des protéines G en absence de leur association avec le GPCR (Blumer et Lanier 2003; Sato 2006). Ainsi, elles peuvent influencer la dissociation du GDP et exécuter l'échange de GTP à la sous-unité  $G\alpha$  ou encore favoriser la dissociation de complexes  $G\beta\gamma$  de  $G\alpha$  afin qu'il puisse activer l'effecteur correspondant. Alternativement, les AGS peuvent également empêcher le transfert du signal du récepteur aux protéines G. Ainsi, en s'associant avec le GPCR, elles entrent en compétition avec les protéines G pour la liaison au récepteur (Sato 2006). Toutefois, le mécanisme d'intégration de ces protéines à l'intérieur des systèmes de signalisation récepteur-protéines G et le type stimuli qui les activent restent à être déterminés.

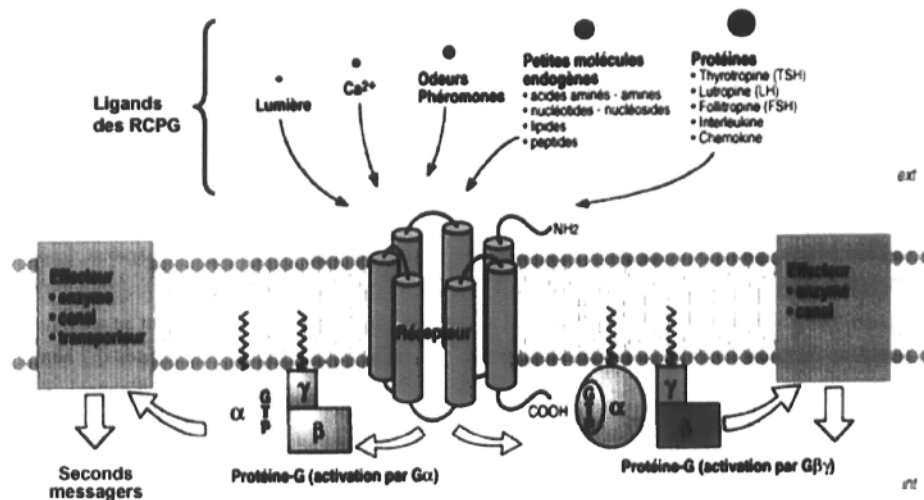
### 1.3. Mécanismes d'activation des GPCRs

Durant les dernières années, des études portant sur l'élucidation des mécanismes de liaison et d'activation ont permis de mieux comprendre les changements conformationnels des GPCRs et leur organisation au travers de la membrane plasmique (Gether 2000; Hubbell et al. 2000). Ces connaissances ont permis de développer un modèle de structure tertiaire général s'appliquant à tous les GPCRs (Ballesteros et Weinstein 1995; Baldwin et

al. 1997) qui permet de les étudier.

### 1.3.1 La liaison ligand-récepteur

Concernant l'architecture tridimensionnelle du GPCR, les sept hélices adoptent une disposition particulière en barillet autour d'un axe central délimitant une cavité du côté extracellulaire, plus ou moins profonde selon le récepteur, et qui fait partie du site de liaison aux agonistes (Figure 3). Les récepteurs de petits ligands endogènes possèdent un site de liaison profondément enfoui dans l'épaisseur de la membrane plasmique et limité par le troisième domaine transmembranaire (Assié 2004). En utilisant la spectroscopie d'absorbance, Lin et Sakmar (1996) ont été en mesure de fournir les premières évidences directes que la photoactivation, pour un récepteur rhodopsine, induisait un mouvement relatif des segments TM3 et TM6. D'autres études biophysiques et un ensemble de différentes approches indirectes ont fourni l'évidence des mouvements de TM3 et TM6 lors de l'activation du récepteur par l'agoniste (Menalas et Davies 2002). L'activation d'un GPCR implique donc d'importants changements tridimensionnels permettant plus aisément au récepteur de subir une conversion de son état inactif à actif.



**Figure 3.** L'activation d'un GPCR par son ligand entraîne un remaniement de la structure du récepteur, qui est ensuite capable d'activer les protéines G intracellulaires qui activent à leur tour toute une série d'effecteurs intracellulaires (enzymes, canaux ioniques,

transporteurs, etc.) ou membranaires (comme représenté). Ces effecteurs permettent, la plupart du temps, la modulation la concentration intracellulaire de seconds messagers.

### 1.3.2 Oligomérisation

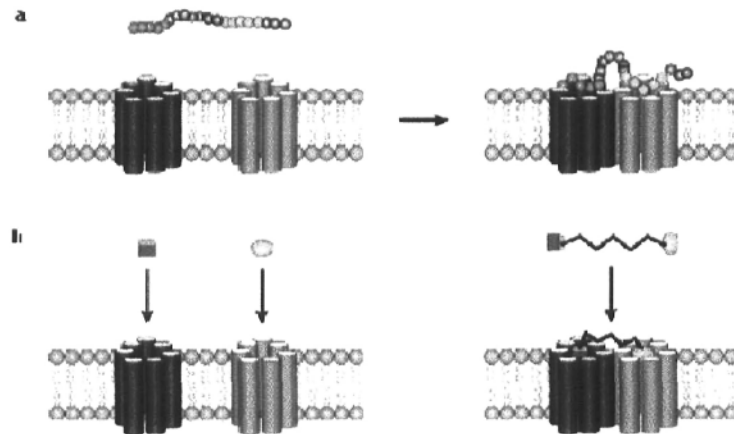
Initialement, on croyait que les GPCRs existaient sous forme de monomères. Mais, depuis le milieu des années 1990, de nombreuses publications ont successivement démontrées que l'oligomérisation peut se produire pour une grande partie des GPCRs. Ces complexes homodimériques ou hétérodimériques proposent l'existence de multiples sites de liaison dans une population donnée de récepteurs, ce qui permet d'augmenter le potentiel de transmission du signal, qui dépend de la concentration de l'agoniste et de la disponibilité en récepteur (Bouvier 2002; George *et al.* 2002; Milligan 2006).

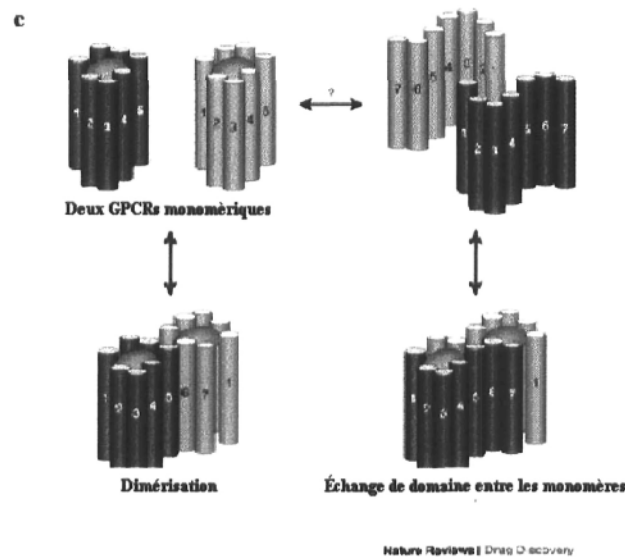
Dans le modèle traditionnel de transduction du signal, l'amplification était généralement au niveau des protéines G ou des effecteurs et non pas au niveau du récepteur lui-même. Cependant, l'oligomérisation serait un moyen d'amplifier le signal par l'activation momentanément de plusieurs récepteurs. Par exemple, des études de cristallographie du récepteur glutamate métabotrophique ont révélé non seulement que le récepteur existe sous forme de dimère, mais que cette dimérisation jouerait probablement un rôle important dans le mécanisme d'activation (Kunishima *et al.* 2000). D'autres publications au sujet de cette même famille démontrent, par exemple, que la formation du complexe hétérodimérique GABA<sub>B</sub> R1 et R2 est pré-requise pour l'expression d'un récepteur fonctionnel à la surface cellulaire (Bouvier 2001). Spécifiquement, l'un requiert la présence de l'autre; autrement dit, si GABA<sub>B</sub> R2 est exprimé seul à la surface cellulaire, il ne peut lier le ligand (Bouvier 2001). Cela a été confirmé lors de travaux démontrant que le ligand se lie à GABA<sub>B</sub> R1, mais que la transmission du signal aux protéines G se produisait que par l'entremise de R2 (Calver *et al.* 2001; Robbins *et al.* 2001; Duthey *et al.* 2001).

La pertinence de la compréhension de ce mécanisme a également été démontrée pour le récepteur orphelin GPR50 qui inhibe la fonction du récepteur MT<sub>1</sub> de la mélatonine par hétérodimérisation (Levoye 2006). Le récepteur GPR50 se dimérise constitutivement

avec d'autres GPCRs de manière spécifique. De façon intéressante, l'engagement du GPR50 avec  $MT_1$  a de profondes conséquences sur la fonction de  $MT_1$ , à savoir l'inhibition des sites de liaison pour l'agoniste, le couplage des protéines G hétérotrimériques et la fixation des  $\beta$ -arrestines (Levoye 2006). Il est à noter que l'expression du récepteur de la mélatonine, un GPCR, a été observée dans les macrophages péritonéaux (Garcia-Perganeda *et al.* 1999). Un autre exemple, le récepteur de chimiokines CCR5 et celui des opioïdes. Ensemble, ils forment un hétérodimère qui contribuerait à leur trans-désensibilisation. La trans-désensibilisation entre ces deux GPCRs se produirait dans les cellules immunitaires et dans le système nerveux central (Susuki *et al.* 2002; Chen *et al.* 2004).

La dynamique et la régulation de la formation des oligomères de GPCRs est encore obscure. Une question actuelle est de savoir si la liaison de l'agoniste favorise l'association ou la dissociation du complexe dimérique, ou encore si la liaison se produit avec des oligomères préformés, et provoquant un changement conformationnel (George *et al.* 2002). Selon certains auteurs, l'oligomérisation semble être un événement précoce survenant lors du transport des GPCRs à la membrane (George *et al.* 2002).





Tiré et adapté : George R. Susan, nature 2002

**Figure 4.** Représentation schématique du ligand induisant une hétérodimérisation. Un peptide bivalent avec deux sites de reconnaissance pour des récepteurs distincts pourrait réunir les récepteurs simultanément et inciter les récepteurs à la dimérisation. Si les deux récepteurs préexistent en tant qu'oligomère, le ligand pourrait améliorer la conformation hétéromérique par liaison des deux récepteurs (a). Similairement, un ligand dimérique avec liaison appropriée pourrait inciter ou améliorer la dimérisation de deux récepteurs. Il est plausible que les ligands homodimères et hétérodimères pourraient de manière sélective assembler des récepteurs hétéromériques et homomériques (b). Les GPCRs de la famille A pourraient interagir entre eux pour former des oligomères. Pour ce faire, les GPCRs pourraient aussi participer à un processus d'échange de domaines (c).

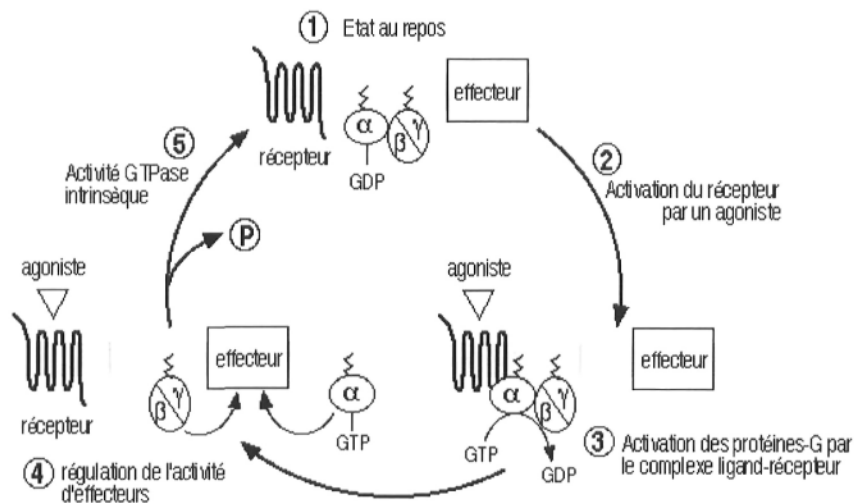
### 1.3.3 Le couplage et l'activation des protéines G hétérotrimériques

La liaison du ligand, les changements conformationnels du récepteur, et dans certains cas la dimérisation du récepteur sont tous préalables au dernier aspect du mécanisme d'activation des GPCRs; c'est-à-dire le couplage et l'activation des protéines G. Une fois activés par l'agoniste, les segments transmembranaires du récepteur interagissent entre eux et la structure tridimensionnelle de leurs régions intracytoplasmiques est conséquemment modifiée, ce qui conduit à l'interaction spécifique du récepteur avec une protéine G (Hermans 2003; Offermans 2003). Ce changement conformationnel du corps central lors de l'activation a été caractérisé par des études biophysiques de la rhodopsine et du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique (Gether *et al.* 1997; Lin et Sakmar 1996; Ward *et al.* 2001). Ces études ont montré la rotation du troisième et du sixième domaine transmembranaire de

30 degrés dans le sens des aiguilles d'une montre (en regardant le récepteur depuis sa face cytoplasmique) lors du passage en conformation active. Il y a alors démasquage du site de liaison des protéines  $G\alpha$  à proximité. Il est probable que d'autres éléments de la molécule se déplacent lors de cette activation. La spécificité d'interaction entre les GPCRs et les différentes protéines G n'est généralement pas absolue, mais relative et peut dépendre du contexte cellulaire, c'est-à-dire de l'assortiment des protéines susceptibles d'entrer dans la constitution d'un complexe multi-moléculaire. Ceci explique d'ailleurs que les GPCRs puissent activer des voies différentes dans des types cellulaires différents ou même dans les mêmes types cellulaires, mais en situations physiologiques différentes. La plupart des récepteurs peuvent activer plus d'un sous-type de protéines G.

Toutes les protéines G sont ainsi de véritables interrupteurs moléculaires des voies de signalisation. En outre, elles régulent l'activité d'une variété d'effecteurs, tels que des enzymes et des canaux ioniques. Leur mécanisme général d'activation repose sur l'échange du GDP pour du GTP, induit suite à l'association de l'agoniste à son récepteur. En effet, il est bien documenté que les GPCRs peuvent mener à l'activation de Ras et de Rho GTPases pour l'échange de ces guanosines. Tel que discuté précédemment, leur activation s'effectue lors d'une réaction d'échange, au niveau de site spécifique de  $G\alpha$ , d'une molécule de GDP par une molécule de GTP (figures 3 et 5) et leur inhibition se fait après l'hydrolyse irréversible du GTP en GPD. Les facteurs qui catalysent les échanges sur les protéines G sont appelés GEF (*GTP/GDP Exchange Factor*) et l'activité GTPase intrinsèque est contrôlée par des protéines régulatrices GAP (*GTPases Activating Protein*) (Siderovski *et al.* 1996; Gudermann *et al.* 1996). Le mécanisme précis de cette interaction reste cependant mal connu, notamment en ce qui concerne la position relative du GPCR et de la sous-unité  $\alpha$  lors de l'interaction. Un modèle d'interaction a été proposé à partir des données de cristallographie de la protéine  $G\alpha$ ; le positionnement de son domaine C terminal dans la crevasse du corps central entraînerait le mouvement d'une hélice  $\alpha$  et d'un feuillet  $\beta$  qui sont à la fois à la périphérie du domaine C-terminal et du site de liaison du GDP. Ce mouvement permettrait la libération du GDP (Assié 2004). L'activité de la sous-unité  $G\alpha$

est très instable, dû au fait que son activité GTPasique est régulée par les régulateurs RGS (*Regulator of G protein signalling*). Les protéines RGS agissent comme des régulateurs négatifs de la signalisation dépendante des protéines G, elles régulent de plus la durée de la signalisation. Elles accélèrent l'activité GTPasique des sous-unités  $G\alpha$ ; c'est-à-dire qu'elles accélèrent de 100 à 1000 fois l'hydrolyse du GTP (pour du GDP) et présentent une spécificité d'action vis-à-vis ces protéines  $G\alpha$ . Cela conduit donc à l'inactivation et à la réassociation des sous-unités  $G\alpha/\beta\gamma$  (Hepler 2003; Combarous 2005). Il existe d'ailleurs 30 protéines de type RGS qui sont actuellement connues et qui ont de la sélectivité pour différents types des sous-familles de protéines G. L'implication des protéines RGS a déjà été rapportée dans la régulation de nombreuses fonctions cellulaires comme la prolifération et la différenciation cellulaire, le développement embryonnaire, la réponse aux neurotransmetteurs ou encore dans le trafic membranaire (De Vries et Farquhar 1999; Wettschureck et Offermanns 2005).



*Tiré et adapté* : Wettschureck et Offermanns, *Physiol Rev* 2005

**Figure 5.** Un GPCR au repos (1) est activé par la liaison d'un agoniste spécifique (2). Le changement de conformation du complexe agoniste-récepteur qui s'en suit permet l'échange du GDP pour du GTP (3) conduisant à une dissociation entre la sous-unité  $G\alpha$  activé d'un côté et le complexe des sous-unités  $G\beta\gamma$  de l'autre côté. Ces sous-unités activent leurs effecteurs respectifs (4) membranaires ou cytosoliques. Le déclenchement de l'activité GTPase intrinsèque à la sous-unité  $G\alpha$  enclenche l'hydrolyse du GTP en GDP et entraîne la reconstitution du complexe hétérotrimérique ( $G\alpha/\beta\gamma$ ) (5) et le retour à la phase initiale (1).

## 1.4 Signalisation intracellulaire des GPCRs

### 1.4.1 Via les cascades enzymatiques

Les récepteurs à sept domaines transmembranaires présentent de grandes similitudes dans leurs voies de signalisation intracellulaires, dont celle la plus connue conduisant à l'augmentation de la concentration du second messenger intracellulaire, AMPc. D'autres voies conduisent à la production de deux autres seconds messagers, le diacylglycérol (DAG) et l'inositol 1, 4, 5 triphosphate (IP3), de même qu'à l'intervention d'un "troisième" messenger, le calcium.

#### 1.4.1.1 Voie de l'AMP cyclique

Ce système est le mieux connu. Il est à la base de l'élaboration du concept de second messenger intracellulaire et c'est celui qui est utilisé par un nombre considérable de médiateurs. La synthèse d'AMPc par la conversion de l'adénosine triphosphate (ATP) est catalysée par l'adénylate cyclase (ou adényl cyclase) dont l'activité est essentiellement contrôlée par les protéines  $G_s$  et  $G_i$  ( $G_{stimulatrice}$  et  $G_{inhibitrice}$ ). L'adénylate cyclase est une enzyme transmembranaire dont 9 isoformes ont été décrites chez les mammifères (Hanoune et Defer 2001). Le premier et le deuxième segments cytoplasmiques de cette enzyme forment un site capable de lier l'ATP et de catalyser la conversion d'ATP en AMPc. L'AMPc régule différentes activités cellulaires par son habileté à lier et stimuler la protéine kinase A (PKA) (Francis et Corbin 1999; Combarrous 2004).

##### 1.4.1.1.1 La protéine kinase A

La PKA est un hétérotétramère constitué de deux sous-unités régulatrices et de deux unités catalytiques. Deux isoformes ont été décrites, la PKA-I et la PKA-II, chacune possédant 2 isoformes de sous-unités  $RI\alpha$ ,  $RI\beta$ ,  $RII\alpha$  ou  $RII\beta$ . Ces sous-unités régulatrices



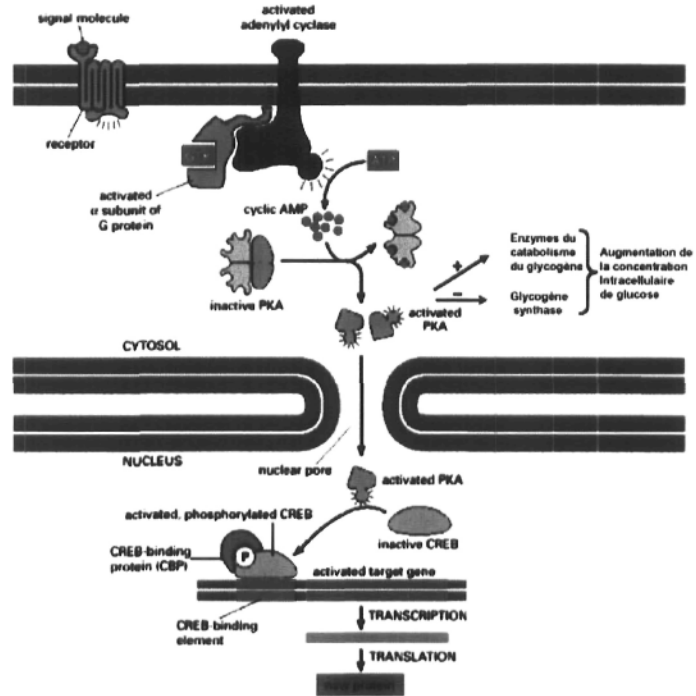
contiennent en particulier deux sites de liaison à l'AMPc. L'activation de la PKA par quatre molécules d'AMPc peut être schématisée classiquement en distinguant plusieurs étapes (Taylor SS, 1990). Premièrement, il y a liaison de deux molécules d'AMPc aux sites C-terminaux des sous-unités régulatrices de la PKA (seuls sites accessibles), ce qui entraîne un changement de conformation rendant accessibles les sites A. Deuxièmement, deux molécules supplémentaires d'AMPc se lient aux sites A des sous-unités régulatrices. Ces liaisons entraînent la libération des sous-unités de la PKA et son expédition vers leurs cibles. Les cibles pour lesquelles un site de phosphorylation par la PKA a été identifié sont nombreuses (Shabb 2001). On peut notamment distinguer les facteurs de transcription appartenant aux familles du facteur CREB et SF-1, de même que certaines histones (H1c, H3) et les cibles extranucléaires appartenant aux voies de signalisation de l'AMPc, de la phosphodiesterase spécifique de l'AMPc (PDE4D3), des phosphoinositols, du calcium et des voies des MAP-kinases.

#### 1.4.1.1.2 Régulation de la transcription (CREB)

L'AMPc agit principalement en contrôlant la biosynthèse de protéines spécifiques au niveau de la transcription. C'est au travers de la phosphorylation de facteurs de transcription que s'effectuent ces contrôles. Des travaux effectués sur les promoteurs de gènes, dont l'expression est stimulée par la voie de l'AMPc, ont permis de mettre en évidence une séquence consensus jouant un rôle clé (Montminy *et al.* 1986). Dénommée CRE (élément de réponse à l'AMPc), elle est constituée de la séquence TGACGTCA. Cette caractérisation a permis quelques années plus tard de purifier une protéine de 43 kD liant le CRE, CREB (*cyclic AMP response element binding protein*) (Radhakrishnam *et al.* 1997; Mayr et Montminy 2001). La protéine CREB possède un domaine KID (domaine inductible par les kinases), en région N-terminale, contenant de nombreuses sérines et plus particulièrement la sérine 133 au principal site de phosphorylation de la protéine par la PKA. En région C-terminale, on distingue le domaine basique de liaison à l'ADN. CREB est le prototype d'une famille de facteurs de transcription liant le CRE et partageant une grande homologie structurale et fonctionnelle, comprenant CREM (*cyclic AMP response*

*element modulator* ) et l'ATF-1 (*activating transcription factor 1*) (Mayr et Montminy 2001). L'expression de CREB et d'ATF-1 est reconnue comme étant ubiquitaire, alors que celle de CREM est considérée comme plus spécifique à certains tissus. Le facteur CREB peut se lier à des promoteurs comportant ou pas une boîte TATA ; en revanche, seuls les promoteurs porteurs de la boîte TATA semblent pouvoir être activés après stimulation de la voie de l'AMPc (Conkright *et al.* 2003). De plus, CREB stimule la transcription des gènes par l'intermédiaire d'un coactivateur essentiel, appelé CBP (*CREB binding protein*), auquel il se lie après avoir été phosphorylé par la PKA (Radhakrishnam *et al.* 1997). L'inactivation de la transcription est ensuite observée après déphosphorylation de CREB par des phosphatases.

De très nombreux gènes régulés par des facteurs de la famille CREB ont été répertoriés et codent pour des protéines impliquées dans le métabolisme cellulaire. Il existe par ailleurs des gènes cibles impliqués dans divers signaux endocriniens, nerveux (Assié 2004) et immunitaire (Park *et al.* 2005). Plus précisément, des auteurs ont récemment attribué un rôle clé pour le facteur de transcription CREB dans la maintenance de survie des macrophages (Park *et al.* 2005).



**Figure 6.** Transduction du signal par le biais des protéines G et la voie de l'adénylate cyclase. La sous-unité  $G\alpha$  activée et relâchée s'associe à l'adénylate cyclase et la stimule. L'enzyme catalyse la conversion de l'ATP en AMPc. Il s'ensuit de l'activation de la PKA et de la phosphorylation et activation du facteur de transcription CREB. Ce dernier se lie à son site spécifique sur le promoteur, ce qui stimule la transcription du gène (avec l'aide de son coactivateur CBP).

#### 1.4.1.1.3 Autres voies d'action de l'AMPc

Il est maintenant clair qu'une autre voie d'action de l'AMPc existe, soit l'ouverture et la fermeture de canaux ioniques membranaires. L'AMPc peut moduler les propriétés de certaines protéines par interaction directe. C'est le cas, par exemple, pour les protéines-canaux dites HCN (*Hyperpolarisation-activated Cyclic-Nucleotide modulated Cation Non-selective Channel*); c'est-à-dire les canaux activés par l'hyperpolarisation. Une augmentation de l'AMPc intracellulaire, en réponse aux GPCRs activés, conduit à l'ouverture d'un canal. Ce dernier laisse ainsi entrer les ions chargés à l'intérieur de la cellule, ce qui génère une hyperpolarisation membranaire et, par conséquent, un changement de gradient. Une telle modulation laisse supposer un rôle de l'AMPc dans la génération de rythmes dans le cœur et dans le cerveau. D'autres canaux ioniques peuvent

aussi être activés par l'AMPc, notamment les canaux CNG (*cyclic nucleotide gated channel*) qui sont non sélectifs aux ions. L'activation ou la modulation de ces canaux par l'AMPc se fait via l'interaction d'un domaine de liaison aux nucléotides cycliques situés du côté carboxy-terminal de la protéine canal (HCN).

#### 1.4.1.2 Voies des phosphoinositides

Cette voie est généralement activée par de nombreuses hormones et met en œuvre non pas un seul, mais deux seconds messagers intracellulaires, le diacylglycérol (DAG) et l'inositol 1, 4, 5 triphosphate (IP<sub>3</sub>), produits de l'activation de la phospholipase C (PLC). Cette enzyme, ancrée à la face cytosolique de la membrane plasmique, catalyse la réaction d'hydrolyse du PIP<sub>2</sub> en IP<sub>3</sub> et DAG. Elle est activée par les protéines Gα<sub>q</sub>. L'IP<sub>3</sub> est un second messenger qui induit l'augmentation du calcium intracellulaire et le DAG active la PKC qui, tout comme la PKA, peut phosphoryler diverses protéines afin de moduler leur activité. Il existe 11 isoformes de PLC, soit β (1-4), γ (1,2), δ (1-4), et ε. Les GPCRs activent principalement les isoformes β par le biais des sous-unités de la classe Gα<sub>q</sub>.

