

Université Louis Pasteur - Strasbourg I
Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

THESE

En vue de l'obtention du grade de
Docteur de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg
Discipline : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Contribution aux études structurales
des récepteurs de chimiokines
CCR5 et CXCR4,
principaux co-récepteurs du VIH-1
exprimés en
système levure et en cellule d'insecte

Présentée par
Valérie Klein

Soutenue publiquement le 14 octobre 2005
A l'UMR7100 du CNRS, Illkirch

Devant les membres du jury :

Docteur Franc Pattus
Docteur Jean-Luc Galzi
Professeur Marcel Hibert
Docteur Fernando Arenzana-Seisdedos
Docteur Hugues Lortat-Jacob
Docteur Jean-Philippe Pin

Directeur de thèse
Co-directeur de thèse
Rapporteur interne
Examineur
Rapporteur externe
Rapporteur externe

SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
LISTE DES ABREVIATIONS	9
LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX	11
INTRODUCTION GENERALE	15
CHAPITRE 1 : LES RECEPTEURS COUPLES AUX PROTEINES G	16
1. FAMILLES STRUCTURELLES DES RÉCEPTEURS COUPLÉS AUX PROTÉINES G	17
1.1. Famille 1 ou A	19
1.2. Famille 2 ou B	20
1.3. Famille 3 ou C	21
1.4. Autres familles	23
2. LES VOIES DE SIGNALISATION DES RCPG	23
2.1. Les protéines G hétérotrimériques	23
2.1.1. Le cycle fonctionnel des protéines G	24
2.1.2. Diversité des sous-unités α et classification des protéines G	25
2.1.2.1. Les sous-unités α des protéines G	26
2.1.2.2. Les sous-unités β/γ des protéines G	26
2.1.3. Structure cristallographique des protéines G	27
2.2. Régulation de l'activation des récepteurs couplés aux protéines G	28
2.2.1. Les protéines RGS	28
2.2.2. Désensibilisation et régulation négative	28
2.2.2.1. La désensibilisation homologue	29
2.2.2.2. La désensibilisation hétérologue	30
2.2.2.3. La régulation négative	31
2.2.3. Mécanismes moléculaires de la régulation de la réponse	31
2.2.3.1. Les arrestines	31
2.2.3.3. Internalisation par la voie des cavéoles	33
2.3. Voies de signalisation ne faisant pas intervenir les protéines G	34
2.3.1. Activation des différentes voies MAPK	35
2.3.2. Autres voies de signalisation	36
3. IMPACT DE LA MODULATION DE LA STRUCTURE D'UN RCPG	36
3.1. La structure tridimensionnelle de la rhodopsine	36
3.2. Différents états conformationnels d'un récepteur	40

3.3. Activité constitutive	41
3.4. Oligomérisation	42
4. RCPG ET SANTÉ HUMAINE	45
4.1. RCPG et médicaments	45
4.2. Mutants constitutivement actifs des RCPG à l'origine de pathologies humaines	45
4.3. RCPG viraux	46
4.4. RCPG orphelins	47
5. CONCLUSIONS	47

CHAPITRE 2 : LES CHIMIOKINES ET LEURS RECEPTEURS **49**

1. PRÉSENTATION DU SYSTÈME CHIMIOKINE	49
1.1. Les chimiokines et leurs dérivés	49
1.1.1. Nomenclature	49
1.1.2. Rôles physiologiques des chimiokines	49
1.1.2.1. Chimiotactisme	49
1.1.2.2. Autres fonctions des chimiokines	50
1.1.3. Classification des chimiokines	50
1.1.3.1. Classification structurale	50
1.1.3.2. Classification fonctionnelle	52
1.1.4. Structure tridimensionnelle des chimiokines	53
1.2. Les récepteurs de chimiokines	55
1.2.1. Classification des récepteurs de chimiokines	55
1.2.2. Caractéristiques des récepteurs de chimiokines	56
1.2.3. Signalisation des récepteurs de chimiokines	57
1.3. Implications des chimiokines et de leurs récepteurs en santé humaine	58
2. LE RÉCEPTEUR CCR5	61
2.1. Les chimiokines ligands de CCR5	61
2.1.1. RANTES	62
2.1.2. MIP-1	63
2.2. Généralités	64
2.2.1. Clonage	64
2.2.2. Fonction et expression	64
2.2.3. Knocked-out	65
2.3. Structure tridimensionnelle et site de fixation du ligand	65
2.3.1. Caractéristiques structurales	65
2.3.2. Site de liaison des ligands	65
2.3.3. Rôle des glycosaminoglycanes	67
2.4. Ponts disulfures	68
2.5. Modifications post-traductionnelles de l'extrémité amino-terminale	68
2.6. Palmitoylation et localisation dans les radeaux lipidiques	69
2.7. Oligomérisation	71
2.8. Signalisation et expression	72
2.8.1. Voies de signalisation	72
2.8.2. Phosphorylation	73

2.8.3. Interaction avec les arrestines	74
2.8.4. Endocytose et recyclage	75
2.8.5. Régulation hétérologue	76
3. LE RÉCEPTEUR CXCR4	77
3.1. La chimiokine SDF-1	77
3.2. Généralités à propos du récepteur CXCR4	79
3.2.1. Historique	79
3.2.2. Gène et expression	80
3.2.3. Rôles physiologiques	80
3.2.4. Effets du knocked-out	80
3.3. Structure tridimensionnelle et site de fixation du ligand	81
3.3.1. Caractéristiques structurales	81
3.3.2. Liaison du ligand endogène	81
3.3.3. Rôle des glycosaminoglycanes	83
3.4. Ponts disulfures	84
3.5. Modifications post-traductionnelles de l'extrémité amino-terminale	84
3.6. Localisation dans les radeaux lipidiques	85
3.7. Oligomérisation	87
3.8. Signalisation et expression	88
3.8.1. Voies de signalisation	88
3.8.2. Endocytose et recyclage	89
3.8.3. Ubiquitinylation	89

CHAPITRE 3 : IMPLICATION DE CXCR4 ET CCR5 DANS L'INFECTION A VIH 91

1. GÉNÉRALITÉS	91
1.1. Historique	91
1.2. Histoire naturelle de l'infection à VIH	91
1.3. Epidémiologie	92
2. BIOLOGIE DU VIRUS	93
2.1. Structure du virus	93
2.1.1. Organisation du génome viral	93
2.1.2. Structure des particules virales	95
2.2. Hétérogénéité du virus et sous-groupes	96
3. MÉCANISME D'ENTRÉE DU VIRUS DANS LA CELLULE HÔTE	97
3.1. Attachement du VIH-1	97
3.2. Engagement du co-récepteur	98
3.2.1. Phénotype du virus lié à l'utilisation du co-récepteur	98
3.2.2. Conséquences de la mutation CCR5 Δ 32	99
3.3. Fusion des membranes	100
3.4. Cycle de réplication	101
4. IMPORTANCE DES CO-RÉCEPTEURS	104
4.1. Implications des modifications post-traductionnelles de CCR5 et CXCR4 pour leur fonction de co-récepteur du VIH-1	104
4.2. Site de liaison et signalisation induite par la fixation de gp120	106

5. EFFET PROTECTEUR DES CHIMIOKINES ET DE LEURS DÉRIVÉS DANS LE CADRE DE L'INFECTION À VIH	107
5.1. Effet de RANTES, MIP-1 α et MIP-1 β sur les souches R5 et de SDF-1 sur les souches X4	107
5.2. Effets des dérivés de chimiokines	108
5.3. Les intrakines	109
6. LE TRAITEMENT DE L'INFECTION À VIH	110
6.1. Les premiers médicaments	110
6.1.1. Les inhibiteurs de la transcriptase inverse	110
6.1.2. Les inhibiteurs de la protéase virale	110
6.2. Les nouvelles cibles	111
6.2.1. Les inhibiteurs de l'intégrase virale	111
6.2.2. Les inhibiteurs de la protéine de nucléocapside p7	111
6.2.3. Les inhibiteurs de l'entrée du virus	111
6.2.4. Les autres cibles	112
6.2.5. Anticorps	112
6.2.6. Vaccination	113
6.3. Les antagonistes des récepteurs de chimiokines	114
6.3.1. Antagonistes de CCR5	114
6.3.2. Antagonistes de CXCR4	115

CHAPITRE 4 : PROBLEMATIQUE DE LA THESE ET SITUATION DU SUJET DANS LE CONTEXTE DE RECHERCHE **119**

1. OBJECTIFS DES RECHERCHES MENÉES AU LABORATOIRE	119
2. PRÉSENTATION DU RÉSEAU ANRS	120
2.1. Expression dans <i>Escherichia coli</i>	120
2.2. Expression dans la levure <i>Hansenula polymorpha</i>	121
2.3. Expression en cellules d'insectes S2	121
2.4. Expression en cellules mammifères par le système SFV	122
3. PROBLÉMATIQUE DE LA THÈSE	123

CHAPITRE 5 : EXPRESSION DU RECEPTEUR DE CHIMIOKINES CCR5 DANS LE SYSTEME HANSENULA POLYMORPHA - RESULTATS ET DISCUSSION **125**

1. PRÉSENTATION ET ORIGINALITÉ DU SYSTÈME D'EXPRESSION	125
2. RÉSULTATS ET DISCUSSION	127
2.1. Outils moléculaires	127
2.2. Construction des souches exprimant CCR5	128
2.2.1. Principe de la transformation intégrative chez la levure	128
2.2.2. Contrôle de l'intégration	129
2.3. Caractérisation biochimique du récepteur	133
2.3.1. Principe de l'induction	133
2.3.2. Mise au point du protocole de détection du récepteur	134

2.4. Essais de liaison de ligands à l'équilibre	134
2.5. Solubilisation	136
2.5.1. Principe de la solubilisation d'une protéine membranaire et critères de choix d'un détergent	136
2.5.2. Efficacité de solubilisation du récepteur CCR5	137
2.5.3. Mise en évidence d'une agrégation irréversible du récepteur exprimé dans la levure <i>Hansenula polymorpha</i>	142
3. DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSIONS	146

CHAPITRE 6 : MATÉRIELS ET MÉTHODES - *Hansenula polymorpha* **149**

1. MATÉRIEL	149
1.1. Organismes et milieux de culture	149
1.1.1. Bactéries	149
1.1.2. Levure	149
1.1.3. Stockage et décongélation	150
1.2. Plasmides	150
1.3. Enzymes de restriction et réactifs de clonage	151
1.4. Produits divers	151
2. MÉTHODES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE	152
2.1. Clonage	152
2.1.1. Stratégies de PCR	152
2.1.1.1. Construction des vecteurs pHipX4.pMOX.CCR5.Scpx15tag	152
2.1.1.2. Construction du vecteur pHipX4.pMOX.Hppex3.CCR5	152
2.1.2. Amplification des fragments d'ADN par PCR	153
2.1.3. Clonage des fragments de PCR	153
2.1.3.1. Extraction et purification de l'ADN	153
2.1.3.1.1. Dépôt et migration	153
2.1.3.1.2. Extraction et purification de l'ADN	153
2.1.3.2. Clonage dans le vecteur TOPO	154
2.1.3.3. Préparation d'ADN plasmidique pour les études analytiques	154
2.1.3.4. Préparation d'ADN plasmidique pour le séquençage et la transformation	155
2.1.4. Clonage dans le vecteur d'expression	155
2.1.4.1. Ligation	155
2.1.4.2. Transformation des bactéries compétentes XL-1 Blue	155
2.2. Construction et contrôle des souches levures	156
2.2.1. Préparation de levures compétentes pour la transformation	156
2.2.2. Transformation des souches levure par électroporation	157
2.2.3. Préparation d'ADN génomique de levure	157
2.2.4. Hybridation ADN/ADN de type Southern blot	158
2.2.4.1. Préparation de la sonde	158
2.2.4.2. Préparation de la membrane	159
2.2.4.3. Hybridation de la sonde sur l'ADN génomique	160
3. CULTURE ET INDUCTION DES SOUCHES <i>Hansenula polymorpha</i>	160
3.1. Adaptation au milieu minéral	160

3.2. Induction	160
3.3. Culture en fermenteur	161
4. MÉTHODES DE BIOCHIMIE	161
4.1. Lyse des cellules et préparation de membranes	161
4.1.1. Lyse mécanique au désintégrateur de cellules	161
4.1.2. Méthode enzymatique douce à la zymolyase (préparation de protoplastes)	162
4.2. Immunodétection du récepteur	163
4.2.1. Dot blot en conditions non dénaturantes	163
4.2.2. SDS-PAGE et Western blot	163
4.2.3. Détection du récepteur	164
4.3. Solubilisation du récepteur	165
4.3.1. Solubilisation classique	165
4.3.2. Test « urée »	166
4.4. Immunoprécipitation	166
5. CARACTÉRISATION FONCTIONNELLE DU RÉCEPTEUR : LIAISON DE LIGANDS RADIOMARQUÉS À L'ÉQUILIBRE	167

**CHAPITRE 7 : EXPRESSION DES RECEPTEURS CCR5 ET CXCR4 FUSIONNES A
L'EGFP DANS LES CELLULES S2 - RESULTATS ET DISCUSSION** **169**

1. INTRODUCTION	169
1.1. Les cellules S2 en tant que système d'expression hétérologue	169
1.2. Choix de l'étiquette EGFP	171
1.2.1. Description de la protéine EGFP	171
1.2.2. Applications à la biologie cellulaire	171
1.2.3. Utilisation de la GFP en fusion à des RCPG	172
2. RÉSULTATS ET DISCUSSION	173
2.1. Outils moléculaires	173
2.2. Quantification totale des récepteurs CCR5 et CXCR4 fusionnés à l'EGFP exprimés en cellules S2	175
2.2.1. Influence du temps d'induction	176
2.2.2. Influence des additifs ajoutés au milieu de culture	178
2.3. Localisation cellulaire du récepteur	179
2.3.1. Microscopie sur cellules vivantes	179
2.3.2. Observation de cellules fixées	181
2.3.3. Etude de l'influence de la séquence signal	182
2.3.4. Analyse de la localisation cellulaire des récepteurs en fonction du temps d'induction par microscopie sur cellules vivantes	183
2.3.5. Analyse de la localisation des récepteurs par flottaison des membranes sur un gradient discontinu de saccharose	184
2.3.5.1. Introduction	184
2.3.5.2. Principe	184
2.3.5.3. Résultats	185
2.4. FRET	187
2.4.1. Introduction	187

2.4.2. Principe	188
2.4.3. Résultats obtenus avec le récepteur CXCR4	190
2.4.4. Résultats de FRET sur CCR5	191
2.5. Essai d'optimisation de l'expression des récepteurs CCR5 et CXCR4 fusionnés à l'EGFP dans les cellules S2	192
2.5.1. Enrichissement des lignées polyclonales exprimant les récepteurs CCR5 et CXCR4 fusionnés à l'EGFP par tri sur billes immunomagnétiques	193
2.5.2. Influence du tri sur billes sur le taux d'expression du récepteur	193
2.5.3. Influence du tri sur billes immunomagnétiques sur la localisation cellulaire du récepteur	194
2.5.4. Influence du tri sur billes immunomagnétiques sur le FRET	196
2.6. Solubilisation des récepteurs EGFP.CCR5 et EGFP.CXCR4	197
3. DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSIONS	198
3.1. Validation du système d'expression S2	198
3.2. Optimisations à apporter au système d'expression S2	199
3.3. Conclusions	201

CHAPITRE 8 : MATÉRIELS ET MÉTHODES - CELLULES SCHNEIDER ET HEK 203

1. MATÉRIEL	203
1.1. Organismes et milieux de culture	203
1.1.1. Bactéries (voir chapitre 6)	203
1.1.2. Cellules d'insectes	203
1.1.3. Cellules mammifères	203
1.2. Plasmides	203
1.2.1. Plasmides pour les cellules d'insectes	203
1.2.2. Plasmides pour les cellules mammifères	204
1.3. Enzymes de restriction et matériel de biologie moléculaire	204
2. MÉTHODES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE	205
2.1. Clonage	205
2.1.1. Stratégies de PCR	205
2.1.1.1. Constructions pour S2	205
2.1.1.2. Constructions pour HEK	206
2.1.2. Amplification des fragments par réaction de polymérisation en chaîne	206
2.1.3. Clonage des fragments de PCR	207
2.1.3.1. Extraction et purification des fragments d'ADN	207
2.1.3.1.1. Dépôt et migration (voir chapitre 6)	207
2.1.3.1.2. Extraction et purification de l'ADN	207
2.1.3.2. Clonage dans le vecteur TOPO	207
2.1.3.3. Préparation d'ADN plasmidique pour les études analytiques (voir chapitre 6)	207
2.1.3.4. Préparation d'ADN plasmidique pour le séquençage et la transfection	207
2.1.4. Construction des vecteurs d'expression	208
2.1.4.1. Ligation et amplification	208
2.1.4.2. Contrôle de la ligation par réaction de polymérisation en chaîne	208
3. CULTURE DES CELLULES S2	209

3.1. Congélation, décongélation et maintien	209
3.2. Transfection	210
3.3. Etablissement de lignées polyclonales stables	211
3.4. Tri sur billes immunomagnétiques	211
4. CULTURE DES CELLULES HEK	212
4.1. Congélation, décongélation et conditions de culture	212
4.2. Transfection	213
4.3. Etablissement de lignées polyclonales stables	214
4.4. Isolation clonale	214
5. MÉTHODES DE BIOCHIMIE POUR LES CELLULES S2	214
5.1. Préparation des échantillons	214
5.1.1. Lyse et préparation de membranes totales	214
5.1.2. Séparation des membranes par flottaison sur un gradient discontinu de saccharose	215
5.2. Immunodétection du récepteur	215
5.2.1. SDS-PAGE et Western blot	215
5.2.2. Détection du récepteur	216
6. Fluorescence	216
6.1. Mesure de fluorescence sur cellules entières	216
6.2. FRET	217
7. MICROSCOPIE	217
7.1. Fixation des cellules S2	217
7.2. Epifluorescence	218
8. SOLUBILISATION DES RÉCEPTEURS	219
CHAPITRE 9 : CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES	221
BIBLIOGRAPHIE	225
GLOSSAIRE	263

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADNc : Acide DésoxyriboNucléique Complémentaire
AMPc : Adénosine MonoPhosphate Cyclique
ANRS : Agence Nationale de Recherche sur le SIDA
AOP : Amino-OxyPentane
APS : Ammonium PerSulfate
ARN : Acide RiboNucléique
ARNm : Acide RiboNucléique Messenger
ATP : Adénosine TriPhosphate
BET : Bromure d'ETHidium
BRET : Bioluminescence Resonance Energy Transfer
BSA : Bovine Serum Albumine
CD4 : Cluster of Differentiation
CHAPS : (3-[3-Cholamidopropyl)-diméthyl-ammonio]-1-propane-sulfonate
CHAPSO : (3-[3-Cholamidopropyl)-diméthyl-ammonio]-2-hydroxy-1-propane-sulfonate
DAG : DiAcylGlycérol
DC-SIGN : Dendritic Cell-Specific ICAM-3 Grabbing Non-integrin
DDM : β -DoDecylMaltoside
DMSO : DiméthylSulfOxyde
DO : Densité Optique
EDTA : Ethylène Diamine TétrAcétate
EGFP : Enhanced Green Fluorescent Protein
ERK : Extracellular Regulated Kinase
FCS : Fœtal Calf Serum
FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer
GABA : γ -AminoButyric Acic
GAG : GlycosAminoGlycanes
GDP : Guanosine DiPhosphate
GFP : Green Fluorescent Protein
GRK : G-protein Receptor Kinase
GTP : Guanosine TriPhosphate
HAART : Highly Active Antiretroviral Therapy
HEK : Human Embryonic Kidney
HRP : Horse Raddish Peroxydase
hMOR : Human Mu Opioid Receptor

HSPG : Heparan Sulfate ProteoGlycan
IP₃ : Inositol 1,4,5-triPhosphate
IUPHAR : International Union of PHARmacology
JNK : c-Jun N-terminal Kinase
KO : Knocked Out
LTR : Long-Terminal Repeat
MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase
MCP : Monocyte Chemotactic Protein
MIP : Macrophage Inflammatory Protein
nM/ μ M/mM : nano- :micro- :millimolaire
NP-40 : Nonidet-P40
n-OctylPOE : n-OctylPolyOxyEthylène
PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS : Phosphate Buffer Saline
PCR : Polymerase Chain Reaction
PEI : PolyEthylèneImine
PIP₂ : Phosphatidyl Inositol 4,5-diPhosphate
PKA : Protéine Kinase A
PKC : Protéine Kinase C
PMSF : PhenylMethylSulphonylFluoride
RANTES : Regulatory upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted
RGS : Regulator of G-protein Signaling
RCPG : Récepteur Couplé aux Protéines G
rpm : Rotation Par Minute
RT : Reverse Transcriptase
S2 : cellules issues d'embryons de *Drosophila melanogaster*, lignée numéro 2
SCID : Severe Combined ImmunoDeficiency
SDF : Stromal cell Derived Factor
SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate- PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SIDA : Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquis
Tris : Tri-(hydroxyméthyl)-amino méthane
TritonX-100 : octylphénolpoly(éthylèneglycoléther)_n
VIH : Virus d'ImmunoDéficiency Humaine