##### 1.4.1.2.1 Inositol triphosphate

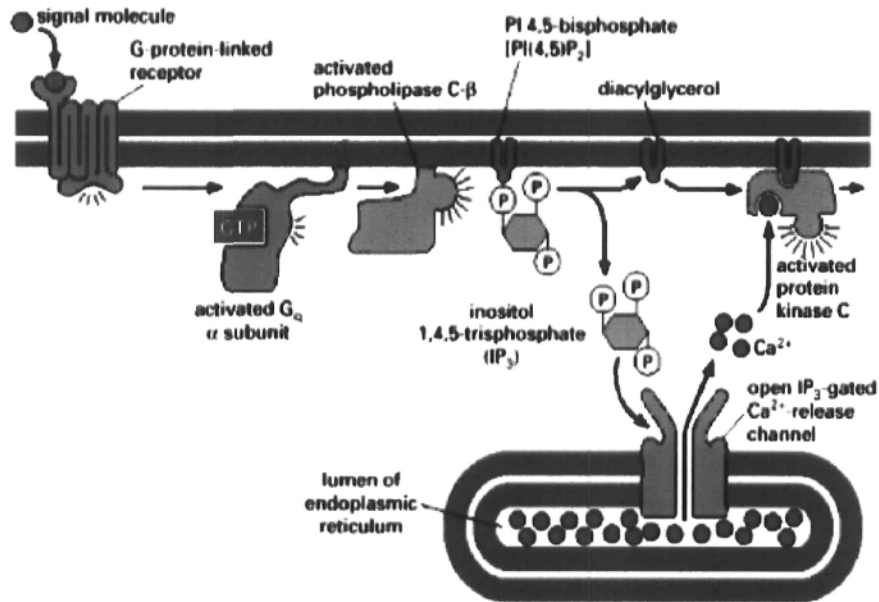
Le Ca<sup>2+</sup> est un messenger intracellulaire ubiquitaire qui contrôle une multitude d'activités cellulaires dont la stimulation, la sécrétion et la contraction cellulaire, l'activation neuronale et le contrôle de l'expression de nombreux gènes. Les GPCRs peuvent réguler la concentration de Ca<sup>2+</sup> par le biais de la PLC/IP<sub>3</sub>. L'IP<sub>3</sub> augmente le calcium intracellulaire par deux mécanismes. Le premier est l'ouverture de canaux calciques situés dans la membrane du réticulum endoplasmique, permettant ainsi la libération de calcium. Ces canaux sont des homotétramères formés par l'association de quatre récepteurs de l'IP<sub>3</sub>. Les monomères possèdent donc un site de liaison à l'IP<sub>3</sub> dans leur partie N-terminale. Dans leur domaine de régulation, on retrouve des sites de phosphorylation par la PKA et la PKC, un site de liaison du calcium et un site de liaison de l'ATP. Le deuxième mécanisme d'action de l'IP<sub>3</sub> est l'ouverture de canaux calciques spécifiques situés dans la membrane plasmique. Ces canaux sont différents des canaux calciques connus jusqu'à présent et leur nature exacte n'est pas encore établie (Assié G, 2004). Leur ouverture est déclenchée par la diminution

des stocks de calcium dans le réticulum endoplasmique. Le couplage entre ces récepteurs et le réticulum endoplasmique n'est pas élucidé, mais des protéines appelées TRP (*transient receptor potential*) sont impliquées et font peut-être partie de la composition de ces canaux (Putney 2001; Taylor et Laude 2002). L'inactivation de l'IP3 passe par deux mécanismes; la majeure partie est déphosphorylée par une phosphatase spécifique et une faible proportion est phosphorylée pour être ensuite transformée en inositol 1, 3, 4, 5 tétraphosphate (IP4) (Cantley 2002).

#### 1.4.1.2.2 Diacylglycérol et Protéine Kinase

Le DAG, formé par la PLC, fait partie de dérivés de lipides membranaires. Il reste localisé dans la membrane plasmique et active certaines isoformes de la PKC une fois transloquées à la membrane plasmique. Certains dérivés de phospholipides membranaires (acide arachidonique, phosphatidylsérine, acides gras libres), des composés hydrosolubles, comme le calcium ou certains dérivés du PI, régulent l'activation des PKC. Les domaines régulateurs de cette enzyme possèdent des sites de liaison pour les différentes molécules régulatrices (DAG, acides gras libres, PIP3, phosphatidylsérine, calcium). Le domaine CaLB (*calcium lipid binding*) permet la fixation du calcium et participe à la translocation de la PKC à la membrane et le domaine catalytique contient un site de liaison pour l'ATP. Les cibles de la PKC sont multiples; on peut citer l'activation de la voie des MAP-kinases et celle de NFκB, et la phosphorylation de récepteurs GPCRs et RTK. La PKC contribue d'ailleurs à la désensibilisation de ces récepteurs (Casabona 1997).

Finalement, d'autres seconds messagers, lipidiques, sont produits par l'hydrolyse de phospholipides membranaires. Par exemple, les sous-unités Gβγ active la phospholipase A2 qui métabolise de l'acide arachidonique à partir de phospholipides. L'acide arachidonique est le précurseur de divers médiateurs (prostaglandines, leucotriènes) et joue lui-même un rôle de second messenger pouvant moduler certains canaux ioniques ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ) (Kim et Clapham 1989; Sergeeva *et al.* 2005).



**Figure 7.** Transduction du signal par le biais des protéines G et de la voie des phospholipases. La sous-unité  $G\alpha$  activée et relâchée s'associe et stimule la phospholipase C. L'enzyme catalyse la réaction d'hydrolyse de  $PIP_2$  en  $IP_3$  et DAG. Ces deux produits agissent en tant que seconds messagers pour activer, chacun, leur cible respective, tel qu'illustré sur ce schéma. Pendant que le DAG se fixe à la PKC, le  $IP_3$  module l'ouverture des canaux calciques. Par l'entremise du calcium libéré, la protéine kinase C activée peut alors agir sur de multiples cibles.

#### 1.4.1.3 Les GPCRs et les MAP kinases

Les MAP-kinases (mitogen-activated-protein) sont des sérine/thréonine kinases impliquées dans la prolifération, la différenciation et l'apoptose (Schaeffer et Weber 1999). Il existe trois grandes classes de MAP-Kinases: les ERK1 et 2 impliquées dans la transduction de stimuli induisant la prolifération, la différenciation et la transformation oncogénique, les JNK (c-Jun N-terminal kinase) et la p38 kinase, impliquées dans la transduction de stress environnementaux et de cytokines inflammatoires. Ses trois voies ont en commun d'appartenir à une cascade kinasique, dont celle de la protéine kinase MAPK/ERK1/2 qui est la voie la mieux étudiée (Kolch 2000).

Les études sur la relation entre l'activation des GPCRs et celle de MAPK/ERK, aussi liée à une expression transitoire des GPCRs, ont démontré que les sous-types de protéines  $G\alpha_q$  et/ou  $G\beta\gamma$  étaient impliquées en tant que transducteurs dans la cascade

kinasique (Gutkind 1998; GPCRs in CNS 2002). De plus, une variété de co-facteurs sont impliqués dans la signalisation des GPCRs par les MAPKs incluant des membres des familles Ras, Rho, la famille Src kinases, d'autres tyrosines kinases cytoplasmiques, comme la Pyk-2, la PI3K et la PKC (Short 2000; Bhattacharya 2004). La PI3K est une enzyme clé impliquée dans la régulation de multiples fonctions des cellules de mammifères, telles que la croissance, le trafic vésiculaire, l'organisation du cytosquelette, la prolifération et la différenciation (Kang *et al.* 2001; Shah *et al.* 2006). L'isoforme gamma de PI3K, principalement exprimée dans les cellules hématopoïétiques, est activée par les GPCRs et a été reconnue pour sa liaison avec les protéines RhoGTPases Rac1, cd42 et Ras (Jones 2003; Bhattacharya *et al.* 2004, Stephens *et al.* 2002). Ces interactions sont impliquées de façon importante dans la polarisation du cytosquelette d'actine et donc de la chimiotaxie.

#### 1.4.2 Via les canaux ioniques

Les canaux ioniques jouent un rôle essentiel dans la transduction de signaux extracellulaires. Ils peuvent être situés sur la membrane plasmique ou au sein de la membrane d'organelles intracellulaires (réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, mitochondries). Lorsqu'ils s'ouvrent, ces canaux permettent le passage plus ou moins sélectif de certains ions selon des gradients de concentration. Les GPCRs peuvent aussi moduler les canaux ioniques, et leurs transporteurs actifs, directement ou indirectement (Leaney *et al.* 2001; Menelas et Davies 2002; Assié 2004).

##### 1.4.2.1 Régulation directe des canaux ioniques

Certains canaux à conductance potassique ou calcique voient leur activité modulée par certaines sous-unités  $G\alpha_i$  et  $G\alpha_s$  après l'activation du GPCR. La modulation directe des canaux ioniques par le couplage des protéines G se rapporte au fait que les sous-unités de ces protéines interagissent physiquement avec des régions discrètes du complexe des canaux causant ainsi des changements d'activité (ouverture/fermeture). L'exemple le mieux étudié d'une modulation directe par des protéines G est le canal potassique à rectification

entrante. Ces canaux favorisent le passage des ions dans le sens entrant au détriment du sens sortant. Ils n'ont pas de seuil d'activation, mais leur activité dépend du gradient électrochimique. Après activation du récepteur, il y a ouverture de ces canaux potassiques par la sous-unité  $G\alpha_o$  et  $G\beta\gamma$  (Menalas et Davies 2002; Assié 2004). Ces interactions des protéines  $G\beta\gamma$  avec les canaux  $Ca^{2+}$  se produit aussi bien par la région N-terminale, intracellulaire ou C-terminale.

Dans le SNC, il y a plusieurs types de canaux  $Ca^{2+}$  dépendants du voltage (leur ouverture dépend de la modification de la polarité membranaire), L, N et T. Ils règlent un éventail de processus intracellulaires, incluant la transmission pré- et post-synaptique, la modulation des seconds messagers dépendants et la transcription de gènes (Mark et al. 2000; Mark et Herlitze 2000).

#### 1.4.2.2 Régulation indirecte des canaux ioniques

L'activation indirecte des canaux par les protéines G est généralement plus durable et souvent plus lente que l'activation directe. Cette activation se produit par un second messenger en aval des protéines G. Les canaux ioniques ciblés par ces voies altéreront par conséquent le niveau d'excitabilité de la membrane pour une période de temps beaucoup plus prolongée. L'activation de l'adénylate cyclase par le biais d'un GPCR, générant de l'AMP cyclique, représente un exemple classique de la modulation des canaux calciques. En effet, la liaison de l'AMPc à la sous-unité régulatrice de la PKA stimule l'enzyme à phosphoryler divers substrats impliqués dans l'initiation, la maintenance et l'inhibition de différentes réponses signalétiques, dont celles des canaux  $Ca^{2+}$ . La PKA peut aussi phosphoryler le canal  $Na^+$  (voltage-gated) du cerveau chez le rat causant ainsi la suppression de l'influx nerveux (Cantrell *et al.* 2005).



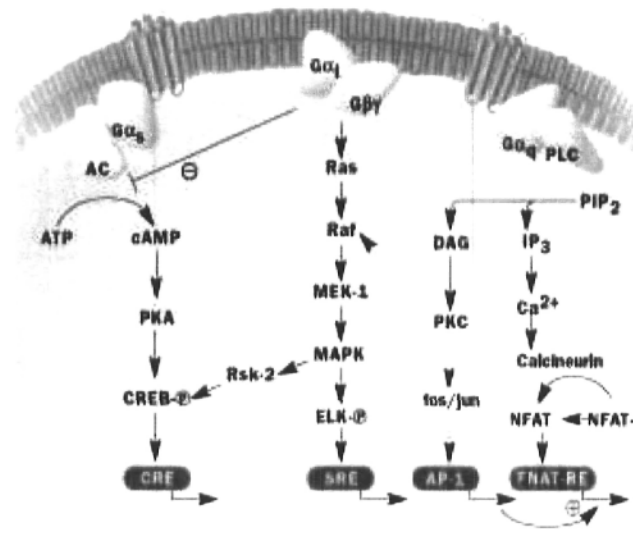


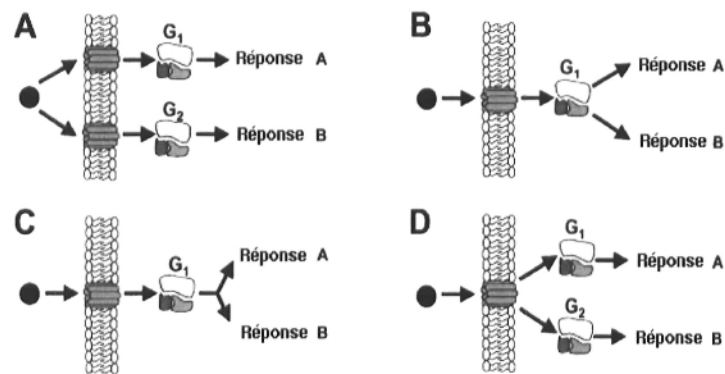
Figure 8. Schéma représentant diverses voies de signalisation intracellulaire pouvant être activées suite à la stimulation des GPCRs.

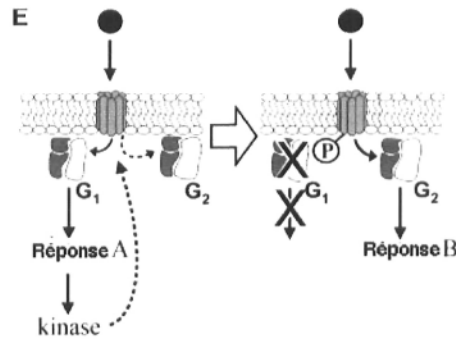
### 1.4.3 La diversité et la complexité de la signalisation intracellulaire des GPCRs

L'étude de l'activation des récepteurs couplés aux protéines G a révélé qu'il s'agit d'un phénomène plus complexe qu'originellement admis par le passé. Contrairement à la théorie classique, il est maintenant établi qu'un même récepteur peut moduler des voies distinctes de signalisation. La découverte récente de l'existence de plusieurs isoformes pour un même récepteur implique un niveau de complexité supplémentaire. Ces isoformes sont générées entre autre par épissage alternatif et de l'édition d'ARN (le terme édition de l'ARN désigne un certain nombre de mécanismes qui entraînent des changements de la séquence d'un ARN par rapport à la séquence génomique. Ce phénomène permet à la cellule de modifier la séquence de l'ARNm après la transcription, alors que l'épissage alternatif une étape nécessaire pour rendre un ARN messenger viable à la traduction et qui consiste à la déletion des introns ou des exons. (Paasche *et al.* 2001; Pauwels et al 2000). De plus, l'existence de polymorphismes dans les gènes codant les GPCRs produit des variants alléniques dans la population, et confère un degré de variabilité supplémentaire. Puisqu'un nombre très élevé de GPCRs peut être exprimé par un type cellulaire donné, il n'est donc pas surprenant que des croisements entre leurs voies signalétiques peuvent se produire

menant de ce fait à diverses réponses physiologiques.

La transduction du signal par le biais des GPCRs se produirait principalement dans les microdomaines spécialisés de la membrane cellulaire, voulant ainsi que la signalisation soit dépendante de la stœchiométrie des éléments présents dans ces domaines (Hur et Kim 2002; Ostrom 2002). Finalement, l'assemblage des GPCRs en dimères ou oligomères, telle que mentionné plus haut, peut affecter le trafic intracellulaire, la reconnaissance du ligand, la régulation de la transcription du récepteur et de ces effecteurs; ce qui accroît la complexité et la diversité du système. Dans beaucoup de cas, il se produit des réactions croisées entre différents sous-types de GPCRs, résultant de l'hétérodimérisation et pouvant engendrer une modulation positive ou négative des réponses fonctionnelles initiales à l'agoniste (Lavoie et *al.* 2002; Hermans 2003). En somme, les réponses induites suite à l'activation des GPCRs sont très complexes et dépendent en outre de l'agoniste (nature, concentration, propriétés structurales), du récepteur (variants d'ARN, palmitoylation, phosphorylation, densité, interactions protéiques, dimérisation) et des protéines G (disponibilité, compartimentage, régulateurs RGS).





*Tiré et adapté : Hermans Emmanuel, Pharmacol Ther., 2003*

**Figure 9.** Diversité et complexité de la signalisation des GPCRS. Un seul ligand peut donc activer différents sous-type d'un récepteur spécifiques à des protéines G distinctes (a). La divergence de la signalisation peut se refléter par l'habileté que peut posséder un sous-type de protéines G à activer directement une variété de cascades intracellulaires (b, c). De plus, le couplage fonctionnel d'un seul récepteur avec deux ou plusieurs protéines G, de classes différentes, rehausse de plus le niveau de complexité de la signalisation occasionné par l'activation des GPCRS (E.Hermans 2003) (d). Un autre mécanisme possible est la commutation du couplage fonctionnel de différentes protéines G à un récepteur donné, lors de la cascade signalétique, menant à l'inhibition d'une réponse et à l'activation d'une autre en cours de route (e).

### 1.5 Mécanismes de rétro-contrôle des GPCRS

L'arrêt du signal résulte de la mise en place de mécanismes régulateurs opérants au niveau des différents acteurs de la cascade signalétique. Une importante caractéristique typique du système de signalisation des protéines G repose sur le fait qu'il n'est pas constant et qu'il exhibe une mémoire d'activation antérieure. Ainsi, une forte activation primaire du récepteur mène en une capacité réduite future d'être stimulé (désensibilisation), alors qu'une faible activation initiale par l'agoniste le prédispose à une plus forte stimulation future (sensibilisation) (Gainetdivov *et al.* 2004). De plus, les réponses cellulaires engendrées par les GPCRS sont, habituellement, rapidement atténuées. Cet arrêt du signal résulte de la mise en place de mécanismes régulateurs opérants au niveau des différents acteurs de la cascade signalétique.

### 1.5.1 La désensibilisation

La diversité observée pour les ligands, les récepteurs, les protéines G et les effecteurs se retrouve également dans les mécanismes conduisant à l'inactivation des GPCRs. La désensibilisation, c'est-à-dire l'affaiblissement de la réponse du GPCR à l'agoniste en fonction du temps, représente un important mécanisme physiologique de rétrocontrôle protégeant le récepteur contre l'activation chronique. Ce processus est la conséquence d'une combinaison de différents mécanismes intracellulaires, incluant le découplage des protéines G, l'internalisation des récepteurs de la surface cellulaire aux compartiments intracellulaires, ainsi que la régulation négative des GPCRs (Jockers *et al.* 1999; Pak *et al.* 1999).

La première étape de la désensibilisation concerne le ligand, dont sa suppression du milieu extracellulaire par les processus de recapture de l'agoniste et/ou de dégradation extracellulaire par des enzymes spécifiques. Le second niveau d'arrêt du signal affecte le récepteur lui-même. Cette inactivation est la conséquence de la phosphorylation du récepteur par deux classes de protéines kinases, la famille de la sérine/thréonine kinase appelée GRK, et la famille des phosphorylases activées par les seconds messagers PKC et PKA. Dès lors, deux formes de désensibilisation peuvent être distinguées: la désensibilisation homologue et la désensibilisation hétérologue. La désensibilisation homologue est initiée uniquement après liaison spécifique du ligand à son récepteur. Ce découplage fonctionnel, médié par la famille des sérine/thréonine kinases GRK, est qualifié de ligand-dépendant. Cet arrêt du signal nécessite également la présence d'une classe de protéines solubles, les arrestines, fonctionnant comme cofacteurs des GRK afin d'empêcher totalement l'interaction récepteur-protéine G. Les GRK peuvent phosphoryler les GPCRs activés sur les résidus sérines et thréonines contenues dans la queue C-terminale ou dans la troisième boucle intracellulaire du récepteur (Bünemann *et al.* 1999; Bünemann et Hosey 1999). Cependant, contrairement aux phosphorylases activées par les seconds messagers, aucune séquence consensus n'a pu être identifiée sur les GPCRs cibles. Les seules indications permettant de supposer l'existence de sites consensus de phosphorylation

concernent les séquences adjacentes aux résidus sérine et thréonine phosphorylés. De plus, plusieurs stratégies expérimentales ont été utilisées et ont confirmé que les arrestines contribuaient de manière bien spécifique à la désensibilisation homologue, mais pas à la désensibilisation hétérologue (Lohse *et al.* 1992; Sohlemann *et al.* 1995).

Pour sa part, la désensibilisation hétérologue survient lors de la phosphorylation d'un GPCR par des kinases activées et ne survient qu'après stimulation d'un autre type de récepteur porté par la même cellule. Ce découplage fonctionnel est dit agoniste indépendant et est médié par la PKA et la PKC. La contribution relative des kinases dans la désensibilisation des GPCRs est difficile à évaluer et peut même être très complexe, car des régulations croisées peuvent exister entre les deux familles de kinases (PKC et GRK). Par exemple, dans le système olfactif, l'inhibition de ces deux classes de protéines kinases abolit complètement la désensibilisation des récepteurs (Schleicher *et al.* 1993). De plus, la concentration de l'agoniste conditionne le type de phosphorylation subit par le récepteur. Il semble, en effet, que le rôle de la PKA soit prédominant à faible concentration en ligand (Lohse *et al.* 1990), alors qu'à forte concentration, la désensibilisation soit médiée par les deux classes de kinases (Freedman *et al.* 1995).

### 1.5.2 L'internalisation

Un aspect important de la régulation des GPCRs est l'internalisation ou la séquestration des récepteurs qui se produit dans les compartiments intracellulaires (Ferguson 2001). En privant le ligand de son récepteur, l'internalisation participe donc à la désensibilisation temporelle des GPCRs. Si l'endocytose des complexes ligand-récepteurs constitue une étape de l'atténuation du signal de ces récepteurs, ce mécanisme est récemment apparu comme étant aussi important pour la resensibilisation des GPCRs et l'initiation d'une seconde cascade signalétique indépendante de la voie classique passant par des protéines G (Alvi *et al.* 2006).

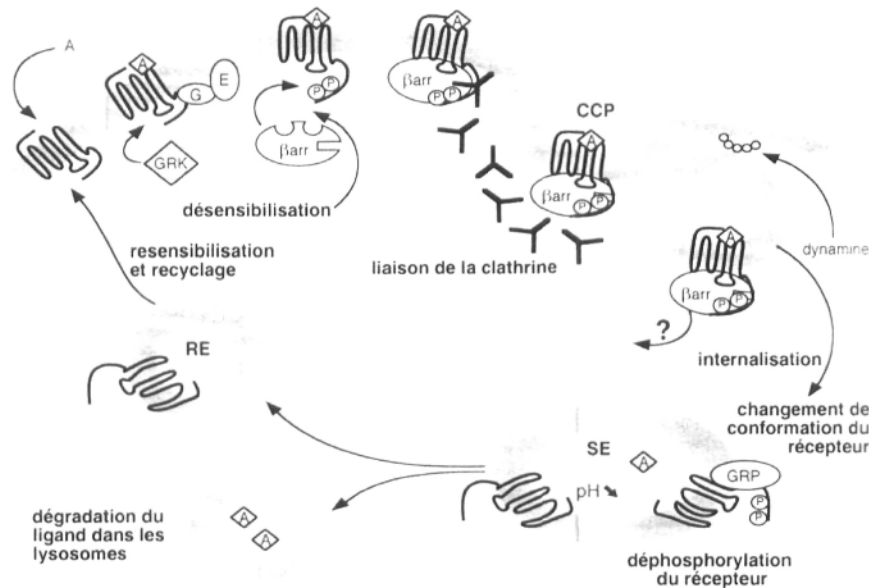
La grande majorité des récepteurs pénètre dans la cellule via les puits d'invagination tapissés de clatherine ou CCP (*clathrin-coated pits*) et se retrouve au niveau des compartiments précoces d'endocytose (EE, *early endosome*) dans les cinq minutes qui suivent la scission des vésicules de la surface membranaire. Cet endosome primaire, formé par l'assemblage de vésicules de clatherine (CCV, *clathrin-coated vesicles*) et localisé à la périphérie cellulaire est appelé "*sorting endosome*" (SE). Le SE est le lieu où s'effectue le tri des molécules qui seront recyclées à la membrane plasmique ou transportées vers les compartiments tardifs de l'endocytose (Ferguson *et al.* 1996). La morphologie tubulo-vésiculaire et la valeur acide du pH (5,9 - 6,0) sont les propriétés essentielles de cet endosome. La dissociation du complexe ligand-récepteur résultant de cette acidification autorise le recyclage du récepteur et la dégradation du ligand (Kaiser *et al.* 1988). Le contenu de ces SE est ensuite délivré aux compartiments tardifs de l'endocytose qui fusionnera par la suite aux lysosomes (Mullock *et al.* 1998). Les enzymes lysosomiales des endosomes tardifs sont fortement concentrées dans les lysosomes et dégradent le contenu vésiculaire. Après relâche des enzymes lysosomiales, le récepteur peut être recyclé vers le TGN (trans-Golgi network) (Traub *et Kornfeld* 1992; Rohn *et al.* 2000).

Les GPCRs peuvent suivre différentes voies d'internalisations: selon le processus arrestine-dépendant ou indépendant, la voie clatherine-dépendante ou encore celle cavéole-dépendante. La voie empruntée par la majorité des GPCRs nécessite la présence des arrestines, fait intervenir les vésicules de clatherine (CCV) et dépend de la GTPase dynamine (Goodman *et al.* 1996; Parent *et al.* 1999). L'individualisation du puit d'endocytose en vésicule se fait par le resserrement complet du col de ce puit. C'est un processus très coûteux en énergie et en machinerie protéique. La dynamine est donc une GTPase qui entraînera, par changement de conformation, le rapprochement des deux membranes de même que leur fusion (Urrutia *et al.* 1997). L'internalisation peut également avoir lieu selon un processus arrestine-indépendant et dynamine-dépendant, et l'association avec les cavéoles peut-être aussi envisagée pour certains GPCRs (Anderson 1998; Okamoto *et al.* 1998). Par exemples, les récepteurs angiotensines II de type 1, les récepteurs  $\beta$ 2-adrénergiques, les récepteurs bradykinines B2, les récepteurs "calcium-sensing" et les

récepteurs des endothélines sont séquestrés via les cavéoles (Raposo et al. 1989; Ishizaka *et al.* 1998; Haasemann *et al.* 1998; Kifor *et al.* 1998; Chun *et al.* 1994). Le rôle des cavéolines en tant que protéines adaptatrices de ce mécanisme n'a pas encore été démontré. Par contre, la dynamine participe à la scission des cavéoles (Oh *et al.* 1998; Henley *et al.* 1998). L'internalisation peut aussi avoir lieu selon un processus arrestine-indépendant et dynamine-indépendant. Ce profil d'internalisation est également applicable aux récepteurs angiotensines II type 1A et dopamines D2 (Zhang *et al.* 1996; Vickery et von Zastrow 1999). La machinerie cellulaire (protéines adaptatrices, type de vésicules et protéines responsables de la scission) utilisée pour ce type d'endocytose reste à découvrir. Pour certains GPCRs, l'internalisation est réversible et les récepteurs séquestrés sont recyclés vers la membrane (von Zastrow et Kobilka 1992; Böhm *et al.* 1997). La dissociation du complexe ligand-récepteur et la déphosphorylation des récepteurs par les phosphatases endosomiales (autorisant la dissociation des arrestines), opérées au niveau des endosomes primaires (SE), sont indispensables à l'étape de recyclage. Pour quelques GPCRs, l'internalisation est irréversible. Ces récepteurs activés par clivage de leurs extrémités N-terminales traversent rapidement les endosomes précoces, puis tardif, et finissent par être dégradés dans les lysosomes. Le recouvrement des récepteurs à la surface cellulaire nécessite une nouvelle synthèse protéique ou la mobilisation des stocks intracellulaires de récepteurs intacts. Pour la plupart des GPCRs, les éléments de séquence responsables de l'internalisation sont localisés dans leurs extrémités C-terminales. Il n'est cependant pas possible d'établir de séquence consensus d'internalisation commune à tous ces récepteurs, car chaque récepteur présente des caractéristiques d'internalisation qui lui sont propres.

La régulation dynamique de la signalisation par les GPCRs nécessite le maintien de la balance entre les mécanismes contribuant à l'initiation, à l'arrêt et au rétablissement du signal. L'internalisation aurait un rôle plus important dans la resensibilisation que dans la désensibilisation des récepteurs. La resensibilisation est un processus qui nécessite les étapes de dissociation du complexe ligand/récepteur dans les compartiments précoces de l'endocytose, de déphosphorylation des récepteurs, de dissociation des arrestines et le recyclage des récepteurs à la surface cellulaire. Par contre, les étapes conduisant à la

renaturation du récepteur ne sont pas encore bien définies. De plus, la séquestration des complexes ligands/récepteurs à l'intérieur des endosomes peut déclencher une nouvelle cascade signalétique, distincte de celle initiée au niveau membranaire (Chun et al. 1995).



Tiré et adapté : Ferguson et Caron, 1998, site internet <http://www.123bio.net/revues/psarret/fig20.html>

**Figure 10.** Représentation schématique de la désensibilisation et de la resensibilisation d'un GPCR après activation par l'agoniste: exemple du récepteur  $\beta_2$ -adrénergique. La liaison de l'agoniste (A) est suivie de la phosphorylation par les GRK, l'interaction avec les  $\beta$ -arrestines ( $\beta$ -arr) et le découplage des protéines G (G)-effecteur (E). La désensibilisation se poursuit par l'endocytose du complexe ligand-récepteur via les puits tapissés de clathrine (CCP). Le complexe est ensuite dissocié par abaissement du pH dans les endosomes précoces (SE). Les phosphatases endosomales (GRP) déphosphorylent les récepteurs. Le récepteur, après avoir transité dans le compartiment de recyclage (RE), réapparaît à la surface cellulaire (resensibilisation). Le ligand est dégradé dans les lysosomes, mais peut aussi, dans certains cas, être livré vers le réseau trans-Golgien (TGN).

### 1.5.3 La régulation négative

La diminution du nombre total de récepteurs à la surface cellulaire se produit lors d'une exposition chronique à un ligand agoniste. Les mécanismes susceptibles de diminuer le nombre de récepteurs d'un type donné passent par une augmentation de la dégradation des récepteurs préexistants et/ou une réduction de leur synthèse.

Il n'est pas encore établi si l'internalisation constitue l'étape initiale de cette

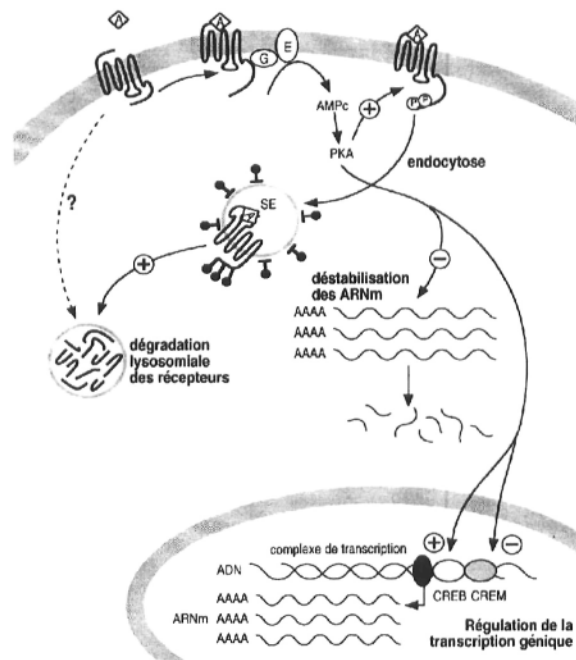


dégradation ou si une voie distincte transporte les GPCRs aux lysosomes. Le trafic des récepteurs des endosomes précoces vers les lysosomes constitue un mécanisme possible de la "down regulation" des GPCRs. Tandis que la majorité des récepteurs séquestrés sont recyclés à la surface cellulaire, il est possible qu'une petite fraction soit présentée aux lysosomes (von Zastrow et Kobilka 1992). Cette idée est supportée par une étude indiquant que la surexpression d'une  $\beta$ -arrestine mutée, inhibant l'endocytose, réduit également le taux de dégradation du récepteur b2-adrénérique (Gagnon et al. 1998). La même observation a pu être faite pour les récepteurs neurokine NK-1, muscarinique M3 et neurotensine NTS1 (Vandembulcke *et al.* 1998; Grady *et al.* 1995; Yang et al. 1995). Ainsi, le trafic des récepteurs, des endosomes précoces vers les lysosomes, constitue un mécanisme possible de régulation négative des GPCRs (figure 4).

La régulation négative peut aussi être la conséquence de la diminution de l'expression génique et/ou de l'activation d'événements post-transcriptionnels comme la déstabilisation des ARNm (figure 4). La régulation de la transcription génique semble être modulée par les seconds messagers tels que l'AMPc. Par exemple, les effets médiés par l'AMPc sont liés à la fixation de facteurs de transcription (CREB, par exemple) sur des éléments de réponse à l'AMPc et présents dans la région promotrice de certains gènes.

En somme, les mécanismes conduisant à l'atténuation du signal des GPCRs présentent un intérêt considérable pour de nombreuses raisons. Chez un individu normal, ces processus contrôlent la capacité des cellules à répondre à un signal extracellulaire et régulent l'intensité et la durée du signal. La suppression de l'agoniste, la désensibilisation et l'internalisation du récepteur ou encore la "down regulation" empêchent toute stimulation excessive ou répétée des cellules. De même, la resensibilisation des récepteurs assure le maintien de la capacité d'une cellule à répondre de nouveau à l'agoniste. Ces mécanismes régulateurs sont aussi très importants du point de vue pathologique et thérapeutique. L'altération de l'une ou l'autre des étapes de l'arrêt du signal peut entraîner le dérèglement de la cellule et à terme conduire au déclenchement de la maladie. Par exemple, la recapture

de l'agoniste par des transporteurs spécifiques constitue un moyen efficace d'empêcher la persistance d'une stimulation. Plusieurs maladies semblent être liées à l'activité des transporteurs. L'utilisation d'inhibiteurs et de certaines drogues psychoactives révèle l'importance de ce mécanisme dans l'arrêt du signal (Giros *et al.* 1996). Le récepteur lui-même peut être la cause de déficiences dans les mécanismes conduisant à l'atténuation du signal. Par exemple, certaines mutations apparaissant spontanément *in vivo* provoquent l'activation constitutive des GPCRs (Botto *et al.* 1997). Enfin, les altérations peuvent aussi concerner la surexpression et la sous-expression ou encore la mutation de protéines, telles que les sérine/thréonine kinases (GRK) ou les arrestines.



*Tiré et adapté* : Ferguson et Caron, 1998, site internet <http://www.123bio.net/revues/psarret/fig20.html>

**Figure 11.** Les mécanismes possibles de la régulation négative des GPCRs. La réduction du nombre total de récepteurs peut résulter de l'augmentation de la dégradation des récepteurs dans les compartiments lysosomaux, de la diminution de la synthèse des récepteurs au niveau transcriptionnel et/ou post-transcriptionnels tels que la déstabilisation des ARNm.

## 1.6 Les GPCRs dans la biologie des macrophages et des cellules microgliales

### 1.6.1 Les macrophages et la microglie

L'immunité innée constitue une première ligne de défense naturelle lorsque des microorganismes ou des particules étrangères pénètrent l'organisme. Reposant sur la reconnaissance du non soi infectieux, la réponse immunitaire innée est d'action immédiate et fait appel aux cellules d'origine myéloïde, comme les cellules dendritiques, les cellules de Langerhans, les granulocytes, les monocytes/macrophages ainsi que la microglie du cerveau, ou encore aux cellules NK (Natural Killer). Les macrophages, font partie des cellules dites présentatrices d'antigènes. Ces cellules permettent l'évaluation de la dangerosité d'un antigène grâce à la reconnaissance de signatures spécifiques. "Éboueurs" de l'organisme, les macrophages captent et internalisent le pathogène pour ensuite le dégrader en courts fragments peptidiques qui seront présentés aux lymphocytes à l'aide des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) exposé à leur surface. Les macrophages font donc le lien entre l'immunité innée et l'immunité acquise.

Les cellules microgliales sont en fait les macrophages résidents du SNC. Bien qu'elles diffèrent des macrophages entre autre par leur morphologie et leur efficacité moins grande à présenter les antigènes, elles sont aussi des sentinelles de leur environnement. Elles sont principalement protectrices et de soutien dans leurs fonctions constitutives et inductibles et sont indispensables à la maturation adéquate et au bon fonctionnement du tissu nerveux. Équipée de "senseurs", c'est-à-dire de récepteurs et dans une certaine mesure de canaux ioniques rapporteurs d'effets, la microglie détient la capacité à discerner les signaux de danger et à percevoir les perturbations fonctionnelles de son environnement. Conséquemment à leur activation, elle sécrète une variété de facteurs trophiques, de facteurs de croissance et de facteurs toxiques comme certaines cytokines et les radicaux libres. Ainsi, le dosage de la réponse immunitaire innée devient primordial et l'étude approfondie de l'activation microgliale et des facteurs qui peuvent l'influencer s'avère fondamentale.

Les cellules de l'immunité innée reconnaissent spécifiquement des molécules retrouvées à la surface des microorganismes par le biais de récepteurs membranaires dénommés PRR pour «*pattern recognition receptors*». Ces éléments reconnus sont appelés

PAMPs pour «*pathogen-associated molecular patterns*». Par exemples, la lipopolysaccharide (LPS) est une composante importante de la paroi des bactéries à Gram négatif reconnu par ces récepteurs. Plus précisément ce sont les récepteurs TLRs (*Toll-like receptors*) qui lient avec une grande affinité les PAMPs (Akira 2001; Takeda et Akira 2003). Ils présentent tous, à leur portion cytoplasmique, un domaine TIR similaire les uns des autres. Ce domaine tient son nom à la similarité de la région cytoplasmique du récepteur à l'IL-1 avec celle des TLRs, d'où le diminutif TIR pour «*Toll/IL-1 receptor homologous region*».

Chez les mammifères, le TLR4 est impliqué dans l'expression de gènes codant des cytokines inflammatoires et des molécules de costimulation (Medzhitov *et al.* 1997). Il y a aussi d'autres molécules additionnelles impliquées dans cette reconnaissance. En fait, l'endotoxine LPS circulante est immédiatement capturée par la protéine sérique LBP (*LPS binding protein*). Ce nouveau complexe peut lier une autre molécule soluble ou membranaire, soit le CD14 (Wright *et al.* 1990; Ulvitch et Tobias 1994). Le CD14 membranaire est présent à la surface des cellules myéloïdes et est une glycoprotéine ancrée dans la membrane cellulaire, qui ne peut cependant à elle seule transmettre de signaux intracellulaires (Ulvitch et Tobias 1994). Une fois formé, le complexe LBP/LPS/CD14 se lie au récepteur TLR4 et une robuste cascade signalétique s'en suit immédiatement, menant à l'activation subséquente des facteurs de transcription NF $\kappa$ B et AP-1. Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B est activé non pas seulement par la LPS bactérienne, mais aussi par de nombreux stimuli, comme certaines cytokines et agents mitogéniques. Ce facteur régule la transcription de nombreux gènes impliqués dans le processus inflammatoire.

La réaction inflammatoire est nécessaire à la défense immunitaire de l'organisme et peut mener à l'élimination des corps étrangers. De plus, elle pourrait contribuer au processus de remyélinisation, car il a été démontré que l'absence de sécrétion de la cytokine IL-1 $\beta$  par les cellules microgliales induit un retard dans les processus de remyélinisation (Mason et Suzuki 2001). Lorsqu'elle est chronique, la réponse inflammatoire peut devenir

néfaste pour l'organisme. Toutefois, l'organisme dispose de mécanismes de rétroaction pour contrôler une réponse exagérée. En somme, la LPS s'avère un excellent modèle pour étudier l'inflammation.

### **1.6.2 Le rôle des GPCRs dans les fonctions des macrophages et des cellules microgliales**

Le contrôle précis du trafic cellulaire est essentiel pour le développement et le fonctionnement du système immunitaire. Tout comme de nombreux autres récepteurs membranaires, ceux couplés aux protéines G à la surface des macrophages y sont d'une grande importance en modulant des fonctions biologiques telles que la prolifération, la différenciation, l'activation, la reconnaissance, l'endocytose, la migration et la sécrétion (Burke et Lewis 2002,). Chez les monocytes, de nombreux GPCRs ont été regroupés dans la superfamille des récepteurs de chimiokines. Cette famille excède maintenant plus de 60 membres, lesquelles sont subdivisées en types C, CC (CCR) ou CXC (CXCR) (Tableau 3). Par exemple, un récepteur de chimiokine couplé aux protéines Gq, peut stimuler la voie des MAPK comme cela a déjà été décrit dans la partie précédente. Une stimulation inhabituelle des MAPKs peut conduire à l'expression de certains gènes qui sont normalement réprimés et qui peuvent par exemple contribuer à la défense de l'hôte. Il a aussi été rapporté que les récepteurs de chimiokines peuvent subir une dimérisation après liaison du ligand, un événement qui enclenche l'activation de la voie JAK-STAT (Cartier *et al.* 2005). Ces deux cascades intracellulaires sont d'importantes voies régulatrices de la prolifération, la différenciation, la phagocytose et la motilité cellulaire.

Les voies effectrices du flux de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire, de la réorganisation du cytosquelette, de l'activation des fonctions spécialisées des leucocytes et de leur mouvement directionnel, dépendent en outre des produits dérivés de l'activité des seconds messagers suite à l'activation de GPCR, comme la PLC et la PI3K. Cette dernière kinase s'avère cruciale pour l'accumulation des macrophages aux sites inflammatoires (Wymann *et al.* 2003) et pour la coordination du processus de phagocytose (Len *et al.* 2003). De plus,

l'hydrolyse du GTP par les GEF-GTPases, menant à l'activation de la PI3K, est une étape essentielle pour beaucoup de processus biologiques de ces cellules. De ce fait, les GPCRs, dépendamment du type de protéines G recrutées, utilisent les Rho GTPases Rac, Cdc42, Arf, Ras, Rab et RhoA qui sont formellement impliquées dans les processus de prolifération et d'activation des monocytes. Également, Rac est reconnu spécifiquement en tant que molécule clé dans la phagocytose (Kanazawa *et al.* 2002) de même que dans l'activation microgliale (Imai et Kohsaka 2002), alors que Rab5 jouerait un rôle dans la maturation des phagosomes (Len 2002). L'activité d'ARF6 serait quant à elle reliée à l'endocytose lors du processus de phagocytose (Len Stephens 2002).

La microglie exprime également plusieurs récepteurs purinergiques P2Y, couplés aux protéines G, qui sont liés à leur activation de même qu'à l'expression de molécules pro-inflammatoires ou neuroprotectrices (Xiang et Burnstock 2005). La stimulation de récepteurs purinergiques peut déclencher la libération de l'IL-1 et l'IL-10 ou atténuer la libération des cytokines pro-inflammatoires TNF et IL-6 par la microglie activée (Färber et Kettenmann 2006). Par exemple, les récepteurs P2Y<sub>12</sub> sont importants dans la transformation morphologique rapide des cellules microgliales, déclenchée par l'ATP (Kettenmann 2006). Haynes *et al.* (2006) fournissent maintenant l'évidence génétique que le récepteur P2Y<sub>12</sub> est un site primaire auquel l'ATP agit pour inciter l'activation microgliale en réponse à des blessures locales du SNC. De leur côté, les récepteurs cannabinoïdes de la microglie, par exemple, permettent une protection neuronale (Cabral et Marciaro 2005; Cabral 2005; Eljaschewitsch 2006). De plus, la production d'endocannabinoïdes par la microglie, module l'activation cellulaire par le biais de récepteurs cannabinoïdes, CB1 et CB2 (Stefano *et al.* 1996; Waskman *et al.* 1999, Walter, 2003, Facchinetti *et al.* 2003). Ces endocannabinoïdes (AEA, 2-AG) peuvent aussi contribuer à la prolifération des cellules microgliales (Carrier *et al.* 2004) et participer à leur recrutement vers les sites inflammatoires (Walter *et al.* 2003; Franklin *et al.* 2003). Pour leur part, les récepteurs glutamates ont un rôle significatif dans la modulation de la survie cellulaire dans le système nerveux durant le stress oxydatif (Chong 2005). L'activation des récepteurs du glutamate, mGluRIS, préviendrait l'activité pro-

inflammatoire des cellules microgliales (Chong 2005).

L'étude des GPCRs dans le (CNS) est non seulement appropriée pour la compréhension de la physiologie et la pathophysiologie cérébrale, mais peut aussi mener au développement de traitements ciblés pour différentes maladies.

Le tableau suivant regroupe tous les types de GPCRs ayant un rôle établi, ou une potentielle implication, dans la régulation des macrophages et des cellules microgliales.

Tableau 3. Les GPCRs connus apparentés à la famille Rhodopsine et exprimés par la lignée des monocytes.

Catégorie de récepteur	Ligand	Type cellulaire	Fonction	Référence
<b>Adénosine</b>				
A <sub>1</sub>	Adénosine	Microglie Macrophage	Prolifération, apoptose, production IL-1, NO métalloprotéinase	Gebicke-Haerter 1996; Tsutsui et al. 2004;
A <sub>2A,B</sub>	Adénosine	Microglie  Monocyte/macrophage	Prolifération, apoptose, expression de COX-2, sécrétion de NGF  Atténue la croissance de glioblastome	Zidek 2004; Saura et al. 2005  Hasko G, 2005
A <sub>3</sub>	Adénosine	Microglie	↑ production IL-1, 6, 12 ↑ Phosphorylation de ERK1/2	Sinowitz M. 2006 Hasko G et al. 2005
<b>Adrénérurgique</b>				
Bêta <sub>3</sub>	Adrénaline	Macrophage péritonéal	Suppression prolifération et	Tanaka KF. 2002
Alpha <sub>2A</sub>	Adrénaline	Microglie	induction IL-1	
Alpha <sub>1A</sub> , Bêta <sub>1</sub>	Adrénaline Noradrénaline	Microglie Microglie	Possiblement impliqué dans la survie microgliale et la neuroprotection	Kohji Mori. 2002
<b>Anaphylatoxines</b>				
C5R 1 et C3RI (GPR77)	C5a ou CD88 et C3a	Macrophage, microglie	Activation, migration, augmente la phagocytose	Davoust N. 1999 Martin Carol B. 2006
<b>Angiotensine</b>				
AT <sub>1</sub> et AT	Angiotensine	Monocyte Macrophage Microglie	Infiltration et athérogénèse Accumulation aux sites Activation	Toko 2004; Keidar 2002 Roulston C.L. 2005
<b>Bombésine</b>				
BB <sub>1</sub> ou NMBR	Neuromédine B	Macrophage activé	Migration	Del Rio M. 1994
BB <sub>2</sub>	Gastrin-releasing peptide	Macrophage	Atténuation de la sécrétion de cytokines	Dal-Pizzol F. 2006
<b>Bradykinine</b>				
B <sub>1</sub> et B <sub>2</sub>	Bradykinine	Macrophage, microglie	Activation	Noda 2003 et 2004 Bockann S., 2000



Catégorie de récepteur	Ligand	Type cellulaire	Fonction	Référence
<b>Cannabinoïdes</b> CB <sub>1</sub> et CB <sub>2</sub>	2AG, cannabinoïde, anandamine. ACEA, méthanandamine,	Macrophage, microglie	Initiation et modulation de l'activation cellulaire Modulation expression de cytokines et de chimiokines, Prolifération Migration	Cabral GA. 2005; Walter 2003; Sinha P. 1998  Carrier. 2004 Franklin A. 2003
<b>Chimiokines</b> CCR1,3,5	RANTES/MIP-1 MCP-2,3,4, HCC-1, 4	Monocyte/macrophage, Microglie	Recrutement de cellules immunes et migration	Sunnemark D. 2003 Zuurman MW. 2003
CXCR1, 2	MRP-1 (CCL6)	Microglie	Développement postnatal du cérébellum Neuromodulateurs et migration	Cowell Silverstein 2003  Cartier L. 2005
CXCR3 ou GPR9	IL-8/GCP-2	Monocyte/macrophage, Microglie	Migration, production de cytokines inflammatoire	Kanno M. 2005
CXCR4	IMig, I-TAC	Monocyte/macrophage, Microglie	Induction production du peptide bêta-amyloïde	Cross, Woodroffe 1999
	SDF-1	Macrophage Microglie	Neuroprotection et migration	Franciosi S. 2005
CX3CR1	Fractalkine	Microglie, Monocyte/macrophage	Homéostasie, impliqué dans le développement du cerveau, prolifération	Hatori K. 2006 Li H. 2006 ; Heise CE 2005 ; Cartier. L. 2005
CXCR6 ou STRL33	CXCL6	Monocyte	VIH infiltration, Différenciation	Lee Benhur 1999; Albright 1999
XCR1 ou GPR5	Lymphotactine	Monocyte/macrophage	Adhésion cellulaire Prolifération, migration et communication Recrutement de cellules immunitaires et neuroprotection	Green S.R. 2006 Cartier L. 2005
<b>Cholecystokinine</b> CCK <sub>2</sub> ou CCK-B	Gastrine	Cellules mononuclées	Recrutement	Ruth JH, 2006

Catégorie de récepteur	Ligand	Type cellulaire	Fonction	Référence
<b>Endothéline</b> ET <sub>A</sub> ET <sub>B</sub>	Endothéline 1 et 2 Endothéline 1, 2 et 3	Macrophage, microglie Microglie et macrophage activé	↓ production IL-12 ↓ production NO Neuroprotecteur ? Interactions neurone- microglie et cellules endothéliales-microglie Migration	Dufresne M. 2006 Hasko 2002 Katrin Färber 2005 Lool LS. 2002  McLarnon JG. 2000
<b>Formyl peptide</b> FMLP-R1,2 ou FPRL1,2	N-formylated peptide (N-fmet-leu-phe)	Macrophage, microglie Microglie et macrophage activé	Migration Phagocytose	Mandal 2005 Yazawa H. 2001
<b>Galanine</b> GAL <sub>1-3</sub>	Galanine	Monocyte/macrophage Microglie	Inhibition de la production de TNF	Su Y. 2003
<b>Acide gras</b> GPR43 ou FFA3 GPR40 ou FFA2  GPR35	Acétate Acide carboxylique eicosatriynoïque Acide Kynurénique	Microglie  Leucocytes, monocytes purifiés	Activation et différenciation  ?	Le Poul E. 2003 Nilsson NE. 2003  Briscoe C.P 2003
<b>Histamine</b> H <sub>1-2</sub> H <sub>3-4</sub>	Histamine Histamine	Monocyte/macrophage	Prolifération différenciation Maturation, inhibition production TNF et IL-12	Sasaguri Y. 2004, Tanimoto A. 2001 Vannier. 1991
<b>5-Hydroxytrptamine</b> 5-HT1A  5-HT2A 5-HT7	Sérotonine  sérotonine Sérotonine	Macrophage péritonéal  Monocyte/macrophage Microglie	Augmentation de la phagocytose ? Formation/différenciation Induction IL-6	Freire-Garabal 2003  Suguro T. 2006 Mahe C. 2005
<b>Leucotriène et lipoxine</b> CysLT <sub>1-2</sub> ALX LTB <sub>1-2</sub>	Leucotriène D <sub>4</sub> et C <sub>4</sub> Lipoxine A Leucotriène B <sub>4</sub>	Microglie Monocyte/macrophage Macrophage	Activation, médiation et amplification de la réponse inflammatoire Croissance Migration leucocytaire	Ballerini P. 2005 Capra V. 2005 Parkinson JF. 2006 Nieves D. 2006 Talvani A. 2002
<b>Lysophospholipide</b> LPA <sub>1-2</sub> et LPA <sub>3</sub> S1P <sub>1,2,3,5</sub> et LPA <sub>1</sub> S1P <sub>1,2,4</sub> G2A	Acide lysophosphatidique Sphingosine 1- phosphate LPC	Monocyte/macrophage Microglie activée Microglie Monocyte/macrophage Macrophage	Activation ? ? Initiation de la phagocytose, migration	Fueller M. 2003 Tham CS. 2003; Moller 2001 Duong CQ 2004 Yang LV., 2005

Catégorie de récepteur	Ligand	Type cellulaire	Fonction	Référence
<b>Hormone de la mélanocortine</b> MC <sub>1</sub> et MC <sub>5</sub> MC <sub>2</sub> MC <sub>3</sub> MC <sub>4</sub>	Alpha-mélanocyte Adrénocorticotrophie Gamma-mélanocyte Bêta-mélanocyte	Microglie, macrophage Leucocyte Microglie, macrophage Microglie, macrophage	↑ IL-6, régulation de la sécrétion de TNF Immunomodulation Induction IL-10, anti-inflammatoire, Augmentation IL-6,	Lindberg C. 2005; Taylor 2005 Taherzadeh S. 1999, Johnson EW. 2001; Lam W. 2006 Lindberg C. 2005
<b>Muscarinique</b> M <sub>1,5</sub> ou AChR	Acétylcholine	Macrophage péritonéal Microglie	Modulation angiogénèse Inhibition de la cytotoxicité Possible régulation de la sécrétion de l'APP	De la Torre 2005 Hirayama M. 2001 Zhang L, 1998
<b>Neuropeptide</b> GPR154	Neuropeptide S	Macrophage	Maturation ? Modulation de la réponse immune	Pulkinen W., 2006
NPY1R et NPY2R	Neuropeptide Y	Monocyte/macrophage	Favorise le stress oxydatif	Schwarz 1994
NPY5R	Neuropeptide Y	Monocyte/macrophage	Favorise la dégradation de particule phagocytée	Dimitjevic M. 2005
<b>Neurotensine</b> NTR1 ou NTS <sub>1</sub>	Neurotensine	Macrophage péritonéal	Induction NO et migration	Kim HS. 2006
NTR3 ou NTS <sub>3</sub> ou Sortilline	Neurotensine	Microglie	Migration, expression de cytokines et chimiokines	Martin S. 2005 et 2003 Shytle RD. 2004 Wang H. 2003 Suzuki T., 2006 De Simone R. 2005
<b>Nicotinique</b> nAChR	Nicotine	Macrophage, microglie	Activation, rôle anti-inflammatoire	Schaub A, 2001, Offermans 2006
PUMA-G ou GPR109A	Nicotine	Macrophage activé	Modulation de la sécrétion de TNF, ↑ de l'expression cox-2 et PGE	Schaub A, 2001, Offermans 2006
<b>Opioides</b> Delta-opioid receptor Kappa-opioid receptor	Bêta-endorphine Dynorphine A	Macrophage Microglie	Migration Neuroprotection Communication cellulaire	Calvo CF. 2000 Qin L. 2005 ; Policchio I. 2005 Chao CC. 1998

Catégorie de récepteur	Ligand	Type cellulaire	Fonction	Référence
<b>Opioides (suite)</b> Mu-opinoïde ou MOR	Bêta-endorphine	Monocyte, microglie	Chimiotaxie	Wright GJ. 2003,
<b>Orexine</b> OX <sub>1,2</sub>	Orexine A et B	Monocyte/macrophage Microglie	? Limite l'activation cellulaire	Hatherley 2005; Dick AD. 2001
<b>Platelet-activating factor</b> PAFR	PAF	Microglia Macrophage	Chimiotaxie Activation Phagocytose Activation de NFκB et chimiotaxie	Aihara M. 2000 Bate C. 2006 De Oliveira SI. 2006 Seo KH. 2006
<b>Prokinétine</b> PKR-1, 2 ou GPR73	Prokinétine 1 et 2	Monocyte/macrophage	Migration, production de cytokines, différenciation	Martucci C. 2006 Dorsch M. 2005
<b>Prostanoïde</b> DP	Prostaglandine D <sub>2</sub>	Microglie	Possible implication dans la phagocytose et la migration	Mohri I. 2003
EP <sub>1</sub> EP <sub>2</sub> et EP <sub>3</sub>	Prostaglandine E <sub>2</sub> Prostaglandine E <sub>2</sub>	Microglie Microglie	Activation, impliquée dans l'astrogliosis et la démyélinisation Induction iNOS et COX-2 et nécessaire à la neurotoxicité	Mohri I. 2006 Minghetti 1997; Shie 2005
EP <sub>3</sub>	Prostaglandine E <sub>2</sub> Prostaglandine E <sub>2</sub>	Microglie activée  Macrophage activé	Suppression de cytokines prophagocytiques, ↓ du CMH II et molécule costimulation B7, effets anti-inflammatoires Inhibition du TNF/IL-1 Inhibition phagocytose	Shie et Breyer 2005 Levi G. 1998 Slawik H 2004 Aronoff DM 2004
EP <sub>4</sub> et EP <sub>2</sub>	Prostaglandine E <sub>2</sub>	Monocyte/macrophage Microglie	Suppression production de chimiokines Induction iNOS Modulation des cytokines	Takayama K. 2002; Treffkorn L. 2004 Shie et Montine 2005 Chen BC 2006, Plum J. 2002 Luttmann W. 1999

Catégorie de récepteur	Ligand	Type cellulaire	Fonction	Référence
<b>Prostanoïde (suite)</b>				
IP <sub>1</sub>	Prostacycline	Microglie	Synergise avec les cytokines pour inhiber celles proinflammatoires	Tsai MJ. 2005
TP ou GPR44	Thromboxane A <sub>2</sub>	Monocyte, microglie	Suppression de l'effet de la LPS et diminution du nombre de cellules	Kitanaka 1995; Kumar A. 2005
<b>Protéase</b>				
PAR1, 3	Thrombine	Microglie Monocyte/macrophage	? Activation	Suo 2002 et 2003; Lee 2006
PAR2, 4	Sérine Protéase, trypsine	Microglie	Induction de médiateurs pro-inflammatoires	Schaffner, 2005 Noorbakhsh F., 2006 Johansson U., 2005
<b>Purinergique</b>				
P2Y <sub>1</sub>	ADP	Microglie Monocyte/macrophage	Activation Migration	Ballerini P., 2005 McCloskey MA, 1999
P2Y <sub>2,4,6</sub>	ATP, UTP, UDP	Microglie Monocyte/macrophage	↑ de la formation vésicule pinocytose, influx Na <sup>+</sup> et efflux de K <sup>+</sup> , détection de débris cellulaire et tissulaire, médiation de la production d'IL-8, rôle possible dans l'apoptose et chimiotaxie, sécrétion d'IL-1 et génération NO, prolifération Suppression du TNF et IL-12, adhésion aux cellules endothéliales, stimule la synthèse d'eicosanoïdes	Sung SS. 1985, Coutinho-Silva R. 2005 et Di Virgilio F. 2001  Burnstock G. 2004 et 2006
P2Y <sub>11</sub>	ATP	Macrophage	?	Mamedova L. 2005
P2Y <sub>12</sub>	ADP	Microglie, macrophage	Chimiotaxie	Sasaki 2003, Kettenmann H. 2006
P2Y <sub>13</sub> ou GPR86	ADP	Cellules myéloïdes Microglie	? Chimiotaxie	Nasu-Tada 2005 Communi D., 2001 Nasu-Tada 2005

Catégorie de récepteur	Ligand	Type cellulaire	Fonction	Référence
<i>Purinergique (suite)</i> P2Y <sub>14</sub> ou GPR105	UDP-Glucose	Cellules myéloïdes Microglie	? Activation	Abbracchio MP. 2003 Bianco F. 2005
<i>Relaxine</i> LGR7 ou GPR135	Relaxine 3	Monocyte	Possible rôle dans la différenciation, la croissance et l'apoptose Adhésion et migration	Parsell DA. 1996; Ivell 2002; Schwabe 1994  Figueirodo KA. 2006
<i>Somastotatine</i> SSTR2	Somastotatine	Macrophage Microglie	Signal de costimulation lymphocytaire, Action anti- proliférative et possible contribution à la formation de glioblastome	Perez J. 2003 Fiendt J. 1998 Cervera P. 2002
SSTR3	Somastotatine	Macrophage Microglie	Activation Action anti-proliférative,	Krantic S. 2004
SSTR4	Somastotatine	Microglie	Inhibition IL-13 et GM-CSF	Fiendt J. 1998
<i>SPC/LPC</i> GPR65 et GPR4 GPR6 et GPR3	Lysophospholipide Sphingosylphosphoryl- choline	Monocyte/macrophage Monocyte/macrophage	Possible rôle chiomiotaxique ?	Zhu K. 2001 Duong CQ. 2004
GPR45	Lysophosphatidylcholine	Monocyte	?	
<i>Tachykinine</i> NK1	Substance P	Monocyte/macrophage Microglie	Régulation de l'expression de récepteurs chimiokines Phagocytose	Rasley 2002 Harting, 1988 Rasley A, 2002 et Marriott T. 2000;
NK2	Neurokinine A	Cellules myéloïdes	Induction de NFκB, cytokines Effet anti-prolifératif	Bordelli C. 2005 Vishalakumar S, 2006
<i>Urotensine</i> UT	Urotensine I	Macrophage	Formation/différenciation	Watanabe T., 2005

## Le GPR84

Parce qu'ils forment la plus grande famille de protéines impliquées dans la signalisation cellulaire, les GPCRs sont la cible privilégiée de plus de 50% des médicaments qui existent actuellement sur le marché en Amérique du Nord (<http://www.woodmacresearch.com/phview>; Klabunde et Hessler 2002). Toutefois, leur potentiel thérapeutique n'est que partiellement exploité. Environ 300 GPCRs n'ont pas encore été exploités, dont 150 GPCRs totalement orphelins. L'étude de cette famille de récepteurs présente un intérêt scientifique majeur. Il s'agit d'établir le lien entre la séquence de ces GPCRs et leur fonction physiopathologique. La compréhension de la fonction des nouveaux récepteurs orphelins et une meilleure connaissance de l'interaction entre les GPCRS et les médicaments reste un défi majeur pour l'identification de nouvelles cibles.