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

INTRODUCTION

CHAPITRE 1 : LES RECEPTEURS COUPLES AUX PROTEINES G

Figure 1 : Représentation schématique d'un RCPG	p18
Figure 2 : Représentation schématique des trois principales sous-familles des RCPG de la famille 1	p20
Figure 3 : Représentation schématique des RCPG des familles 2 et 3	p21
Figure 4 : Structure cristallographique du domaine extracellulaire du récepteur mGlu1 dans sa forme complexée et dans sa forme libre	p22
Figure 5 : La triade « RCPG-Protéine G-Effecteur »	p24
Figure 6 : Représentation de la structure tridimensionnelle d'une sous-unité α de protéine G hétérotrimérique	p27
Figure 7 : Représentation du dimère $G_{\beta\gamma}$ d'une protéine G hétérotrimérique	p27
Figure 8 : Représentation schématique des évènements conduisant à l'internalisation des RCPG par la voie des puits recouverts de clathrine	p33
Figure 9 : Voies de signalisation induites par les RCPG	p35
Figure 10 : Structure cristallographique de la rhodopsine bovine	p38
Figure 11 : Détails structuraux de quatre régions de la rhodopsine	p39
Figure 12 : Etats conformationnels des RCPG	p41
Tableau 1 : Principales sous-unités des protéines G et leurs effecteurs primaires	p25
Tableau 2 : Exemples de RCPG natifs présentant une activité constitutive en conditions physiologiques	p42
Tableau 3 : Quelques exemples de maladies humaines liées à des mutations au niveau de RCPG	p46

CHAPITRE 2 : LES CHIMIOKINES ET LEURS RECEPTEURS

Figure 1 : Principales voies de signalisation induites par la liaison des chimiokines sur leurs récepteurs	p58
Figure 2 : Structure cristallographique du dimère de RANTES	p63
Figure 3 : Structure cristallographique du dimère de MIP-1 β	p64
Figure 4 : Schéma d'interaction entre CCR5 et ses ligands	p67
Figure 5 : Topologie en deux dimensions de la séquence du récepteur CCR5 humain	p77
Figure 6 : Structure tridimensionnelle de SDF-1	p79
Figure 7 : Modèle d'interaction entre SDF-1 et CXCR4	p83
Figure 8 : Topologie en deux dimensions de la séquence du récepteur CXCR4 humain	p90

Tableau 1 : Nomenclature des chimiokines humaines.....	p53
Tableau 2 : Les récepteurs de chimiokines et leurs ligands	p56
Tableau 3 : Récepteurs de chimiokines et maladies humaines associées	p60

CHAPITRE 3 : IMPLICATIONS DE CXCR4 ET CCR5 DANS L'INFECTION A VIH

Figure 1 : Organisation génomique de l'ADN proviral du VIH-1	p94
Figure 2 A : Représentation schématique d'une particule virale.....	p95
Figure 2 B : Particules virales à la surface des cellules.....	p96
Figure 3 : Mécanisme d'entrée du VIH-1 dans la cellule hôte	p101
Figure 4 : Cycle de réplication du VIH.....	p103
Figure 5 : Structures de quelques antagonistes des récepteurs de chimiokines.....	p117

Tableau 1 : Tableau récapitulatif de l'épidémie de VIH et de SIDA dans le monde.....	p93
Tableau 2 : Sous-groupes de VIH-1 et zone géographique de prévalence.....	p96

PREMIERE PARTIE : EXPRESSION DU RECEPTEUR DE CHIMIOKINES CCR5 DANS LE SYSTEME *Hansenula polymorpha*

CHAPITRE 5 : RESULTATS ET DISCUSSION

Figure 1 : Présentation du système d'expression <i>Hansenula polymorpha</i>	p127
Figure 2 : Différentes constructions incluant le gène de CCR5.....	p128
Figure 3 : Principe de la transformation intégrative chez la levure	p129
Figure 4 : Contrôle du locus d'intégration et du nombre de copies intégrées par hybridation ADN/ADN de type Southern	p130
Figure 5 : Hybridation ADN/ADN de type Southern.....	p132
Figure 6 : Variation du taux d'expression du récepteur en fonction du nombre de copies intégrées.....	p133
Figure 7 : Détection par Western blot du récepteur solubilisé.....	p138
Figure 8 : Détection par Western blot du récepteur solubilisé en modifiant les paramètres de solubilisation par le CHAPS	p140
Figure 9 : Détection du récepteur par Western blot dans les culots de solubilisation après trois extractions successives en présence de 1 % de CHAPS.....	p142
Figure 10 : Rendements de solubilisation du récepteur par l'urée.....	p143
Figure 11 : Détection du récepteur par Western blot après test urée + β -mercaptoéthanol	p145
Figure 12 : Etudes de microscopie électronique	p146

Tableau 1 : Premiers essais de solubilisation du récepteur CCR5.....	p138
Tableau 2 : Optimisation de la solubilisation du récepteur CCR5 par le CHAPS Etude de l'influence de la concentration en sel, de la concentration en détergent et de la température de solubilisation	p140
Tableau 3 : Optimisation de la solubilisation du récepteur CCR5 par le CHAPS par trois extractions successives.....	p141

CHAPITRE 6 : MATERIELS ET METHODES

Figure 1 : Représentation du vecteur d'expression pHipX4	p151
Figure 2 : Détection du récepteur par Western blot	p165
Tableau 1 : Composition du milieu minéral.....	p149
Tableau 2 : Mélange de vitamines x1000	p149
Tableau 3 : Composition du milieu Vishniac x1000.....	p150

DEUXIEME PARTIE : EXPRESSION DES RECEPTEURS CCR5 ET CXCR4 EN FUSION A L'EGFP DANS LE SYSTEME S2

CHAPITRE 7 : RESULTATS ET DISCUSSION

Figure 1 : Structure cristallographique de la GFP	p171
Figure 2 : Représentation schématique des protéines de fusion exprimées dans les cellules S2	p175
Figure 3 : Etude de l'influence du temps d'induction sur la fluorescence totale	p176
Figure 4 : Augmentation du taux d'expression du récepteur en fonction du temps d'induction.....	p177
Figure 5 : Etude de l'influence du DMSO sur la fluorescence totale	p178
Figure 6 : Observation de cellules vivantes exprimant le récepteur EGFP. Δ CCR5	p180
Figure 7 : Observation de cellules vivantes exprimant les récepteurs EGFP.CCR5 et EGFP.CXCR4.....	p180
Figure 8 : Observation de cellules fixées exprimant le récepteur EGFP.CXCR4	p181
Figure 9 : Observation de cellules vivantes exprimant le récepteur EGFP.CXCR4.....	p182
Figure 10 : Principe de la séparation de membranes par flottaison sur un gradient discontinu de saccharose	p185
Figure 11 : Mesure de la fluorescence de chaque fraction issue de la préparation de membranes par flottaison sur gradient discontinu de saccharose	p186
Figure 12 : Illustration de l'utilisation du FRET comme outil pharmacologique.....	p188
Figure 13 : Principe du FRET	p189

Figure 14 : Détection de l'interaction entre les récepteurs EGFP.CXCR4 et SDF-1-TR par FRET sur cellules entières	p190
Figure 15 : Etude de l'influence du tri sur billes immunomagnétiques sur le taux d'expression	p194
Figure 16 : Observation de cellules vivantes exprimant les récepteurs EGFP.CXCR4 et EGFP.CCR5 après tri cellulaire sur billes immunomagnétiques.....	p195
Figure 17 : Influence du tri cellulaire sur billes immunomagnétiques sur l'efficacité de FRET	p196
Figure 18 : Solubilisation des récepteurs EGFP.CCR5 et EGFP.CXCR4 par le NP-40....	p198

CHAPITRE 8 : MATERIELS ET METHODES

Figure 1 : Représentation schématique du vecteur pMT-Bip-V5/His	p204
Figure 2 : Gamme étalon de l'EGFP purifiée.....	p217

INTRODUCTION GENERALE

Lorsqu'on connaît les processus divers et variés qui font intervenir les récepteurs couplés aux protéines *G* (RCPG), on comprend aisément le vif intérêt porté par de nombreux laboratoires à les étudier. En effet, les RCPG sont impliqués dans des processus physiologiques nécessaires à la survie et à la défense de l'organisme, mais également dans de nombreux processus pathologiques.

Parmi les RCPG, les récepteurs de chimiokines contribuent au déroulement normal de l'immunité en aidant l'organisme à se défendre lors d'une infection ou d'une inflammation. Néanmoins, ils ont également été impliqués dans de nombreux processus pathologiques allant de la polyarthrite rhumatoïde à l'asthme, en passant par le psoriasis, ou certaines formes de cancer.

De façon plus surprenante, certains pathogènes extérieurs ont la capacité d'utiliser ces récepteurs pour infecter les cellules et se propager dans l'organisme par leur intermédiaire. C'est notamment le cas du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) qui utilise principalement deux récepteurs de chimiokines, *CCR5* et *CXCR4*, pour infecter les cellules du système immunitaire, conduisant à l'immunodépression des patients au stade SIDA (Syndrome d'ImmunoDéficience Acquise).

L'émergence de souches résistantes aux traitements actuels, mais aussi les effets secondaires lourds supportés par les patients soulignent la nécessité de trouver rapidement d'autres traitements pour les patients infectés. De nombreuses voies sont explorées dans ce sens. La résolution de la structure cristallographique des co-récepteurs est l'une de ces voies dans la mesure où la structure tridimensionnelle de la protéine pourrait faciliter le dessin de nouvelles molécules actives spécifiques de ces récepteurs.

Je présenterai les récepteurs couplés aux protéines *G* dans le premier chapitre de cette introduction. Les récepteurs de chimiokines seront plus particulièrement détaillés dans le chapitre 2, et enfin je parlerai de l'implication des récepteurs de chimiokines *CCR5* et *CXCR4* dans le processus de l'infection à VIH dans le dernier chapitre de l'introduction.

Les stratégies et les résultats de ce travail de thèse seront présentés dans les chapitres 4 à 8.

CHAPITRE 1

LES RECEPTEURS COUPLES AUX PROTEINES G

« Les bébés ont besoin de communication pour survivre. Le lait et le sommeil ne suffisent pas. La communication est aussi un élément indispensable à la vie »

Bernard Werber

Extrait de *l'Encyclopédie du savoir relatif et absolu*

L'isolement est une situation particulièrement néfaste pour tout être vivant qui peut engendrer des dégâts considérables pour l'être humain. L'évolution des organismes multicellulaires est elle aussi conditionnée par la capacité qu'ont les cellules qui les composent à communiquer non seulement entre elles, mais aussi avec leur environnement.

À l'échelle de la cellule, la communication s'effectue soit par contact direct entre deux cellules, soit de manière indirecte en faisant intervenir un grand nombre de messagers de nature très variée. Quel que soit le mode de communication, le processus fait intervenir un récepteur dont le rôle est de transmettre un message de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule. De façon générale, un récepteur est défini comme une macromolécule qui est impliquée de manière directe et spécifique dans la transmission d'un signal inter- et intracellulaire. Globalement, la fixation d'un ligand sur un récepteur modifie la conformation de celui-ci et ce processus lui permet de transmettre un signal en faisant intervenir une cascade de différentes protéines réceptrices localisées à la membrane ou dans le milieu intracellulaire.

Il existe quatre grandes classes de récepteurs membranaires :

- Les canaux ioniques,
- Les récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G,
- Les récepteurs enzymes,
- Les régulateurs de la transcription.

Le groupe des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) est particulièrement intéressant de par sa complexité et sa diversité. Les RCPG transmettent des réponses cellulaires extrêmement diversifiées par des protéines capables de lier le GTP, les protéines G hétérotrimériques, mais aussi en faisant intervenir un grand nombre de partenaires membranaires ou intracellulaires. La complexité de ce système résulte notamment des propriétés intrinsèques d'amplification de la réponse à travers une vaste cascade de signalisation, mais réside également dans la diversité des mécanismes de régulation qui contrôlent la nature, la durée et l'amplitude des réponses cellulaires.

Les RCPG représentent la plus grande famille de molécules de surface impliquées dans la transmission du signal. Globalement, on estimait que les RCPG représentaient environ 1 % de la totalité du génome humain. Le séquençage du génome a dénombré 616 gènes codant pour des RCPG (Venter *et al.*, 2001). Une étude ultérieure en a identifié 950 (Takeda *et al.*, 2002). Cette deuxième méthode d'analyse repose sur le fait que la majorité des gènes codant pour les RCPG ne possèdent pas d'introns dans la région codante (Gentles et Karlin, 1999). De plus, les auteurs ont pris en compte le fait que les récepteurs de cette famille ont pour caractéristique commune une séquence en acides aminés comportant sept séquences hydrophobes correspondant aux sept domaines transmembranaires (Baldwin, 1993 ; Schertler *et al.*, 1993 ; Strader *et al.*, 1994). Ce nombre rend compte de la taille de cette famille de protéines qui est la plus vaste, la plus ubiquitaire et la plus diversifiée trouvée dans la nature, toutes classes de protéines confondues, ce qui conforte l'idée de leur importance physiologique. Ces récepteurs sont impliqués dans de nombreuses fonctions physiologiques naturelles aussi diverses et variées que la phototransduction, l'olfaction, l'immunité, la digestion. Une comparaison directe entre les RCPG humains et murins révèle un degré d'homologie très élevé : la préservation de cette famille de récepteurs au cours de l'évolution est aussi un argument allant dans le sens de leur importance pour la cellule (Vassilatis *et al.*, 2003).

Néanmoins, on a également mis en évidence leur rôle dans de nombreux processus pathologiques telles certaines maladies inflammatoires, cancers, troubles neuro-dégénératifs et cardio-vasculaires, infection virale qui peuvent être liés soit à une mutation du récepteur, soit à une surexpression ou alors à leur utilisation comme récepteur de molécules non-endogènes. C'est en partie pour toutes ces raisons que les ligands des RCPG ou les molécules qui agissent au niveau de la cascade de signalisation induite par ces récepteurs sont souvent utilisés en médecine et que ces protéines sont cibles d'un grand nombre de médicaments.

1. Familles structurales des récepteurs couplés aux protéines G

Les premiers RCPG ont été clonés dans les années 80. Les deux premiers furent le récepteur de la rhodopsine bovine (Nathans et Hogness, 1983) et le récepteur de l'adrénaline (Dixon *et al.*, 1986). Les méthodes de clonage par homologie développées ultérieurement ont permis d'identifier plusieurs centaines de nouveaux récepteurs grâce à leur caractéristique structurale commune qui consiste en la présence de sept séquences hydrophobes d'environ 20 à 25 résidus (Baldwin *et al.*, 1997) séparées par des boucles hydrophiles de taille variable. Tous les récepteurs de cette famille et ce quelle

que soit leur espèce d'origine possèdent un tel arrangement ce qui a permis d'établir un modèle consistant en un arrangement de sept domaines transmembranaires organisés en hélices α , compatible avec la carte de densité électronique à faible résolution de la rhodopsine bovine (Schertler *et al.*, 1993).

Ces récepteurs sont tous organisés de la même manière : l'extrémité amino-terminale est exposée à l'extérieur de la cellule, les sept segments transmembranaires (TMI à TMVII) sont reliés entre eux par trois boucles extracellulaires (e1, e2, e3) et trois boucles intracellulaires (i1, i2 et i3) de taille variable, pour aboutir à une extrémité carboxy-terminale située du côté cytoplasmique (figure 1).

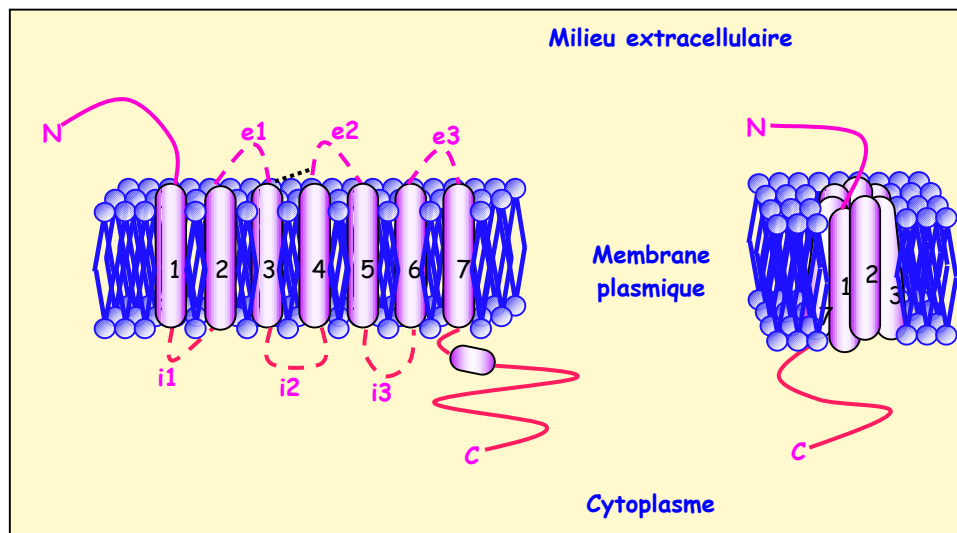


Figure 1 : Représentation schématique d'un RCPG

A gauche, représentation linéaire. A droite, représentation en tonneau sur laquelle ne sont pas schématisées les boucles extra- et intracellulaires pour plus de clarté. Les sept segments transmembranaires symbolisés par les segments violets sont reliés entre eux par trois boucles extracellulaires e1 à e3 et trois boucles intracellulaires i1 à i3. L'extrémité amino-terminale représentée en rose est extracellulaire. L'extrémité carboxy-terminale représentée en rouge est intracellulaire.

En plus de cette caractéristique structurale commune à tous les RCPG, l'analyse des séquences a permis une classification plus fine des récepteurs en six familles, dont trois principales (Probst *et al.*, 1992 ; Bockaert et Pin, 1999 ; Gether, 2000 ; Foord *et al.*, 2005). Les différences se situent principalement au niveau :

- De l'organisation de l'extrémité amino-terminale dont la longueur varie de 7 à 595 acides aminés (Ji *et al.*, 1998) et qui peut subir des modifications post-traductionnelles très variées,
- De la taille des boucles comprise entre 5 et 230 acides aminés,
- De la séquence en acides aminés, notamment la présence de résidus cystéines qui participent à l'arrangement structural des récepteurs en formant des ponts disulfures,

- De l'organisation de l'extrémité carboxy-terminale qui peut être soit totalement absente (Sealfon *et al.*, 1997) ou avoir une longueur considérable de 359 acides aminés (Ji *et al.*, 1998).

1.1. Famille 1 ou A

Elle constitue la famille majoritaire et la plus étudiée. Elle regroupe les récepteurs aux neurotransmetteurs classiques (amines biogéniques et neurotransmetteurs), aux prostaglandines et les récepteurs d'une large variété de peptides et de neuropeptides. Ce groupe contient également une multitude de récepteurs odorants et la désormais très célèbre rhodopsine. D'un point de vue phylogénétique, cette famille peut être divisée en plusieurs sous-groupes, cinq à six selon les auteurs (Bockaert et Pin, 1999 ; Gether, 2000), mais on distingue trois sous-famille dominantes :

- Le groupe 1a est constitué des récepteurs des petits ligands pour lesquels le site de liaison est constitué par une cavité formée par les segments transmembranaires.

- Le groupe 1b inclut les récepteurs des peptides dont le site de liaison implique l'extrémité amino-terminale, les boucles extracellulaires et la partie supérieure des domaines extracellulaires

- Le groupe 1c est composé par les récepteurs des hormones glycoprotéiques (hormone lutéinisante, FSH et TSH). Il est caractérisé par un grand domaine amino-terminal et un site de liaison principalement situé dans la partie amino-terminale, en contact avec les premières et troisièmes boucles extracellulaires.

Il existe également à l'intérieur de cette famille un nombre restreint de résidus conservés qui sont notamment des prolines localisées au niveau des segments transmembranaires. Il existe néanmoins un résidu hautement conservé : il s'agit d'une arginine située dans un motif Asp/Glu-Arg-Tyr (D/E-R-Y), encore appelé DRY box, situé au niveau de l'extrémité cytoplasmique du troisième segment transmembranaire. Ce motif DRY semble jouer un rôle dans la stabilité du récepteur, mais aussi dans le couplage du récepteur aux protéines G hétérotrimériques et ce en tandem avec la boucle i3 et l'extrémité carboxy-terminale (Scheer *et al.*, 1996 ; Bockaert et Pin, 1999). On retrouve également deux résidus cystéines localisés dans les boucles e1 et e3 qui forment un pont disulfure qui semble important pour la conformation du récepteur.

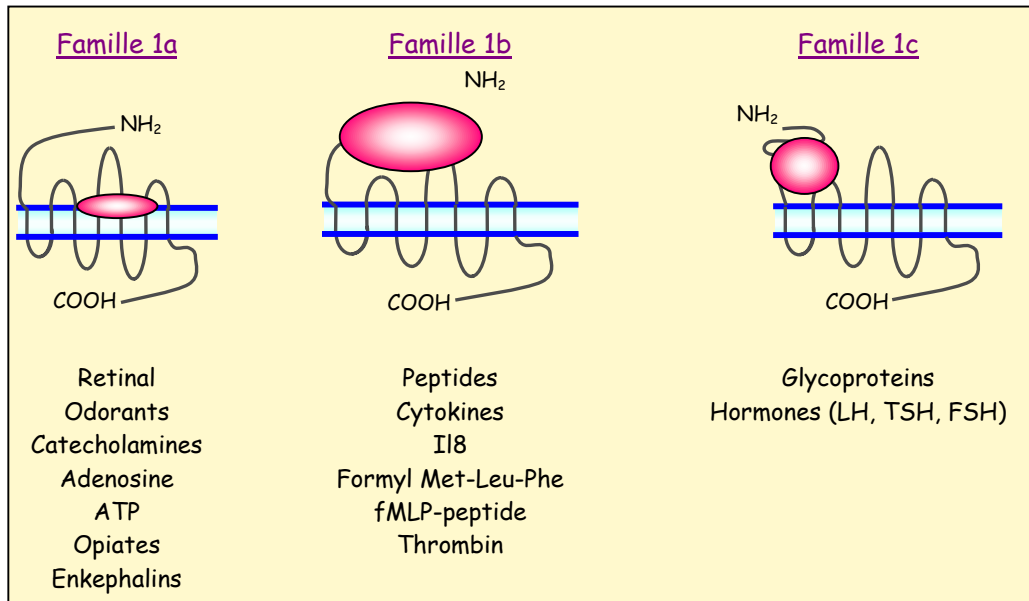


Figure 2 : Représentation schématique des trois principales sous-famille des RCPG de la famille 1. Les trois sous-familles se distinguent par le domaine de liaison des ligands qui se situe au niveau des segments transmembranaires pour les récepteurs du groupe 1a. Dans le groupe 1b, le site de liaison est formé par le domaine amino-terminal, les boucles extracellulaires et le haut des segments transmembranaires. Dans le cas du groupe 1c enfin, le site de fixation implique des acides aminés de l'extrémité amino-terminale et des boucles e1 et e3 (non visualisé sur la représentation linéaire).

(Tiré de Bockaert et Pin, 1999)

1.2. Famille 2 ou B

La deuxième famille de RCPG comprend un nombre plus restreint de récepteurs, en général ce sont des récepteurs pour des hormones peptidiques de grande taille comme le glucagon, le PACAP (Pituitary Adenyl Cyclase Activating Peptide) et le VIP (Vasoactive Intestinal Peptide). Le site de liaison implique le domaine amino-terminal qui est relativement long, la première boucle extracellulaire et le premier segment transmembranaire. Cette famille de récepteurs présente une topologie similaire à celle du groupe 1c, mais pas d'homologie de séquence. Le domaine amino-terminal contient six cystéines conservées qui forment entre elles des ponts disulfures semblant intervenir dans la liaison du ligand. Le motif DRY est absent et il existe des prolines conservées mais elles sont différentes de celles trouvées dans la famille 1.

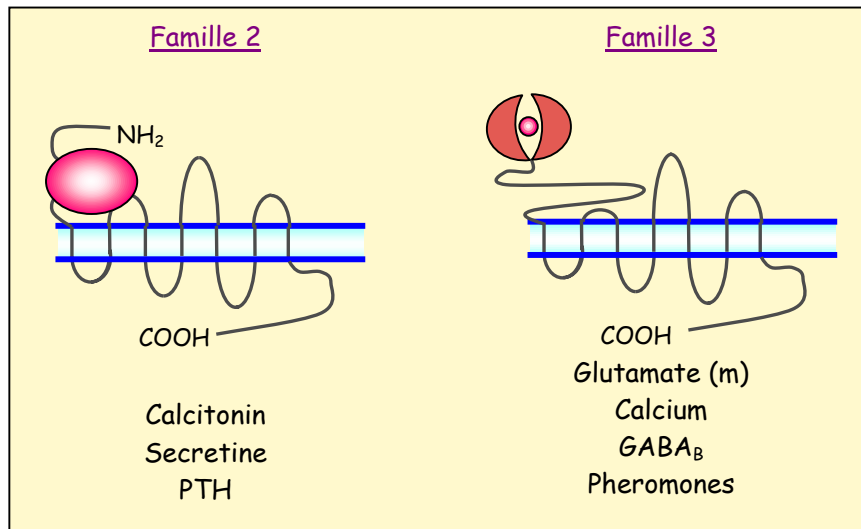


Figure 3 : Représentation schématique des RCPG de la famille 2 et de la famille 3

Les récepteurs de la famille 2 possèdent une longue extrémité amino-terminale impliquée dans la liaison du ligand et contenant plusieurs cystéines (non représentées). Le site de liaison du ligand fait aussi intervenir des résidus des boucles e1 et e3 (non visible sur la version linéaire du récepteur) ainsi que le haut des TM. Le domaine extracellulaire extrêmement long des récepteurs de la famille 3 se structure en poche pour accueillir le ligand (l'extrémité amino-terminale n'est pas représentée à l'échelle pour la simplicité du schéma). (Tiré de Bockaert et Pin, 1999)

1.3. Famille 3 ou C

Les récepteurs métabotropiques des neurotransmetteurs (récepteur métabotropique du glutamate et récepteur du GABA) et les récepteurs calciques constituent la troisième famille. Cette famille est caractérisée par un domaine extracellulaire extrêmement long pouvant atteindre 800 acides aminés, qui correspond au site de fixation du ligand. La structure tridimensionnelle de l'extrémité amino-terminale du récepteur métabotropique du glutamate a été résolue et a permis de montrer une structure en dimère (Kunishima *et al.*, 2000). Ce domaine a la possibilité de s'organiser en trois conformations, deux conformations libres I et II et une forme complexée avec le ligand.

Hormis la présence du ligand, la conformation de la forme libre II est équivalente à celle de la forme complexée, alors qu'elle est totalement différente de la forme libre I. Chaque monomère se divise en deux domaines reliés par trois boucles courtes. Les monomères sont reliés par un pont disulfure pour former un dimère à l'interface duquel se trouve une hélice. La conformation des domaines des monomères entre eux contrôle l'activité du récepteur (Kunishima *et al.*, 2000 ; Parmentier *et al.*, 2002 ; Jingami *et al.*, 2003).

(Pour revue Pin *et al.*, 2003)

Figure 4 : Structure cristallographique du domaine extracellulaire du récepteur mGlu1 dans sa forme complexée et dans sa forme libre
(Tiré de Kunishima *et al.*, 2000)

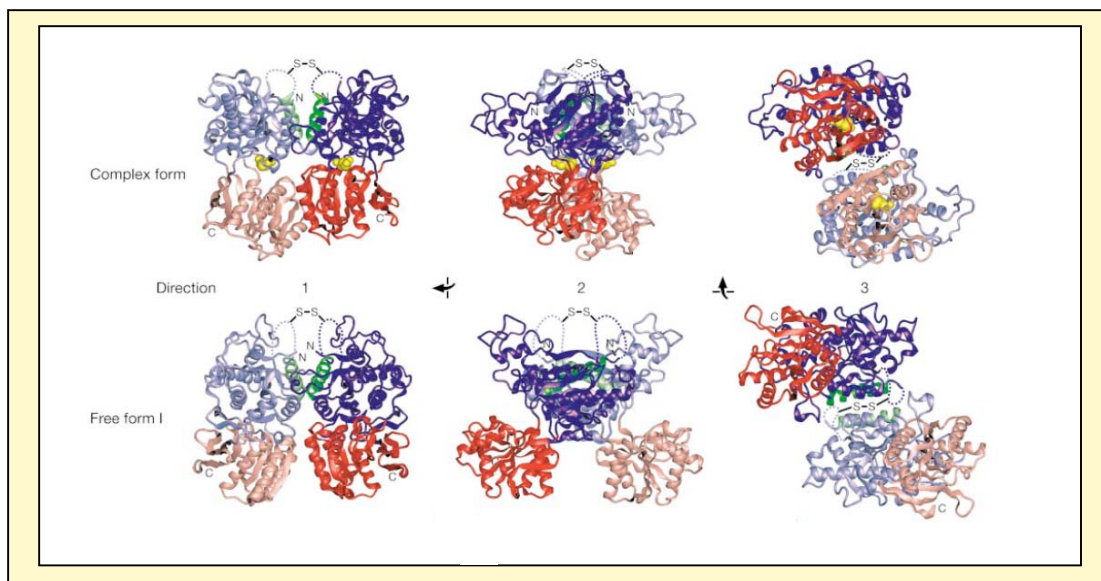


Figure 4A : Trois vues orthogonales de la structure en dimère du domaine de liaison du récepteur mGlu.

La ligne du haut correspond à la structure du domaine dans sa forme complexée (complex form). La ligne du bas correspond à la forme libre I (free form I).

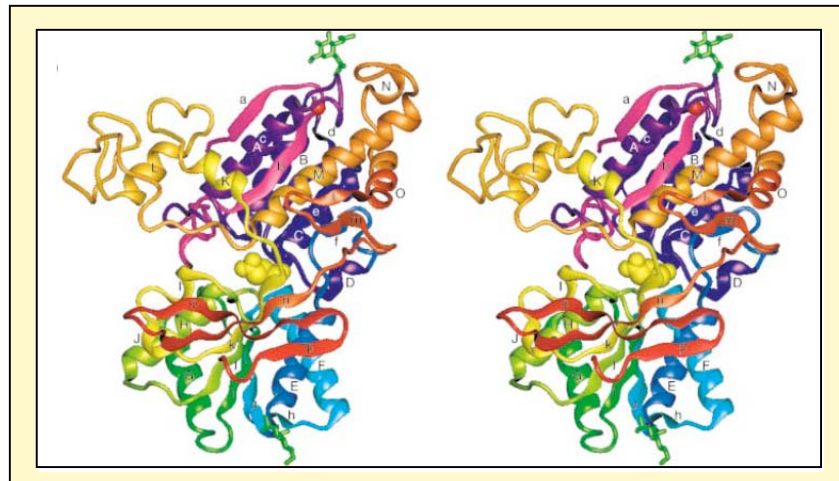


Figure 4B : Vue stéréo de la structure tridimensionnelle de la forme complexée

Le modèle en ruban est coloré selon les couleurs de l'arc-en-ciel afin de repérer les extrémités N-ter et C-ter en allant respectivement du violet au rouge. Les sucres sont représentés en vert et l'ion métallique lié par une sphère rouge. Le glutamate est symbolisé par les sphères jaunes.

1.4. Autres familles

Les trois dernières familles sont composées de récepteurs absents chez les mammifères. La famille 4 est constituée par les récepteurs des phéromones de levures. La famille 5 inclut les récepteurs Frizzled et Smoothened impliqués dans le développement de la drosophile, en particulier la polarité cellulaire et la segmentation. Enfin la dernière famille 6, qui est minoritaire, comporte uniquement quatre récepteurs à l'AMPc observés chez l'amibe *Dictyostelium discoideum* (Klein *et al.*, 1988 ; Raisley *et al.*, 2004).
(pour revue Fredriksson *et al.*, 2003).

2. Les voies de signalisation des RCPG

2.1. Les protéines G hétérotrimériques

Hormis les éléments structurels, une autre caractéristique commune à cette famille de récepteurs est que l'initiation de la cascade de signalisation se produit en réponse à l'interaction avec les protéines G hétérotrimériques. La liaison du ligand induit des changements conformationnels au niveau de la poche formée par les sept domaines transmembranaires. Ce remodelage de la structure du récepteur permet son interaction avec les protéines G. Ce sont donc les protéines G qui assurent la transduction de l'activation d'un récepteur par un agoniste, c'est-à-dire le couplage du récepteur à un effecteur pour aboutir à une réponse cellulaire particulière.

La transduction d'un signal par le système RCPG/protéine G/effecteur s'accompagne d'un processus d'amplification du message. L'activation de l'effecteur se traduit par la synthèse de nombreuses molécules de seconds messagers dont chacun ira à son tour activer d'autres protéines.
(pour revue Hermans, 2003 ; Robishaw et Berlot, 2004).

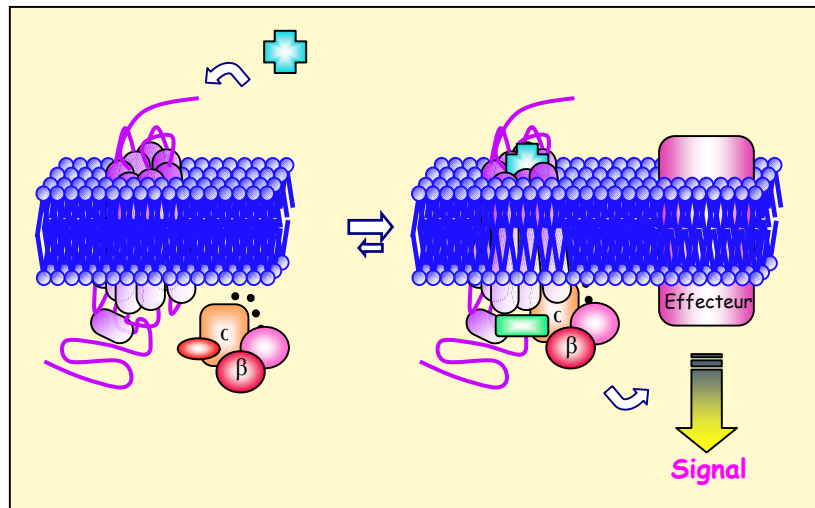


Figure 5 : La triade « RCPG-Protéine G-Effacteur »

La liaison du ligand sur le récepteur entraîne son couplage à une protéine G hétérotrimérique qui assure ensuite la transduction du signal en envoyant un message à un effecteur qui peut être une enzyme ou un canal ionique pour aboutir à une réponse cellulaire.

2.1.1. Le cycle fonctionnel des protéines G

Toutes les protéines G sont formées de l'association d'une sous-unité α avec un complexe β/γ .

Le transfert d'information entre le récepteur activé par l'agoniste et l'effecteur passe par des cycles d'activation et d'inactivation de la protéine G. Lorsque le site est occupé par du GDP (figure 5, à gauche, ovale rouge), les sous-unités α , β et γ sont associées, ce qui constitue la forme inactive de la protéine G. L'activation du récepteur par un agoniste entraîne une diminution de l'affinité de la sous-unité α pour le GDP et favorise l'échange d'une molécule de GDP contre une molécule de GTP (figure 5, à droite, rectangle vert) au niveau du site actif de la sous-unité α . Pendant un état intermédiaire, la sous-unité α n'est plus liée à un nucléotide. Cet état est transitoire puisque dans les cellules, la forte concentration de GTP (10^{-4} M) va favoriser sa liaison. La liaison du GTP induit une dissociation de l'hétérotrimère, ce qui permet à la sous-unité α mais aussi au complexe β/γ d'interagir avec des effecteurs. L'activité GTPasique intrinsèque de la sous-unité α induit une hydrolyse du GTP en GDP, permettant ainsi un retour à l'état initial, c'est-à-dire une conformation inactive présentant une affinité élevée pour le complexe β/γ .

Plusieurs études ont montré que le site d'interaction entre le récepteur et la protéine G implique des régions intracellulaires proches de la membrane, en particulier les boucles intracellulaires i2 et i3, ainsi que l'extrémité carboxy-terminale du récepteur, mais jusqu'alors aucune séquence consensus d'interaction entre le récepteur et la protéine G n'a été identifiée (Wess, 1997 ; Gether, 2000).

2.1.2. Diversité des sous-unités α et classification des protéines G

La complexité et la spécificité de la signalisation induite par les RCPG repose sur la grande variété de protéines G. Une quarantaine de sous-unités ont été clonées :

- 23 sous-unités α de 39 à 46 kDa codées par 17 gènes (Gudermann *et al.*, 1997) et classées en quatre familles ($G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_s$, $G\alpha_{q/11}$ et $G\alpha_{12}$),
- 6 sous-unités β de 35 à 37 kDa et 12 sous-unités γ de 6 à 8 kDa (Gudermann *et al.*, 1997).

Une grande variété d'effecteurs a été identifiée comme le montre le tableau 1.

Même si toutes les combinaisons ne sont pas retrouvées dans la nature, le nombre théorique d'associations en trimères entre les différentes sous-unités contribue à la diversité et à la spécificité des signaux activés par les RCPG.

	PROTEINES G	EFFECTEURS
α_s	$\alpha_{ST1}, \alpha_{ST2}, \alpha_{SS2}, \alpha_{SS1}, \alpha_{OF}$	Adénylate cyclase (+)
	$\alpha_{i1}, \alpha_{i2}, \alpha_{i3}$	Adénylate cyclase (-) Canaux Cl^- et K^+ (+) Phospholipases C et A2 (+)
$\alpha_{i/o}$	$\alpha_{t1}, \alpha_{t2}, \alpha_{Gus}$	cGMP-PDE (+)
	α_{o1}, α_{o2}	Canaux Ca^{++} voltage dépendant (-) Canaux K^+ (+)
	α_Z	Adénylate cyclase (-)
$\alpha_{q, 11}$	$\alpha_q, \alpha_{11}, \alpha_{14}, \alpha_{15}, \alpha_{16}$	Phospholipase C (+)
$\alpha_{12,13}$	α_{12}, α_{13}	Phospholipase A2 (+) c-Jun kinase (+) Canaux Ca^{++} (L) (+)
	β_1 à β_6 γ_1 à γ_{12}	Phospholipases C et A2 (+) Adénylate cyclase I (-), II et IV (+) GIRK (+) Canaux Ca^{++} (N, P, Q) (-) MAPK (+) Canaux Na^+ (+) Kinases c-Jun kinase PI_3 -kinase (+) PKC et PKD (+)

Tableau 1 : Principales sous-unités des protéines G et leurs effecteurs primaires
Les sous-unités sont classées par homologie de séquences.

Dans le cas des effecteurs, (+) signifie une stimulation de l'activité et (-) une inhibition.

2.1.2.1. Les sous-unités α des protéines G

Les protéines G se distinguent les unes des autres par leurs sous-unités α qui leur confèrent leur spécificité. La sous-unité α joue un rôle déterminant dans le couplage du récepteur à l'effecteur, chaque type de sous-unité interagissant spécifiquement avec un groupe de récepteurs et activant un effecteur donné. Les techniques de biologie moléculaire ont conduit à l'identification de plusieurs sous-unités α et ont permis de proposer, sur la base de leur homologie de séquence quatre groupes de protéines G :

- Les protéines G de la famille G_s stimulent l'adénylate cyclase qui catalyse la conversion de l'ATP cytoplasmique en AMPc. Les sous-unités α_s , α_t , et α_{olf} sont inhibées par la toxine cholérique par un mécanisme d'ADP-ribosylation de l'arginine 201 de la protéine G , conduisant à une inhibition de l'activité GTPase de la protéine.

- Les protéines de la famille G_i comportent les sous-unités α_i , α_o et α_t . Toutes ces protéines inhibent l'adénylate cyclase, d'où une diminution de l'AMPc intracellulaire et sont ADP-ribosylables par la toxine pertussique sur un résidu cystéine de l'extrémité carboxy-terminale, ce qui conduit à un découplage du récepteur.

- Les protéines de la famille G_q comportent notamment les protéines α_q et α_{11} qui stimulent la phospholipase C- β d'où une hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-diphosphate (PIP₂) en inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) et diacylglycérol (DAG). L'IP₃ va diffuser à travers le cytoplasme et provoquer la libération du calcium à partir des stocks intracellulaires.

- Les protéines de la famille G_{12} et G_{13} activent les facteurs d'échange GTP associés à la protéine Rho.