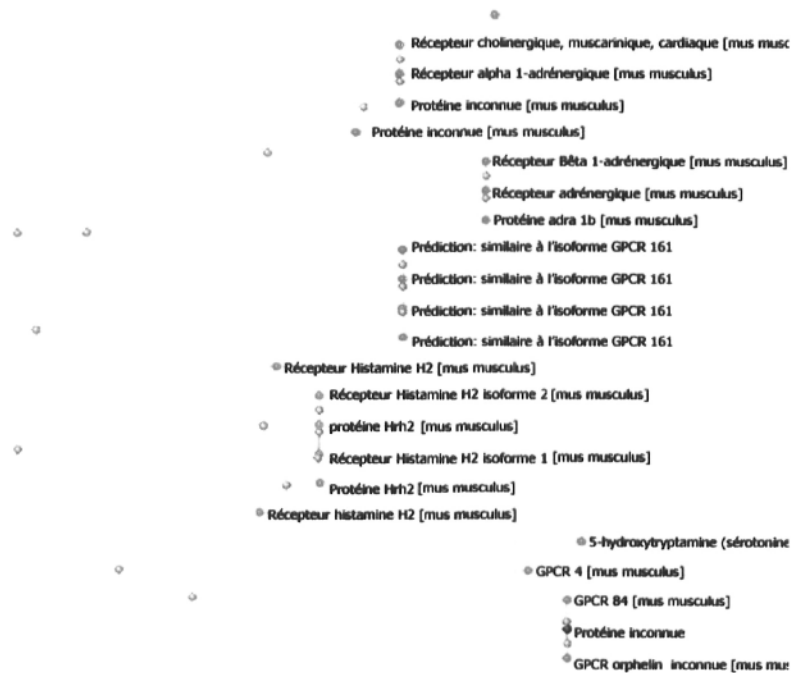
Le GPR84 est un gène nouvellement identifié, par notre équipe, comme étant fortement exprimé dans la microglie activée du cerveau, mais absent en condition normale (Bédard *et al.* 2007). La microglie joue des rôles bénéfiques ou nuisibles dans plusieurs pathologies, comme la sclérose en plaques (Heppner *et al.* 2005), l'Alzheimer (Simard *et al.* 2006) et les tumeurs cérébrales (Villeneuve *et al.* 2005). Nous avons donc porté notre intérêt sur ce récepteur, afin d'étudier sa distribution cellulaire et sa régulation génique.

Ne révélant, jusqu'à tout récemment, aucune fonction ni ligand spécifique du GPR84, les études phylogénétiques nous indiquent qu'il dispose de certaines homologies de séquence avec les récepteurs de la classe A « *Rhodopsin-like* ». Il semble de plus être classifié dans un sous-groupe hétérogène de récepteurs qui englobent tous ceux liant les amines biogéniques (Joost et Methner 2002). Tout dernièrement, une équipe de chercheurs ont découvert des ligands potentiels du récepteur GPR84 en culture cellulaire. Ce sont des acides gras saturés de 9 à 14 atomes de carbone, dont les plus actifs sont l'acide caprique ou décanoïque (C10), l'acide undécanoïque (C11) et l'acide laurique ou dodécanoïque (C12) (Wang *et al.* 2006). Toutefois, en règle générale, les acides gras naturels ont un nombre pair d'atomes de carbone. Dans cette étude, ils ont de plus utilisé une concentration

supraphysiologique (de l'ordre des  $\mu\text{M}$ ), alors qu'en condition physiologique, les concentrations sont beaucoup plus faibles (de l'ordre des  $\text{nM}$ ). Ces résultats suggèrent que ces acides gras ne seraient pas les ligands endogènes du GPR84.

Le gène GPR84 de la souris code pour une protéine de 396 résidus d'acides aminés, présentant 85% d'homologie avec la protéine humaine (Wittenberger *et al.* 2001). Par analyse de séquence génomique, Wittenberger et ses collègues (2001) ont localisé le gène humain sur le chromosome 12q13.13 et celui murin sur le chromosome 15. Tout comme nous l'avons mentionné dans la section de classification des GPCRs, les récepteurs apparentés à la rhodopsine comporte généralement un motif DRY. Le GPR84, à sa différence, possède plutôt un motif GRY et ses extrémités N et C terminales sont relativement courtes. On ignorait encore le sous-type de protéines G que recrute le récepteur de même que les effecteurs et la voie de signalisation empruntée jusqu'à ce qu'une équipe suggère que l'activation du GPR84 soit couplé à une voie découlant de l'activation d'une protéine de type  $G_{i/o}$  (Wang *et al.* 2006). Enfin, selon le site Genelynx et NCBI, on lui attribue, de façon imprécise, un rôle dans la communication cellulaire et les dernières publications lui accorde un rôle dans l'immunité (Venkataraman et Kuo 2005; Wang *et al.* 2006; Bouchard *et al.* 2007). L'arbre de classification, à la figure 10, illustre les GPCRs présentant certaines homologies de séquence avec la séquence nucléotidique du GPR84 de souris.





**Figure 12.** Dendrogramme des récepteurs présentant certaines similarités de séquences en relation avec le GPR84 ou EX33. Les multiples alignements inter-espèces ont été générés sur le site [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi).

Initialement, l'expression du gène GPR84 a été découverte dans tous les organes vitaux humains, y compris la médulla du cerveau et la moelle épinière, la moelle osseuse et les leucocytes périphériques du sang (Wittenberger *et al.* 2001). L'expression de l'ARNm, un transcrit de 1.5 Kb, était beaucoup plus abondante chez les neutrophiles, eosinophiles et monocytes que chez les lymphocytes (Wittenberger *et al.*; Yousefi *et al.* 2001). Récemment, Venkataraman et Kuo (2005) ont utilisé une souris déficiente en GPR84 qui n'exposait aucune anomalie phénotypique évidente. Ils ont rapporté que des lymphocytes T déficients en GPR84 exprimaient plus abondamment l'interleukine-4 que des lymphocytes T de type sauvage lorsqu'ils étaient stimulés, en culture, avec un anticorps anti-CD3 ou anti-CD28. De plus, Wang. *et al* (2006) ont démontré une expression accrue du GPR84 chez les monocytes/macrophages activés, de même qu'une production amplifiée de la cytokine pro-inflammatoire IL-12 suite à l'association du GPR84 à des acides gras. Toutefois, aucune fonction au niveau du CNS ne lui a été attribuée.

## 1.7 Objectifs des travaux

Dans le cadre d'un programme visant à démystifier les mécanismes qui gouvernent la formation et les fonctions biologiques des macrophages du cerveau, notre laboratoire se concentre sur l'étude de nouvelles molécules modulées de façon différentielle chez ces cellules en diverses conditions inflammatoires. Le but de ces travaux à long terme est de manipuler ces cellules à des fins thérapeutiques.

Nous avons récemment comparé le transcriptome des cellules microgliales, des monocytes et des macrophages par l'utilisation de puce à ADN (Bédard *et al.* 2007). Le GPR84 était parmi les gènes identifiés comme étant exprimé dans la microglie fraîchement purifiée, mais une étude préliminaire ultérieure a révélé très peu de cellules exprimant le transcrit du GPR84 dans le cerveau de souris adultes en bonne santé. Dans la présente étude, nous avons testé l'hypothèse que la transcription du gène GPR84 soit augmentée dans la microglie lors de processus inflammatoires, comme l'endotoxémie et l'encéphalomyélite autoimmune expérimentale (EAE : modèle animal de la sclérose en plaques). Plus spécifiquement, nous avons étudié la distribution de l'ARNm du GPR84 dans le cerveau de souris et sa régulation à l'aide de médiateurs pro-inflammatoires. Dans le chapitre qui suit, je présenterai les résultats de cette étude qui ont d'ailleurs été publiés dans le journal *Glia* (Bouchard *et al.* 2007).

## CHAPITRE II

# **G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR 84, A MICROGLIA-ASSOCIATED PROTEIN EXPRESSED IN NEUROINFLAMMATORY CONDITIONS <sup>1</sup>**

Caroline Bouchard, Julie Pagé, Andréanne Bédard, Pierrot Tremblay and Luc  
Vallières

### **2.1 Résumé**

Le récepteur couplé aux protéines G GPR84 est un membre nouvellement identifié de la superfamille des récepteurs à sept domaines transmembranaires, dont le ligand endogène, la fonction et la régulation demeurent inconnus. Dans cette étude, nous rapportons une robuste expression du GPR84 dans les cellules microgliales chez les souris souffrant d'endotoxémie. Cet effet fut aussi observé dans des populations de macrophages périphériques et, à une moindre mesure, dans les monocytes. L'expression du GPR84, au cours de l'endotoxémie, est gouvernée, au moins en partie, par des cytokines pro-inflammatoires, notamment le TNF et l'IL-1. Des souris déficientes en l'une ou l'autre de ces cytokines comportaient un nombre considérablement diminué de cellules exprimant le GPR84 dans leur cortex cérébral comparativement aux souris de type sauvage, en réponse à la LPS. De plus, lorsqu'il fut injecté intracérébralement ou encore additionné à des cultures microgliales, le TNF recombinant stimulait l'expression du GPR84 par le biais d'un mécanisme insensible à la dexaméthasone. Finalement, nous avons démontré que la production du GPR84 par la microglie se présentait non seulement durant la phase aiguë de l'endotoxémie, mais également durant l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), un modèle de la sclérose en plaques. En conclusion, cette étude rapporte l'identification d'un nouveau marqueur, sensible, de l'activation microgliale, lequel pourrait jouer un rôle important dans la régulation des processus neuroinflammatoires.

---

<sup>1</sup> Article publié dans le journal *Glia*, 21 février 2007

## 2.2 Abstract

G protein-coupled receptor 84 (GPR84) is a recently discovered member of the seven transmembrane receptor superfamily whose function and regulation are unknown. Here we report that in mice suffering from endotoxemia, microglia express GPR84 in a strong and sustained manner. This property is shared by subpopulations of peripheral macrophages and, to a much lesser extent, monocytes. The induction of GPR84 expression by endotoxin is mediated, at least in part, by proinflammatory cytokines, notably tumor necrosis factor (TNF) and interleukin-1 (IL-1), because mice lacking either one or both of these molecules have fewer GPR84-expressing cells in their cerebral cortex than wild-type mice during the early phase of endotoxemia. Moreover, when injected intracerebrally or added to microglial cultures, recombinant TNF stimulates GPR84 expression through a dexamethasone-insensitive mechanism. Finally, we show that microglia produce GPR84 not only during endotoxemia, but also during experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), a model of multiple sclerosis. In conclusion, this study reports the identification of a new sensitive marker of microglial activation, which may play an important regulatory role in neuroimmunological processes, acting downstream to the effects of proinflammatory mediators.

## 2.3 Introduction

GPR84 (also called EX33) is a newly discovered orphan receptor of the rhodopsin superfamily that shows only limited similarity to known receptors (Foord et al. 2005; Fredriksson et al. 2003; Joost and Methner 2002; Wittenberger et al. 2001; Yousefi et al. 2001). It is predicted to contain seven transmembrane domains linked by alternating intracellular and extracellular loops. According to phylogenetic studies (Fredriksson et al. 2003; Joost and Methner 2002; Wittenberger et al. 2001), GPR84 can be classified in a heterogeneous subgroup of distantly related receptors that include those for biogenic amines and phospholipid mediators, but whether the natural ligand of GPR84 belongs to one of these classes of signaling molecules remains to be determined.

GPR84 was first identified as being predominantly expressed in myeloid cells, including neutrophils, eosinophils and phorbol ester-activated peripheral blood

mononuclear cells, suggesting a role for GPR84 in immune function (Yousefi et al. 2001). GPR84-deficient mice have been generated and exhibit no obvious abnormalities, although T lymphocytes collected from these mice secrete higher levels of interleukin-4 than wild-type T cells in response to CD3 crosslinking in culture (Venkataraman and Kuo 2005). No other function has been ascribed to GPR84 thus far.

The primary immune effector cells of the central nervous system, microglia, are of myeloid-monocytic origin. These cells play detrimental and beneficial roles in many pathologies, such as multiple sclerosis (Heppner et al. 2005), Alzheimer's disease (Simard et al. 2006) and cerebral tumors (Villeneuve et al. 2005). Unfortunately, there is no way at present to selectively manipulate these cells for therapeutic purposes, but this possibility may emerge from a better understanding of the mechanisms that govern their development and function. To identify novel signaling pathways involved in microglia biology, we have recently compared the transcriptomes of microglia, monocytes and spleen macrophages after isolation by flow cytometry using oligonucleotide microarrays (Bédard et al. 2007). GPR84 was among the genes identified as being highly expressed in freshly-purified microglia, but subsequent work revealed very few GPR84-expressing cells in the brains of healthy adult mice. In the present study, we explored the possibility that the GPR84 gene is transcriptionally inducible in microglia. The results indicate that these cells express GPR84 under different inflammatory conditions, notably endotoxemia and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), suggesting a role for GPR84 in the regulation of microglia and neuroinflammatory processes.

## **2.4 Materials and methods**

### **2.4.1 Animals**

C57BL/6 mice purchased from Charles River Laboratories (Montréal, QC, Canada) were adapted to standard laboratory conditions for 1 week before any manipulation. C57BL/6 mice deficient in TNF, IL-1 or both and their wild-type controls were generated from breeders originally obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Genotypes were confirmed by PCR as described previously (Turrin and Rivest 2006). All experiments

were done on males aged 2 to 3 months in accordance with current guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

#### **2.4.2 Intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LPS)**

LPS from *Escherichia coli* O55:B5 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) was dissolved in pyrogen-free saline and injected intraperitoneally at a dose of 1 mg/kg. Control mice were treated identically, except that LPS was substituted by saline.

#### **2.4.3 Intravenous injection of TNF**

Recombinant mouse TNF (R&D Systems, Minneapolis, MN; < 1 endotoxin unit per µg) was dissolved in pyrogen-free saline and injected via a tail vein at a dose of 100 ng per animal. Control mice were treated identically, except that TNF was substituted by saline.

#### **2.4.4 Intracerebral injection of TNF**

Mice were anesthetized, shaved and immobilized in a stereotaxic frame. A midline incision was made on the scalp, followed by a circular craniotomy over the right hemisphere, 1.7mm lateral and 1mm rostral from bregma. After removal of the dura mater, a 28-gauge stainless steel internal cannula (Plastics One, Roanoke, VA) connected to a 5-µl Hamilton syringe by polyethylene tubing was advanced into the caudoputamen at a depth of 3.5 mm from the skull surface. Thereafter, 1 µl of pyrogen-free saline containing 100 ng of TNF was injected over 2 min using a UMPII micropump (World Precision Instruments, Sarasota, FL). After the injection, the syringe was left in place for 2 min before being withdrawn very slowly. Control mice were treated identically, except that TNF was substituted by saline.

#### **2.4.5 EAE induction**

Mice were injected subcutaneously on day 0 and 7 with 200 µl of emulsion containing 300 µg of myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) peptide 35-55 (synthesized by Service de Synthèse de Peptide de l'Est du Québec, Québec, QC, Canada) in saline with an equal volume of complete Freund's adjuvant containing 500 µg of killed

*Mycobacterium tuberculosis* H37 RA (Difco Laboratories, Detroit, MI). In addition, 500 ng of pertussis toxin (List Biological Laboratories, Campbell, CA) were injected intraperitoneally immediately and 48 h after the first immunization. Mice were monitored daily for clinical signs of EAE and scored as follows: 0, no detectable signs; 1, tail flaccidity; 2, hindlimb weakness and poor righting ability; 3, hindlimb paralysis/paresis; 4, hindlimb paralysis and forelimb paraparesis; 5, moribund or dead.

#### 2.4.6 Tissue preparation

Mice were anesthetized and transcardially perfused with 10 ml of saline, followed by ice-cold 4% paraformaldehyde in borate buffer, pH 9.5, over 10 min. Their brains, spinal cords and spleens were removed, postfixed for 2 days at 4 °C and then cryoprotected overnight in the same fixative supplemented with 20% sucrose. The brains and spleens were cut at 30 µm using a freezing microtome, collected in cryoprotectant (30% ethylene glycol, 20% glycerol, 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4) and stored at -20°C until histological analysis. Spinal cord segments were cut at 30 µm using a cryostat, mounted onto Snowcoat X-tra slides (Surgipath, Winnipeg, MB, Canada) and stored at -20°C.

#### 2.4.7 cDNA cloning

Total RNA from BV2 cells, cultured with LPS as described below, was isolated using the GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) following the manufacturer's protocol. Five micrograms of RNA was reverse transcribed for 50 min at 42°C with Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA). Partial cDNAs were PCR amplified with Platinum Pfx DNA polymerase (Invitrogen) and the following primers: GPR84 (full length), forward 5'-CTGGAAGCCTGACTGCCCCTCAAAA-3' and reverse 5'-CTCC- TTGGGTCACACAGGGTTGACG-3'; GPR84 (nested #1), forward 5'-CCTCCACCTCCATTGGCGTACCG-3' and reverse 5'-GCAAAGCTGGTCACCCCCA-CAAC-3'; GPR84 (nested #2), forward 5'-AGAAGCCATGCCTGGCCACTTCC-3' and reverse 5'-GGGGCTTGCGATGCACTTCTGG-3'; GPR84 (nested #3), forward 5'-CCAC-GCGTATGGCTCCATCCTGA-3' and reverse 5'-CACAGGGTTGACGCACTGATTCC-TG-3'; TNF, forward 5'-CCCAGAAAAGCAAGCAGCCAACCA-3' and reverse 5'-GAG-AGGCCAGGTGGGACAGTC-3'; TNF, forward 5'-CCCAGAAAAGCAAGCAGCCAA-

CCA-3' and reverse 5'-GAGAGGCCAGGTGGGGACAGCTC-3'. The PCR conditions consisted of an initial denaturation step (94°C, 2 min), followed by 30 cycles of PCR reaction (94°C for 15 sec, 63°C for 30 sec, 68°C for 100 sec), and then by a final extension step (68°C, 2 min). The amplicons were cloned into the PCR-Blunt II-TOPO vector (Invitrogen) and automatically sequenced from both ends to confirm identity. Before riboprobe synthesis (see below), the plasmids were linearized and purified with a QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Valencia, CA).

#### **2.4.8 *In situ* hybridization**

GPR84 and TNF mRNAs were detected by radioisotopic *in situ* hybridization according to a previously described protocol (Villeneuve et al. 2005)

#### **2.4.9 Combined immunohistochemistry and *in situ* hybridization**

Free-floating sections were washed in 50mM potassium phosphate-buffered saline (KPBS) and treated with an avidin-biotin blocking kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA). The sections were then incubated sequentially for 2 h at room temperature with rabbit anti-Iba1 (1:1000; Waco Chemicals, Richmond, VA) and goat anti-rabbit (1:400; Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) antibodies in KPBS supplemented with 2% heparin sulfate. After a one-hour incubation in ABC solution (Vector Laboratories), the staining was developed for 9 min in KPBS containing 0.5 mg/ml diaminobenzidine, 2 mg/ml  $\beta$ -D(+)-glucose and 1  $\mu$ l/ml glucose oxidase. Each of those steps was followed by four 5-min rinses in KPBS. Following staining, the sections were processed for *in situ* hybridization detection of GPR84 as described above, except that thionin counterstaining was omitted.

#### **2.4.10 Volumetric analysis**

All quantitative analyses were done by an observer who was blind to the treatment status of the material. Systematically sampled sections (every 10<sup>th</sup> section through the brain) were processed for *in situ* hybridization detection of GPR84 as described above. The volume occupied by GPR84<sup>+</sup> cells was estimated by the Cavalieri method using Stereo Investigator software (Microbrightfield, Colchester, VT) driving a motorized stage (Ludl, Hawthorne, NY) on a Nikon E800 microscope with a 4 $\times$  Plan Apochromat objective



(numerical aperture 0.1). A point grid of  $300 \times 300 \mu\text{m}$  was overlaid on each section and the points that fell within the region of interest were counted. Point counts were converted to volume estimates taking into account sampling frequency, magnification, grid size, and section thickness.

#### **2.4.11 Cell counting**

Systematically sampled sections (every 10<sup>th</sup> section through the brain or 6<sup>th</sup> section through the spinal cord) were hybridized for GPR84 mRNA as described above. Labeled cells were counted in the cerebral cortex or the T1-T10 of the spinal cord using the optical fractionator method and Stereo Investigator software. The region of interest was traced using a 4× Plan Apochromat objective (numerical aperture 0.1) and sampled using a 40× Plan Apochromat oil objective (numerical aperture 1.4). The counting parameters for the brain were as follows: distance between counting frames,  $400 \times 400 \mu\text{m}$ ; counting frame size,  $100 \times 100 \mu\text{m}$ . For the spinal cord, the counting parameters were the following: distance between counting frames,  $500 \times 1000 \mu\text{m}$ ; counting frame size,  $80 \times 80 \mu\text{m}$ . The counting unit was defined as a cluster of emulsion grains with a diameter not larger than  $21 \mu\text{m}$ . The clusters were counted only if they laid within the counting frame and did not intersect forbidden lines.

#### **2.4.12 Imaging**

Photomicrographs were taken using a Retiga EX monochrome camera (QImaging, Burnaby, BC, Canada) mounted on a Nikon E800 microscope. The images were adjusted for contrast, brightness and sharpness using Photoshop 7 (Adobe Systems, San Jose, CA).

#### **2.4.13 Optical densitometry**

*In situ* hybridization signals were quantified at the single-cell level by optical density readings. Sections of the dorsal cerebral cortex were photographed (12-bit, grayscale) in dark-field microscopy using a 10× Plan Apochromat objective. On each image, the intensity of all the signals was analyzed with ImageJ software 1.36. Each signal was circled using the round selection tool of a fixed dimension ( $40 \times 40$  pixels) and the mean optical

intensity of that area was recorded. The value was subtracted from the average of 6 background measurements.

#### **2.4.14 Cell culture**

BV2 mouse microglial cells were seeded at  $1 \times 10^6$  cells/well in 6-well plates and grown for 24 h in Dulbecco's modified Eagle's medium (Wisent, Saint-Bruno, QC, Canada) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 110 mg/L sodium pyruvate, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. THP-1 human monocytes were seeded at  $2 \times 10^6$  cells in T25 flasks and grown for either 24 h under the same conditions as BV2 cells or for 72 h in the presence of 100 ng/ml phorbol 12-myristate 13-acetate (Sigma-Aldrich). The medium was then replaced with fresh medium supplemented with one or a combination of the following: recombinant mouse TNF, IL-1 and IL-6 (R&D Systems; < 1 endotoxin unit per µg), PGE2 (Sigma-Aldrich), goat anti-TNF, anti-IL-1 and anti-IL-6 antibodies (R&D Systems), dexamethasone phosphate (Sabex, Boucherville, QC, Canada) and LPS. Cells were cultured for 6 h under these conditions before total RNA isolation.

#### **2.4.15 Real-time quantitative RT-PCR (qRT-PCR)**

RNA from BV2 cells and Ficoll-purified leukocytes was isolated using the GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit or the Trizol reagent (Sigma), respectively. RNA quantity and quality were assessed using the RNA 6000 Nano LabChip and Agilent Bioanalyser 2100 (Agilent, Mountain View, CA). 1.25 µg of total RNA was reverse transcribed for 10 min at 25 °C and 120 min at 42 °C using a random primer hexamer and Superscript II reverse transcriptase. Quantitative PCR was conducted in duplicate in a final volume of 15 µl containing 1× Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), 10 nM Z-tailed forward primer (GPR84, 5-ACTGA ACCTGACCGTACAGT-GAAACTGGGAACCTCAGTCTC-3; TLR2, 5-ACTGAACCTGACCGTACAAAGAT-GCGCTTCCTGAATTTG-3; 18S rRNA, 5-ACTGAACCTGACCGTACATGCATGTCT-AAGTACGCACGG-3), 100 nM untailed reverse primer (GPR84, 5-TTGGCATCTGAGC-TGTTCCA-3; TLR2, 5-CGTTTTTACCACCCGGATCC-3; 18S rRNA, 5-AATGAGCC-

ATTCGCAGTTTCA-3), 100 nM Amplifluor Uniprimer (Chemicon, Temecula, CA) and 2  $\mu$ l cDNA. Amplification was done using the ABI PRISM 7900 sequence detector (Applied Biosystems) under the following conditions: 2 min at 50°C, 4 min at 95°C, followed by 55 cycles of 15 sec at 95°C and 40 sec at 55°C. Ribosomal 18S RNA was used as an internal control to normalize the expression levels of GPR84 mRNA. Data were analyzed using SDS 2.0 software (Applied Biosystems).

#### 2.4.16 Statistical analysis

Means were compared using the unpaired *t* test or one-way ANOVA when the data met the assumptions of normality (Shapiro-Wilk *W* test) and homogeneity of variance (Levene's test). As an alternative, the Wilcoxon rank-sum or Kruskal-Wallis test was used when the distribution was abnormal or the Welch ANOVA when the variances were unequal. The Tukey-Kramer HSD or Dunn's test was used for parametric or nonparametric *post hoc* multiple comparisons, respectively. A two-way ANOVA, followed by the Tukey test, was used when more than one independent variable was being evaluated. The relationship between the number of GPR84<sup>+</sup> cells and the clinical score of EAE was examined using the Spearman rank correlation test. All statistical analyses used an alpha of 0.05 and were done with Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, CA).

## 2.5 Results

### 2.5.1 Microglia express GPR84 during endotoxemia

To verify whether GPR84 expression is upregulated in the nervous system during endotoxemia, brain sections from mice injected intraperitoneally with LPS or saline were analyzed for the presence of GPR84 mRNA by radioisotopic *in situ* hybridization using a 1.47-kb riboprobe. While very few positive cells were detectable in normal conditions (**Fig. 1a**) and 1 h after LPS injection (data not shown), many strongly positive cells were observed along the leptomeninges and blood vessels 3 h after LPS treatment (**Fig. 1b,e**). At all the other time points examined (i.e., 6, 12 and 24 h), GPR84-expressing cells were

found in large numbers, distributed rather evenly across the parenchyma, from the olfactory bulb to the medulla (**Fig. 1c,d,f,g**). To determine the identity of these cells, adjacent sections were doubly labeled for GPR84 mRNA and the monocytic cell marker Iba1 by combined *in situ* hybridization and immunohistochemistry. We found that GPR84 mRNA was virtually always colocalized with Iba1 (**Fig. 1h**), and that a majority of Iba1<sup>+</sup> cells

expressed this transcript from 6 to 24 h after LPS injection. Additional sections hybridized with three nested antisense riboprobes (203-229 bp in length) revealed similar results, whereas sections hybridized with a full-length sense riboprobe showed no signal (data not shown), confirming the specificity of the method. Furthermore, we analyzed total RNA extracted from the brains of mice killed 6 or 24 h after LPS injection by qRT-PCR. As expected, the results showed that the levels of GPR84 mRNA were increased at these time points (**Fig. 1i**) and closely paralleled those of TLR2 (**Fig. 1j**), an inflammatory marker known to be induced in the brain by LPS (Laflamme et al. 2001). Altogether, these results indicate that microglia selectively express GPR84 during endotoxemia in a strong and sustained manner.