2.1.2.2. Les sous-unités β/γ des protéines G

Elles sont fortement associées en un complexe que seul un détergent peut dissocier (Clapham et Neer, 1997). Elles forment ensemble une unité fonctionnelle capable de réguler de nombreuses protéines effectrices comme l'adénylate cyclase (Federman *et al.*, 1992), la phospholipase C (Katz *et al.*, 1992), la phospholipase A2 (Kim *et al.*, 1989), les canaux ioniques potassiques ou calciques (Kim *et al.*, 1989 ; Ikeda, 1996 ; Medina *et al.*, 2000), ainsi que les protéines de la famille Src (Luttrell *et al.*, 1997). La sous-unité β interagit avec la sous-unité α tandis que la sous-unité γ détermine la spécificité de l'effecteur et aurait un rôle dans l'interaction avec le récepteur (Hou *et al.*, 2000).

2.1.3. Structure cristallographique des protéines G

Quelques structures de protéines G sont désormais connues (Noel *et al.*, 1993 ; Benjamin *et al.*, 1995 ; Lambright *et al.*, 1996 ; Sondek *et al.*, 1996 ; Sunahara *et al.*, 1997) et ont permis de montrer que la sous-unité α est constituée de deux domaines :

- Un domaine GTPase formé de six brins β entourés de six hélices α .
- Un domaine en hélice α , formé d'une longue hélice α centrale et de cinq petites hélices.

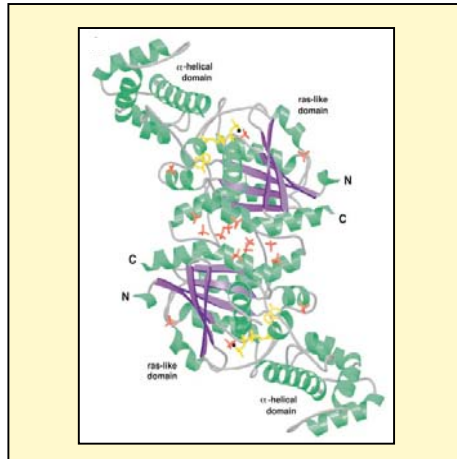


Figure 6 : Structure tridimensionnelle d'une sous-unité α de protéine G hétérotrimérique. On observe un dimère de $G\alpha_s.GTP\gamma S$ (analogue non hydrolysable du GTP) dans l'unité asymétrique des cristaux. Les 16 anions phosphates sont représentés en rouge. La molécule de $GTP\gamma S$ est représentée en jaune. Les hélices α sont représentées en vert, les brins β en violet et les boucles en gris.
(Extrait de Sunahara *et al.*, 1997)

La sous-unité β se replie en brins hautement symétriques (« β propeller »), tandis que la sous-unité γ est formée d'une hélice α en interaction avec l'extrémité aminotermine de la sous-unité β . Il semblerait que cette forte interaction hélice-hélice entre les sous-unités soit à l'origine de leur indissociabilité.

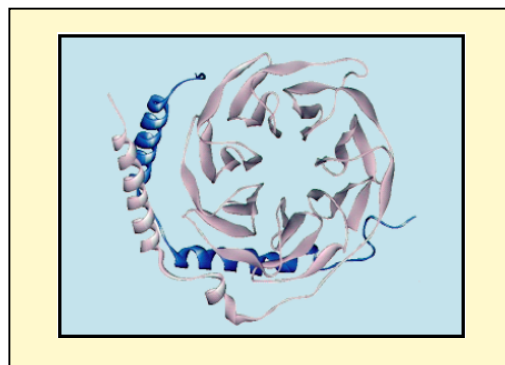


Figure 7 : Structure tridimensionnelle du dimère $G\beta\gamma$ d'une protéine G hétérotrimérique. En gris est représentée la structure en brins β de la sous-unité β , en bleu la structure en hélice de la sous-unité γ .
(Extrait de Sondek *et al.*, 1996)

2.2. Régulation de l'activation des récepteurs couplés aux protéines G

L'activité des récepteurs couplés aux protéines G repose sur un équilibre entre différents mécanismes complexes qui gouvernent la signalisation du récepteur et l'arrêt de la réponse. Il n'est pas surprenant que les mécanismes impliqués dans l'arrêt de la réponse soient hautement complexes quand on sait que la signalisation induite par les RCPG est essentielle aux fonctions cellulaires.

2.2.1. Les protéines RGS

Le signal intracellulaire peut être limité par l'arrêt de la présence du ligand extracellulaire ainsi que par la modulation de l'activité GTPase de la sous-unité α par d'autres protéines que le récepteur.

L'hydrolyse du GTP en GDP est un processus régulé par les protéines RGS (Regulator of G protein Signaling) qui servent à moduler le signal déclenché par la liaison de l'agoniste sur son récepteur. Les RGS jouent le rôle de GAPs (GTPase Activating Proteins). Les RGS ne possèdent pas d'activité GTPasique, mais elles réduisent le signal transmis par $G\alpha$ liée au GTP (activée par le récepteur) en stabilisant l'état transitoire ce qui facilite l'hydrolyse du GTP d'un facteur 100 à 1000. La protéine G retourne alors dans son état inactif liée au GDP. Puisqu'elles facilitent la réassociation de $G\alpha$ et de $G\beta\gamma$, on considère que les RGS inhibent aussi indirectement la signalisation par le dimère $G\beta\gamma$.

La famille des RGS comprend plus de 30 membres, dont les tailles varient de 17 à 160 kDa et qui peuvent être soit membranaires soit cytosoliques. La signature des protéines de cette famille consiste en un domaine RGS de 120 résidus qui se lie à la sous-unité $G\alpha$ et qui est responsable de la fonction GAP. On distingue deux classes de RGS : les petites protéines RGS (160 à 217 résidus) qui ne possèdent que le domaine RGS suivi de courtes extrémités amino et carboxy terminales ; les grandes protéines RGS (372 à 1387 résidus) contiennent des motifs additionnels qui établissent des liens entre les protéines G hétérotrimériques et d'autres voies de signalisation. Globalement leur rôle est de permettre la réassociation de l'hétérotrimère en fin de cycle.

(pour revue Chasse et Dohlman, 2003 ; McCudden *et al.*, 2005).

Cependant, dans le but de moduler l'amplitude et la durée du signal dans des contextes cellulaires divers, d'autres mécanismes peuvent être utilisés pour réguler les cascades de signalisation au niveau des RCPG.

2.2.2. Désensibilisation et régulation négative

La signalisation d'un RCPG peut être atténuée rapidement (cinétique de l'ordre de quelques secondes à la minute) par deux mécanismes : la désensibilisation homologue,

impliquant des kinases spécifiques des RCPG et la désensibilisation hétérologue qui fait intervenir des kinases activées par les seconds messagers.

Des diminutions plus importantes de la sensibilité des RCPG peuvent également être dues à une diminution du nombre de récepteurs dans le cas de la régulation négative, cette diminution étant liée à réduction de la synthèse protéique et de la quantité d'ARNm ainsi qu'à une dégradation lysosomiale des récepteurs existants. Ces événements se produisent selon une échelle de temps variable allant de la seconde pour la phosphorylation à la minute pour l'endocytose voire l'heure pour observer une diminution du nombre de récepteurs (Ferguson, 2001).

L'intensité de la désensibilisation varie d'une atténuation de l'efficacité de l'agoniste et donc de la réponse maximale (par exemple dans le cas du récepteur β 2-adrénergique) à une extinction complète du signal (dans le cas des récepteurs visuels et olfactifs). (pour revue Lefkowitz, 1998 ; Perez et Karnik, 2005).

2.2.2.1. La désensibilisation homologue

Après une activation aiguë par un agoniste, le récepteur adopte une conformation permettant l'exposition de séquences consensus favorisant le recrutement et la liaison de kinases qui vont phosphoryler le récepteur.

La phosphorylation est un phénomène très important dans le processus de désensibilisation des RCPG. Elle se produit au niveau des résidus sérine et thréonine situés sur les boucles intracellulaires ou au niveau de l'extrémité carboxy-terminale. Les enzymes impliquées dans ces processus de phosphorylation sont soit des GRKs (G protein Receptor Kinases) ou par des kinases activées par des seconds messagers comme l'AMPc dans le cas de la PKA ou le DAG et le calcium dans le cas de la PKC (pour revue Vazquez-Prado *et al.*, 2003).

Dans le cas de la désensibilisation homologue, la phosphorylation se fait par des kinases spécifiques de la famille des RCPG, les GRKs. La famille des GRKs est composée de sept membres qui présentent de fortes homologies de séquence et qui appartiennent à la famille des sérines/thréonines kinases. Elles possèdent toutes un domaine catalytique central et une extrémité amino-terminale importante pour la reconnaissance des RCPG contenant un domaine RGS. L'extrémité carboxy-terminale est impliquée dans des interactions protéine-protéine et dans l'adressage des kinases vers la membrane et les récepteurs.

Fonctionnellement les GRKs présentent trois caractéristiques :

- Elles phosphorylent préférentiellement les récepteurs en conformation active occupé par leur agoniste plutôt que les récepteurs inactifs ou liés à un antagoniste.
- L'interaction avec les récepteurs augmente leur activité.
- La phosphorylation des RCPG fait intervenir des mécanismes régulateurs impliqués dans l'adressage de ces enzymes vers les récepteurs et la membrane (Pitcher *et al.*, 1998).

Les GRKs induisent une désensibilisation homologue spécifique de l'agoniste, puisque seuls les récepteurs activés par un agoniste sont susceptibles d'être phosphorylés par les GRKs. Elles phosphorylent le récepteur au niveau des boucles intracellulaires i2 et i3 et de l'extrémité carboxy-terminale (Lefkowitz, 1998). La phosphorylation du récepteur par une GRK permet la liaison d'une arrestine sur le récepteur, qui masque ainsi les séquences d'interaction avec les sous-unités α des protéines G hétérotrimériques ce qui a pour conséquence d'inhiber stériquement l'interaction entre le récepteur et la protéine G, d'où le découplage exposé dans le cas de la désensibilisation homologue (Ferguson, 2001).

La phosphorylation des récepteurs par les GRKs est un phénomène très rapide dont la cinétique peut varier de la milliseconde à la seconde, au point qu'il est impossible de détecter une modification du nombre de récepteurs à la surface de la cellule (Freedman *et al.*, 1997 ; Pitcher *et al.*, 1998 ; Penela *et al.*, 2003 ; Willets *et al.*, 2003).

2.2.2.2. La désensibilisation hétérologue

On distingue la désensibilisation dite homologue, induite par la liaison de l'agoniste de la désensibilisation hétérologue qui est elle indépendante d'un ligand spécifique mais provoquée par l'activation d'un autre récepteur sur la même cellule. Ce phénomène est lié au fait que les kinases dépendantes des seconds messagers vont phosphoryler non seulement les récepteurs activés par les agonistes mais aussi les récepteurs n'ayant pas été stimulés préalablement par un ligand.

Les protéines kinases activées par les seconds messagers sont ici responsables de la phosphorylation du récepteur. La PKA et la PKC sont des phosphotransférases qui catalysent le transfert d'un groupement phosphate de l'ATP vers les résidus sérine et thréonine présents au niveau des séquences consensus des boucles intracellulaires et de l'extrémité carboxy-terminale. De façon simplifiée et pour ce qui nous intéresse, la PKA est activée par l'AMPc la PKC est activée par le calcium et le DAG.

D'un point de vue moléculaire, le processus est équivalent à celui médié par les GRKs puisque ce sont les groupements phosphates qui favorisent le découplage du récepteur

de la protéine *G* par un encombrement stérique, ainsi que le recrutement des arrestines conduisant ainsi à l'internalisation du récepteur afin d'interrompre le signal et de ne plus l'alimenter. Ce mécanisme est prédominant dans le cas des faibles concentrations en agonistes (Ferguson, 2001).

2.2.2.3. La régulation négative

La régulation négative, appelée par les anglophones la « down-regulation » intervient après une stimulation prolongée et répétée du récepteur pour protéger la cellule des effets délétères liés à une suractivation du récepteur (Tsao *et al.*, 2001). Elle résulte :

- Soit d'une diminution au niveau de la synthèse protéique : baisse de l'activité transcriptionnelle, ou de la synthèse d'ARN messenger.
- Soit d'une augmentation de la dégradation secondaire du récepteur aboutissant à son internalisation par les mécanismes d'endocytose ou de séquestration
- Soit d'une intensification des processus de dégradation du récepteur *via* les lysosomes.

Dans le cas de la régulation négative, on observe donc une diminution du nombre de récepteurs présents à la surface de la cellule.

2.2.3. Mécanismes moléculaires de la régulation de la réponse

2.2.3.1. Les arrestines

L'interaction de l'arrestine avec un RCPG permet de découpler physiquement ce dernier de la protéine *G*. Les arrestines se lient préférentiellement à un récepteur phosphorylé par une GRK (Ferguson, 2001).

Les arrestines forment une famille de protéines homologues et similaires structurellement. On connaît quatre types d'arrestines :

- L'arrestine visuelle, ou arrestine-1, est exclusivement exprimée dans la rétine où elle éteint le signal médié par la rhodopsine activée en dissociant la rhodopsine de sa protéine *G* spécifique, la transducine, mais n'intervient pas dans le processus d'internalisation (Dolph *et al.*, 1993 ; Goodman *et al.*, 1996).

- Les β -arrestines 1 et 2 (appelées aussi arrestines 2 et 3, respectivement), qui sont impliquées dans la désensibilisation des RCPG, sont ubiquitaires. Elles découplent le récepteur de la protéine *G* et interviennent dans la translocation des récepteurs vers les puits recouverts de clathrine. Au repos, la β -arrestine 2 est activement exclue du noyau alors que la β -arrestine 1 a une distribution à la fois cytosolique et nucléaire (Oakley *et al.*, 2000).

- La « cone arrestin » ou arrestine 4 est localisée principalement dans les cônes responsables de la vision de jour et dans une sous-population de neurones de la glande pinéale (Craft *et al.*, 1994).

Pour se lier à de multiples types de RCPG et empêcher leur signalisation, les arrestines sont capables de reconnaître divers domaines et conformations des récepteurs. Avant leur recrutement par les RCPG, les β -arrestines sont distribuées de manière diffuse dans le cytoplasme (Goodman *et al.*, 1996 ; Luttrell *et al.*, 1997). L'activation du récepteur se traduit par la translocation des arrestines du cytoplasme vers la membrane et par leur liaison au récepteur.

Si le rôle fonctionnel le plus ancien connu pour les arrestines est celui du découplage entre récepteur activé et protéine *G*, on a également découvert un rôle de médiateur dans les processus d'internalisation des récepteurs par les puits recouverts de clathrine (Prossnitz, 2004). Les arrestines ont également été impliquées dans de nombreux processus cellulaires (pour revue Lefkowitz et Shenoy, 2005).

2.2.3.2. La voie des vésicules à clathrine

Le mécanisme d'internalisation des récepteurs à sept domaines transmembranaires le mieux caractérisé est l'internalisation dépendante de la β -arrestine qui a lieu par la voie des vésicules recouvertes de clathrine. Les β -arrestines sont impliquées dans ce processus à la fois en interagissant avec le récepteur occupé par un agoniste et avec les éléments de la machinerie des vésicules recouvertes de clathrine.

Même si la phosphorylation de certains RCPG semble être une condition nécessaire à leur internalisation (Chen *et al.*, 2004b ; Krasel *et al.*, 2005), certains exemples tendent à montrer que la phosphorylation notamment par les GRKs n'est pas indispensable à l'internalisation de tous les récepteurs (Rasmussen *et al.*, 2004). La phosphorylation stabiliserait un état conformationnel nécessaire pour promouvoir l'interaction du récepteur avec d'autres éléments cellulaires impliqués dans l'endocytose comme l'arrestine qui sert de protéine adaptatrice en dirigeant le récepteur vers les puits recouverts de clathrine (Ferguson, 2001). Les β -arrestines interagissent avec les chaînes lourdes de la clathrine, et avec la sous-unité adaptatrice du complexe AP-2 (Adaptator Protein 2). Les récepteurs couplés aux protéines *G* n'ont pas de séquence cytoplasmique reconnue directement par AP-2. Ce sont les β -arrestines qui permettent la liaison non seulement aux molécules de clathrine mais aussi au complexe adaptateur AP-2 (Goodman *et al.*, 1996 ; Laporte *et al.*, 2000 ; Laporte *et al.*, 2002).

Cette interaction coordonnée entre la β -arrestine, la clathrine et AP-2, ainsi qu'avec les phosphoinositides du feuillet interne de la membrane cellulaire conduit à l'adressage du RCPG vers les puits recouverts de clathrine de la membrane. Les protéines

adaptatrices AP-2 reconnaissent un motif dans le domaine cytosolique des protéines membranaires et recrutent les molécules de clathrine au niveau de la face cytoplasmique de la membrane ce qui permet l'assemblage du manteau de clathrine. La dynamine permet par son activité GTPasique intrinsèque l'hydrolyse du GTP et la scission de la vésicule.

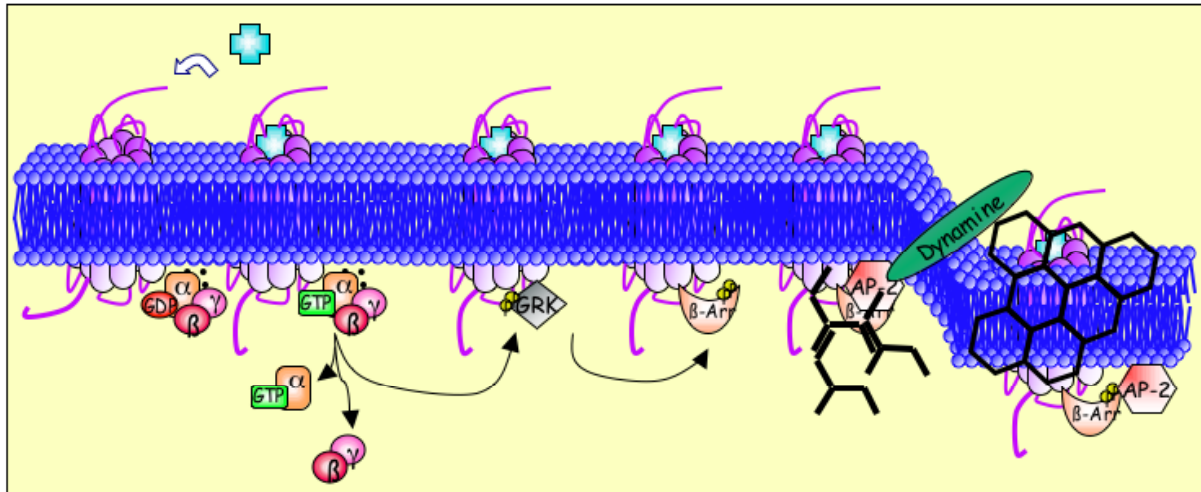


Figure 8 : Représentation schématique des évènements conduisant à l'internalisation des RCPG par la voie des puits recouverts de clathrine

En réponse à la liaison d'un ligand sur le récepteur, la protéine G activée recrute les GRKs. Suite à la phosphorylation induite par les GRKs, il y a liaison de la β -arrestine sur le récepteur, puis recrutement du complexe adaptateur AP-2 et de molécules de clathrine. La scission de la vésicule ainsi formée est régulée par l'activité de la dynamine. La vésicule formée est soit dégradée soit recyclée.

(D'après Claing *et al.*, 2002).

L'internalisation du récepteur permet soit une resensibilisation en déphosphorylant le récepteur au niveau des endosomes grâce à des phosphatases associées à la face cytoplasmique puis un recyclage (désensibilisation); soit une dégradation dans les lysosomes (régulation négative).

2.2.3.3. Internalisation par la voie des cavéoles

Les cavéoles sont définies comme des microdomaines membranaires résistants à la solubilisation par des détergents agressifs, invaginés de 60 à 80 nm de diamètre, sans clathrine, enrichis en cholestérol libre, en sphingolipides et contenant une protéine de structure la cavéoline (Fielding et Fielding, 2000). Les cavéolines serviraient d'éléments de structure et d'attachement pour d'autres protéines afin de créer de vrais centres de signalisation (Fielding et Fielding, 2000). L'internalisation par la voie des cavéoles est indépendante de la clathrine et des arrestines, mais dépendante de la dynamine (Okamoto *et al.*, 2000). Au cours de l'internalisation, la dynamine se localise au niveau du cou de la vésicule formée à partir des cavéoles et son activation nécessite l'hydrolyse du

GTP (Oh *et al.*, 1998). Il semblerait que ce soit une interaction directe entre les récepteurs et la cavéoline qui dirigerait l'internalisation du récepteur par les cavéoles (Gines *et al.*, 2001). Le processus d'internalisation par la voie des cavéoles implique aussi des tyrosine kinases et la présence de filaments d'actine (Fuki *et al.*, 2000).