### 2.5.2 Peripheral monocytic cells express GPR84 in response to LPS

To address the question of whether GPR84 is expressed only by microglia or also by other populations of monocytic cells, we first analyzed spleen sections from LPS-treated and control mice by *in situ* hybridization. Similarly to what we observed in the brain, almost no signal was detected under normal conditions (**Fig. 2a,b**) and 1 h after LPS injection (data not shown), but many positive cells were observed from 3 to 24 h post-treatment (**Fig. 2c,d**). Dual labeling confirmed that the majority of GPR84 mRNA<sup>+</sup> cells were Iba1<sup>+</sup> macrophages (**Fig. 2e**). Interestingly, these cells were mainly located in the red pulp and much less frequently in the white pulp (**Fig. 2c**), indicating that GPR84 is differentially expressed among subsets of macrophages. Next, to determine whether GPR84 expression is upregulated in leukocytes during endotoxemia, blood samples collected from mice 6 h after intraperitoneal injection of LPS or saline were analyzed by qRT-PCR. As shown in **Fig. 2f**, the leukocytic levels of GPR84 mRNA were very low in LPS-treated mice, but significantly higher than in normal mice. To examine more specifically the ability

of monocytes, the common precursors of microglia and peripheral macrophages, to produce GPR84, cultures of non-adherent cells of the monocytic line THP-1 were exposed for 6 h to LPS, and RNA extracted from these cells were analyzed by qRT-PCR. As a positive control, THP-1 cells previously differentiated into adherent macrophages in the presence of phorbol ester were treated identically. Consistent with the above results, a relatively small but significant increase in the levels of GPR84 mRNA was observed in undifferentiated

THP-1 cells, whereas these levels were 6 to 7 time higher in their differentiated counterparts (**Fig. 2f**). Together, these results indicate that monocytic cells other than microglia can express GPR84 upon appropriate stimulation, and suggest that GPR84 might play a more important role in macrophages than in monocytes.

### **2.5.3 Proinflammatory cytokines induce GPR84 expression in cultured microglia through a dexamethasone-insensitive mechanism**

Because LPS is thought not to cross the blood-brain barrier (Nadeau and Rivest 2000; Singh and Jiang 2004), it is possible that proinflammatory molecules rapidly produced within the brain in response to endotoxin mediate the induction of GPR84 expression. To explore this possibility, we cultured BV2 microglial cells for 6 h with either LPS, as a positive control, or different mediators known to be expressed in the brain during endotoxemia. Quantitative RT-PCR analysis showed that molecules able to stimulate the NF- $\kappa$ B pathway, namely LPS, TNF and, to a lesser extent, IL-1, but not IL-6 nor PGE2, enhanced the levels of GPR84 mRNA in BV2 cells (**Fig. 3a**). The effects of TNF and IL-1 were blocked by the addition of the corresponding antibodies to the culture medium (**Fig. 3b**), but not by the addition of anti-IL-6 antibody, confirming the specificity of the results. Note that the fact that the anti-TNF and anti-IL-1 antibodies (but not the anti-IL-6 antibody) reduced the levels of GPR84 mRNA below the basal levels (PBS controls) indicate that these antibodies successfully blocked not only the cytokines supplemented to the cultures, but also those endogenously produced by the cells.

To gain insight into the mechanism that governs GPR84 gene transcription, we examined its sensitivity to the glucocorticoid agonist dexamethasone. This steroid has been

shown to repress about half of the LPS-inducible genes in macrophages by disrupting interactions between the p65 subunit of NF- $\kappa$ B and interferon regulatory factor 3 (Ogawa et al. 2005). As revealed by qRT-PCR, addition of dexamethasone to the culture medium at a concentration as high as 1  $\mu$ g/ml did not block the induction of GPR84 expression by LPS or TNF (**Fig. 3c**). As a positive control, RNA extracted from LPS-stimulated cells incubated with or without dexamethasone were analyzed for IL-6 expression, which is known to be sensitive to dexamethasone (Ogawa et al. 2005). As expected, a 3.8-fold

reduction of LPS-induced IL-6 expression was observed in dexamethasone-treated cells (**Fig. 3d**). Altogether, these results demonstrate that proinflammatory cytokines, notably TNF, stimulate GPR84 expression in cultured microglia through a dexamethasone-insensitive pathway.

#### **2.5.4 TNF induces GPR84 expression in the brain**

To confirm *in vivo* the ability of TNF to induce GPR84 expression in microglia, brain sections from mice killed 3 or 6 h after intracerebral injection of TNF or saline were analyzed by *in situ* hybridization. Strong signals were found only around the needle track in control mice (**Fig. 4a**), but in a large proportion of the ipsilateral hemisphere in TNF-treated animals (**Fig. 4b-e**). More precisely, stereological analysis revealed that the volume occupied by GPR84<sup>+</sup> cells was about 4 times larger in TNF-treated mice compared to controls (**Fig. 4f**). However, this volume was similar at both time points, suggesting that TNF reached its maximal effect early after injection. To determine whether this response was dependent on the route of administration, additional mice were injected intravenously with TNF and killed at the same time points, but no increase in GPR84 expression was noted in any region of the brain (data not shown). Overall, these results raise the possibility that TNF, produced within the nervous system in response to endotoxin, mediates the induction of GPR84 expression, as it is the case for other genes such as CD14 (Nadeau and Rivest 2000).

### 2.5.5 TNF and IL-1 partially mediate the induction of GPR84 expression in microglia by LPS

To investigate the importance of TNF and IL-1 in the regulation of GPR84 expression in microglia during endotoxemia, mice deficient or not in TNF, IL-1 or both, and sharing the same genetic background, were injected intraperitoneally with LPS and killed 6 h later. Their brains were processed for in situ hybridization, and the number of GPR84<sup>+</sup> cells was estimated in the cerebral cortex using unbiased methods. As shown in **Fig. 5a-e**, we found that the density of GPR84<sup>+</sup> cells was reduced by 42% in IL-1-knockout mice, 56% in TNF-knockout mice and 72% in double knockout mice compared with wild-type littermates. To complement this result, we measured the intensity of hybridization

signals for GPR84 mRNA in the cerebral cortex at the single-cell level by optical density readings. The data revealed that the relative abundance of GPR84 mRNA per cell was reduced by 49% in IL-1-knockout mice, 68% in TNF-knockouts and 76% in double knockouts (**Fig. 5f**). In other words, not only there were fewer GPR84<sup>+</sup> microglia in the brains of mice lacking TNF and/or IL-1, but also microglia that were identified as being positive expressed lower levels of GPR84 mRNA (**Fig. 5g**). Therefore, our results indicate that the induction of GPR84 expression in the brain during endotoxemia is mainly mediated by TNF and, to a lesser extent, IL-1. However, the fact that GPR84 expression was not totally abolished in double knockout mice suggests that other mediators might also contribute to this effect.

### 2.5.6 Microglia express GPR84 during EAE

TNF and other proinflammatory cytokines are known to be produced in the nervous system in many pathological and traumatic conditions (Allan and Rothwell 2001; Nguyen et al. 2002). GPR84 could thus be expressed not only during endotoxemia, but also in other neuroinflammatory conditions in which TNF is produced, notably multiple sclerosis. To examine this possibility, mice were immunized with a MOG peptide to induce EAE, and their brains and spinal cords were collected for in situ hybridization. As shown in **Fig. 6**, numerous GPR84<sup>+</sup> cells were found throughout the CNS of EAE mice. In contrast to what we observed during the later phases of endotoxemia, these cells were not evenly

distributed, but formed clusters, often near blood vessels. Stereological analysis on sagittal sections of the spinal cord (T1-T10) revealed that GPR84<sup>+</sup> cells were already abundant at the onset of EAE (**Fig. 6g**), and that their number tends to increase with disease severity (Spearman rank correlation test,  $P = 0.003$ ,  $R = 0.80$ ). These results suggest that GPR84 might contribute to the development of neuroinflammatory diseases such as multiple sclerosis.

## 2.6 Discussion

In this study, we examined the regulation of a newly discovered gene expressed by myeloid cells, namely GPR84, for which very little information is available. The main finding is that GPR84 gene transcription is strongly induced in microglia by diverse inflammatory stimuli of exogenous or endogenous origin. In pathological conditions, such as endotoxemia and autoimmune demyelinating disease, GPR84 expression in the CNS is widespread and sustained in time. These observations lead us to propose that GPR84, a membrane receptor predicted to interact with G protein subunits, is important for the regulation of microglia, although its precise function remains to be determined.

The present work shows that endotoxemia induces a wave of GPR84 gene expression in the brain that starts along the meninges and vasculature and propagates through all parenchymal regions within a few hours. It is generally believed that endotoxin does not cross the blood-brain barrier (Nadeau and Rivest 2000; Singh and Jiang 2004), implying that soluble mediators released by activated cells (e.g., endothelia, perivascular macrophages) are responsible for the induction of GPR84 gene transcription. In an attempt to identify such mediators, we examined the effect of TNF, because it has been shown that intracerebral administration of anti-TNF antibody blocked LPS induction of CD14 expression in microglia (Nadeau and Rivest 2000). We also examined the effect of IL-1, because this cytokine has overlapping roles with TNF and could thus compensate for its absence. Our results support the concept that TNF and, to a lesser extent, IL-1 mediate the effect of LPS on GPR84 expression in the brain, and that the lack of either one of these cytokines is not compensated by the other. It remains to be determined whether other



mediators contribute to the stimulation of GPR84 expression in the conditions examined here or in response to different immune stimuli.

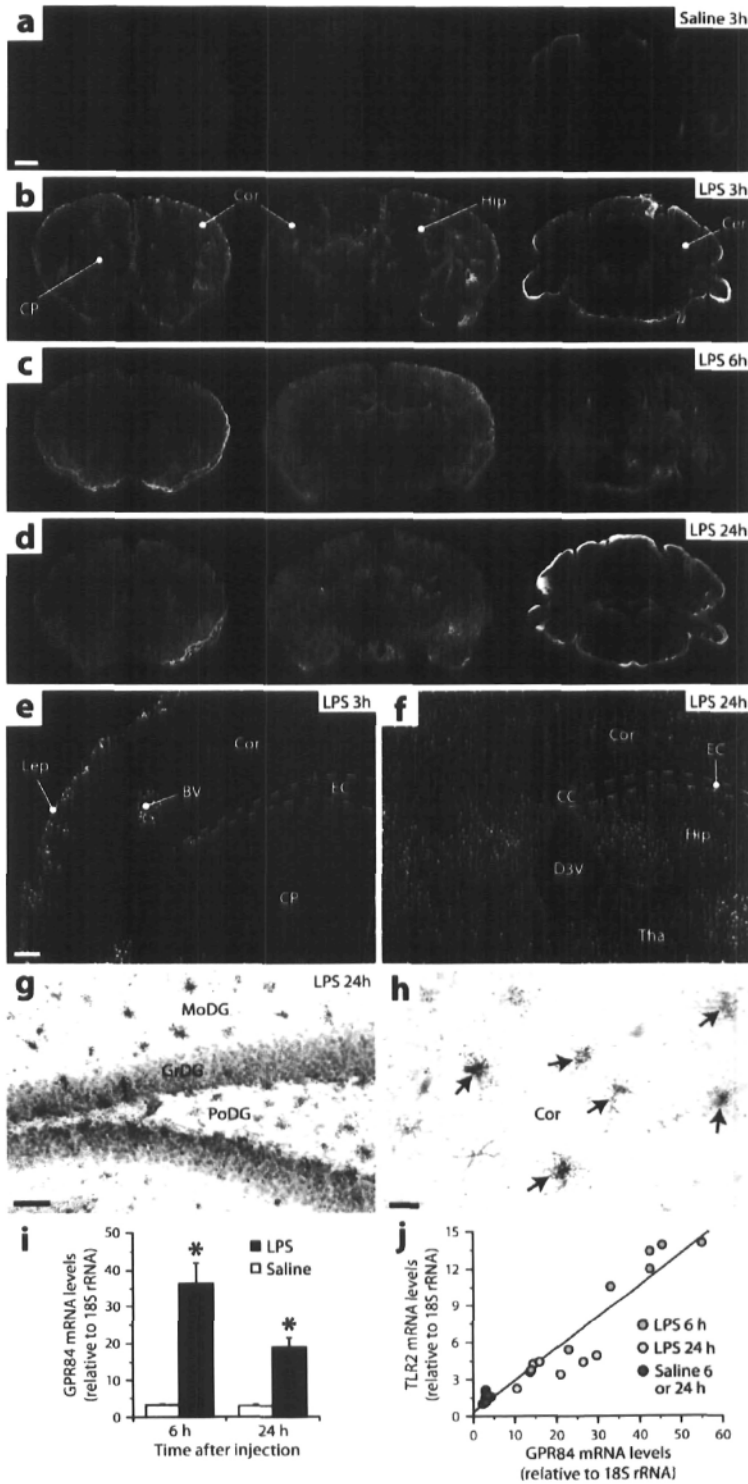
Our results predict that GPR84 would be expressed in the CNS not only during endotoxemia and multiple sclerosis, but also in all neurological conditions in which TNF or IL-1 $\beta$  are produced, such as brain injury, infection, cancer and Alzheimer's disease. In future studies, it will be important to determine whether GPR84 signaling contributes to the development of inflammation in these conditions, and what the consequence of its

dysregulation is. Furthermore, for basic science and therapeutic purposes, it would be useful to identify agents able to inhibit this pathway. Our results indicate that GPR84 gene transcription is not affected by dexamethasone, perhaps because it is induced by a MyD88-independent mechanism or requires coactivators other than the interferon regulatory factors, as suggested for other LPS-inducible, glucocorticoid-resistant genes (Ogawa et al. 2005). As an alternative, it would be interesting to examine the effects of other immunosuppressors, such as cannabinoids, which have recently been shown to interfere with LPS/CD14/TLR4 signaling, probably through a MyD88-independent pathway (Eljaschewitsch et al. 2006; Rivest 2006). Furthermore, the development of specific inhibitors for GPR84 should be of great interest in the pharmaceutical industry, as small-molecule GPR modulators are estimated to account for nearly half of the most popular drugs on the market today (Menzaghi et al. 2002). Because GPR84 is expressed only after appropriate immunostimulation and seems restricted to the myeloid compartment, such antagonists could prove more specific, less toxic and thus safer than other immunomodulators currently available.

Most proteins known to be produced by microglia can also be produced by their monocyte precursors. Only a few proteins, such as TREM2 (Schmid et al. 2002), have been identified with certainty as being expressed more abundantly in microglia compared to monocytes. The present work reveals that microglia and some populations of peripheral macrophages, such as those of the splenic red pulp, have the ability to produce much higher

levels of GPR84 than monocytes and other types of macrophages, such as those of the splenic white pulp. This observation suggests that GPR84 might play a predominant role in some populations of macrophages, including microglia, and not in monocytes. GPR84 can thus be added to the short list of genes known as being expressed preferentially in microglia versus monocytes.

In conclusion, this study identifies GPR84 as a new player in the biology of microglia, and shows for the first time that its expression is highly inducible under inflammatory conditions. The greatest challenges are now to determine the precise role of GPR84, to identify its natural ligand, and to explore the possibility of targeting this signaling pathway for therapeutic benefit.



**Figure 1.** GPR84 is strongly expressed by microglia during endotoxemia.

**a,** Dark-field photomicrographs showing virtually no *in situ* hybridization signal for GPR84 mRNA in brain sections from a mouse killed 3 h after saline injection.

**b-d,** Strong hybridization signals for GPR84 mRNA in brain sections of mice killed 3, 6 or 24 h after intraperitoneal LPS injection, respectively.

**e-g,** Dark-field and bright-field images showing GPR84-producing cells at higher magnifications (blue, Nissl counterstaining). Note that the expression of GPR84 mRNA is restricted to the leptomeninges and blood vessels 3 h after LPS injection, but is widespread at 24 h.

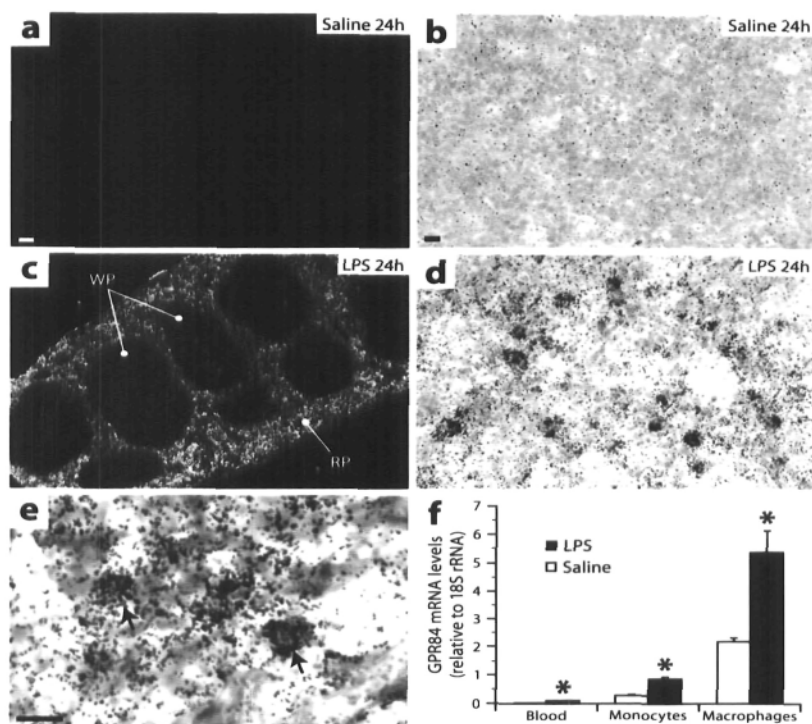
**h,** Double labeling for the microglial marker Iba1 (brown, immunoperoxidase staining) and GPR84 mRNA (black grains, *in situ* hybridization). Arrows indicate doubly labeled cells.

**i,** Increased levels of GPR84 mRNA were detected in the brains of LPS-treated mice, as determined by qRT-PCR. Data are expressed as a ratio to 18S rRNA (mean  $\pm$  SE). \*Two-way ANOVA (treatment,  $P < 0.0001$ ; time,  $P = 0.012$ ; treatment,  $P = 0.013$ ) followed by Tukey-Kramer test.

**j,** A strong correlation was found between the levels of GPR84 and TLR2 mRNAs, as determined by qRT-PCR (Pearson correlation,  $P < 0.0001$ ,  $R = 0.96$ ).

**Abbreviations:** BV, blood vessel; Cer, cerebellum; Cor, cerebral cortex; CC, corpus callosum; CP, caudoputamen; D3V, dorsal third ventricle; EC, external capsule; GrDG, granule cell layer of the dentate gyrus; Hip, hippocampus; Lep, leptomeninges; MoDG, molecular layer of the dentate gyrus; PoDG, polymorphic layer of the dentate gyrus; Tha, thalamus.

**Scale bars:** **a-d,** 1 mm; **e, f,** 250  $\mu$ m; **g,** 50  $\mu$ m; **h,** 20  $\mu$ m.



**Figure 2.** GPR84 is expressed by peripheral macrophages and, to a lesser extent, monocytes upon stimulation with LPS.

**a, b,** Dark-field and bright-field photomicrographs showing no *in situ* hybridization signal for GPR84 mRNA in spleen sections from a mouse killed 24 h after saline injection. Blue, thionin counterstaining.

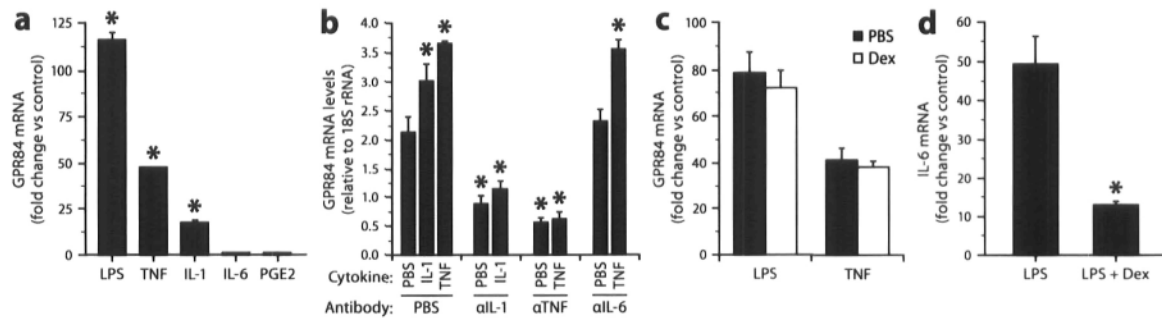
**c, d,** Strong hybridization signals (white or black grains) for GPR84 mRNA in spleen sections from a mouse killed 24 h after intraperitoneal LPS injection. Note the difference between the red and white pulp.

**e,** Double labeling for the macrophage marker Iba1 (brown, immunoperoxidase staining) and GPR84 mRNA (black grains, *in situ* hybridization). Arrows indicate double-labeled cells.

**f,** qRT-PCR analysis revealed a small but significant increase in GPR84 expression in blood leukocytes collected from mice 6 h after LPS injection. Increased levels of GPR84 mRNA were also recorded in cultured THP-1 cells, undifferentiated (monocytes) or differentiated into macrophages by exposure to phorbol ester, 6 h after the addition of LPS. Data are expressed as a ratio to 18S rRNA (mean  $\pm$  SE). \*Student's *t* test,  $P = 0.0057$  (blood), 0.0017 (monocytes) or 0.0169 (macrophages).

**Abbreviations:** RP, red pulp; WP, white pulp.

**Scale bars:** **a, c,** 100  $\mu$ m; **b, d,** 20  $\mu$ m; **e,** 10  $\mu$ m.



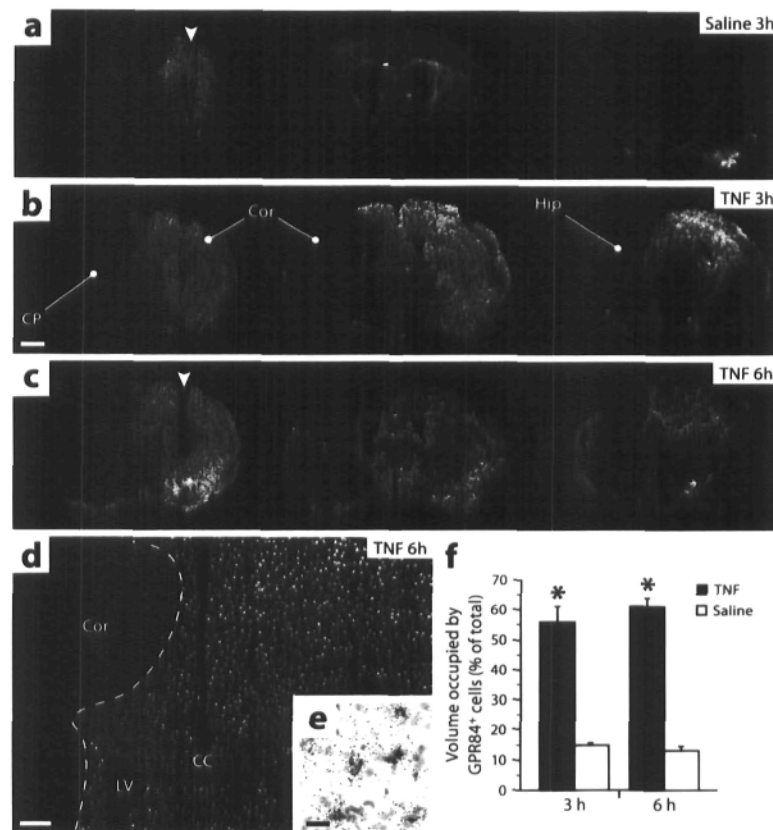
**Figure 3.** GPR84 expression is induced in cultured microglia by proinflammatory molecules through a dexamethasone-insensitive mechanism.

**a,** Quantitative RT-PCR analysis showed increased levels of GPR84 mRNA in BV2 microglial cells exposed for 6 h to LPS, TNF or IL-1, but not to IL-6 nor PGE2, compared to those in control cells. Concentrations used: LPS, 1 µg/ml; cytokines and PGE2, 100 ng/ml. Data are expressed as mean ± SE. \*Kruskal-Wallis ANOVA followed by Dunn's test,  $P = 0.01$ .

**b,** The increase of GPR84 mRNA in BV2 cells in response to TNF (10 ng/ml) or IL-1 (10 ng/ml) was blocked by co-incubation with the corresponding antibody (αTNF or αIL-1, 8 µg/ml), but not with anti-IL-6 antibody (αIL-6, 8 µg/ml). \*Significantly different from untreated cells (two-way-ANOVA followed by Tukey-Kramer test,  $P < 0.0001$ ).

**c,** The induction of GPR84 expression in BV2 cells by LPS (1 µg/ml) or TNF (100 ng/ml) was not inhibited by the addition of dexamethasone (Dex; 1 µg/ml).

**d,** As a positive control for the experiment shown in **c**, a 3.8-fold reduction of LPS-induced IL-6 expression was detected in cells treated with dexamethasone (1 µg/ml). \*Student's *t* test,  $P = 0.0063$ .



**Figure 4.** GPR84 expression is induced after intracerebral injection of TNF.

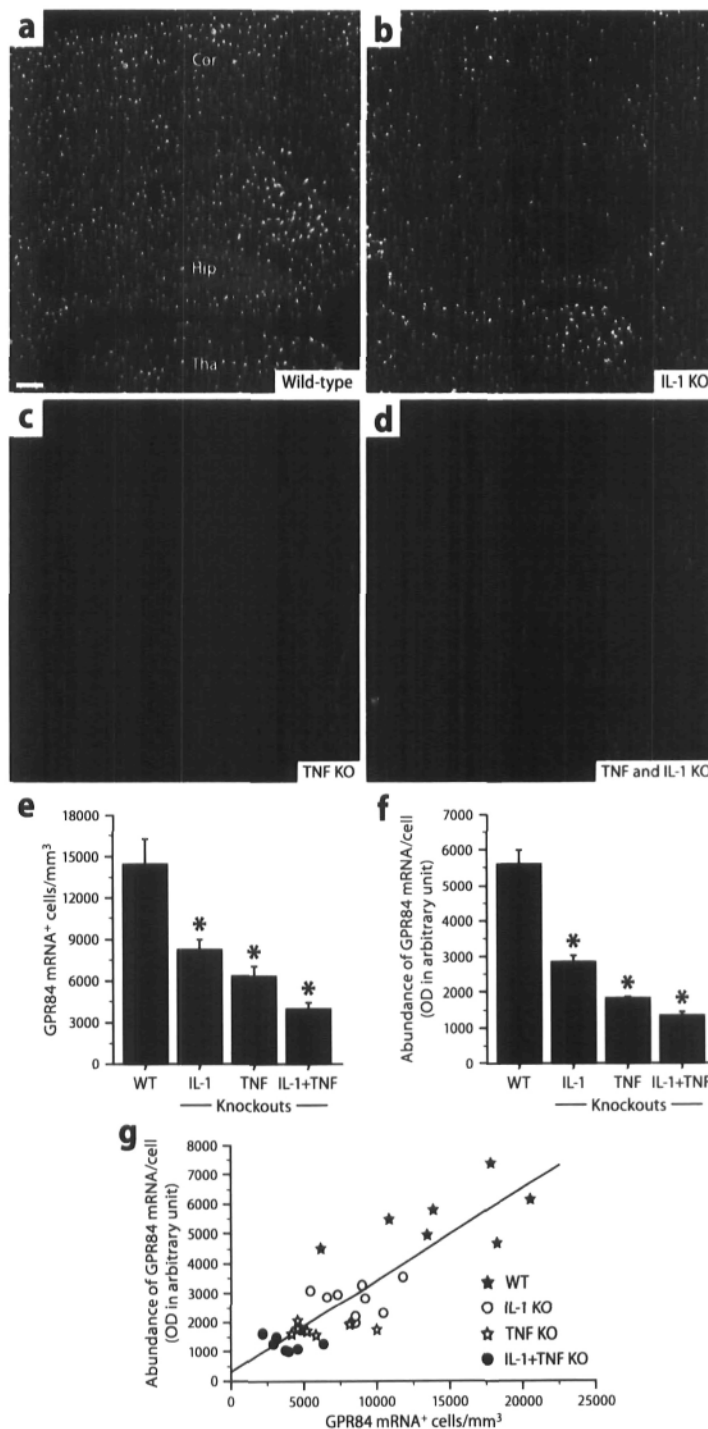
**a-c,** Dark-field photomicrographs showing *in situ* hybridization signals for GPR84 mRNA in brain sections of mice killed 3 or 6 h after injection of TNF (100 ng) or saline into the right caudoputamen. Note that GPR84-expressing cells were present only around the needle track (arrowhead) in the control mouse (**a**), but in a large proportion of the ipsilateral hemisphere in TNF-injected mice (**b, c**).