Le cholestérol semble jouer un rôle fondamental dans ce processus d'internalisation puisque la déplétion des membranes en cholestérol abolit à la fois l'internalisation des récepteurs par la voie des cavéoles mais aussi par les voies des puits recouverts de clathrine (Ikonen, 2001).

Les protéines internalisées par la voie des cavéoles peuvent être recyclées vers la membrane ou adressées aux lysosomes (Okamoto *et al.*, 2000).

Plusieurs équipes ont mis en évidence des processus d'internalisation de RCPG par la voie des cavéoles (Barnett-Norris *et al.*, 2005) : récepteur β 2-adrénergique (Couet *et al.*, 1997), Edg1 (Kohno *et al.*, 2002), kinine de type 1 (Sabourin *et al.*, 2002), récepteur dopaminergique D1 (Yu *et al.*, 2004), récepteur sérotoninergique 5-HT_{2A} (Bhatnagar *et al.*, 2004).

Néanmoins, les rafts, enrichis en cholestérol et en sphingolipides, forment eux aussi des microdomaines organisés dans la membrane plasmique (Schlegel et Lisanti, 2001). Des études de microscopie électronique ont montré une localisation dans les rafts de certains RCPG après leur stimulation, comme par exemple le récepteur de l'angiotensine ATII-1 (Wyse *et al.*, 2003). Très récemment, il a été montré que le récepteur β -adrénergique internalisait *via* les rafts (Allen *et al.*, 2005).

Actuellement les mécanismes conduisant les récepteurs dans de tels microdomaines ne sont pas connus et les techniques utilisées ne permettent pas toujours de conclure définitivement à cette localisation particulière des récepteurs dans ces microdomaines. (pour revue Kirkham et Parton, 2005).

2.3. Voies de signalisation ne faisant pas intervenir les protéines G hétérotrimériques

Outre leurs rôles classiques connus, de plus en plus d'études portent sur la signalisation des RCPG soit à plus long terme, soit après leur internalisation qui n'est pas synonyme de fin de transduction du signal.

Ces mécanismes sont très difficiles à mettre en évidence dans la mesure où il existe une large variété de récepteurs exprimés dans un même tissu. Il résulte de cette co-expression une réponse cellulaire extrêmement complexe, ce qui rend très difficile l'étude de la voie de signalisation liée à un seul récepteur. Ces voies de signalisation sont donc étudiées en exprimant indépendamment chaque récepteur dans un système d'expression hétérologue, approche largement critiquée puisque le récepteur est sorti

de son contexte naturel. En effet, on peut facilement imaginer que la réponse est dépendante du tissu et du taux d'expression des protéines impliquées dans la signalisation, et de la stoechiométrie des différents partenaires ce qu'il est impossible de reproduire en système d'expression hétérologue. Néanmoins, cette approche, même si elle est contestée reste la meilleure pour mettre en évidence de telles voies de signalisation.

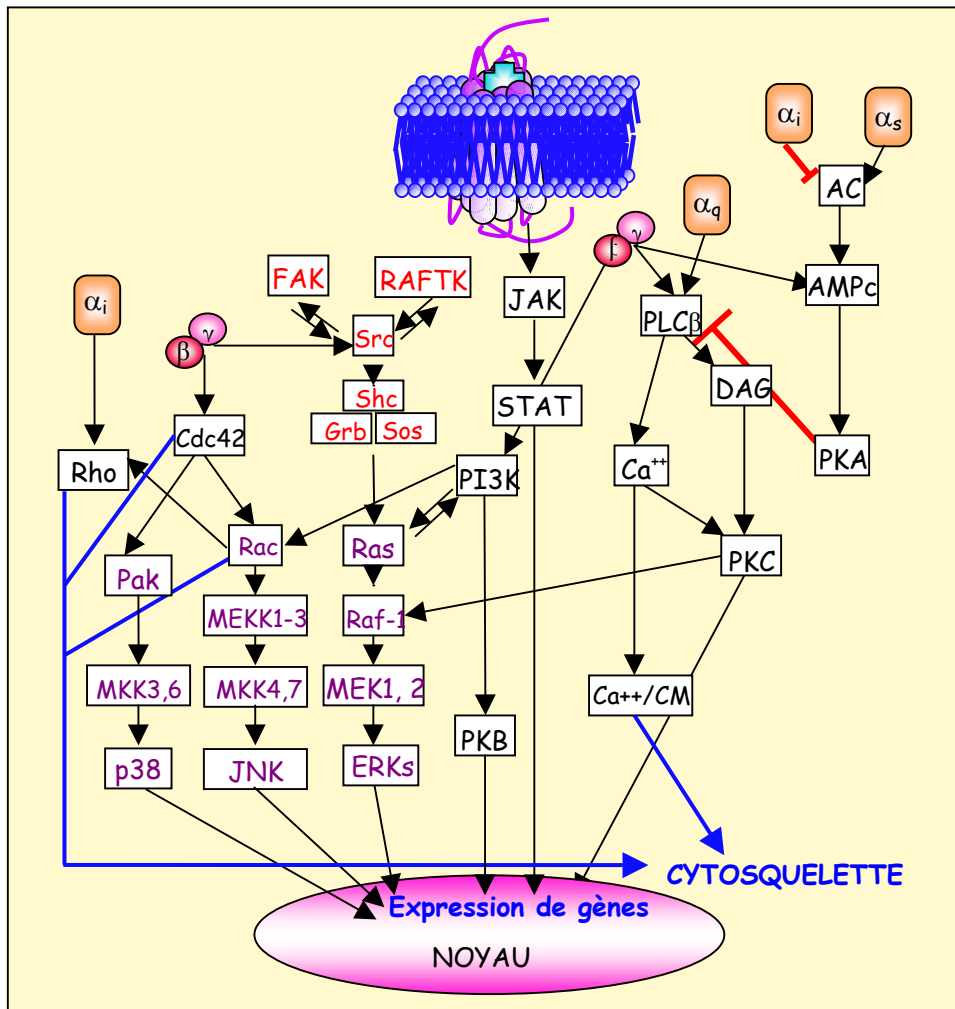


Figure 9 : Voies de signalisation induites par les RCPG

Abréviations : JAK : Janus kinase ; STAT : protéines Stat (Stat = signal transducer and activator of transcription ; AC : Adénylate Cyclase ; PKA : Protéine Kinase A ; PLC : PhosphoLipase C ; DAG : DiAcylGlycérol ; CM : CalModuline ; PI3K : PhosphoInositide 3-Kinase ; PKC : Protéine Kinase C ; PKB : Protéine Kinase B ; FAK : Focal Adhesion Kinase p125 ; RAFTK : Related Focal Adhesion Kinases ; Shc et Grb2 : molécules adaptatrices ; Sos (Son Of Sevenless) : guanosine exchange factor for Ras ; Src : tyrosine kinases ; MEKK : MEK kinase ; MEK : MAPkinase ; ERK : Extracellular Regulated Kinase ; JNK : c-Jun NH₂ terminal kinase.

(Tiré de Stantchev et Broder, 2001)

2.3.1. Activation des différentes voies MAPK

Les RCPG ont la capacité d'interagir avec d'autres protéines que les protéines G hétérotrimériques et sont capables de produire de nombreux signaux qui régulent la

différenciation et la croissance cellulaire, incluant la stimulation des GTPases de la famille Ras et l'activation de la cascade des MAP kinases (Dikic et Blaukat, 1999). Les mécanismes utilisés par les RCPG pour réguler l'activité des MAPKs diffèrent selon le récepteur et le type de cellule mais font intervenir quatre grands mécanismes que je ne détaillerai pas ici :

- Mécanisme déclenché par les protéines kinases A et C (Gutkind, 1998)
- Mécanisme déclenché par les β -arrestines (Luttrell *et al.*, 1997)
- Mécanisme de transactivation des récepteurs à tyrosine kinases (Lowes *et al.*, 2002 ; Piiper et Zeuzem, 2004)
- Mécanisme déclenché par interaction directe avec le récepteur (Guillet-Deniau *et al.*, 1997)

2.3.2. Autres voies de signalisation

On trouve dans la littérature de plus en plus d'études qui montrent que les boucles extracellulaires et le domaine carboxy-terminal des RCPG présentent des motifs structuraux caractéristiques des interactions protéine/protéine.

Selon toute vraisemblance, ces protéines qui se lient directement aux RCPG semblent participer à l'assemblage et à la cohésion d'un véritable échafaudage protéique fonctionnel autour du récepteur (Brzostowski et Kimmel, 2001 ; Milligan et White, 2001).

L'engouement observé depuis une vingtaine d'années pour l'étude des RCPG va sans doute se poursuivre pour mettre en évidence toutes ces voies de signalisation nouvellement découvertes. D'un point de vue médical en effet, les principales études se sont portées sur la recherche de nouveaux ligands du récepteur impliqué dans la pathologie, mais sans doute est-il plausible à l'heure actuelle de vouloir trouver des molécules interagissant à un autre endroit de la voie de signalisation, encore faut-il que cette voie soit connue.

3. Impact de la modulation de la structure d'un RCPG

3.1. La structure tridimensionnelle de la rhodopsine

La rhodopsine est le récepteur modèle de la famille 1 qui regroupe 90% des RCPG. La rhodopsine est activée par la lumière et produit une signalisation intracellulaire qui aboutit à la vision. Avec 348 acides aminés, la rhodopsine bovine a une longueur intermédiaire parmi les membres de la famille 1. Elle comporte la plupart des acides aminés communs aux RCPG appartenant à cette famille. La longueur des sept hélices

transmembranaires et des trois boucles extracellulaires est à peu près la même pour la plupart des membres de cette famille. La variation dans les autres régions reflète probablement la spécificité de chaque récepteur pour ses ligands ou ses protéines G. Il est donc légitime de considérer la rhodopsine comme modèle pour les RCPG de cette famille. Elle comporte bien évidemment des caractéristiques qui lui sont propres comme le chromophore qui n'est pas un ligand au sens strict du terme puisqu'il est lié covalamment aux domaines transmembranaires. Le chromophore initialement présent sous la forme inactive est le 11-cis-rétinal, la capture d'un photon conduit à sa photoisomérisation en 11- trans-rétinal.

La publication de la structure tridimensionnelle de la rhodopsine bovine résolue à 2,8 Å en 2000 fut la première description d'une structure à haute résolution d'un RCPG à l'état inactif (Palczewski *et al.*, 2000). Aucune autre structure de RCPG n'avait été résolue jusque-là et il y a plusieurs explications à cet état de fait. D'abord, la cristallisation de protéines nécessite une grande quantité de protéine pure et stable. Or, les protéines membranaires sont pour la grande majorité naturellement faiblement exprimées et leur purification est longue et mal maîtrisée. La difficulté majeure réside dans le fait qu'il est nécessaire de maintenir les protéines membranaires dans un environnement proche de celui des membranes lors de toutes les étapes de leur manipulation. Cet environnement est mimé par les détergents ce qui constitue une difficulté supplémentaire lors de la purification et de la cristallisation. La rhodopsine est, au vu de ces différentes considérations, une véritable exception. Ce récepteur est très fortement exprimé au niveau des bâtonnets rétiniens. La concentration en rhodopsine s'élève à 3 mM représentant 90% des protéines dans cette membrane. La source naturelle est abondante et l'enrichissement est tel qu'il permet une purification rapide. Cependant, de nombreuses années ont été nécessaires pour l'obtention d'une structure à haute résolution.

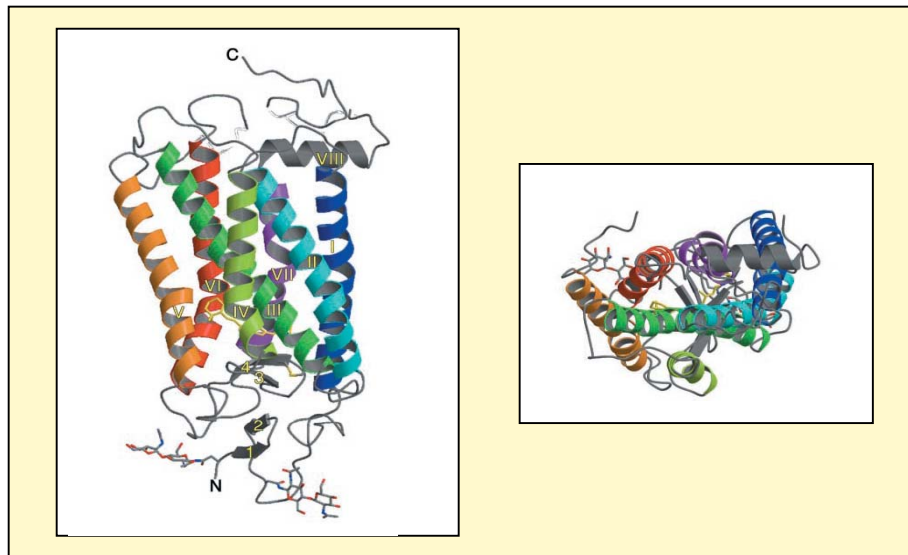


Figure 10 : Structure cristallographique de la rhodopsine bovine à 2,8 Å de résolution
 A gauche, vue parallèle au plan de la membrane. A droite, vue dans le plan de la membrane depuis le côté cytoplasmique.

(Tiré de (Palczewski *et al.*, 2000))

La résolution de cette structure a permis quelques découvertes clé qui n'avaient pas été mises en évidence sur les modèles tirés des séquences.

- Les segments transmembranaires I, II, III et VI sont significativement plus longs que ceux prédits par l'analyse des profils d'hydrophatie (30, 30, 33 et 31 résidus alors que les profils prédisaient 25, 25, 20 et 24, respectivement).

- Le pont disulfure entre Cys¹¹⁰ et Cys¹⁸⁷, commun à tous les RCPG était initialement supposé entre les boucles extracellulaires e1 et e2. Or la structure tridimensionnelle révèle que la Cys¹¹⁰ se situe en fait à l'extrémité extracellulaire du troisième segment transmembranaire. Le pont disulfure contraint la boucle e2, entre les hélices IV et V, dans un repliement formant une structure en deux couches avec le domaine amino-terminal (figure 11A), obstruant ainsi le site de liaison du ligand situé entre les segments transmembranaires.

- Une hélice courte amphiphile supplémentaire VIII a été mise en évidence, située directement à côté de la septième hélice transmembranaire au niveau de la surface putative de la membrane (figure 10, hélice grise). Les hélices VII et VIII forment presque un angle droit, correspondant à l'empilement aromatique de la Tyr³⁰⁶ et de la Phe³¹³ conservées (figure 11B).

- Les résidus Asn⁵⁵, Asp⁸³, Asn⁷⁸ et Trp¹⁶¹ semblent constituer un important réseau de liaisons hydrogènes entre les hélices transmembranaires (figure 11C)

- Le motif DRY Glu¹³⁴-Arg¹³⁵-Tyr¹³⁶ situé à l'extrémité intracellulaire de l'hélice III, interagit avec la Glu²⁴⁷ et la Thr²⁵¹ de l'hélice VI à l'extrémité cytoplasmique de l'hélice III (figure 11D).

(Yeagle *et al.*, 2000 ; Meng et Bourne, 2001 ; Okada *et al.*, 2001 ; Saunders, 2001 ; Sakmar, 2002 ; Stenkamp *et al.*, 2002).

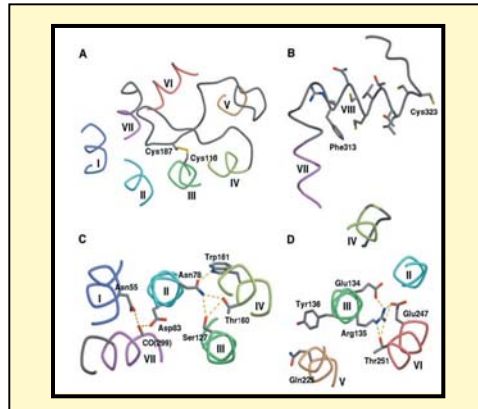


Figure 11 : Détails structuraux dans quatre régions de la rhodopsine

- (A) La boucle e2 à proximité du pont disulfure formé par les Cys¹¹⁰ et Cys¹⁸⁷.
 (B) L'hélice VIII formée par les résidus de Lys³¹¹ à Leu³²¹.
 (C) Liaisons hydrogènes interhélices entre Asn⁵⁵ et TMI, TMII et TMVII et Asn⁷⁸ et TMII, TMIII et TMIV
 (D) Le motif tripeptidique Glu¹³⁴-Arg¹³⁵-Tyr¹³⁶ (DRYBox) situé dans TMIII.
 (Tiré de Palczewski *et al.*, 2000).

À l'opposé, les boucles cytoplasmiques i1, i2 et i3 s'ouvrent presque pour former l'interface putative avec la protéine G hétérotrimérique. La plupart des résidus conservés parmi les membres de la famille 1 forment des liens non-covalents qui stabilisent la forme inactive. Les hélices transmembranaires I, IV, VI et VII présentent une courbure imposée par des résidus proline. Le TMII présente une courbure supplémentaire liée à la présence de résidus Gly⁸⁹ et Gly⁹⁰, ce qui fait que cette région est plus proche de l'hélice III que de l'hélice I. Les extrémités cytoplasmiques des TMII et IV sont proches l'une de l'autre, mais s'éloignent dans la région du Trp¹⁶¹, un résidu hautement conservé parmi les RCPG.

La structure à haute résolution de la rhodopsine a donc apporté de nouvelles données par rapport au modèle de Baldwin (Baldwin *et al.*, 1997). Elle a révélé une orientation précise des hélices transmembranaires, une structure unique de la seconde boucle extracellulaire et la présence d'une hélice amphipatique dans l'extrémité carboxy-terminale. Même si cette structure atomique n'est pas complète puisque certaines portions de boucles sont absentes et même si elle ne représente que la forme inactive de la rhodopsine avec son chromophore 11-cis-rétinal et ne donne donc pas d'information sur la fonction, elle n'en demeure pas moins un excellent point de départ pour la compréhension des mécanismes de transduction du signal visuel et pour la conception de nouveaux modèles d'autres RCPG. Cette structure constitue un modèle indispensable pour interpréter les résultats d'études moléculaires et structurales. Même si de nombreux efforts restent à accomplir avec les autres RCPG, il est

maintenant admis que l'obtention de structures tridimensionnelles de RCPG est autant indispensable que concevable.

3.2. Différents états conformationnels d'un récepteur

Plusieurs modèles décrivant de manière théorique les mécanismes d'activation d'un RCPG ont été suggérés.

Dans le premier modèle qui est le plus simple, un agoniste A se lie à une forme inactive du récepteur R_i pour former un complexe AR_i qui subit ensuite plusieurs modifications conformationnelles pour aboutir à un état actif AR_a (Figure 12, orange). Néanmoins, ce modèle extrêmement simplifié ne permet pas d'expliquer les différentes réponses observées pour un grand nombre de récepteurs, d'où l'idée de proposer des modèles d'activation faisant intervenir plusieurs états actifs du récepteur.

Dans le cas du modèle ternaire simplifié, l'activation du récepteur est suivie par la liaison de la protéine G sur un état actif du récepteur différent de celui induit par la liaison du ligand. Le complexe AR_aG (Figure 12, vert) qui en résulte peut alors activer l'effecteur.

Le modèle accepté le plus largement est le modèle complexe ternaire étendu (connu aussi sous le nom de modèle à deux états). Ce modèle a été proposé en réponse à la découverte que les récepteurs pouvaient adopter une conformation active spontanément, en absence d'agoniste et être couplés aux protéines G (Samama *et al.*, 1993 ; Leff, 1995). Le récepteur existerait en équilibre entre un état inactif R_i et une conformation active R_a (Samama *et al.*, 1993). En l'absence d'agoniste, l'état inactif est prévalent, cependant la barrière énergétique entre les deux états R_i et R_a est suffisamment faible pour permettre à une certaine fraction de récepteurs d'être spontanément dans l'état R_a . Les agonistes lient avec la plus forte affinité les récepteurs dans la conformation R_a , ce qui déplace l'équilibre et augmente ainsi la proportion de récepteurs R_a . A l'opposé, les agonistes inverses inhibent l'activité spontanée en stabilisant le récepteur dans la conformation inactive R_i , déplaçant l'équilibre à partir de l'état R_a . Les antagonistes sont alors définis comme des ligands intermédiaires capables de lier avec la même affinité les états conformationnels R_i et R_a du récepteur n'induisant donc pas de modification de l'équilibre (Samama *et al.*, 1993 ; Leff, 1995). La version du modèle ternaire étendu rajoute donc une situation dans laquelle le récepteur peut être activé sans liaison d'un agoniste (Figure 12, turquoise), et peut également activer la protéine G sans avoir lié son ligand (Figure 12, rose).

Enfin, le modèle ternaire cubique ajoute un complexe entre le récepteur inactif et la protéine G , R_iG (Figure 12, rouge) qui n'a pas la capacité d'induire une signalisation.

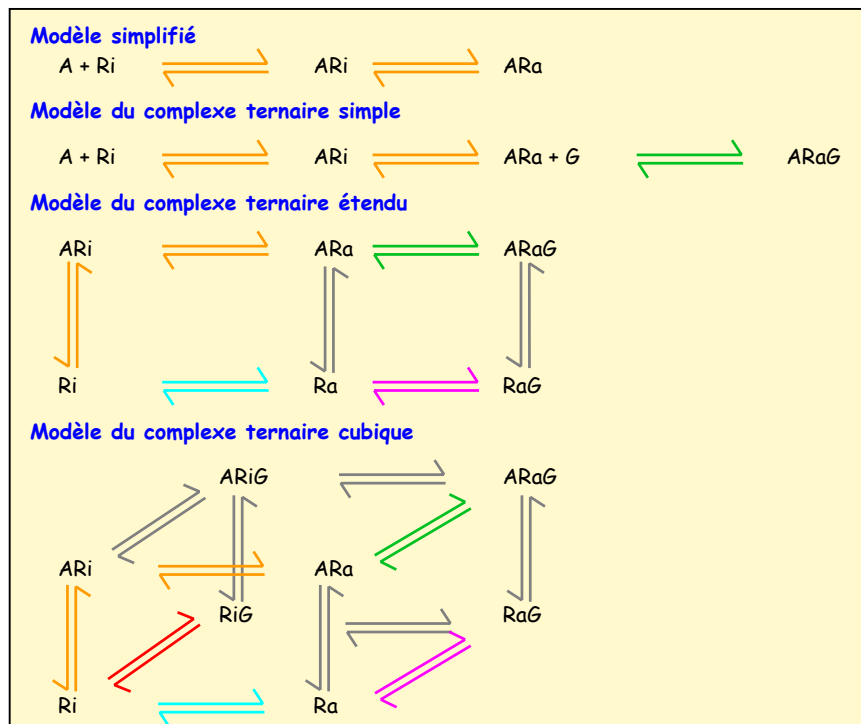


Figure 12 : Différents modèles proposés pour l'activation des RCPG

orange : activation du récepteur par fixation du ligand ; turquoise : activation du récepteur par modulation allostérique ; rose : activation de la protéine *G* en l'absence de ligand ; vert : activation de la protéine *G* en présence de ligand ; rouge : récepteur inactif couplé à une protéine *G*

(Tiré de Kenakin, 2004)

De nombreuses observations vont dans le sens que le modèle le plus adapté est le modèle cubique ternaire, qui est certes complexe, mais qui est le seul à pouvoir expliquer différentes observations complexes de certains RCPG.

3.3. Activité constitutive

En accord avec le modèle du complexe ternaire décrit plus haut, les RCPG existent à un état d'équilibre entre plusieurs états actifs R_a et inactifs R_i . Le modèle simple qui prédit que la liaison d'un agoniste sur le récepteur conduit à la formation d'un complexe stable R_aA a été remis en question avec la découverte de mutants de récepteurs ayant la capacité de passer spontanément de l'état R_i vers l'état R_a sans avoir fixé un agoniste. On note qu'environ 40 % des RCPG humains testés présentent une activité basale (Seifert et Wenzel-Seifert, 2002).

Une activité constitutive se définit comme une activité spontanée, indépendante d'un ligand qui conduit à une production de seconds messagers. Elle peut être bloquée par des ligands agonistes inverses. Le premier récepteur constitutivement actif découvert fut un mutant du récepteur β 2-adrénergique (Cotecchia *et al.*, 1990), mais depuis de nombreux CAM (mutants constitutivement actifs) ont été identifiés (pour

revue Parnot *et al.*, 2002). Les récepteurs CAM adoptent une conformation active en l'absence de ligand et sont capables d'activer les protéines G hétérotrimériques. Des analyses de séquences sur des récepteurs CAMs de la famille 1 ont montré une mutation récurrente dans le motif conservé DRY. Ce résultat laisse penser que la boîte DRY est un motif structural majeur qui contraint le récepteur dans une conformation inactive. La fixation du ligand qui, en déplaçant les boucles du récepteur, modifie la conformation de ce motif, rendrait possible une interaction avec les protéines G hétérotrimériques. L'analyse de multiples CAM de récepteurs différents a permis de pointer d'autres contraintes conformationnelles importantes pour l'activité, comme celles par exemple entre les domaines transmembranaires TMVI et TMVII dans la rhodopsine (pour revue Pauwels et Wurch, 1998). De nombreux groupes ont développé des approches systématiques pour identifier les interactions intramoléculaires conduisant à l'activation d'un RCPG par mutagenèse aléatoire. Bien que les RCPG aient en général une activité basale faible voire indétectable, plusieurs RCPG présentent une activité constitutive modérée ou élevée dans les conditions physiologiques normales *in vivo* (voir quelques exemples dans le tableau 2).

Récepteur	Couplage	Intensité de l'activité	Références
α_{1A}/α_{1D} -adrénergique	Gq	forte	(Noguera <i>et al.</i> , 1996)
β_1/β_2 -adrénergique	Gs	forte (atrium droit) faible (autres tissus)	(Varma <i>et al.</i> , 1999)
sérotoninergique 5-HT _{2C}	Gq	forte	(Harvey <i>et al.</i> , 1999)
histaminergique H ₃	Gi/o	forte	(Morisset <i>et al.</i> , 2000)
muscarinique M ₂	Gi	modérée	(Hanf <i>et al.</i> , 1993)

Tableau 2 : Exemples de RCPG natifs présentant une activité constitutive en conditions physiologiques

3.4. Oligomérisation

Le schéma simplifié de la signalisation d'un RCPG présente en général un récepteur de surface activé par la liaison d'un agoniste, d'où une activation d'un seul type de protéine G. Ce modèle est appuyé par plusieurs hypothèses, notamment par le fait que cette équation simple permet d'expliquer la libération d'une molécule de GDP et la fixation d'une molécule de GTP, phénomène qui est considéré comme la signature de l'activation des RCPG. Néanmoins, cette hypothèse est de plus en plus controversée. Il est classiquement admis qu'une seule molécule de RCPG est suffisante pour activer une protéine G hétérotrimérique avec pour conséquence une stoechiométrie d'interaction RCPG/protéine G de type 1:1 (Gether et Kobilka, 1998).

L'oligomérisation des RCPG est cependant une question récurrente. Les premiers résultats des études biochimiques ont longtemps été considérés comme issus d'une agrégation artéfactuelle sans justification physiologique. Néanmoins dans les dernières années, plusieurs exemples, même s'ils sont rares et ne peuvent donc pas être généralisés, ont montré que la dimérisation était une condition nécessaire à la fonction. Des preuves biochimiques, biophysiques et pharmacologiques basées sur des méthodes de fluorescence sur cellules entières comme le Transfert d'Energie de Résonance de Bioluminescence (BRET) ou le Transfert d'Énergie de Résonance de Fluorescence (FRET) ont été avancées confortant la notion de dimères ou d'oligomères (Angers *et al.*, 2000 ; Overton et Blumer, 2000 ; Salahpour *et al.*, 2000 ; Wurch *et al.*, 2001 ; Mercier *et al.*, 2002 ; Overton et Blumer, 2002 ; Dinger *et al.*, 2003 ; Canals *et al.*, 2004 ; Wang *et al.*, 2005). Cette dimérisation semble avoir des effets variables sur la fonction du récepteur : même si dans certains cas la dimérisation ne paraît pas essentielle à la fonction du récepteur, elle semble néanmoins la moduler. La dimérisation pourrait être impliquée dans la modulation de plusieurs propriétés fonctionnelles des RCPG comme la liaison, la signalisation, le trafic et dépend des récepteurs considérés (pour revues Bouvier, 2001 ; Angers *et al.*, 2002 ; Bai, 2004 ; Parnot et Kobilka, 2004). Les oligomères de récepteurs constituent alors un paramètre supplémentaire dans la diversification de la fonctionnalité des RCPG.

Plusieurs études ont montré que des récepteurs d'une même famille pouvaient interagir entre eux. Dans le cas des récepteurs des opiacés, l'hétérodimérisation κ/δ augmente l'effet d'inhibition de l'adénylate cyclase et module la pharmacologie du récepteur (Jordan et Devi, 1999 ; Pascal et Milligan, 2005).

Le plus inattendu, peut-être, est que la dimérisation des RCPG ne se limite pas aux homodimères mais qu'ils peuvent aussi interagir avec des RCPG d'un autre type pour former des hétérodimères (Prinster *et al.*, 2005). L'importance de l'hétérodimérisation a été montrée initialement avec les récepteurs $GABA_B$. Des études sur ces récepteurs ont montré que la dimérisation était capitale à la fonction du récepteur. Le récepteur n'est fonctionnel qu'à l'état d'hétérodimère $GABA_B-R1$ et $GABA_B-R2$. La sous-unité $GABA_B-R1$ possède le site de liaison du ligand, mais ne s'exprime pas à la surface de la cellule lorsqu'elle est exprimée seule. La sous-unité $GABA_B-R2$ s'exprime à la surface, mais n'a pas la capacité de lier le ligand. Lorsqu'elles sont co-exprimées, les deux sous-unités s'associent en formant une interaction de type « coiled-coil » au niveau des domaines carboxy-terminaux, cette interaction étant nécessaire pour la liaison du ligand et la signalisation successive à cette fixation (Galvez *et al.*, 2001).

On recense d'autres cas pour lesquels la dimérisation semble être nécessaire à l'activité du récepteur : récepteurs du goût T1R2 et T1R3 (Nelson *et al.*, 2001 ; Nelson *et al.*, 2002).

On recense également des cas de dimérisation constitutive, notamment pour le récepteur de la mélanocortine (Mandrika *et al.*, 2005). Bien que la majorité des exemples de dimérisation concernent donc des récepteurs de la même sous-famille, Jordan et collègues ont montré que des récepteurs de deux sous-familles distinctes, récepteurs adrénergiques et récepteurs des opioïdes, couplés à des protéines *G* hétérotrimériques différentes (respectivement $G\alpha_s$ et $G\alpha_i$), peuvent aussi former des hétérodimères (Jordan et Devi, 1999). Si ce processus de dimérisation s'est révélé à l'origine de pharmacologies, de couplages, ou de processus de désensibilisation particuliers, rien ne prouve que ce phénomène soit indispensable à l'activation des RCPG ou à l'activation différentielle des protéines *G* hétérotrimériques. La signification fonctionnelle du phénomène est encore sujette à débat. De plus, les mécanismes qui engendrent la dimérisation ne sont pas clairement établis, la dimérisation pouvant se produire au niveau de la membrane plasmique sous l'influence d'un stimulus, ou au niveau de la synthèse sous forme de dimères. Terrillon et collègues ont montré que les récepteurs de la vasopressine et ceux de l'ocytocine sont présents sous forme d'homomères et d'hétérodimères dès le réticulum endoplasmique quand ils sont exprimés dans des cellules HEK293 (Terrillon *et al.*, 2003). Cette observation suggère que dans ce cas au moins, l'oligomérisation est un phénomène qui s'établit très tôt durant le processus de biosynthèse/maturation.

Globalement on peut imaginer que le processus de dimérisation intervient au niveau de quatre grands domaines :

- Elle peut être impliquée dans la qualité et le contrôle du repliement des récepteurs néosynthétisés et dans leur adressage à la membrane plasmique.
- Elle peut jouer un rôle au niveau de la diversité pharmacologique en modulant la coopérativité de la liaison des ligands.
- Elle peut moduler la transduction du signal liée à un ligand donné en modifiant la sélectivité d'interaction entre un RCPG et une protéine *G* donnée ce qui résulte en un couplage différent à celui initialement connu.
- Elle peut intervenir au niveau de l'internalisation du récepteur en favorisant une voie d'endocytose de l'un des partenaires de l'hétérodimère.

Les domaines d'interaction au niveau des segments transmembranaires sont recherchés et des modèles commencent à être proposés (Dean *et al.*, 2001 ; Filizola et Weinstein, 2002). Mais le débat continue cependant quant à une généralisation du rôle de la dimérisation dans l'activation ou la désensibilisation de tous les RCPGs (pour revues Lee *et al.*, 2003b ; Milligan *et al.*, 2003 ; Bulenger *et al.*, 2005).

4. RCPG et santé humaine

4.1. RCPG et médicaments

Parmi les 500 médicaments les plus couramment utilisés actuellement, près de 30 % ont pour cible un RCPG. Au vu de la grande diversité de localisation et de fonction des RCPG, on retrouve forcément des médicaments visant des pathologies tout aussi diverses tels des anti-migraineux, des anti-psychotiques, des anti-histaminiques, des analgésiques ou des β -bloquants.

En chiffres, les RCPG ont rapporté 23,5 milliards de dollars aux industries pharmaceutiques en 2002 (Drug and Market Development Publications, juin 2002). Cette famille de protéine est donc très étudiée pour son implication directe en santé humaine, mais présente également un intérêt non négligeable d'un point de vue financier, encore faut-il pouvoir mener à bien cette recherche qui coûte cher (pour revue Schoneberg *et al.*, 2004).

4.2. Mutants constitutivement actifs des RCPG à l'origine de pathologies humaines

Dans des conditions physiologiques normales, l'activité constitutive du récepteur a pour rôle de maintenir une fonction physiologique sans causer de phénotype pathologique. Néanmoins, il existe des mutants constitutivement actifs qui montrent une activité anormale notamment en ce qui concerne l'activation des protéines *G* et des effecteurs.

Les maladies causées par des dysfonctionnements de RCPG peuvent être dues à des aberrations chromosomiques ou à des malformations de la protéine.

Le premier mutant CAM à l'origine d'une maladie humaine à avoir été identifié est un mutant du récepteur de la rhodopsine qui cause une forme de pigmentation rétinienne. Une centaine de mutations à l'origine de cette pathologie ont été identifiées. Immédiatement après cette découverte, le nombre de mutants à l'origine de maladies humaines n'a cessé d'augmenter. Le récepteur de la vasopressine a été cloné en 1992 et en même temps un mutant du récepteur causant des diabètes insipides liés au chromosome X a été identifié. De la même façon, le clonage des récepteurs à TSH et à LH/hCG a été suivi par l'identification de formes mutées de ces récepteurs à l'origine de maladies humaines.

On connaît à l'heure actuelle plus de trente maladies et phénotypes cliniques qui sont associés à des mutations de RCPG, dont quelques exemples sont répertoriés dans le tableau 3 (pour revue Schoneberg *et al.*, 2004).

Récepteur	Maladie associée
Follitropine (FSH)	syndrome d'hyperstimulation ovarienne
Lutropine (LHCG)	puberté mâle précoce et limitée
Rhodopsine (RHO)	aveuglement nocturne stationnaire
Thyrotropine (TSH)	hyperthyroïdie
Calcium (CaS)	hypoparathyroïdie dominant et sporadique
PTH	chondrodysplasie, nanisme des membres inférieurs
Angiotensine (AT ₂)	retard mental lié au chromosome X
Vasopressine (V ₂)	diabète néphrogéniques insipides
Mélanocortine (MC ₄)	obésité
Rhodopsine (RHO)	rétinite pigmentaire
MASS1	syndrome de Usher

Tableau 3 : Quelques exemples de maladies humaines liées à des mutations au niveau de RCPG
La partie du haut donne des exemples de maladies liées à un gain de fonction, la partie du bas à une perte de fonction du récepteur.

(Extrait de Schoneberg *et al.*, 2004)

4.3. RCPG viraux

Au cours de l'évolution, les virus ont développé nombre de stratégies en vue de détourner à leur avantage la machinerie des cellules hôtes mais aussi pour échapper au système immunitaire afin de garantir leur propre survie et leur propagation. On connaît plusieurs virus qui codent pour des protéines analogues à des RCPG. Certains virus ont adopté des gènes de cellules hôtes et optimisé leurs produits de synthèse afin d'en tirer profit. C'est ainsi que certains membres de la famille des *Herpesviridae* et des *Poxviridae* ont incorporé dans leur génome certaines chimiokines et leurs récepteurs.

Même si on sait depuis longtemps que le développement de certaines tumeurs est étroitement lié à une infection virale, ce n'est qu'en 2000 que le récepteur ORF74, un RCPG codé par HHV8 (Human HerpesVirus 8), a clairement été impliqué dans le processus tumorigène du Sarcome de Kaposi (Yang *et al.*, 2000 ; Couty et Gershengorn, 2004). D'autres RCPG analogues des récepteurs de chimiokines ont été identifiés, les plus connus étant le récepteur U12 codé par HHV6 et US28 codé par hCMV (human CytoMegalovirus) qui sont impliqués dans le développement de certains lymphomes et dans plusieurs type d'athérosclérose, néanmoins le processus pathogène n'est pas clair (Gao et Murphy, 1994 ; Isegawa *et al.*, 1998).

A l'heure actuelle, plus de dix chimiokines codées par des virus et approximativement le même nombre de récepteurs ont été identifiés par homologie de séquence avec l'équivalent humain (Wells et Schwartz, 1997).

(pour revue Rosenkilde *et al.*, 2001).

4.4. RCPG orphelins

Le séquençage du génome humain a permis de mettre en évidence presque 200 nouveaux RCPG ne possédant pas de ligands endogènes identifiés à l'heure actuelle (Im, 2002). Suite à cette découverte, de nombreuses stratégies, notamment de pharmacologie inverse, sont mises en place pour trouver et la fonction et les ligands de ces récepteurs qui semblent aussi impliqués dans un grand nombre de pathologies humaines (pour revue Civelli, 2005). La désorphelinisation de ces récepteurs est devenue capitale au vu de leur potentiel thérapeutique (Kutzleb *et al.*, 2005).

Les récepteurs orphelins sont classés par homologies de séquences dans la famille à laquelle ils appartiennent, néanmoins, plusieurs RCPG « extrêmes », c'est-à-dire n'appartenant à aucune famille connue, ont été identifiés (Katugampola et Davenport, 2003).

Plusieurs équipes ont déjà mené avec succès des expériences de désorphelinisation en identifiant plusieurs ligands comme étant activateurs de récepteurs orphelins : ainsi l'apeline, la « ghréline » (growth hormone releasing peptide) sont des ligands de récepteurs orphelins. On a également identifié les « traceamines », comme la β -phényléthylamine, la turamine et l'octopamine, comme ligands de la famille des récepteurs orphelins apparentés aux récepteurs adrénergiques et sérotoninergiques.

Dans tous ces cas, l'identification des ligands endogènes a permis d'améliorer la compréhension de certains aspects de la physiologie des récepteurs orphelins.

5. Conclusions

La famille des RCPG est donc d'un intérêt substantiel pour la recherche médicale, ce qui est confirmé par les nouvelles découvertes portant sur cette classe de récepteurs. Néanmoins, comme c'est le cas pour toutes les protéines membranaires, la recherche sur ce type de récepteur coûte cher et pose de nombreux problèmes techniques, principalement liés au manque de données structurales et au faible taux d'expression naturel de ces récepteurs.

Même si la structure tridimensionnelle de la rhodopsine a pu apporter quelques éclaircissements, elle ne reste qu'un modèle qui peut s'appliquer plus ou moins parfaitement selon les récepteurs considérés. L'obtention de nouvelles structures tridimensionnelles serait une avancée formidable pour mieux comprendre tous les mécanismes liés aux RCPG. Ces structures pourraient permettre de comprendre et de déterminer de façon plus précise la position du ligand sur le récepteur, de dessiner de nouveaux ligands antagonistes dans le cas des récepteurs impliqués dans certaines pathologies.

Ce travail de thèse est une contribution à l'étude structurale de deux RCPG, les récepteurs de chimiokines CCR5 et CXCR4.