**d, e,** Dark-field and bright-field images showing GPR84<sup>+</sup> cells at higher magnifications (blue, Nissl counterstaining). A dashed line separate the area containing GPR84<sup>+</sup> cells (right) from the area devoid of such cells (left).

**f,** As estimated by the Cavalieri method, the volume occupied by GPR84<sup>+</sup> cells in TNF-injected mice was ~4 times that in control mice. No difference was observed between the time points examined. Data are expressed as mean  $\pm$  SE. \*Two-way ANOVA followed by Tukey-Kramer test,  $P < 0.0001$ .

**Abbreviations:** Cor, cerebral cortex; CC, corpus callosum; CP, caudoputamen; Hip, hippocampus; LV, lateral ventricle.

**Scale bars:** **a-c,** 1 mm; **d,** 250  $\mu$ m; **e,** 20  $\mu$ m.



**Figure 5.** Reduced expression of GPR84 in mice deficient in TNF and/or IL-1.

**a-d,** Dark-field photomicrographs showing *in situ* hybridization signals for GPR84 mRNA in brain sections of mice killed 6 h after intraperitoneal injection of LPS.

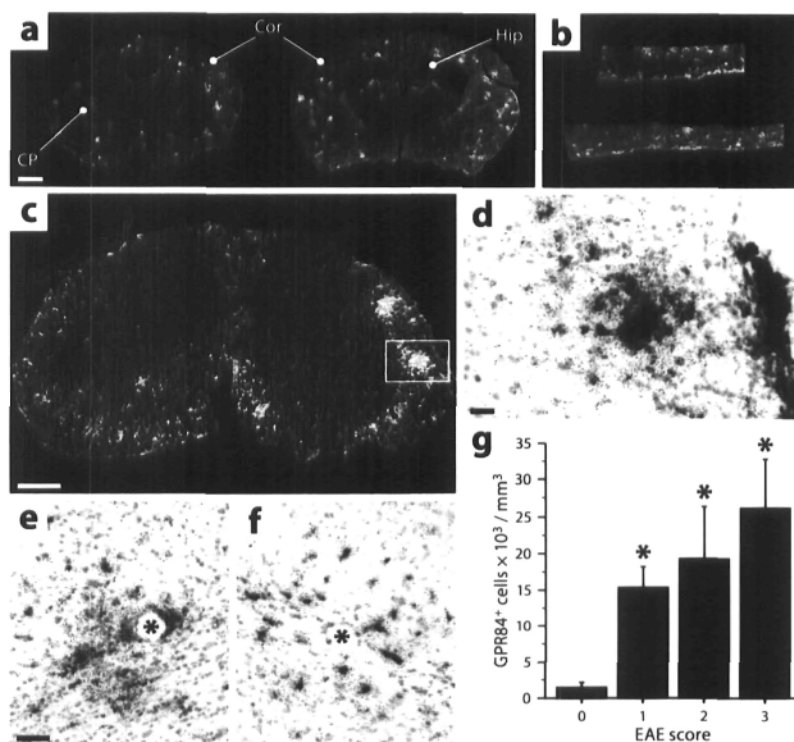
**e,** Stereological analysis revealed reduced numbers of GPR84<sup>+</sup> cells in the cerebral cortex in mice lacking IL-1, TNF or both, compared with wild-type (WT) littermates. Data are expressed as mean ± SE. \*Welch ANOVA followed by Tukey-Kramer test,  $P < 0.0001$ .

**f,** Densitometric analysis revealed lower levels of GPR84 mRNA in cortical microglia in the knockouts. Data are expressed as mean ± SE. \*Welch ANOVA followed by Tukey-Kramer test,  $P < 0.0001$ .

**g,** A positive correlation was found between the number of GPR84<sup>+</sup> cells and the relative abundance of GPR84 mRNA per cell (Pearson correlation,  $P < 0.0001$ ,  $R = 0.85$ ).

**Abbreviations:** Cor, cerebral cortex; Hip, hippocampus; Tha, thalamus.

**Scale bar:** a-d, 200 μm.



**Figure 6.** GRP84 is expressed in the CNS during EAE.

**a, b,** Dark-field photomicrographs showing *in situ* hybridization signals for GPR84 mRNA in brain and spinal cord sections, respectively, of EAE mice with a clinical score of 3.

**c,** A coronal section of the spinal cord from a EAE mouse showing many GPR84<sup>+</sup> cells, preferentially located in the white matter.

**d,** Higher magnification in bright-field of the boxed area in **c**. Blue, Nissl counterstaining.

**e, f,** Bright-field images showing clusters of GPR84-expressing cells near blood vessels (asterisk).

**g,** Stereological cell counts revealed that the number of GPR84-positive cells in the spinal cords of EAE mice tend to increase with disease severity (Spearman rank correlation test,  $P = 0.003$ ,  $R = 0.80$ ). Data are expressed as mean  $\pm$  SE. \*Welch ANOVA followed by Tukey-Kramer test,  $P = 0.03$ .

**Abbreviations:** Cor, cerebral cortex; CP, caudoputamen; Hip, hippocampus.

**Scale bars:** **a, b,** 1 mm; **c,** 100  $\mu$ m; **d,** 25  $\mu$ m; **e, f,** 50  $\mu$ m.



## CHAPITRE III

### CONCLUSION

L'interaction entre le système immunitaire périphérique et cérébral est bien acceptée dans la communauté scientifique. Toutefois, les pathogènes invasifs ne peuvent diffuser librement dans le tissu cérébral en raison de la présence de la barrière hémato-encéphalique (BHE). L'endotoxine de *E.coli* (LPS), une fois présente dans la circulation sanguine, ne traverse donc pas cette barrière (Nadeau et Rivest 2000; Sing et Jiang 2004). C'est pourquoi d'autres acteurs, les médiateurs solubles relâchés par les cellules activées (exemples: cellules endothéliales, macrophages périvasculaires), permettraient la communication et l'activation des cellules résidentes du cerveau. L'infection systémique à la LPS s'avère donc un très bon modèle d'étude pour la régulation de gènes pro-inflammatoires, comme le GPR84, dans les cellules myéloïdes microgliales.

L'objectif principal de départ était de démontrer la robuste inductibilité de l'expression génique du GPR84 dans la microglie et les macrophages périvasculaires suite à une réaction inflammatoire systémique engendrée par l'endotoxine (LPS) et autres stimuli. Nous voulions de plus examiner le patron d'expression du GPR84 dans le tissu cérébral lors de la phase aiguë de cette réponse inflammatoire systémique. Les résultats que nous avons obtenus se sont avérés intéressants puisqu'ils ajoutent un nouvel acteur, le récepteur GPR84, dans la biologie des cellules microgliales et nous démontrent son implication, proprement dite, dans des conditions neuropathologiques où figure le TNF. De plus, la grande majorité de nos résultats ont été obtenus *in vivo*, ce qui ajoute une touche de crédibilité aux données scientifiques.

Nous démontrons dans le chapitre II, qu'une stimulation immunitaire systémique induit une vague d'expression du gène GPR84, débutant le long des méninges et de la microvasculature, s'avérant comparable au patron normal d'expression du récepteur TLR2 (Laflamme 2001) ou encore de la cytokine TNF (Nadeau 2002). En effet, certaines régions fortement vascularisées du cerveau, les organes circoventriculaires (CVO) de même que les vaisseaux sanguins, sont d'importantes cibles pour les cytokines d'origine systémique

produites lors de la phase aigüe de la réponse inflammatoire. Les leptoméniges sont aussi reconnues comme étant des structures hautement vascularisées qui sont de plus sensibles aux agents infectieux. De ces structures, une rapide initiation de l'activation transcriptionnelle de différentes molécules inflammatoires, dont le GPR84, peuvent alors diffuser à travers le SNC et activer les macrophages résidants par le biais de récepteurs constitutifs ou inductibles. À l'intérieur de quelques heures (6 heures), et ce, jusqu'à 24 heures suivant l'injection de l'endotoxine, la transcription de notre gène à l'étude s'étendait à travers tout le parenchyme, d'où l'importance de s'y attarder.

De plus, le niveau d'ARNm du gène GPR84 fût fortement augmenté suite à une injection intracérébrale de TNF, autant qu'il fût significativement diminué suite à l'injection de LPS chez les animaux délétères pour le gène TNF. Cela suggère que cette cytokine est un des médiateurs contribuant à la stimulation de l'expression du gène GPR84. Parce que la production de cytokine IL-1, en absence de TNF pourrait engendrer un effet compensatoire (Turrin 2006), nous avons pris soin d'examiner la régulation du GPR84 par cette interleukine. Nos résultats ont confirmé l'hypothèse que le TNF, et dans une moindre mesure l'IL-1, peuvent moduler la transcription du gène GPR84. Toutefois, l'expression n'étant pas totalement abolie lors de l'inhibition de l'une ou l'autre ou des deux cytokines, d'autres médiateurs peuvent nécessairement activer le GPR84 lors de l'endotoxémie.

Il est bien connu que la LPS agit via le récepteur TLR4/CD14, exprimé en outre dans les CVO, le plexus choroïdien et les leptoméniges (Lacroix et Feinstein 1998; Laflamme et Rivest 2001). Ainsi, lors d'un stimulus extracellulaire précis, comme la LPS, l'interaction entre ce stimulus et son récepteur membranaire TLR4 active une importante cascade de signalisation passant par la molécule adaptatrice MyD88 (qui se lie au domaine cytoplasmique du complexe TLR4), menant à l'activation et donc à la translocation nucléaire des facteurs de transcription tels que, IRF (MyD88-indépendant), AP-1 et NF- $\kappa$ B (MyD88-dépendant) par exemple. Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B, par exemple, se lie par la suite à la séquence consensus  $\kappa$ B présente dans les promoteurs et une production de nombreuses molécules pro-inflammatoires tel l'IL-1, le TNF- $\alpha$  (Nadeau et Rivest 1999), l'IL-6 (Vallieres et Rivest 1997), le TLR2 (Laflamme et al. 2001), des molécules

d'adhésion, et de nombreux récepteurs de chimiokines (Zuurman 2003) comme le FFR2 s'en suit.. D'ailleurs, le FFR2 tout comme le GPR84, est surexprimé suite à une activation microgliale à la LPS et au TNF et requiert la participation du facteur de transcription NFκB (Cui *et al.* 2002). On peut donc penser que le facteur d'activation de la transcription du gène GPR84 serait le NFκB, tel qu'il est le cas pour de nombreux gènes inductibles suite au déclenchement d'une réponse inflammation.

Dans le but d'explorer la voie de signalisation qui gouvernerait la transcription du GPR84, nous avons examiné sa sensibilité à la dexaméthasone. Ce glucocorticoïde est reconnu pour réprimer un grand nombre gènes inductibles par le facteur de transcription NFκB dans les macrophages suite à l'activation de la voie LPS dépendante de MyD88. Tout comme mentionné dans la section résultat du chapitre II, le gène GPR84 s'est présenté résistant au dexaméthasone. On peut donc supposer que la voie de signalisation menant à l'activation du GPR84 serait indépendante de la protéine adaptatrice MyD88 ou requerrait des coactivateurs autres que les IRF (*Interferin Regulatory Factors*), tel que suggéré dans le cas d'autres gènes inductibles par la LPS et insensibles à la dexaméthasone (Ogawa *et al.* 2005). Des travaux subséquents seront toutefois nécessaires pour élucider les mécanismes précis de régulation du gène GPR84.

Récemment, une étude investiguée chez les souris déficiente pour le gène GPR84 a démontré une surproduction de l'interleukine-4 par les lymphocytes T stimulés (Venkataraman et Kuo 2005). Or, la voie de signalisation conduisant à la production d'IL-4 passe par un complexe JAK/STAT (Nelson 2003), tout comme dans le cas de l'interféron gamma (IFN-γ) par exemple, qui de plus active un facteur activateur de la transcription IRF (*Interferon Regulatory Factor*). On pourrait donc prétendre qu'en absence du GPR84, il y aurait également plus d'interféron produit par les cellules en guise d'établir l'équilibre, mais les données scientifiques de l'étude de Venkataraman nous révèlent aucune différence au niveau de l'expression en INF-γ chez les lymphocytes T. Ainsi, la régulation négative du gène GPR84 dans la microglie, pourrait s'avérer une cible d'étude intéressante lors du processus neuroinflammatoire, puisqu'une étude récente démontre que l'expression endogène de l'IL-4 peut également être stimulée dans la microglie activée suite à la LPS

(Park 2005). Donc, si tout comme dans le cas des cellules T, l'absence du GPR84 provoquerait l'augmentation de cette IL-4, cela pourrait s'avérer bénéfique dans le cas de l'EAE. Dans notre projet, nous avons induit l'EAE, un modèle animal de la sclérose en plaques. Puisqu'il y a présence de TNF et d'autres cytokines produites dans le SNC lors de cette maladie (Tanuma 1999), nous avons émis l'hypothèse qu'il y aurait également une forte induction de l'expression du gène GPR84 dans le cerveau et dans la moelle épinière. Effectivement, puisqu'il est modulé en partie par le TNF dans la microglie, nos résultats appuient notre conclusion générale. L'expression du GPR84 est impliquée dans le processus de neuroinflammation, mais pourrait de plus contribuer au développement de maladies neurodégénératives comme la sclérose en plaques.

L'apparition de l'EAE est une résultante du phénomène d'auto-immunité où il y a présentation d'une protéine myélinique au récepteur T spécifique par la cellule présentatrice d'antigène (CPA) périphérique. Au niveau du SNC, la microglie et les macrophages périvasculaires agissent en CPA durant la phase effectrice de l'EAE. Cette reconnaissance de l'antigène induit une activation des lymphocytes T CD4 + qui vont activer les macrophages, favoriser la production de cytokines pro-inflammatoires conduisant à l'infiltration leucocytaire, à l'inflammation du système nerveux central (SNC) et à la destruction des tissus. Plus précisément, une fois le lymphocyte activé, c'est la présence de certaines cytokines spécifiques dans l'environnement qui déterminera la spécificité de leur action et de leur différenciation. De ce fait, l'IL-12 induira la maturation des lymphocytes T CD4+ activés en Th1, qui produiront ensuite de l'IFN $\gamma$  pour activer les macrophages et de l'IL-2 pour stimuler de façon autocrine la production de ces cellules Th1. De son côté, l'IL-4 permettra la différenciation des lymphocytes T CD4+ activés en Th2, qui stimuleront ensuite la réponse humorale (production d'anticorps par les lymphocytes B). Les preuves scientifiques affirment que les principales cellules T auto-réactives, contribuant au développement de la maladie, sont de phénotype Th1. Alors que certaines études révèlent que l'activation de cellules Th2, réprime les symptômes cliniques de l'EAE, la démyélinisation et l'expression de gènes associés à l'inflammation (Kirwin 2006). La protection est accompagnée par la production augmentée ultérieure d'IL-10 et d'IL-5 et une inhibition de prolifération de cellule Th1 (Berghmans 2006). De plus, la

production de l'IL-4 stimule la microglie à produire de l'IGF-1 (*Insulin-like growth factor*), laquelle est associée à l'induction de la neurogénèse (O'kusky 2000; Aberg 2000), de la prolifération de cellules hématopoïétiques (Shen 2005) de même qu'à la myélinisation (Carson 1993). On peut penser qu'une délétion en GPR84, lors de l'EAE mènerait à une plus grande capacité des cellules microgliales et lymphocytaires à produire de l'IL-4 de même que d'autres cytokines anti-inflammatoires, comme l'ont observé Venkataraman et Kuo dans leur culture in vitro (2005). Ceci nous poussent à croire que dans le cas de l'EAE, où nos résultats nous indiquent clairement une forte expression du gène GPR84 près des vaisseaux sanguins, sa délétion pourrait s'avérer bénéfique par l'apport d'une plus grande proportion de cytokines anti-inflammatoires, et donc de cellules Th2 qui favorisera une meilleure réponse humorale. De plus, l'étude qui a permis d'attribuer un ligand potentiel au GPR84, a démontré que son activation coïncidait avec une plus forte production de l'IL-12 par les macrophages activés. Sa délétion serait, une fois de plus, en faveur du phénotype Th2 (Xang 2006). Toutefois, avant de juger que le GPR84 pourrait être intéressant pour des modalités thérapeutiques qui viendrait modifier le profil global des cytokines, d'autres travaux seront nécessaires afin d'analyser les taux de cytokines, la proportion des cellules Th1/Th2, de macrophages/microglie, de cellules B de même que le taux de démyélinisation chez les animaux EAE déficient en GPR84 comparativement aux animaux exprimant normalement le gène.

Notre étude démontre que ce sont principalement les macrophages plutôt que leurs précurseurs, les monocytes, qui expriment le GPR84. Lors de la réaction inflammatoire, les monocytes migrent du sang vers le cerveau et dans le modèle de sclérose en plaques, ils sont grandement présents dans les lésions actives. On peut présumer qu'une fois infiltrés et ayant atteint la maturité, les monocytes, devenus macrophages, acquièrent une plus grande capacité à exprimer le gène GPR84. Cet aspect, appuyé de nos résultats révélant la distribution de l'ARNm du GPR84 tout près des plaques, où les monocytes et macrophages matures se retrouvent, permet de conclure que le GPR84 détient une fonction biologique spécifique de ces cellules. Ce n'est cependant qu'en utilisant des souris modifiées génétiquement, soit déficiente en GPR84, ou encore surexprimant le gène de façon constitutive, que nous serons en mesure de lui attribuer une fonction.

Dans une étude préliminaire, qui n'est pas présentée dans cet ouvrage, nous avons utilisé des souris dépourvues du gène GPR84. Tout comme l'avait remarqué Venkataraman et ses collègues, les souris sont viables et ne présentent aucune anomalie phénotypique (2005). Dans un premier temps, nous avons procédé à des analyses comportementales des animaux KO souffrant d'endotoxémie (injection intrapéritonéale de LPS) à différents temps, soit de 1 à 48 h suivant l'injection. Malheureusement, les symptômes habituels de choc septique que présentent les animaux souffrant d'endotoxémie (Hart 1998; Kelley et al. 2003; Chen et al. 2005) se sont révélés indifférents chez les souris GPR84 KO comparativement aux souris de type sauvage.

Parallèlement, afin de vérifier s'il y a progression ou amélioration des symptômes au cours des différentes phases de la maladie EAE, des animaux KO additionnels ont été immunisés pour induire l'EAE. Ces travaux, actuellement, en cours dans notre laboratoire pourront nous éclairer sur le rôle global du GPR84. Subséquemment, d'autres travaux chez les souris GPR84 KO injectés à la LPS seront acheminés dans le but d'identifier, au niveau moléculaire, des modulations potentiellement affectées des gènes fonctionnels chez la microglie. À cet effet, le cerveau des souris déficientes en GPR84 sera analysé pour évaluer l'expression différentielle de tous les gènes présents dans le tissu cérébral. Plus spécifiquement, on cherchera à savoir si l'absence du gène GPR84 évoquera une déficience quelconque chez ces souris lors de la réponse inflammatoire innée. Les événements en «aval» engendrés par l'activation du GPR84 et les partenaires moléculaires impliqués peuvent être déchiffrés par l'utilisation de puces à ADN. La possibilité de faire le pont entre la signalisation de GPCR peut aussi être exploré par mutagenèse dirigée de récepteurs, de protéines G et de protéines RGS.

De façon incontournable, il serait très intéressant avant ce précédent aspect, de procéder à l'identification du ligand endogène du récepteur à l'étude. Dans ce dessein, il faudrait avoir recours à une technique de criblage à partir de sources naturelles. Ainsi, des extraits tissulaires, des fluides corporels ou encore des exsudats inflammatoires pourraient être fractionnés et utilisés pour la recherche d'activités biologiques détectables au moyen de cellules transfectées qui exprimeraient de manière stable le récepteur d'intérêt. Toutefois, l'isolement et la purification de ces molécules à partir d'extraits biologiques sont

extrêmement délicats à réaliser. La caractérisation des ligands naturels de GPCRs constitue un enjeu majeur pour le développement de médicaments innovants. Les GPCRs sont des cibles de surface auxquelles se lient les médicaments afin de stimuler des modifications fonctionnelles. Ces médicaments destinés au traitement des maladies régulées par les GPCRS couvrent la plupart des domaines thérapeutiques et pourraient donc s'étendre dans notre cas, aux maladies neuroinflammatoires et autoimmunitaires, comme la sclérose en plaques.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abbracchio, M. P et al. (2003). "Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y<sub>14</sub> receptor) adds diversity to the P2Y receptor family." *Trends Pharmacol Sci* 24(2): 52-5.

Aihara, M. et al. (2000). "Interaction between neurone and microglia mediated by platelet-activating factor." *Genes Cells* 5(5): 397-406.

Akira, S. (2001a). "[Bacterial infections and toll-like receptors]." *Kekkaku* 76(8): 593-600.

Akira, S. (2001b). "Toll-like receptors and innate immunity." *Adv Immunol* 78: 1-56.

Akira, S., et al. (2001). "Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity." *Nat Immunol* 2(8): 675-8

Albright, A. V. et al. (1999). "Microglia express CCR5, CXCR4, and CCR3, but of these, CCR5 is the principal coreceptor for human immunodeficiency virus type 1 dementia isolates." *J Virol* 73(1): 205-13.

Allan, S. M. and N. J. Rothwell (2001). "Cytokines and acute neurodegeneration." *Nat Rev Neurosci* 2(10): 734-44.

Allan, S. M. (2002). "Varied actions of proinflammatory cytokines on excitotoxic cell death in the rat central nervous system." *J Neurosci Res* 67(4): 428-34.

Aloisi, F. (2001). "Immune function of microglia." *Glia* 36(2): 165-79.

Alvi, F. et al. (2006). "Regulation of membrane trafficking and endocytosis by protein kinase C: emerging role of the pericentration, a novel protein kinase C-dependent subset of recycling endosomes." *Cell Mol Life Sci*.

Anderson, R. G. (1998). "The caveolae membrane system." *Annu Rev Biochem* 67: 199-225.

Aronoff, D. M. et al. (2004). "Prostaglandin E<sub>2</sub> inhibits alveolar macrophage phagocytosis through an E-prostanoid 2 receptor-mediated increase in intracellular cyclic AMP." *J Immunol* 173(1): 559-65.

Assie, G. et al. (2004). "Biochemistry of hormones and their mechanism of action : membrane receptors." *j.emcend* 1(4): 169-199.

Baldwin, J. M. et al. (1997). "An alpha-carbon template for the transmembrane helices in the rhodopsin family of G-protein-coupled receptors." *J Mol Biol* 272(1): 144-64.

Ballerini, P. et al. (2005). "P2Y<sub>1</sub> and cysteinyl leukotriene receptors mediate purine and



cysteinyl leukotriene co-release in primary cultures of rat microglia." *Int J Immunopathol Pharmacol* 18(2): 255-68.

Ballesteros, J. A. and H. Weinstein (1992). "Analysis and refinement of criteria for predicting the structure and relative orientations of transmembrane helical domains." *Biophys J* 62(1): 107-9.

Ballesteros, J. A. et al. (2001). "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* 276(31): 29171-7.

Ballesteros, J. A. et al. (2001). "Structural mimicry in G protein-coupled receptors: implications of the high-resolution structure of rhodopsin for structure-function analysis of rhodopsin-like receptors." *Mol Pharmacol* 60(1): 1-19.

Bardelli, C. et al. (2005). "Expression of functional NK1 receptors in human alveolar macrophages: superoxide anion production, cytokine release and involvement of NF-kappaB pathway." *Br J Pharmacol* 145(3): 385-96.

Bate, C. et al. (2006). "Platelet-activating factor antagonists protect amyloid-beta damaged neurons from microglia-mediated death." *Neuropharmacology* 51(2): 173-81.

Benito, C. et al. (2003). "Cannabinoid CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are selectively overexpressed in neuritic plaque-associated glia in Alzheimer's disease brains." *J Neurosci* 23(35): 11136-41.

Bhattacharya, M. et al. (2004). "Small GTP-binding protein-coupled receptors." *Biochem Soc Trans* 32(Pt 6): 1040-4.

Bianco, F. et al. (2005). "Pathophysiological roles of extracellular nucleotides in glial cells: differential expression of purinergic receptors in resting and activated microglia." *Brain Res Brain Res Rev* 48(2): 144-56.

Blais, V. and S. Rivest (2001). "Inhibitory action of nitric oxide on circulating tumor necrosis factor-induced NF-kappaB activity and COX-2 transcription in the endothelium of the brain capillaries." *J Neuropathol Exp Neurol* 60(9): 893-905.

Blais, V. and S. Rivest (2003). "[Role of the innate immune response in the brain]." *Med Sci (Paris)* 19(10): 981-7.

Blumer, J. B. and S. M. Lanier (2003). "Accessory proteins for G protein-signaling systems: activators of G protein signaling and other nonreceptor proteins influencing the activation state of G proteins." *Receptors Channels* 9(3): 195-204.

Bockaert, J. et al. (2003). "The 'magic tail' of G protein-coupled receptors: an anchorage for functional protein networks." *FEBS Lett* 546(1): 65-72.

- Bockmann, S. and I. Paegelow (2000). "Kinins and kinin receptors: importance for the activation of leukocytes." *J Leukoc Biol* 68(5): 587-92.
- Bohm, S. K., et al. (1997). "Identification of potential tyrosine-containing endocytic motifs in the carboxyl-tail and seventh transmembrane domain of the neurokinin 1 receptor." *J Biol Chem* 272(4): 2363-72.
- Botto, J. M. et al. (1997). "Identification in the rat neurotensin receptor of amino-acid residues critical for the binding of neurotensin." *Brain Res Mol Brain Res* 46(1-2): 311-7.
- Bouvier, M. (2001). "Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors." *Nat Rev Neurosci* 2(4): 274-86.
- Braun, M. C. and B. L. Kelsall (2001). "Regulation of interleukin-12 production by G-protein-coupled receptors." *Microbes Infect* 3(2): 99-107.
- Bresnick, J. N. et al. (2003). "Identification of signal transduction pathways used by orphan G-protein-coupled receptors." *Assay Drug Dev Technol* 1(2): 239-49.
- Briscoe, C. P. et al. (2003). "The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids." *J Biol Chem* 278(13): 11303-11.
- Bunemann, M. and M. M. Hosey (1999). "G-protein coupled receptor kinases as modulators of G-protein signalling." *J Physiol* 517 ( Pt 1): 5-23.
- Bunemann, M. et al. (1999). "Desensitization of G-protein-coupled receptors in the cardiovascular system." *Annu Rev Physiol* 61: 169-92.
- Burke, B. and C. Lewis (2002). *The Macrophage*. Oxford.
- Burnstock, G. (2004). "Introduction: P2 receptors." *Curr Top Med Chem* 4(8): 793-803.
- Burnstock, G. (2006). "Purinergic signalling--an overview." *Novartis Found Symp* 276: 26-48; discussion 48-57, 275-81.
- Buttini, M. et al. (1996). "Peripheral administration of lipopolysaccharide induces activation of microglial cells in rat brain." *Neurochem Int* 29(1): 25-35.
- Cabral, G. A. and F. Marciano-Cabral (2005). "Cannabinoid receptors in microglia of the central nervous system: immune functional relevance." *J Leukoc Biol* 78(6): 1192-7.
- Calver, A. R. et al. (2001). "The C-terminal domains of the GABA(b) receptor subunits mediate intracellular trafficking but are not required for receptor signaling." *J Neurosci* 21(4): 1203-10.
- Calvo, C. F. et al. (2000). "Identification of an opioid peptide secreted by rat embryonic mixed brain cells as a promoter of macrophage migration." *Eur J Neurosci* 12(8): 2676-84.

- Calvo, C. F. et al. (2005). "A pro- and an anti-inflammatory cytokine are synthesised in distinct brain macrophage cells during innate activation." *J Neuroimmunol* 170(1-2): 21-30.
- Cantley, L. C. (2002). "The phosphoinositide 3-kinase pathway." *Science* 296(5573): 1655-7.
- Cantrell, A. R. et al. (1999). "Voltage-dependent neuromodulation of Na<sup>+</sup> channels by D1-like dopamine receptors in rat hippocampal neurons." *J Neurosci* 19(13): 5301-10.
- Capra, V. et al. (2005). "CysLT1 receptor is a target for extracellular nucleotide-induced heterologous desensitization: a possible feedback mechanism in inflammation." *J Cell Sci* 118(Pt 23): 5625-36.
- Carrier, E. J. et al. (2004). "Cultured rat microglial cells synthesize the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol, which increases proliferation via a CB2 receptor-dependent mechanism." *Mol Pharmacol* 65(4): 999-1007.
- Cartier, L. et al. (2005). "Chemokine receptors in the central nervous system: role in brain inflammation and neurodegenerative diseases." *Brain Res Brain Res Rev* 48(1): 16-42.
- Casabona, G. (1997). "Intracellular signal modulation: a pivotal role for protein kinase C." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 21(3): 407-25.
- Cervera, P. et al. (2002). "Comparison of somatostatin receptor expression in human gliomas and medulloblastomas." *J Neuroendocrinol* 14(6): 458-71.
- Chakraborty, P. (2001). "G-protein-mediated signaling and its control in macrophages and mammalian cells." *Crit Rev Microbiol* 27(1): 1-8.
- Chen, R. et al. (2005). "Differential expression of cytokines in the brain and serum during endotoxin tolerance." *J Neuroimmunol* 163(1-2): 53-72.
- Chen, B.C. et al. (2006). "Peptidoglycan-induced IL-6 production in RAW 264.7 macrophages is mediated by cyclooxygenase-2, PGE2/PGE4 receptors, protein kinase A, I kappa B kinase, and NF-kappa B." *J Immunol* 177(1): 681-93.
- Chen, C. al. (2004). "Heterodimerization and cross-desensitization between the mu-opioid receptor and the chemokine CCR5 receptor." *Eur J Pharmacol* 483(2-3): 175-86.
- Cherfils, J. and P. Pacaud (2004). "[Activation of G-proteins in three dimensions: one step toward the therapeutic inhibition of nucleotide exchange factors]." *Med Sci (Paris)* 20(4): 393-6.
- Chong, Z. Z. et al. (2005). "mGluRI targets microglial activation and selectively prevents neuronal cell engulfment through Akt and caspase dependent pathways." *Curr Neurovasc Res* 2(3): 197-211.