CHAPITRE 2

LES CHIMIOKINES ET LEURS RECEPTEURS

1. Présentation du système chimiokine

1.1. Les chimiokines et leurs dérivés

1.1.1. Nomenclature

Les chimiokines constituent une large famille de petites protéines (de 6 à 15 kDa) sécrétées par un grand nombre de cellules, principalement les globules blancs ou leucocytes. On connaît à l'heure actuelle plus de 40 chimiokines humaines différentes. Toutes les protéines de cette famille ont en commun certaines propriétés particulières, en premier lieu le chimiotactisme : elles sont capables d'attirer leurs cellules-cibles, en particulier les leucocytes, proportionnellement au gradient de concentration qu'elles forment à partir de leur lieu de production. C'est cette capacité qui leur a donné leur premier nom de cytokines chemoattractantes. Le nom de chimiokines a été adopté définitivement en 1992 lors du troisième congrès international sur les cytokines en tant que néologisme pour cytokine chemoattractante (de l'Anglais CHEMOattractant cytoKINE).

De nombreuses chimiokines avaient été identifiées auparavant et dénommées en fonction de leur localisation tissulaire ou de leur rôle physiologique. En 1995, le comité NC-IUPHAR a organisé la nomenclature des chimiokines. Même si le terme de chimiokines est communément accepté et retrouvé dans la littérature, la nomenclature officielle des chimiokines l'est elle beaucoup moins, et l'ancienne nomenclature reste communément utilisée dans les publications scientifiques.

1.1.2. Rôles physiologiques des chimiokines

1.1.2.1. Chimiotactisme

Le premier rôle mis en évidence pour cette famille de protéines est le chimiotactisme des leucocytes. En effet, les chimiokines ont la capacité de mobiliser les leucocytes pour faire en sorte que ces derniers quittent rapidement les vaisseaux sanguins pour venir s'accumuler sur les sites où se produit une infection ou une inflammation. Les événements cellulaires qui sous-tendent cette migration se déroulent selon un scénario en trois actes : ralentissement des leucocytes circulants, adhésion à la paroi des vaisseaux sanguins par diapédèse, puis migration à travers les cellules endothéliales. Ce mécanisme implique une série d'interactions coordonnées entre les leucocytes et les cellules endothéliales qui nécessite une interconnexion très régulée

entre les sélectines, les intégrines et les chimiokines. La migration de ces cellules entraîne une profonde transformation qui induit la redistribution des récepteurs de chimiokines, des intégrines, des protéines du cytosquelette et de différentes molécules intracellulaires (Kunkel et Godessart, 2002).

La circulation continue des lymphocytes à travers le sang et les tissus de manière organisée conduit les lymphocytes naïfs vers les nœuds lymphoïdes où ils rencontrent l'antigène et sont transformés en lymphocytes mémoire qui migrent vers les tissus lésés pour y assurer la réponse immunitaire. L'augmentation forte de la sécrétion des chimiokines pendant l'inflammation résulte dans le recrutement sélectif de certains leucocytes, notamment les lymphocytes T au niveau des tissus lésés. Le potentiel des lymphocytes T à sécréter des chimiokines suggère que les lymphocytes T eux-mêmes jouent un rôle actif dans le recrutement d'autres types de leucocytes sur le locus de l'infection ou de l'inflammation (Mackay, 2001).

1.1.2.2. Autres fonctions des chimiokines

Initialement les chimiokines étaient connues pour leur rôle dans la communication et la migration des leucocytes. Des études ultérieures ont mis en évidence leurs fonctions et leur implication directe ou indirecte dans d'autres processus biologiques. En effet, les chimiokines sont sécrétées par un grand nombre de cellules : globules blancs (monocytes, macrophages, éosinophiles, lymphocytes T), plaquettes sanguines, fibroblastes, cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et kératinocytes de la peau. Cette découverte a permis de mettre en évidence leur rôle dans des processus biologiques aussi divers que le développement embryonnaire, l'athérosclérose, l'angiogenèse, l'inflammation, la pathogenèse de virus ou encore l'ouverture du col de l'utérus au moment de l'accouchement.

1.1.3. Classification des chimiokines

Les chimiokines forment une famille de ligands très complexes, de par leur diversité, leur sélectivité pour leurs récepteurs et leur divergence phylogénétique. Ce sont de petites protéines de 6 à 15 kDa, composées de 70 à 80 acides aminés. Plus de 40 chimiokines, présentant une identité de séquence de 20 à 90 % ont été identifiées dans le génome humain.

1.1.3.1. Classification structurale

La classification des chimiokines se fait traditionnellement en fonction d'un motif d'acides aminés de l'extrémité amino-terminale, incluant quatre (ou deux) cystéines

conservées. La première forme un pont disulfure avec la troisième, tout comme la deuxième et la quatrième.

- Les chimiokines du groupe CXC (ou α) sont caractérisées par la présence d'un acide aminé entre les deux premières cystéines conservées. A l'intérieur de ce groupe, on distingue deux sous-catégories liées à la présence ou non du motif tripeptidique ELR, immédiatement adjacent au motif CXC. La signification de ce motif n'est pas simplement structurelle.

Les chimiokines ELR+ (CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8 et CXCL15) sont produites par une grande variété de cellules et leur principal rôle est de promouvoir l'adhérence des neutrophiles aux cellules endothéliales ayant pour conséquence leur migration vers les sites inflammatoires. Ces chimiokines sont dites spécifiques des neutrophiles. Ce motif confère à cette famille de chimiokines leurs propriétés angiogéniques. En facilitant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, ces chimiokines pourraient être impliquées dans le développement embryonnaire, la cicatrisation, le développement de tumeurs solides ou l'inflammation chronique.

Les chimiokines ELR- (CXCL4, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14 et CXCL16) attirent les leucocytes et les monocytes, mais présentent une faible capacité à attirer les neutrophiles.

- Lorsque les deux cystéines sont adjacentes, on parle de chimiokines du groupe CC (ou β). Ces chimiokines exercent principalement leur action sur les lymphocytes, les monocytes, les basophiles et les éosinophiles. On dénombre également un petit groupe de CC chimiokines qui possèdent six cystéines conservées, les deux cystéines supplémentaires formant également un pont disulfure (CCL1, CCL15, CCL21, CCL23 et CCL28). En tenant compte des réponses induites ou de similarités de séquences, les CC chimiokines peuvent être divisées en 5 sous-groupes :

Le sous-groupe des chimiokines allergéniques, appelé aussi MCP, regroupe des chimiokines structurellement apparentées : CCL1, CCL2, CCL7, CCL8, CCL11, CCL12, CCL13, CCL24 et CCL26. Elles possèdent une activité pléiotropique, mais sont capables principalement d'activer les éosinophiles et les basophiles.

Le sous-groupe des CC chimiokines pro-inflammatoires et HCC, compte cinq membres : CCL3, CCL4, CCL5, CCL6 et CCL18 ayant une activité pro-inflammatoire et quatre membres du groupe HCC (Haemofiltrate CC chemokine) : CCL14, CCL15, CCL16 et CCL23. Elles ont un rôle fondamental dans les processus inflammatoires.

Le sous-groupe des chimiokines impliquées dans le développement regroupe les chimiokines CCL17, CCL22 et CCL25.

Le sous-groupe des chimiokines homéostatiques compte CCL19, CCL20 et CCL21. Ces trois chimiokines sont produites de façon constitutive par les tissus lymphoïdes et dirigent les lymphocytes T et les cellules dendritiques vers les sites spécifiques au travers du tissu lymphoïde.

CCL27 est unique au vu de sa structure et de sa régulation. Le gène codant pour CCL27 peut générer deux produits distincts résultants d'un épissage différentiel et ayant une localisation tissulaire différente : ESKine est principalement exprimé dans le placenta et possède un peptide signal lui permettant d'être sécrété, alors que PESKY qui est principalement exprimé dans le cerveau, semble être transloqué vers le noyau.

- Dans le groupe CX3C (ou γ) qui ne compte qu'un membre, les résidus cystéines sont séparés par trois acides aminés. On connaît néanmoins deux formes distinctes de cette chimiokine : la forme soluble présente une activité chimioattractante pour les lymphocytes T et les monocytes, alors que la forme liée à la membrane induit une forte adhésion des leucocytes.

- A l'inverse, les chimiokines du groupe C (ou δ) ne possèdent que deux cystéines conservées, correspondant aux deuxième et quatrième cystéines des trois premiers groupes. Cette famille compte deux membres très similaires XCL1 et XCL2 qui ne diffèrent que par la nature des acides aminés 7 et 8. XCL1 a la capacité d'induire le chimiotactisme des lymphocytes.

(pour revue Laing et Secombes, 2004)

1.1.3.2. Classification fonctionnelle

D'un point de vue fonctionnel, on peut classer les chimiokines en deux groupes :

- Les chimiokines inflammatoires sont synthétisées en réponse à des pathogènes et à des stimuli pro-inflammatoires à la fois dans les tissus et dans les leucocytes. Leurs récepteurs sont exprimés sur les cellules phagocytaires comme les neutrophiles, les éosinophiles, les monocytes et les cellules dendritiques immatures mais également à certains niveaux du développement embryonnaire. Elles jouent un rôle dans l'immunité innée, c'est-à-dire la défense de l'organisme contre les pathogènes, et dans l'inflammation.

- Les chimiokines lymphoïdes sont exprimées constitutivement dans des microenvironnements discrets parmi lesquels les tissus lymphoïdes, la peau et les muqueuses. Elles sont impliquées dans le déplacement et le recrutement des lymphocytes tout comme dans le développement. Leurs récepteurs sont exprimés sur les

cellules T et B et les cellules dendritiques immatures. Ces chimiokines dirigent le positionnement des lymphocytes vers les zones spécifiques de cellules B et T dans les organes lymphoïdes secondaires. Ceci facilite l'interaction entre les cellules dendritiques et les lymphocytes T et les lymphocytes B et T à des endroits appropriés, nécessaires au développement de la réponse immunitaire. (pour revue Laing et Secombes, 2004)

Famille	Nom officiel	Nom commun	Famille	Nom officiel	Nom commun
CXC	CXCL1	GRO α	CC	CCL1	I-309
	CXCL2	GRO β		CCL2	MCP-1
	CXCL3	GRO γ		CCL3	MIP-1 α
	CXCL4	PF-4		CCL4	MIP-1 β
	CXCL5	ENA-78		CCL5	RANTES
	CXCL6	GCP-2		CCL6	C10
	CXCL7	NAP-2		CCL7	MCP-3
	CXCL8	IL-8		CCL8	MCP-2
	CXCL9	MIG		CCL9	MIP-1 γ
	CXCL10	IP-10		CCL10	CCL10
	CXCL11	I-TAC		CCL11	Eotaxine
	CXCL12	SDF-1		CCL12	MCP-5
	CXCL13	BCA-1		CCL13	MCP-4
	CXCL14	BRAK		CCL14	CC-1
	CXCL15	Lungkine		CCL15	Leukotactine-1
	CXCL16	CXCL16		CCL16	LEC
XC	CL1	Lymphotactine α		CCL17	TARC
	CL2	Lymphotactine β		CCL18	PARC
CX3C	CX3CL	Fraktaline/Neurotactine		CCL19	ELC
				CCL20	LARC
				CCL21	SLC
				CCL22	MDC
				CCL23	MPIF-1
				CCL24	MPIF-2
				CCL25	TECK
				CCL26	Eotaxine-3
				CCL27	ESkine
				CCL28	MEC

Tableau 1 : Nomenclature des chimiokines humaines
Classification IUPHAR et nomenclature usuelle
(Tiré de Laing et Secombes, 2004)

1.1.4. Structure tridimensionnelle des chimiokines

La structure tridimensionnelle de plusieurs chimiokines a été résolue et montre un repliement caractéristique et commun à cette famille de protéines. Elle consiste en une région amino-terminale flexible structurellement désordonnée qui précède la première

cystéine. Ce domaine est suivi d'une région en boucle appelée boucle N (N loop) suivie d'un feuillet constitué de trois brins β antiparallèles reliés entre eux par les boucles 30s, 40s et 50s. Ce motif en clé grecque fournit une base solide sur laquelle s'ancre le domaine carboxy-terminal organisé en hélice α qui suit la dernière cystéine. La structure tridimensionnelle est stabilisée à la fois par les deux ponts disulfures mais également par des liaisons hydrophobes entre des résidus de l'hélice α carboxy-terminale et des résidus du feuillet β .

La plupart des analyses de structure montrent que les chimiokines sont associées en multimères dans les conditions requises pour la cristallisation. Dans le cas des chimiokines CXC, l'interface de dimérisation se situe au niveau de l'angle du premier brin β alors que dans le cas des chimiokines CC, l'interface se situe plutôt à proximité de l'extrémité amino-terminale d'où la formation de dimères non équivalents.

Malgré le fait qu'aux fortes concentrations nécessaires aux études cristallographiques on observe des dimères voire des multimères, les chimiokines semblent agir à l'état monomérique (Baggiolini *et al.*, 1997). Néanmoins, il semblerait que la plupart des chimiokines se lient à des éléments de la surface cellulaire notamment les glycosaminoglycanes ce qui semblerait favoriser la dimérisation des chimiokines.

Les études structure/fonction indiquent que les chimiokines ont deux sites d'interaction majeurs avec leurs récepteurs. Le premier implique la portion amino-terminale flexible qui précède la première cystéine. Cette région ne semble pas nécessaire à la liaison de la chimiokine avec une haute affinité à son récepteur, mais joue visiblement un rôle dans l'activation du récepteur. Ce segment est également important dans le fait qu'une chimiokine se lie à un récepteur donné.

La deuxième comprend la boucle rigide qui suit immédiatement la deuxième cystéine. L'importance relative de ces deux régions de contact dépend toutefois du récepteur considéré et reflète l'importance de la synergie de contact. La boucle amino-terminale qui suit immédiatement les deux premières cystéines conservées et qui relie l'extrémité amino-terminale flexible au feuillet β semble elle aussi capitale pour la liaison au récepteur, mais elle détermine également la spécificité de liaison.

En résumé, ces résultats expérimentaux suggèrent un modèle d'activation général dans lequel la boucle N de la chimiokine établit un contact initial avec le récepteur suivi par une activation du récepteur *via* la région amino-terminale de la chimiokine.

1.2. Les récepteurs de chimiokines

1.2.1. Classification des récepteurs de chimiokines

Les chimiokines exercent leur activité en interagissant avec des récepteurs de chimiokines, appartenant à la superfamille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines *G*, plus précisément à la famille 1, dont le modèle est la rhodopsine (voir chapitre 1). Ils présentent tous un couplage avec les protéines *G* de la famille *Gi/Go*.

Les récepteurs de chimiokines sont dénommés d'après la classe de chimiokines qu'ils lient. La nomenclature communément acceptée compte donc quatre familles de récepteurs de chimiokines : *CCR*, *CXCR*, *CX3CR* et *XCR* (cette écriture constitue une exception à la nomenclature afin de différencier les récepteurs de chimiokines des récepteurs du complément dénommés *CR*). On compte actuellement six récepteurs de la famille *CXC* (*CXCR1* à *CXCR6*), onze récepteurs pour les chimiokines *CC* (*CCR1* à *CCR11*), un récepteur pour la lymphotactine (*XCR1*) et le récepteur de la fractaline (*CX3CR1*).

A ces récepteurs classiques on peut ajouter *D6* et *Duffy* (*Duffy antigen receptor for chemokine* ou *DARC*) qui sont également des *RCPG* mais qui ne sont visiblement pas capables de signaler et sont donc exclus du système conventionnel classique.

Chez l'homme, la plupart des récepteurs connus peuvent interagir avec plusieurs chimiokines d'un même groupe, et réciproquement une chimiokine peut se lier à plusieurs récepteurs.

Chaque récepteur de chimiokines présente une spécificité pour une chimiokine de laquelle découle une spécificité pour un type de leucocytes. Néanmoins, du fait des liaisons croisées entre chimiokines et récepteurs de chimiokines, cette spécificité cellulaire peut être modifiée.

Récepteur	Ligand correspondant
CXCR1	CXCL6, 8
CXCR2	CXCL1, 2, 3, 5, 6, 7, 8
CXCR3	CXCL9, 10, 11
CXCR4	CXCL12
CXCR5	CXCL13
CXCR6	CXCL16
XCR1	XCL1, 2
CX3CR1	CX3CL1
CCR1	CCL3, 5, 7, 13, 14, 15, 16, 23
CCR2	CCL2, 7, 13
CCR3	CCL5, 7, 8, 11, 13, 15, 24, 26
CCR4	CCL17, 22
CCR5	CCL3, 4, 5
CCR6	CCL20
CCR7	CCL19, 21
CCR8	CCL1
CCR9	CCL25
CCR10	CCL27, 28

Tableau 2 : Les récepteurs de chimiokines et leurs ligands

Certaines chimiokines ont la capacité de se lier à plusieurs récepteurs et un même récepteur peut lier plusieurs chimiokines. On note tout de même quelques couples uniques, notamment CXCR4 et CXCL12; CXCR5 et CXCL13; CXCR6 et CXCL16; CX3CR1 et CX3CL1; CCR8 et CCL1; CCR9 et CCL25

(Tiré de Houshmand et Zlotnik, 2003)

1.2.2. Caractéristiques des récepteurs de chimiokines

La séquence primaire des récepteurs de chimiokines présente 25 à 80 % d'identité de séquence en acides aminés, suggérant un ancêtre commun. Même si ces récepteurs possèdent des caractéristiques communes, on ne leur connaît pas de réelle signature. Néanmoins, ils ont en commun :

- Une séquence primaire de longueur comprise entre 340 et 370 acides aminés.
- Un segment amino-terminal constitué de résidus acides.
- La présence d'une séquence relativement conservée dans la deuxième boucle intracellulaire DRYLAIVHA (ce motif peut présenter de légères variations).
- Une troisième boucle intracellulaire courte et basique
- Une cystéine dans chacun des quatre domaines extracellulaires

La structure des récepteurs de chimiokines n'est pas connue, mais dans la mesure où ces récepteurs appartiennent à la même famille que la rhodopsine, celle-ci est communément utilisée comme modèle d'étude. Néanmoins, cette structure ne sert de modèle qu'en ce qui concerne les segments transmembranaires, et tout ce qui est avancé en matière d'organisation des boucles n'est que pure spéculation (Murphy *et al.*, 2000).

1.2.3. Signalisation des récepteurs de chimiokines

En réponse à la liaison de l'agoniste, les récepteurs de chimiokines interagissent avec les protéines *G* hétérotrimériques et il semblerait que la dimérisation des récepteurs soit importante pour la transduction du signal (Vila-Coro *et al.*, 1999 ; Rodriguez-Frade *et al.*, 2004 ; Springael *et al.*, 2005). Les récepteurs de chimiokines sont souvent donnés en exemple de RCPG qui interagissent avec les protéines *G* de la famille $\alpha_{i/o}$ (Baggiolini *et al.*, 1997 ; Murphy *et al.*, 2000). Néanmoins, on recense plusieurs exemples pour lesquels d'autres types d'interactions ont été observées. Les récepteurs CC pour RANTES, MIP-1 α et MCP-1 semblent pouvoir se coupler aux protéines *G* de la famille α_s et α_q (Maghazachi et Al-Aoukaty, 1998). Les cellules de la microglie exprimant CXCR4 enregistrent une mobilisation de calcium intracellulaire en réponse à la liaison de SDF-1. Cette mobilisation de calcium est totalement inhibée par la toxine pertussique. A l'inverse, dans les astrocytes, cet effet n'est que partiellement inhibé par cette toxine, suggérant que CXCR4 est couplé à une autre classe de protéines *G*.

Néanmoins et toutes exceptions mises à part, la littérature montre que les chimiokines peuvent activer la plupart des voies de signalisation liées aux RCPG déjà mentionnées dans le chapitre 1. De par leur couplage aux protéines de la famille G_i , on observe bien entendu une baisse d'AMPc lié à l'inhibition de l'adénylate cyclase (Murphy *et al.*, 2000). D'autres voies de signalisation ont été mises en évidence et sont schématisées sur la figure 1.