- Chong, Z. Z. et al. (2005). "Oxidative stress in the brain: novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease." *Prog Neurobiol* 75(3): 207-46.
- Chuang, T. T. et al. (1995). "Phosphorylation and activation of beta-adrenergic receptor kinase by protein kinase C." *J Biol Chem* 270(31): 18660-5.
- T
- Chun, M. et al. (1994). "Signal transduction of a G protein-coupled receptor in caveolae: colocalization of endothelin and its receptor with caveolin." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(24): 11728-32.
- Chun, M. et al. (1995). "Endothelin-induced endocytosis of cell surface ETA receptors. Endothelin remains intact and bound to the ETA receptor." *J Biol Chem* 270(18): 10855-60.
- Civelli, O. (2005). "GPCR deorphanizations: the novel, the known and the unexpected transmitters." *Trends Pharmacol Sci* 26(1): 15-9.
- Cohen, G. B. et al. (1993). "Constitutive activation of opsin: influence of charge at position 134 and size at position 296." *Biochemistry* 32(23): 6111-5.
- Combarrous, Y. (2004). *Communications et signalisations cellulaires*. Paris.
- Communi, D. et al. (2001). "Identification of a novel human ADP receptor coupled to G(i)." *J Biol Chem* 276(44): 41479-85.
- Conkright, M. D. et al. (2003). "Genome-wide analysis of CREB target genes reveals a core promoter requirement for cAMP responsiveness." *Mol Cell* 11(4): 1101-8.
- Coutinho-Silva, R. et al. (2005). "Multiple P2X and P2Y receptor subtypes in mouse J774, spleen and peritoneal macrophages." *Biochem Pharmacol* 69(4): 641-55.
- Cowell, R. M. and F. S. Silverstein (2003). "Developmental changes in the expression of chemokine receptor CCR1 in the rat cerebellum." *J Comp Neurol* 457(1): 7-23.
- Cross, A. K. and M. N. Woodroffe (1999). "Chemokines induce migration and changes in actin polymerization in adult rat brain microglia and a human fetal microglial cell line in vitro." *J Neurosci Res* 55(1): 17-23.
- Dal-Pizzol, F., L. P. Di Leone, et al. (2006). "Gastrin-releasing peptide receptor antagonist effects on an animal model of sepsis." *Am J Respir Crit Care Med* 173(1): 84-90.
- Davoust, N. et al. (1999). "Receptor for the C3a anaphylatoxin is expressed by neurons and glial cells." *Glia* 26(3): 201-11.
- de la Torre, E. et al. (2005). "Muscarinic receptors participation in angiogenic response induced by macrophages from mammary adenocarcinoma-bearing mice." *Breast Cancer Res* 7(3): R345-52.

de Oliveira, S. I. et al. (2006). "Phagocytosis of apoptotic and necrotic thymocytes is inhibited by PAF-receptor antagonists and affects LPS-induced COX-2 expression in murine macrophages." *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 80(1-2): 62-73.

De Simone, R. et al. (2005). "Activation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor by nicotine selectively up-regulates cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 in rat microglial cultures." *J Neuroinflammation* 2(1): 4.

De Vries, L. and M. Gist Farquhar (1999). "RGS proteins: more than just GAPs for heterotrimeric G proteins." *Trends Cell Biol* 9(4): 138-44.

Del Rio, M. and M. De la Fuente (1994). "Chemoattractant capacity of bombesin, gastrin-releasing peptide and neuromedin C is mediated through PKC activation in murine peritoneal leukocytes." *Regul Pept* 49(3): 185-93.

Deng, X. and S. Sriram (2005). "Role of microglia in multiple sclerosis." *Curr Neurol Neurosci Rep* 5(3): 239-44.

Derkinderen, P. et al. (2003). "Regulation of extracellular signal-regulated kinase by cannabinoids in hippocampus." *J Neurosci* 23(6): 2371-82.

Dick, A. D. et al. (2001). "Distribution of OX2 antigen and OX2 receptor within retina." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42(1): 170-6.

Dimitrijevic, M. et al. (2005). "Neuropeptide Y and its receptor subtypes specifically modulate rat peritoneal macrophage functions in vitro: counter regulation through Y1 and Y2/5 receptors." *Regul Pept* 124(1-3): 163-72.

Dorsch, M., Y. Qiu, et al. (2005). "PK1/EG-VEGF induces monocyte differentiation and activation." *J Leukoc Biol* 78(2): 426-34.

Dufresne, M. et al. (2006). "Cholecystokinin and gastrin receptors." *Physiol Rev* 86(3): 805-47.

Dunn, A. J. (2002). "Mechanisms by which cytokines signal the brain." *Int Rev Neurobiol* 52: 43-65.

Duong, C. Q. et al. (2004). "Expression of the lysophospholipid receptor family and investigation of lysophospholipid-mediated responses in human macrophages." *Biochim Biophys Acta* 1682(1-3): 112-9.

Duong, C. Q. et al. (2004). "Expression of the lysophospholipid receptor family and investigation of lysophospholipid-mediated responses in human macrophages." *Biochim Biophys Acta* 1682(1-3): 112-9.

- Duthey, B. et al. (2002). "A single subunit (GB2) is required for G-protein activation by the heterodimeric GABA(B) receptor." *J Biol Chem* 277(5): 3236-41.
- Ehrhart, J. D. Obregon, et al. (2005). "Stimulation of cannabinoid receptor 2 (CB2) suppresses microglial activation." *J Neuroinflammation* 2: 29.
- Elefsinioti, A. L. et al. (2004). "A database for G proteins and their interaction with GPCRs." *BMC Bioinformatics* 5: 208.
- Elefsinioti, A. L. et al. (2004). "A database for G proteins and their interaction with GPCRs." *BMC Bioinformatics* 5: 208.
- Eljaschewitsch, E. et al. (2006). "The endocannabinoid anandamide protects neurons during CNS inflammation by induction of MKP-1 in microglial cells." *Neuron* 49(1): 67-79.
- Eng, L. F. et al. (1996). "Inflammation in EAE: role of chemokine/cytokine expression by resident and infiltrating cells." *Neurochem Res* 21(4): 511-25.
- Facchinetti, F. et al. (2003). "Cannabinoids ablate release of TNFalpha in rat microglial cells stimulated with lypopolysaccharide." *Glia* 41(2): 161-8.
- Fan, H. et al. (2004). "Toll-like receptor 4 coupled GI protein signaling pathways regulate extracellular signal-regulated kinase phosphorylation and AP-1 activation independent of NFkappaB activation." *Shock* 22(1): 57-62.
- Farber, K. and H. Kettenmann (2005). "Physiology of microglial cells." *Brain Res Brain Res Rev* 48(2): 133-43.
- Farber, K. et al. (2005). "Dopamine and noradrenaline control distinct functions in rodent microglial cells." *Mol Cell Neurosci* 29(1): 128-38.
- Feindt, J., A. Schmidt, et al. (1998). "Receptors and effects of the inhibitory neuropeptide somatostatin in microglial cells." *Brain Res Mol Brain Res* 60(2): 228-33.
- Ferguson, S. S., L. S. Barak, et al. (1996). "G-protein-coupled receptor regulation: role of G-protein-coupled receptor kinases and arrestins." *Can J Physiol Pharmacol* 74(10): 1095-110.
- Ferguson, S. S., J. Zhang, et al. (1996). "G-protein-coupled receptor kinases and arrestins: regulators of G-protein-coupled receptor sequestration." *Biochem Soc Trans* 24(4): 953-9.
- Ferguson, S. S. (2001). "Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling." *Pharmacol Rev* 53(1): 1-24.
- Foord, S. M., T. I. Bonner, et al. (2005). "International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list." *Pharmacol Rev* 57(2): 279-88.

Franciosi, S., H. B. Choi, et al. (2005). "IL-8 enhancement of amyloid-beta (A $\beta$  1-42)-induced expression and production of pro-inflammatory cytokines and COX-2 in cultured human microglia." *J Neuroimmunol* 159(1-2): 66-74.

Francis, S. H. and J. D. Corbin (1999). "Cyclic nucleotide-dependent protein kinases: intracellular receptors for cAMP and cGMP action." *Crit Rev Clin Lab Sci* 36(4): 275-328.

Franklin, A. et al. (2003). "Palmitoylethanolamide increases after focal cerebral ischemia and potentiates microglial cell motility." *J Neurosci* 23(21): 7767-75.

Franklin, A. and N. Stella (2003). "Arachidonylcyclopropylamide increases microglial cell migration through cannabinoid CB2 and abnormal-cannabidiol-sensitive receptors." *Eur J Pharmacol* 474(2-3): 195-8.

Fredriksson, R. et al. (2003). "The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints." *Mol Pharmacol* 63(6): 1256-72.

Fredriksson, R. et al. (2003a). "Seven evolutionarily conserved human rhodopsin G protein-coupled receptors lacking close relatives." *FEBS Lett* 554(3): 381-8.

Fredriksson, R. et al. (2003b). "There exist at least 30 human G-protein-coupled receptors with long Ser/Thr-rich N-termini." *Biochem Biophys Res Commun* 301(3): 725-34.

Freedman, N. J. et al. (1995). "Phosphorylation and desensitization of the human beta 1-adrenergic receptor. Involvement of G protein-coupled receptor kinases and cAMP-dependent protein kinase." *J Biol Chem* 270(30): 17953-61.

Freire-Garabal, M. et al. (2003). "Serotonin upregulates the activity of phagocytosis through 5-HT<sub>1A</sub> receptors." *Br J Pharmacol* 139(2): 457-63.

Fueller, M. et al. (2003). "Activation of human monocytic cells by lysophosphatidic acid and sphingosine-1-phosphate." *Cell Signal* 15(4): 367-75.

Gagnon, A. W. et al. (1998). "Role of clathrin-mediated endocytosis in agonist-induced down-regulation of the beta2-adrenergic receptor." *J Biol Chem* 273(12): 6976-81.

Gainetdinov, R. et al. (2004). "Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions." *Annu Rev Neurosci* 27: 107-44.

Gebicke-Haerter, P. J. et al. (1996). "Both adenosine A<sub>1</sub>- and A<sub>2</sub>-receptors are required to stimulate microglial proliferation." *Neurochem Int* 29(1): 37-42.

Gebicke-Haerter, P. J. (2005). "Microarrays and expression profiling in microglia research and in inflammatory brain disorders." *J Neurosci Res* 81(3): 327-41.

- Gegner, J. A. et al. (1995). "Lipopolysaccharide (LPS) signal transduction and clearance. Dual roles for LPS binding protein and membrane CD14." *J Biol Chem* 270(10): 5320-5.
- George, S. R. et al. (2002). "G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery." *Nat Rev Drug Discov* 1(10): 808-20.
- Gether, U. et al. (1997). "Agonists induce conformational changes in transmembrane domains III and VI of the beta2 adrenoceptor." *Embo J* 16(22): 6737-47.
- Gether, U. (2000). "Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors." *Endocr Rev* 21(1): 90-113.
- Giros, B. et al. (1996). "Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter." *Nature* 379(6566): 606-12.
- Goodman, O. B. et al. (1996). "Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor." *Nature* 383(6599): 447-50.
- Grady, E. F. et al. (1995). "Delineation of the endocytic pathway of substance P and its seven-transmembrane domain NK1 receptor." *Mol Biol Cell* 6(5): 509-24.
- Green, S. R. et al. (2006). "The CC chemokine MCP-1 stimulates surface expression of CX3CR1 and enhances the adhesion of monocytes to fractalkine/CX3CL1 via p38 MAPK." *J Immunol* 176(12): 7412-20.
- Gudermann, T. et al. (1996). "Diversity and selectivity of receptor-G protein interaction." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36: 429-59.
- Gudermann, T. et al. (1997). "Specificity and complexity of receptor-G-protein interaction." *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 31: 253-62.
- Gutkind, J. S. (1998). "The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades." *J Biol Chem* 273(4): 1839-42.
- Haasemann, M. et al. (1998). "Agonist-induced redistribution of bradykinin B2 receptor in caveolae." *J Cell Sci* 111 ( Pt 7): 917-28.
- Hakak, Y. et al. (2003). "Global analysis of G-protein-coupled receptor signaling in human tissues." *FEBS Lett* 550(1-3): 11-7.
- Hanoune, J. and N. Defer (2001). "Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41: 145-74.
- Hart, B. L. (1988). "Biological basis of the behavior of sick animals." *Neurosci Biobehav Rev* 12(2): 123-37.



- Hasko, G. et al. (2002). "Dopamine suppresses IL-12 p40 production by lipopolysaccharide-stimulated macrophages via a beta-adrenoceptor-mediated mechanism." *J Neuroimmunol* 122(1-2): 34-9.
- Hasko, G. et al. (2005). "Adenosine receptor signaling in the brain immune system." *Trends Pharmacol Sci* 26(10): 511-6.
- Hatherley, D. et al. (2005). "Recombinant CD200 protein does not bind activating proteins closely related to CD200 receptor." *J Immunol* 175(4): 2469-74.
- Hatori, K. et al. (2002). "Fractalkine and fractalkine receptors in human neurons and glial cells." *J Neurosci Res* 69(3): 418-26.
- Haynes, S. E. et al. (2006). "The P2Y(12) receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides." *Nat Neurosci* 9(12): 1512-9.
- Heise, C. E. et al. (2005). "Pharmacological characterization of CXC chemokine receptor 3 ligands and a small molecule antagonist." *J Pharmacol Exp Ther* 313(3): 1263-71.
- Henley, J. R. et al. (1998). "Dynamin-mediated internalization of caveolae." *J Cell Biol* 141(1): 85-99.
- Hepler, J. R. (1999). "Emerging roles for RGS proteins in cell signalling." *Trends Pharmacol Sci* 20(9): 376-82.
- Hepler, J. R. (2003). "RGS protein and G protein interactions: a little help from their friends." *Mol Pharmacol* 64(3): 547-9.
- Heppner, F. L. et al. (2005). "Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis." *Nat Med* 11(2): 146-52.
- Hermans, E. (2003). "Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors." *Pharmacol Ther* 99(1): 25-44.
- Herrmann, R. et al. (2006). "Signal transfer from GPCRs to G proteins: role of the G $\alpha$  N-terminal region in rhodopsin-transducin coupling." *J Biol Chem* 281(40): 30234-41.
- Heuss, C. and U. Gerber (2000). "G-protein-independent signaling by G-protein-coupled receptors." *Trends Neurosci* 23(10): 469-75.
- Hildebrandt, J. D. (2006). "Bring your own G protein." *Mol Pharmacol* 69(4): 1079-82.
- Hirayama, M. and M. Kuriyama (2001). "MK-801 is cytotoxic to microglia in vitro and its cytotoxicity is attenuated by glutamate, other excitotoxic agents and atropine. Possible presence of glutamate receptor and muscarinic receptor on microglia." *Brain Res* 897(1-2): 204-6.

- Hirsch, E. et al. (2000). "Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation." *Science* 287(5455): 1049-53.
- Hobson, J. P. et al. (2001). "Role of the sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1 in PDGF-induced cell motility." *Science* 291(5509): 1800-3.
- Hoffmann, A. et al. (2003). "Elevation of basal intracellular calcium as a central element in the activation of brain macrophages (microglia): suppression of receptor-evoked calcium signaling and control of release function." *J Neurosci* 23(11): 4410-9.
- Huang, J. S. et al. (2004). "Cell signalling through thromboxane A2 receptors." *Cell Signal* 16(5): 521-33.
- Hubbell, W. L. et al. (2000). "Identifying conformational changes with site-directed spin labeling." *Nat Struct Biol* 7(9): 735-9.
- Hur, E. M. and K. T. Kim (2002). "G protein-coupled receptor signalling and cross-talk: achieving rapidity and specificity." *Cell Signal* 14(5): 397-405.
- Imai, Y. and S. Kohsaka (2002). "Intracellular signaling in M-CSF-induced microglia activation: role of Iba1." *Glia* 40(2): 164-74.
- Inoue, K. (2006). "The function of microglia through purinergic receptors: Neuropathic pain and cytokine release." *Pharmacol Ther* 109(1-2): 210-26.
- Ishizaka, N. et al. (1998). "Angiotensin II type 1 receptor: relationship with caveolae and caveolin after initial agonist stimulation." *Hypertension* 32(3): 459-66.
- Ivell, R. (2002). "Endocrinology. This hormone has been relaxin' too long!" *Science* 295(5555): 637-8.
- Iyengar, R. and L. Birnbaumer (1990). *G proteins*. San Diego.
- Jockers, R. et al. (1999). "Beta(2)-adrenergic receptor down-regulation. Evidence for a pathway that does not require endocytosis." *J Biol Chem* 274(41): 28900-8.
- Johansson, U. et al. (2005). "Human peripheral blood monocytes express protease receptor-2 and respond to receptor activation by production of IL-6, IL-8, and IL-1 {beta}." *J Leukoc Biol* 78(4): 967-75.
- Johnson, E. W. et al. (2001). "ACTH receptor distribution and modulation among murine mononuclear leukocyte populations." *J Biol Regul Homeost Agents* 15(2): 156-62.
- Jones, G. E. et al. (2003). "Requirement for PI 3-kinase gamma in macrophage migration to MCP-1 and CSF-1." *Exp Cell Res* 290(1): 120-31.
- Joost, P. and A. Methner (2002). "Phylogenetic analysis of 277 human G-protein-coupled

receptors as a tool for the prediction of orphan receptor ligands." *Genome Biol* 3(11): RESEARCH0063.

Kaiser, J. et al. (1988). "Effect of monensin on receptor recycling during continuous endocytosis of asialoorosomucoid." *Exp Cell Res* 174(2): 472-80.

Kaisho, T. and S. Akira (2001). "Toll-like receptors and their signaling mechanism in innate immunity." *Acta Odontol Scand* 59(3): 124-30.

Kanazawa, H. et al. (2002). "Macrophage/microglia-specific protein Iba1 enhances membrane ruffling and Rac activation via phospholipase C-gamma -dependent pathway." *J Biol Chem* 277(22): 20026-32.

Kang, H. et al. (2002). "Phosphatidylinositol 3-kinase p85 adaptor function in T-cells. Co-stimulation and regulation of cytokine transcription independent of associated p110." *J Biol Chem* 277(2): 912-21.

Kanno, M. et al. (2005). "Functional expression of CCL6 by rat microglia: a possible role of CCL6 in cell-cell communication." *J Neuroimmunol* 167(1-2): 72-80.

Karnik, S. S. et al. (2003). "Activation of G-protein-coupled receptors: a common molecular mechanism." *Trends Endocrinol Metab* 14(9): 431-7.

Keidar, S. et al. (2002). "Oxidative stress increases the expression of the angiotensin-II receptor type 1 in mouse peritoneal macrophages." *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 3(1): 24-30.

Kelley, K. W. et al. (2003). "Cytokine-induced sickness behavior." *Brain Behav Immun* 17 Suppl 1: S112-8.

Kettenmann, H. (2006). "Triggering the brain's pathology sensor." *Nat Neurosci* 9(12): 1463-4.

Kifor, O. et al. (1998). "The calcium-sensing receptor is localized in caveolin-rich plasma membrane domains of bovine parathyroid cells." *J Biol Chem* 273(34): 21708-13.

Kim, D. and D. E. Clapham (1989). "Potassium channels in cardiac cells activated by arachidonic acid and phospholipids." *Science* 244(4909): 1174-6.

Kim, S. U. and J. de Vellis (2005). "Microglia in health and disease." *J Neurosci Res* 81(3): 302-13.

Kim, H. S. et al. (2006). "Neurotensin enhances nitric oxide generation via the JAK2-STAT1 pathway in murine macrophage Raw264.7 cells during costimulation with LPS and IFNgamma." *Neuropeptides* 40(3): 221-9.

Kitanaka, J. et al. (1995). "cDNA cloning of a thromboxane A2 receptor from rat

astrocytes." *Biochim Biophys Acta* 1265(2-3): 220-3.

Klabunde, T. and G. Hessler (2002). "Drug design strategies for targeting G-protein-coupled receptors." *Chembiochem* 3(10): 928-44.

Kolch, W. (2000). "Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions." *Biochem J* 351 Pt 2: 289-305.

Kostenis, E. (2004). "A glance at G-protein-coupled receptors for lipid mediators: a growing receptor family with remarkably diverse ligands." *Pharmacol Ther* 102(3): 243-57.

Krantic, S. et al. (2004). "Novel modalities of somatostatin actions." *Eur J Endocrinol* 151(6): 643-55.

Kremlev, S. G. et al. (2004). "Differential expression of chemokines and chemokine receptors during microglial activation and inhibition." *J Neuroimmunol* 149(1-2): 1-9.

Kristiansen, K. (2004). "Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function." *Pharmacol Ther* 103(1): 21-80.

Kumar, A. et al. (2005). "The isoprostane 8-iso-PGF<sub>2</sub>α suppresses monocyte adhesion to human microvascular endothelial cells via two independent mechanisms." *Faseb J* 19(3): 443-5.

Kunishima, N. et al. (2000). "Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor." *Nature* 407(6807): 971-7.

Ladds, G. et al. (2006). "Differential effects of RGS proteins on Galpha(q) and Galpha(11) activity." *Cell Signal*.

Laflamme, N. and S. Rivest (1999). "Effects of systemic immunogenic insults and circulating proinflammatory cytokines on the transcription of the inhibitory factor kappaB alpha within specific cellular populations of the rat brain." *J Neurochem* 73(1): 309-21.

Laflamme, N. and S. Rivest (2001). "Toll-like receptor 4: the missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating gram-negative bacterial cell wall components." *Faseb J* 15(1): 155-163.

Laflamme, N. et al. (2001). "Circulating cell wall components derived from gram-negative, not gram-positive, bacteria cause a profound induction of the gene-encoding Toll-like receptor 2 in the CNS." *J Neurochem* 79(3): 648-57.

Lam, C. W. et al. (2006). "Melanocortin receptor signaling in RAW264.7 macrophage cell line." *Peptides* 27(2): 404-12.

Lavoie, H. et al. (2002). "Structure of rhodopsin in monolayers at the air-water interface: a

PM-IRRAS and X-ray reflectivity study." *Biochemistry* 41(45): 13424-34.

Le Poul, E. et al. (2003). "Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation." *J Biol Chem* 278(28): 25481-9.

Leaney, J. L. et al. (2001). "Regulation of a G protein-gated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel by a Ca(2<sup>+</sup>)-independent protein kinase C." *J Physiol* 534(Pt. 2): 367-79.

Lee, B. et al. (1999a). "Coreceptor/chemokine receptor expression on human hematopoietic cells: biological implications for human immunodeficiency virus-type 1 infection." *Blood* 93(4): 1145-56.

Lee, B. et al. (1999b). "Quantification of CD4, CCR5, and CXCR4 levels on lymphocyte subsets, dendritic cells, and differentially conditioned monocyte-derived macrophages." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(9): 5215-20.

Lee, D. K. et al. (2002). "Novel G-protein-coupled receptor genes expressed in the brain: continued discovery of important therapeutic targets." *Expert Opin Ther Targets* 6(2): 185-202.

Levi, G. et al. (1998). "Regulation of prostanoid synthesis in microglial cells and effects of prostaglandin E2 on microglial functions." *Biochimie* 80(11): 899-904.

Levoye, A. et al. (2006). "The orphan GPR50 receptor specifically inhibits MT1 melatonin receptor function through heterodimerization." *Embo J* 25(13): 3012-23.

Li, H. et al. (2006). "Different neurotropic pathogens elicit neurotoxic CCR9- or neurosupportive CXCR3-expressing microglia." *J Immunol* 177(6): 3644-56.

Lin, S. W. and T. P. Sakmar (1996). "Specific tryptophan UV-absorbance changes are probes of the transition of rhodopsin to its active state." *Biochemistry* 35(34): 11149-59.

Lindberg, C. et al. (2005). "Cytokine production by a human microglial cell line: effects of beta-amyloid and alpha-melanocyte-stimulating hormone." *Neurotox Res* 8(3-4): 267-76.

Lohse, M. J. et al. (1990). "Multiple pathways of rapid beta 2-adrenergic receptor desensitization. Delineation with specific inhibitors." *J Biol Chem* 265(6): 3202-11.

Lohse, M. J. et al. (1992). "Receptor-specific desensitization with purified proteins. Kinase dependence and receptor specificity of beta-arrestin and arrestin in the beta 2-adrenergic receptor and rhodopsin systems." *J Biol Chem* 267(12): 8558-64.

Loo, L. S. et al. (2002). "Cortical expression of endothelin receptor subtypes A and B following middle cerebral artery occlusion in rats." *Neuroscience* 112(4): 993-1000.

Luttmann, W. et al. (1999). "Modulation of cytokine release from mononuclear cells by

prostacyclin, IL-4 and IL-13." *Cytokine* 11(2): 127-33.

Mahe, C. et al. (2005). "Serotonin 5-HT<sub>7</sub> receptors coupled to induction of interleukin-6 in human microglial MC-3 cells." *Neuropharmacology* 49(1): 40-7.

Mamedova, L. et al. (2005). "CysLT<sub>1</sub> leukotriene receptor antagonists inhibit the effects of nucleotides acting at P<sub>2</sub>Y receptors." *Biochem Pharmacol* 71(1-2): 115-25.

Mandal, P. et al. (2005). "Lipopolysaccharide induces formyl peptide receptor 1 gene expression in macrophages and neutrophils via transcriptional and posttranscriptional mechanisms." *J Immunol* 175(9): 6085-91.

Mark, M. D. et al. (2000a). "G protein modulation of recombinant P/Q-type calcium channels by regulators of G protein signalling proteins." *J Physiol* 528 Pt 1: 65-77.

Mark, M. D. et al. (2000b). "Regulation of GIRK channel deactivation by G<sub>α</sub>(q) and G<sub>α</sub>(i/o) pathways." *Neuropharmacology* 39(12): 2360-73.

Mark, M. D. and S. Herlitze (2000). "G-protein mediated gating of inward-rectifier K<sup>+</sup> channels." *Eur J Biochem* 267(19): 5830-6.

Marteau, F. et al. (2003). "Pharmacological characterization of the human P<sub>2</sub>Y<sub>13</sub> receptor." *Mol Pharmacol* 64(1): 104-12.

Martin, S. et al. (2003). "Involvement of the neurotensin receptor-3 in the neurotensin-induced migration of human microglia." *J Neurosci* 23(4): 1198-205.

Martin, S. et al. (2005). "Neurotensin and the neurotensin receptor-3 in microglial cells." *J Neurosci Res* 81(3): 322-6.

Martin, C. B. et al. (2007a). "Transcriptional control of the C3a receptor gene in glial cells: Dependence upon AP-1 but not Ets." *Mol Immunol* 44(5): 703-12.

Martin, C. B., et al. (2007b). "Regulation of the C5a receptor promoter in glial cells: Minimal dependence upon the CCAAT element in astrocytes." *Mol Immunol* 44(5): 713-21.

Martin-McCaffrey, L. et al. (2005). "Differential expression of regulator of G-protein signaling R12 subfamily members during mouse development." *Dev Dyn* 234(2): 438-44.

Martucci, C. et al. (2006). "Bv8, the amphibian homologue of the mammalian prokineticins, induces a proinflammatory phenotype of mouse macrophages." *Br J Pharmacol* 147(2): 225-34.

Mason, J. L. et al. (2001). "Interleukin-1β promotes repair of the CNS." *J Neurosci* 21(18): 7046-52.

- Matre, V. et al. (1993). "Molecular cloning of a functional human thyrotropin-releasing hormone receptor." *Biochem Biophys Res Commun* 195(1): 179-85.
- Mayr, B. and M. Montminy (2001). "Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB." *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(8): 599-609.
- McCloskey et al. (1999). "Chemotaxis of rat mast cells toward adenine nucleotides." *J Immunol* 163(2): 970-7.
- McCudden, C. R. et al. (2005). "G-protein signaling: back to the future." *Cell Mol Life Sci* 62(5): 551-77.
- McKnight, A. J. and S. Gordon (1996). "EGF-TM7: a novel subfamily of seven-transmembrane-region leukocyte cell-surface molecules." *Immunol Today* 17(6): 283-7.
- McLarnon, J. G. et al. (1999). "Endothelin-induced changes in intracellular calcium in human microglia." *Neurosci Lett* 263(1): 9-12.
- McLarnon, J. G. (2005). "Purinergic mediated changes in Ca<sup>2+</sup> mobilization and functional responses in microglia: effects of low levels of ATP." *J Neurosci Res* 81(3): 349-56.
- Medzhitov, R. et al. (1997). "A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity." *Nature* 388(6640): 394-7.
- Menelas, P. and C. H. Davies (2002). *Understanding G protein-coupled receptors and their role in the CNS*. New York.
- Milligan, G. (1995). "Signal sorting by G-protein-linked receptors." *Adv Pharmacol* 32: 1-29.
- Milligan, G. et al. (1995). "G-protein palmitoylation: regulation and functional significance." *Biochem Soc Trans* 23(3): 583-7.
- Milligan, G. (2006). "G-protein-coupled receptor heterodimers: pharmacology, function and relevance to drug discovery." *Drug Discov Today* 11(11-12): 541-9.
- Milligan, G. and E. Kostenis (2006). "Heterotrimeric G-proteins: a short history." *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1: S46-55.
- Minegishi, T. et al. (1993). "Structure and regulation of LH/CG receptor." *Endocr J* 40(3): 275-87.
- Minghetti, L. et al. (1997). "Inducible nitric oxide synthase expression in activated rat microglial cultures is downregulated by exogenous prostaglandin E<sub>2</sub> and by cyclooxygenase inhibitors." *Glia* 19(2): 152-60.

- Mirzadegan, T. et al. (2003). "Sequence analyses of G-protein-coupled receptors: similarities to rhodopsin." *Biochemistry* 42(10): 2759-67.
- Mody, S. M. et al. (2000). "Incorporation of Galpha(z)-specific sequence at the carboxyl terminus increases the promiscuity of galpha(16) toward G(i)-coupled receptors." *Mol Pharmacol* 57(1): 13-23.
- Mohri, I. et al. (2003). "Hematopoietic prostaglandin D synthase is expressed in microglia in the developing postnatal mouse brain." *Glia* 42(3): 263-74.
- Moller, T. et al. (2001). "Expression and function of lysophosphatidic acid receptors in cultured rodent microglial cells." *J Biol Chem* 276(28): 25946-52.
- Moller, T. et al. (2006). "Activation of microglial cells by thrombin: past, present, and future." *Semin Thromb Hemost* 32 Suppl 1: 69-76.
- Montminy, M. R. et al. (1986). "Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(18): 6682-6.
- Mori, K. et al. (2002). "Effects of norepinephrine on rat cultured microglial cells that express alpha1, alpha2, beta1 and beta2 adrenergic receptors." *Neuropharmacology* 43(6): 1026-34.
- Morris, A. J. and C. C. Malbon (1999). "Physiological regulation of G protein-linked signaling." *Physiol Rev* 79(4): 1373-430.
- Mullock, B. M. et al. (1998). "Fusion of lysosomes with late endosomes produces a hybrid organelle of intermediate density and is NSF dependent." *J Cell Biol* 140(3): 591-601.
- Nadeau, S. and S. Rivest (1999). "Effects of circulating tumor necrosis factor on the neuronal activity and expression of the genes encoding the tumor necrosis factor receptors (p55 and p75) in the rat brain: a view from the blood-brain barrier." *Neuroscience* 93(4): 1449-64.
- Nadeau, S. and S. Rivest (1999). "Regulation of the gene encoding tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) in the rat brain and pituitary in response in different models of systemic immune challenge." *J Neuropathol Exp Neurol* 58(1): 61-77.
- Nadeau, S. and S. Rivest (2000). "Role of microglial-derived tumor necrosis factor in mediating CD14 transcription and nuclear factor kappa B activity in the brain during endotoxemia." *J Neurosci* 20(9): 3456-68.
- Nadeau, S. and S. Rivest (2002). "Endotoxemia prevents the cerebral inflammatory wave induced by intraparenchymal lipopolysaccharide injection: role of glucocorticoids and CD14." *J Immunol* 169(6): 3370-81.
- Nasu-Tada, K. et al. (2005). "Involvement of beta1 integrin in microglial chemotaxis and



proliferation on fibronectin: different regulations by ADP through PKA." *Glia* 52(2): 98-107.

Nguyen, M. D. et al. (2002). "Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration?" *Nat Rev Neurosci* 3(3): 216-27.

Nieves, D. and J. J. Moreno (2006). "Role of 5-lipoxygenase pathway in the regulation of RAW 264.7 macrophage proliferation." *Biochem Pharmacol* 72(8): 1022-30.

Nilsson, N. E. et al. (2003). "Identification of a free fatty acid receptor, FFA2R, expressed on leukocytes and activated by short-chain fatty acids." *Biochem Biophys Res Commun* 303(4): 1047-52.

Noda, M., et al. (2003). "Expression and function of bradykinin receptors in microglia." *Life Sci* 72(14): 1573-81.

Noda, M. et al. (2004). "Kinin receptors in cultured rat microglia." *Neurochem Int* 45(2-3): 437-42.

Noorbakhsh, F. et al. (2006). "Proteinase-activated receptor 2 modulates neuroinflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis." *J Exp Med* 203(2): 425-35.

Offermanns, S. (2003). "G-proteins as transducers in transmembrane signalling." *Prog Biophys Mol Biol* 83(2): 101-30.

Offermanns, S. (2006). "The nicotinic acid receptor GPR109A (HM74A or PUMA-G) as a new therapeutic target." *Trends Pharmacol Sci* 27(7): 384-90.

Ogawa, S. et al. (2005). "Molecular determinants of crosstalk between nuclear receptors and toll-like receptors." *Cell* 122(5): 707-21.

Oh, P. et al. (1998). "Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium." *J Cell Biol* 141(1): 101-14.

Okamoto, C. T. (1998). "Endocytosis and transcytosis." *Adv Drug Deliv Rev* 29(3): 215-228.

Ostrom, R. S. et al. (2000). "Stoichiometry and compartmentation in G protein-coupled receptor signaling: implications for therapeutic interventions involving G(s)." *J Pharmacol Exp Ther* 294(2): 407-12.

Ostrom, R. S. (2002). "New determinants of receptor-effector coupling: trafficking and compartmentation in membrane microdomains." *Mol Pharmacol* 61(3): 473-6.

Paasche, J. D. et al. (2001). "Mechanisms of endothelin receptor subtype-specific targeting

to distinct intracellular trafficking pathways." *J Biol Chem* 276(36): 34041-50.

Pak, Y. et al. (1999). "Agonist-induced, G protein-dependent and -independent down-regulation of the mu opioid receptor. The receptor is a direct substrate for protein-tyrosine kinase." *J Biol Chem* 274(39): 27610-6.

Park, J. M. et al. (2005). "Signaling pathways and genes that inhibit pathogen-induced macrophage apoptosis--CREB and NF-kappaB as key regulators." *Immunity* 23(3): 319-29.

Parsell, D. A. et al. (1996). "Relaxin binds to and elicits a response from cells of the human monocytic cell line, THP-1." *J Biol Chem* 271(44): 27936-41.

Pauwels, P. J. (2000). "Diverse signalling by 5-hydroxytryptamine (5-HT) receptors." *Biochem Pharmacol* 60(12): 1743-50.

Perez, J. et al. (2003). "Somatostatin binds to murine macrophages through two distinct subsets of receptors." *J Neuroimmunol* 138(1-2): 38-44.

Pettipher, R. et al. (2005). "Identification of G-protein-coupled receptors involved in inflammatory disease by genetic association studies." *Curr Opin Pharmacol* 5(4): 412-7.

Picazarri, K. et al. (2005). "Entamoeba histolytica: identification of EhGPCR-1, a novel putative G protein-coupled receptor that binds to EhRabB." *Exp Parasitol* 110(3): 253-8.

Piomelli, D. (2003). "The molecular logic of endocannabinoid signalling." *Nat Rev Neurosci* 4(11): 873-84.

Plum, J. et al. (2002). "Prostacyclin enhances the expression of LPS/INF-gamma-induced nitric oxide synthase in human monocytes." *Nephron* 91(3): 391-8.

Pulkkinen, V. et al. (2006). "Neuropeptide S and G protein-coupled receptor 154 modulate macrophage immune responses." *Hum Mol Genet* 15(10): 1667-79.

Putney, J. W. et al. (2001). "Mechanisms of capacitative calcium entry." *J Cell Sci* 114(Pt 12): 2223-9.

Qiao, J. et al. (2006). "Lysophosphatidylcholine impairs endothelial barrier function through the G protein-coupled receptor GPR4." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291(1): L91-101.

Qin, L. et al. (2005). "Microglial NADPH oxidase mediates leucine enkephalin dopaminergic neuroprotection." *Ann N Y Acad Sci* 1053: 107-20.

Radeff-Huang, J. et al. (2004). "G protein mediated signaling pathways in lysophospholipid induced cell proliferation and survival." *J Cell Biochem* 92(5): 949-66.

Radhakrishnan, I. et al. (1997). "Solution structure of the KIX domain of CBP bound to the

transactivation domain of CREB: a model for activator:coactivator interactions." *Cell* 91(6): 741-52.

Raivich, G. and R. Banati (2004). "Brain microglia and blood-derived macrophages: molecular profiles and functional roles in multiple sclerosis and animal models of autoimmune demyelinating disease." *Brain Res Brain Res Rev* 46(3): 261-81.

Raposo, G. et al. (1989). "Internalization of beta-adrenergic receptor in A431 cells involves non-coated vesicles." *Eur J Cell Biol* 50(2): 340-52.

Rasley, A. et al. (2002). "Expression of functional NK-1 receptors in murine microglia." *Glia* 37(3): 258-67.

Richard, M. F., S. D. Eisenberg, et al. (2004). *Cell Surface Receptors*. San Diego.

Rivest, S. et al. (2000). "How the blood talks to the brain parenchyma and the paraventricular nucleus of the hypothalamus during systemic inflammatory and infectious stimuli." *Proc Soc Exp Biol Med* 223(1): 22-38.

Rivest, S. (2003). "Molecular insights on the cerebral innate immune system." *Brain Behav Immun* 17(1): 13-9.

Rivest, S. (2006). "Cannabinoids in microglia: a new trick for immune surveillance and neuroprotection." *Neuron* 49(1): 4-8.

Robbins, M. J. et al. (2001). "GABA(B2) is essential for g-protein coupling of the GABA(B) receptor heterodimer." *J Neurosci* 21(20): 8043-52.

Rohn, W. M. et al. (2000). "Bi-directional trafficking between the trans-Golgi network and the endosomal/lysosomal system." *J Cell Sci* 113 ( Pt 12): 2093-101.

Rosenkilde, M. M. et al. (2005). "High constitutive activity of a virus-encoded seven transmembrane receptor in the absence of the conserved DRY motif (Asp-Arg-Tyr) in transmembrane helix 3." *Mol Pharmacol* 68(1): 11-9.

Roulston, C. L. et al. (2005). "Minocycline treatment attenuates microglia activation and non-angiotensin II [125I] CGP42112 binding in brainstem following nodose ganglionectomy." *Neuroscience* 135(4): 1241-53.

Ruth, J. H. et al. (2006). "CXCL16-mediated cell recruitment to rheumatoid arthritis synovial tissue and murine lymph nodes is dependent upon the MAPK pathway." *Arthritis Rheum* 54(3): 765-78.

Saeed, S. A. et al. (2004). "Signaling mechanisms mediated by G-protein coupled receptors in human platelets." *Acta Pharmacol Sin* 25(7): 887-92.

Sasaguri, Y. and A. Tanimoto (2004). "Role of macrophage-derived histamine in

atherosclerosis-- chronic participation in the inflammatory response." *J Atheroscler Thromb* 11(3): 122-30.

Sasaki, Y. et al. (2003). "Selective expression of Gi/o-coupled ATP receptor P2Y<sub>12</sub> in microglia in rat brain." *Glia* 44(3): 242-50.

Sato, M. et al. (2006). "Accessory proteins for G proteins: partners in signaling." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 46: 151-87.

Saura, J. et al. (2005). "Adenosine A<sub>2A</sub> receptor stimulation potentiates nitric oxide release by activated microglia." *J Neurochem* 95(4): 919-29.

Schaeffer, H. J. and M. J. Weber (1999). "Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers." *Mol Cell Biol* 19(4): 2435-44.

Schaub, A. et al. (2001). "PUMA-G, an IFN-gamma-inducible gene in macrophages is a novel member of the seven transmembrane spanning receptor superfamily." *Eur J Immunol* 31(12): 3714-25.

Scheer, A. et al. (1996). "Constitutively active mutants of the alpha 1B-adrenergic receptor: role of highly conserved polar amino acids in receptor activation." *Embo J* 15(14): 3566-78.

Schioth, H. B. and R. Fredriksson (2005). "The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective." *Gen Comp Endocrinol* 142(1-2): 94-101.

Schleicher, S. et al. (1993). "A beta-adrenergic receptor kinase-like enzyme is involved in olfactory signal termination." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(4): 1420-4.

Schmid, C. D. et al. (2002). "Heterogeneous expression of the triggering receptor expressed on myeloid cells-2 on adult murine microglia." *J Neurochem* 83(6): 1309-20.

Schnare, M. et al. (2001). "Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses." *Nat Immunol* 2(10): 947-50.

Schwabe, T. et al. (2005). "GPCR signaling is required for blood-brain barrier formation in drosophila." *Cell* 123(1): 133-44.

Schwarz, H. et al. (1994). "Neuropeptide Y is an inducible gene in the human immune system." *J Neuroimmunol* 51(1): 53-61.

Seo, K. H. et al. (2004). "Essential role for platelet-activating factor-induced NF-kappaB activation in macrophage-derived angiogenesis." *Eur J Immunol* 34(8): 2129-37.

Sergeeva, M. et al. (2005). "Regulation of intracellular calcium levels by polyunsaturated fatty acids, arachidonic acid and docosahexaenoic acid, in astrocytes: possible involvement of phospholipase A<sub>2</sub>." *Reprod Nutr Dev* 45(5): 633-46.

- Shabb, J. B. (2001). "Physiological substrates of cAMP-dependent protein kinase." *Chem Rev* 101(8): 2381-411.
- Shah, B. H. et al. (2006). "Role of EGF receptor transactivation in phosphoinositide 3-kinase-dependent activation of MAP kinase by GPCRs." *J Cell Physiol* 206(1): 47-57.
- Shan, L. et al. (2000). "Identification of viral macrophage inflammatory protein (vMIP)-II as a ligand for GPR5/XCR1." *Biochem Biophys Res Commun* 268(3): 938-41.
- Shi, G. X. et al. (2004). "Toll-like receptor signaling alters the expression of regulator of G protein signaling proteins in dendritic cells: implications for G protein-coupled receptor signaling." *J Immunol* 172(9): 5175-84.
- Shie, F. S. et al. (2005a). "Microglial EP2 is critical to neurotoxicity from activated cerebral innate immunity." *Glia* 52(1): 70-7.
- Shie, F. S. et al. (2005b). "Microglia lacking E Prostanoid Receptor subtype 2 have enhanced Abeta phagocytosis yet lack Abeta-activated neurotoxicity." *Am J Pathol* 166(4): 1163-72.
- Short, S. M. et al. (2000). "Integrins regulate the linkage between upstream and downstream events in G protein-coupled receptor signaling to mitogen-activated protein kinase." *J Biol Chem* 275(17): 12970-7.
- Shytle, R. D. et al. (2004). "Cholinergic modulation of microglial activation by alpha 7 nicotinic receptors." *J Neurochem* 89(2): 337-43.
- Siderovski, D. P. et al. (1996). "A new family of regulators of G-protein-coupled receptors?" *Curr Biol* 6(2): 211-2.
- Siderovski, D. P. and F. S. Willard (2005). "The GAPs, GEFs, and GDIs of heterotrimeric G-protein alpha subunits." *Int J Biol Sci* 1(2): 51-66.
- Simard, A. R. et al. (2006). "Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease." *Neuron* 49(4): 489-502.
- Simmons, D. et al. (1989). "A complete protocol for in situ hybridization of messenger RNAs in brain and other tissues with radiolabeled single-stranded RNA probes." *J Histotechnol* 12: 169-181.
- Singh, A. K. and Y. Jiang (2004). "How does peripheral lipopolysaccharide induce gene expression in the brain of rats?" *Toxicology* 201(1-3): 197-207.
- Sinha, D. et al. (1998). "Expression of the CB1 cannabinoid receptor in macrophage-like cells from brain tissue: immunochemical characterization by fusion protein antibodies." *J Neuroimmunol* 82(1): 13-21.

- Slawik, H. et al. (2004). "Microglial expression of prostaglandin EP3 receptor in excitotoxic lesions in the rat striatum." *Neurochem Int* 45(5): 653-60.
- Sohlemann, P. et al. (1995). "Binding of purified recombinant beta-arrestin to guanine-nucleotide-binding-protein-coupled receptors." *Eur J Biochem* 232(2): 464-72.
- Stefano, G. B. et al. (1996). "Cannabinoid receptors are coupled to nitric oxide release in invertebrate immunocytes, microglia, and human monocytes." *J Biol Chem* 271(32): 19238-42.
- Stephens, L. et al. (2002). "Roles of PI3Ks in leukocyte chemotaxis and phagocytosis." *Curr Opin Cell Biol* 14(2): 203-13.
- Su, Y. et al. (2003). "Galanin down-regulates microglial tumor necrosis factor-alpha production by a post-transcriptional mechanism." *J Neuroimmunol* 134(1-2): 52-60.
- Suguro, T. et al. (2006). "Serotonin acts as an up-regulator of acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase-1 in human monocyte-macrophages." *Atherosclerosis* 186(2): 275-81.
- Sung, S. S. et al. (1985). "Extracellular ATP perturbs transmembrane ion fluxes, elevates cytosolic [Ca<sup>2+</sup>], and inhibits phagocytosis in mouse macrophages." *J Biol Chem* 260(25): 13442-9.
- Sunnemark, D. et al. (2003). "Differential expression of the chemokine receptors CX3CR1 and CCR1 by microglia and macrophages in myelin-oligodendrocyte-glycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis." *Brain Pathol* 13(4): 617-29.
- Suzuki, S. et al. (2002). "Interactions of opioid and chemokine receptors: oligomerization of mu, kappa, and delta with CCR5 on immune cells." *Exp Cell Res* 280(2): 192-200.
- Suzuki, T. and R. L. Volle (1979). "Nicotinic, muscarinic and adrenergic receptors in a parasympathetic ganglion." *J Pharmacol Exp Ther* 211(1): 252-6.
- Taherzadeh, M. J. et al. (1999). "Conversion of furfural in aerobic and anaerobic batch fermentation of glucose by *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biosci Bioeng* 87(2): 169-74.
- Takayama, K. et al. (2002). "Prostaglandin E2 suppresses chemokine production in human macrophages through the EP4 receptor." *J Biol Chem* 277(46): 44147-54.
- Takeda, K. and S. Akira (2003). "Toll receptors and pathogen resistance." *Cell Microbiol* 5(3): 143-53.
- Takeshita, A. et al. (1992). "Molecular cloning and sequencing of an alternatively spliced form of the human thyrotropin receptor transcript." *Biochem Biophys Res Commun* 188(3): 1214-9.
- Talvani, A. et al. (2002). "Leukotriene B(4) induces nitric oxide synthesis in *Trypanosoma*

cruzi-infected murine macrophages and mediates resistance to infection." *Infect Immun* 70(8): 4247-53.

Tanaka, K. F. et al. (2002). "Existence of functional beta1- and beta2-adrenergic receptors on microglia." *J Neurosci Res* 70(2): 232-7.

Tanimoto, A. et al. (2001). "Histamine increases the expression of LOX-1 via H2 receptor in human monocytic THP-1 cells." *FEBS Lett* 508(3): 345-9.

Taylor, S. S. et al. (1990). "cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes." *Annu Rev Biochem* 59: 971-1005.

Taylor, C. W. and A. J. Laude (2002). "IP3 receptors and their regulation by calmodulin and cytosolic Ca<sup>2+</sup>." *Cell Calcium* 32(5-6): 321-34.

Taylor, D. L. et al. (2005). "Stimulation of microglial metabotropic glutamate receptor mGlu2 triggers tumor necrosis factor alpha-induced neurotoxicity in concert with microglial-derived Fas ligand." *J Neurosci* 25(11): 2952-64.

Tham, C. S. et al. (2003). "Microglial activation state and lysophospholipid acid receptor expression." *Int J Dev Neurosci* 21(8): 431-43.

Toko, H. et al. (2004). "Angiotensin II type 1a receptor is involved in cell infiltration, cytokine production, and neovascularization in infarcted myocardium." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24(4): 664-70.

Traub, L. M. and S. Kornfeld (1997). "The trans-Golgi network: a late secretory sorting station." *Curr Opin Cell Biol* 9(4): 527-33.

Treffkorn, L. et al. (2004). "PGE2 exerts its effect on the LPS-induced release of TNF-alpha, ET-1, IL-1alpha, IL-6 and IL-10 via the EP2 and EP4 receptor in rat liver macrophages." *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 74(1-4): 113-23.

Tsai, M. J. et al. (2005). "Effect of enhanced prostacyclin synthesis by adenovirus-mediated transfer on lipopolysaccharide stimulation in neuron-glia cultures." *Ann N Y Acad Sci* 1042: 338-48.

Tsutsui, S. et al. (2004). "A1 adenosine receptor upregulation and activation attenuates neuroinflammation and demyelination in a model of multiple sclerosis." *J Neurosci* 24(6): 1521-9.

Turrin, N. P. et al. (2001). "Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine mRNA induction in the periphery and brain following intraperitoneal administration of bacterial lipopolysaccharide." *Brain Res Bull* 54(4): 443-53.

Turrin, N. P. and S. Rivest (2006). "Tumor necrosis factor alpha but not interleukin 1 beta mediates neuroprotection in response to acute nitric oxide excitotoxicity." *J Neurosci* 26(1): 143-51.

Ulevitch, R. J. and P. S. Tobias (1994). "Recognition of endotoxin by cells leading to transmembrane signaling." *Curr Opin Immunol* 6(1): 125-30.

Ulevitch, R. J. and P. S. Tobias (1995). "Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin." *Annu Rev Immunol* 13: 437-57.

Urrutia, R. et al. (1997). "The dynamins: redundant or distinct functions for an expanding family of related GTPases?" *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(2): 377-84.

van Rossum, D. and U. K. Hanisch (2004). "Microglia." *Metab Brain Dis* 19(3-4): 393-411.

Vandenbulcke, F. et al. (2000). "Ligand-induced internalization of neurotensin in transfected COS-7 cells: differential intracellular trafficking of ligand and receptor." *J Cell Sci* 113 ( Pt 17): 2963-75.

Vanderbeld, B. and G. M. Kelly (2000). "New thoughts on the role of the beta-gamma subunit in G-protein signal transduction." *Biochem Cell Biol* 78(5): 537-50.

Vannier, E. et al. (1991). "Histamine suppresses gene expression and synthesis of tumor necrosis factor alpha via histamine H2 receptors." *J Exp Med* 174(1): 281-4.

Vassilatis, D. K. et al. (2003). "The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(8): 4903-8.

Venkataraman, C. and F. Kuo (2005). "The G-protein coupled receptor, GPR84 regulates IL-4 production by T lymphocytes in response to CD3 crosslinking." *Immunol Lett* 101(2): 144-53.

Vickery, R. G. and M. von Zastrow (1999). "Distinct dynamin-dependent and -independent mechanisms target structurally homologous dopamine receptors to different endocytic membranes." *J Cell Biol* 144(1): 31-43.

Villeneuve, J. et al. (2005). "Tumor necrosis factor reduces brain tumor growth by



enhancing macrophage recruitment and microcyst formation." *Cancer Res* 65(9): 3928-36.

Vishalakumar, S. et al. (2006). "The anti-proliferative effect of neurokinin-A on hematopoietic progenitor cells is partly mediated by p53 activating the 5' flanking region of neurokinin-2 receptor." *Cell Signal* 18(4): 422-32.

von Zastrow, M. and B. K. Kobilka (1992). "Ligand-regulated internalization and recycling of human beta 2-adrenergic receptors between the plasma membrane and endosomes containing transferrin receptors." *J Biol Chem* 267(5): 3530-8.

Vroon, A. et al. (2003). "Changes in the G-protein-coupled receptor desensitization machinery during relapsing-progressive experimental allergic encephalomyelitis." *J Neuroimmunol* 137(1-2): 79-86.

Waksman, Y. et al. (1999). "The central cannabinoid receptor (CB1) mediates inhibition of nitric oxide production by rat microglial cells." *J Pharmacol Exp Ther* 288(3): 1357-66.

Walter, L. et al. (2003). "Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration." *J Neurosci* 23(4): 1398-405.

Wang, C. R. et al. (2004). "Up-regulation of XCR1 expression in rheumatoid joints." *Rheumatology (Oxford)* 43(5): 569-73.

Wang, J. et al. (2006). "Medium chain fatty acids as ligands for orphan G protein-coupled receptor GPR84." *J Biol Chem*.

Ward, S. D. et al. (2002). "Conformational changes that occur during M3 muscarinic acetylcholine receptor activation probed by the use of an in situ disulfide cross-linking strategy." *J Biol Chem* 277(3): 2247-57.

Wedegaertner, P. B. and H. R. Bourne (1994). "Activation and depalmitoylation of Gs alpha." *Cell* 77(7): 1063-70.

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

Wettschureck, N. and S. Offermanns (2005). "Mammalian G proteins and their cell type specific functions." *Physiol Rev* 85(4): 1159-204.

Wilson, S. and D. Bergsma (2000). "Orphan G-protein coupled receptors: novel drug targets for the pharmaceutical industry." *Drug Des Discov* 17(2): 105-14.

Winstel, R. et al. (1996). "Protein kinase cross-talk: membrane targeting of the beta-adrenergic receptor kinase by protein kinase C." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(5): 2105-9.

Wittenberger, T. et al. (2001). "An expressed sequence tag (EST) data mining strategy succeeding in the discovery of new G-protein coupled receptors." *J Mol Biol* 307(3): 799-

813.

Witting, A. et al. (2006). "From the Cover: Experimental autoimmune encephalomyelitis disrupts endocannabinoid-mediated neuroprotection." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(16): 6362-7.

Wright, S. D. et al. (1990). "CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein." *Science* 249(4975): 1431-3.

Wright, G. J. et al. (2003). "Characterization of the CD200 receptor family in mice and humans and their interactions with CD200." *J Immunol* 171(6): 3034-46.

Wymann, M. P. et al. (1999). "Phosphoinositide 3-kinase signalling: no lipids." *Biochem Soc Trans* 27(4): 629-34.

Wymann, M. P. et al. (2000). "Lipids on the move: phosphoinositide 3-kinases in leukocyte function." *Immunol Today* 21(6): 260-4.

Wymann, M. P. et al. (2003). "Phosphoinositide 3-kinase gamma: a key modulator in inflammation and allergy." *Biochem Soc Trans* 31(Pt 1): 275-80.

Xiang, Z. and G. Burnstock (2005). "Expression of P2X receptors on rat microglial cells during early development." *Glia* 52(2): 119-26.

Yang, J. et al. (1995). "Mutation of carboxyl-terminal threonine residues in human m3 muscarinic acetylcholine receptor modulates the extent of sequestration and desensitization." *Mol Pharmacol* 48(3): 477-85.

Yang, L. V. et al. (2005). "Gi-independent macrophage chemotaxis to lysophosphatidylcholine via the immunoregulatory GPCR G2A." *Blood* 105(3): 1127-34.

Yazawa, H. et al. (2001). "Beta amyloid peptide (Abeta42) is internalized via the G-protein-coupled receptor FPRL1 and forms fibrillar aggregates in macrophages." *Faseb J* 15(13): 2454-62.

Yousefi, S. et al. (2001). "Cloning and expression analysis of a novel G-protein-coupled receptor selectively expressed on granulocytes." *J Leukoc Biol* 69(6): 1045-52.

Zhang, J. et al. (1996). "Dynamin and beta-arrestin reveal distinct mechanisms for G protein-coupled receptor internalization." *J Biol Chem* 271(31): 18302-5.

Zhang, L. et al. (1998). "Cholinergic agonists increase intracellular Ca<sup>2+</sup> in cultured human microglia." *Neurosci Lett* 255(1): 33-6.

Zhu, K. et al. (2001). "Sphingosylphosphorylcholine and lysophosphatidylcholine are ligands for the G protein-coupled receptor GPR4." *J Biol Chem* 276(44): 41325-35.

Zidek, Z. et al. (2004). "Involvement of adenosine A1 receptors in upregulation of nitric oxide by acyclic nucleotide analogues." *Eur J Pharmacol* 501(1-3): 79-86.

Zuurman, M. W. et al. (2003). "LPS-induced expression of a novel chemokine receptor (L-CCR) in mouse glial cells in vitro and in vivo." *Glia* 41(4): 327-36.