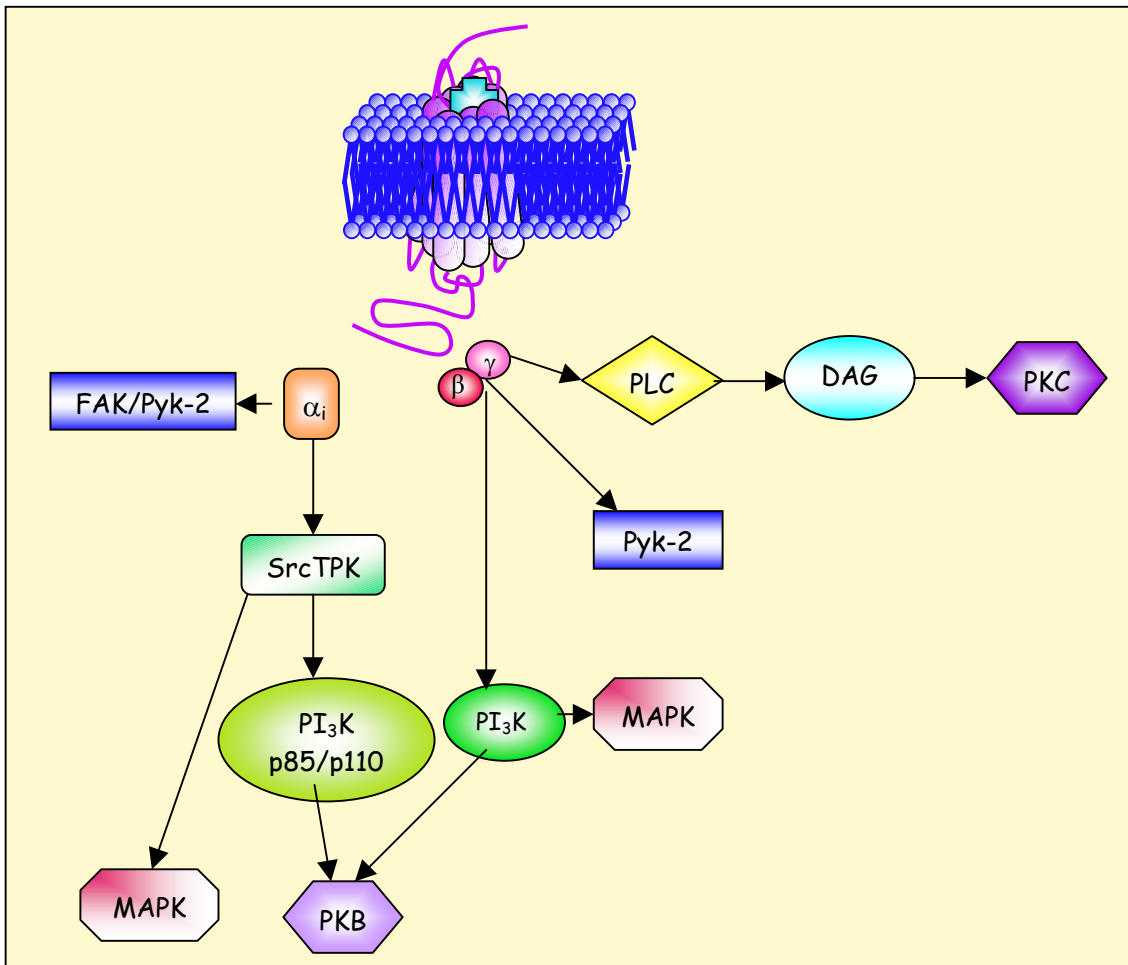


Figure 1 : Principales voies de signalisation induites par la liaison des chimiokines sur leurs récepteurs

PLC : PhosphoLipase C ; PKC : Protéine Kinase C ; PKB : Protéine Kinase B ; MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase ; FAK : Focal Adhesion Kinase p125 ; PI₃K : PI₃ Kinase ; DAG : DiAcylGlycérol ; IP₃ : Inositol 1,4,5-triphosphate ;

(Tiré de Thelen, 2001)

1.3. Implications des chimiokines et de leurs récepteurs en santé humaine

L'existence d'environ 50 ligands et 18 récepteurs dans le système chimiokine indique la complexité de la relation entre ces ligands et leurs récepteurs. La redondance et la promiscuité des liaisons sont un phénomène bien connu dans les cas des chimiokines inflammatoires avec une chimiokine se liant sur plusieurs récepteurs et un récepteur liant plusieurs chimiokines.

Un nouveau degré de complexité est apparu avec la découverte de chimiokines pouvant également jouer le rôle d'antagoniste. Par exemple l'éotaxine est un agoniste pour CCR3 et CCR5 mais un antagoniste de CCR2.

La complexité du système chimiokine, déterminée par les modifications post-traductionnelles et le recouvrement des spectres d'action rend ce système particulièrement attractif en matière de recherche médicale. Les premières indications thérapeutiques de ce système viennent de résultats obtenus sur des modèles de souris knocked-out. Néanmoins, ces résultats se doivent d'être modérés. En effet, les chimiokines et leurs récepteurs sont impliqués dans l'hématopoïèse et le développement, et de ce fait des résultats obtenus sur des souris knocked-out ne sont pas le reflet exact de la vérité. Ces modèles ne sont utilisables que pour une première approche et doivent être validés *in vivo*.

De façon certaine, le rôle des chimiokines et de leurs récepteurs a été mis en évidence chez l'homme dans certaines maladies infectieuses ou virales, ces récepteurs pouvant être utilisés par des facteurs pathogènes pour infecter les cellules et permettre ainsi la multiplication et la transmission de l'agent infectieux. Par exemple, CCR5 et CXCR4 sont impliqués dans l'infection par le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine), Duffy semble impliqué dans une forme de malaria causée par *Plasmodium vivax*. Comme mentionné dans le chapitre 1, on a également identifié des virus de la famille des *Poxviridae* et des *Herpesviridae* qui codent pour des analogues de récepteurs de chimiokines (pour revue Houshmand et Zlotnik, 2003).

Récepteur	Expression	Fonction présumée	Indication thérapeutique
CCR1	N, M, MΦ, T, B, Eo, Ba, P, IDC, MeC	Réponse Th1	Sclérose en plaques, polyarthrite rhumatoïde, rejet de greffe, myocardite virale
CCR2	M, MΦ, T, Ba, NK, IDC, End, F	Inflammation	Sclérose en plaques, arthrite, asthme, glomerulonéphrite, athérosclérose
CCR3	Th2, Eo, Ba, MC, P, DC	Réponse Th2	Asthme, dermatite de contact
CCR4	Th2, Ba, P, IDC	Réponse Th2	Septicité, asthme, dermatite de contact
CCR5	M, MΦ, Th1, NK, Thy, DC, ASMC	Réponse Th1	Sclérose en plaques, polyarthrite rhumatoïde, inflammation intestinale, rejet de greffe, infection à VIH
CCR6	M, MΦ, T, B, IDC	Fonction des DC	Psoriasis
CCR7	T, B, DC	Migration des L et des DC vers les noeuds lymphoïdes	Cancer
CCR8	N, M, T, B, Thy	Réponse Th2	Dermatite atopique, asthme,
CCR9	T, Thy	Trafic des L (thymus et intestin)	Inflammation intestinale, Maladie de Crohn
CCR10	T, Mel, DerEnd, DerFib, Lang	Trafic des L (peau et colon)	Inflammation de la peau, colites ulcéreuses
CXCR1	N, MΦ, T, M, DC, Ast, End	Recrutement des N	Lésion dans la reperfusion des poumons, goutte, psoriasis, cancer
CXCR2	N, MΦ, T, M, DC, Eo, End	Recrutement des N et angiogenèse	Lésion dans la reperfusion des poumons, goutte, psoriasis, cancer, athérosclérose
CXCR3	N, Th1, B, DC, Eo, P, MeC, SMC	Réponse Th1	Sclérose en plaques, polyarthrite rhumatoïde, sarcoïdose, rejet de greffe, cancer
CXCR4	N, M, MΦ, T, B, DC, P, Ast	Organogenèse	Infection à VIH, cancer
CXCR5	M, MΦ, T, B, Ast, Neuron	Migration des cellules B	ND
CXCR6	T, DC	inconnue	ND
CX3CR1	N, M, MΦ, Neuron	Adhésion cellulaire	Rejet de greffe, glomérulonéphrite, inflammation du SNC
XCR1	T	inconnue	ND

Tableau 3 : Récepteurs de chimiokines et maladies humaines associées

Abréviations : B : cellules B ; Ba : basophiles ; (I)DC : (immatures) cellules dendritiques ; Eo : éosinophiles ; M : monocytes ; MC : mastocytes ; MΦ : macrophages ; N : neutrophiles ; NK : cellules natural killer ; P : plaquettes ; T : lymphocytes T ; Th : lymphocyte T helper ; MeC : cellules mésangiales ; End : endothélium ; F : fibroblastes ; ASMC : Aortic Smooth Muscle Cell ; Thy : thymocytes ; Ast : astrocytes ; Mel : mélanocytes ; DerEnd : dermal endothelium ; DerFib : dermal fibroblast ; Lang ; cellules de Langherhans ; SMC : Smooth Muscle Cell
 VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine ; SNC : système nerveux central
 ND : non déterminé ; Maladies : consulter le glossaire

(Tiré de Onuffer et Horuk, 2002)

Des antagonistes de ces récepteurs présentent donc un potentiel thérapeutique énorme au vu des maladies dans lesquelles ils semblent jouer un rôle. Ceci explique l'intérêt que portent les industries pharmaceutiques et les laboratoires académiques à l'étude de ces récepteurs.

Actuellement deux problèmes majeurs se posent quant à la recherche de ces antagonistes :

- D'une part, ils sont tous dessinés en utilisant comme modèle la structure tridimensionnelle de la rhodopsine. On observe donc fréquemment des problèmes d'activité croisée de ces antagonistes sur d'autres récepteurs de la famille 1. Par exemple, l'inhibiteur de CCR5 Sch-350634 développé par la société Schering-Plough

interagit également sur les récepteurs muscariniques de l'acétylcholine (Tagat *et al.*, 2001), ou encore les inhibiteurs de CCR2 dérivés de spiropipéridines développés par Roche se lient à la fois sur les récepteurs α 1-adrénérgiques mais aussi sur les récepteurs sérotoninergiques 5HT-1A (Mirzadegan *et al.*, 2000). La sélectivité très limitée de ces antagonistes pose des problèmes quant à leur potentiel thérapeutique. Il faudrait mieux connaître le site de liaison des ligands et le type d'interactions mises en jeu pour identifier les parties de la molécule sur lesquelles il serait possible de travailler pour la rendre plus sélective. Des études de mutagenèse dirigée ainsi que l'obtention de la structure tridimensionnelle du récepteur avec le ligand pourraient donner ces informations.

- Le deuxième problème auquel se heurte la recherche sur les récepteurs de chimiokines résulte du manque de modèles animaux. D'une part, l'espèce humaine est celle qui présente la plus large variété de chimiokines et de récepteurs correspondant ; d'autre part, le profil d'expression de ces protéines est très différent entre l'homme et les rongeurs. Enfin, la spécificité entre les chimiokines et leurs récepteurs n'est pas la même entre l'homme et la souris. D'où la nécessité de passer par un animal dans lequel le récepteur endogène est totalement supprimé et remplacé par le récepteur humain, et l'établissement de lignées de souris knocked-out.

Conclusions

Les récepteurs de chimiokines représentent donc une cible de choix dans le domaine de la santé, d'où l'intérêt croissant porté par les industries pharmaceutiques et par les laboratoires académiques à l'étude de ces protéines.

Les principales applications d'antagonistes de ces récepteurs seraient l'inflammation (CXCR1, CXCR2, CCR1, CCR2, CCR3 et CCR5), les maladies autoimmunes (CCR1 et CCR2), les processus d'immunorégulation (CCR5, CXCR3, CCR3, CCR4 et CCR8), le cancer (CXCR4 et CCR7) mais aussi et surtout le traitement de certaines maladies infectieuses, notamment dans le cadre du traitement de l'infection à VIH, qui est un énorme problème de santé mondiale (revue potentiel thérapeutique des chimiokines Ribeiro et Horuk, 2005).

Dans ce cadre, des inhibiteurs de CCR5 et CXCR4 seraient une solution éventuelle au traitement de l'infection à VIH.

2. Le récepteur CCR5

2.1. Les chimiokines ligands de CCR5

Les ligands de CCR5 sont des chimiokines de type CC qui sont responsables du chimiotactisme des monocytes, des lymphocytes et des éosinophiles. On trouve

principalement RANTES, MIP-1 α , et MIP-1 β . Il existe des ligands additionnels comme MCP-1, MCP-2, MCP-4 et l'éotaxine, ainsi que MCP-3, mais qui est de façon exceptionnelle un antagoniste (Blanpain *et al.*, 1999c).

La gp120, glycoprotéine de surface du VIH-1 est également considérée comme un ligand de CCR5, mais cet aspect sera discuté dans le chapitre 3.

2.1.1. RANTES

RANTES (Regulated Upon Activation Normal T Cell Expressed and Secreted) ou CCL5 est une petite protéine de 8 kDa, ayant une séquence de 68 acides aminés qui appartient à la famille des chimiokines de type CC et qui se lie spécifiquement à quatre récepteurs : CCR1, CCR3, CCR4 et CCR5. Cette chimiokine est inductible par des agents mitogènes dans plusieurs variétés de cellules T et de lymphocytes circulants, d'où son nom.

Elle est impliquée dans le trafic des cellules lymphoïdes classiques comme les cellules T ou les monocytes. Elle agit aussi sur les basophiles, les éosinophiles, les cellules NK et les cellules dendritiques. RANTES est produite principalement par les cellules T CD8+, les cellules épithéliales, les fibroblastes et les plaquettes durant l'inflammation. Une augmentation de l'expression de RANTES a été associée à de nombreuses pathologies et désordres de l'inflammation comme l'athérosclérose, l'arthrite, le rejet de greffes et l'asthme. Dans toutes ces pathologies, RANTES agit en favorisant l'infiltration des leucocytes sur le site de l'inflammation (Appay et Rowland-Jones, 2001).

La structure de RANTES a été résolue en 1995 et montre un repliement typique des chimiokines. Chaque monomère se compose d'un feuillet de trois brins antiparallèles. Ces brins comptent respectivement 26 à 30, 38 à 46 et 48 à 51 résidus. L'extrémité amino-terminale est désordonnée. L'extrémité carboxy-terminale (résidus 56 à 68) forme une hélice. On trouve deux pont disulfures entre les cystéines 10 et 34, et 11 et 50. A forte concentration, RANTES s'associe en dimère impliquant une interaction entre les résidus 8 et 10 de chaque monomère (Skelton *et al.*, 1995).



Figure 2 : Structure cristallographique du dimère de RANTES
(D'après Skelton *et al.*, 1995)

2.1.2. MIP-1

Les protéines MIP-1 (Macrophage Inflammatory Protein) α , β , γ , respectivement CCL3, 4 et 9 chez l'homme sont des activateurs des récepteurs des chimiokines de la famille CC, principalement CCR1, CCR3 et CCR5. Ce sont de petites protéines appartenant à la famille des CC chimiokines, de poids moléculaire compris entre 8 et 10 kDa, ayant une activité pro-inflammatoire.

Chez l'homme, les ligands de CCR5 sont MIP-1 α /LD78 α (CCL3) et MIP-1 β (CCL4). Ces protéines sont synthétisées sous la forme d'un précurseur de 92 acides aminés qui est ensuite clivé sous l'action de peptidases pour générer une protéine mature de 69-70 acides aminés. On connaît des variants de ces deux protéines CCL3L1/MIP-1 α /LD78 β et CCL15/MIP-1 δ .

Les gènes codant pour ces protéines existent dans la plupart des cellules hématopoïétiques matures. Les macrophages, les lymphocytes (T et B), les cellules dendritiques, les mastocytes et les cellules NK, qui sont directement impliquées dans la réponse immunitaire sont capables de produire de forte quantité de ces protéines, de l'ordre de plusieurs nanogrammes par million de cellules. D'autres cellules comme les plaquettes, les ostéoblastes, les astrocytes et les cellules de la microglie ont la capacité de produire des quantités moindres de CCL3/4 en réponse à une stimulation.

Les protéines de la famille MIP engendrent une forte réponse inflammatoire chronique sur les sites d'une infection ou d'une inflammation, principalement en recrutant les cellules pro-inflammatoires. Elles sont indispensables au chimiotactisme des lymphocytes T depuis le sang vers le locus de l'inflammation et jouent également un rôle

important dans la régulation de la migration des monocytes, des cellules dendritiques et des cellules NK. Elles peuvent aussi réguler les réponses immunitaires en modulant la différenciation des lymphocytes Th (Maurer et von Stebut, 2004).



Figure 3 : Structure cristallographique du dimère de MIP-1 β
(D'après Lodi *et al.*, 1994)

2.2. Généralités

2.2.1. Clonage

Le gène codant pour CCR5 a été cloné en 1996 (Combadiere *et al.*, 1996 ; Raport *et al.*, 1996 ; Samson *et al.*, 1996). La phase ouverte de lecture est composée d'un seul exon. La séquence primaire de CCR5 se compose de 352 acides aminés, ce qui correspond à un poids moléculaire calculé de 40.6 kDa. Le gène codant pour CCR5 est porté par le chromosome 3p21. De nombreux variants non fonctionnels de CCR5 ont été identifiés (Ansari-Lari *et al.*, 1997 ; Carrington *et al.*, 1997).

2.2.2. Fonction et expression

CCR5 est exprimé par des nombreux types cellulaires, tels les cellules dendritiques immatures, les monocytes et macrophages, les lymphocytes T (mémoire ou Th1) ou encore les cellules de Langerhans, mais aussi les fibroblastes ou les cellules épithéliales (Blanpain *et al.*, 2002a). On retrouve également ce récepteur au niveau des organes lymphoïdes primaires et secondaires. Dans le système nerveux central, CCR5 est exprimé sur les neurones, les astrocytes et par les cellules de la microglie. Dans d'autres tissus, CCR5 est exprimé au niveau de l'épithélium, de l'endothélium, du muscle lisse ou des fibroblastes.

2.2.3. Knocked-out

Le rôle de CCR5 *in vivo* est assez mal compris. Des études sur des souris déficientes en CCR5 montrent des faibles déficits dans la réponse immunitaire et chez l'homme les personnes déficientes en CCR5 ne présentent pas de sensibilité accrue à l'infection par VIH (Zhou *et al.*, 1998 ; Sato *et al.*, 1999 ; Andres *et al.*, 2000).

2.3. Structure tridimensionnelle et site de fixation du ligand

A l'heure actuelle, aucune structure tridimensionnelle de récepteurs de chimiokines n'est disponible. Comme c'est le cas pour tous les récepteurs couplés aux protéines G, la difficulté principale résulte dans l'obtention de cristaux. On recense cependant quelques protocoles de purification de CCR5 qui préservent la liaison du ligand (Mirzabekov *et al.*, 1999 ; Stenlund *et al.*, 2003).

2.3.1. Caractéristiques structurales

L'analyse de séquence de CCR5 montre que ce récepteur possède les caractéristiques des récepteurs des chimiokines. On retrouve notamment :

- Des résidus cystéines dans les domaines extracellulaires formant des ponts disulfures qui semblent être impliqués dans la stabilisation du récepteur.
- Le motif DRYLAVHA de la deuxième boucle intracellulaire qui semble impliqué dans le couplage aux protéines G hétérotrimériques.
- Une courte boucle i3 enrichie en résidus chargés positivement.

Même si aucune structure tridimensionnelle n'est disponible actuellement, l'organisation des domaines transmembranaires peut néanmoins être modélisée par des méthodes informatiques en utilisant comme base la structure de la rhodopsine (Dragic *et al.*, 2000 ; Govaerts *et al.*, 2003). Les premières études ont permis de montrer que le motif TXP du deuxième segment transmembranaire est un déterminant structural impliqué dans l'activation du récepteur. La proline semble imposer un coude à l'hélice et cet effet est amplifié par la thréonine qui accentue cette déformation. Une mutation de la proline diminue à la fois la liaison du ligand et la réponse du récepteur (Govaerts *et al.*, 2001), alors qu'une mutation de la thréonine n'affecte pas la liaison mais semble modifier la réponse en rendant le récepteur constitutivement actif (Arias *et al.*, 2003).

2.3.2. Site de liaison des ligands

De façon simplifiée, l'activation du récepteur en réponse à la liaison du ligand peut être décrite suivant un modèle à deux étapes.

Dans un premier temps, le cœur de la chimiokine interagit avec le domaine amino-terminal exposé du récepteur ainsi qu'avec la boucle e2, cette deuxième interaction conférant la spécificité de ligand (Samson *et al.*, 1997). Le domaine amino-terminal et la boucle e2 contribuent à la reconnaissance de la chimiokine en interagissant avec la région amino-terminale et la région située proche du premier brin β de la chimiokine (Zhou *et al.*, 2000). Le domaine amino-terminal libre de la chimiokine interagit ensuite avec la poche formée par les domaines transmembranaires, ce qui déclenche l'activation du ligand (Govaerts *et al.*, 2001 ; Blanpain *et al.*, 2003 ; Govaerts *et al.*, 2003). Des chimiokines tronquées de leur domaine amino-terminal montrent une profonde réduction de l'activité biologique mais conservent leur capacité de liaison au récepteur.

Néanmoins, une chimiokine donnée semble nécessiter différents éléments structurels pour la liaison et l'activation du ligand (Navenot *et al.*, 2001). En effet, certaines mutations du domaine extracellulaire de CCR5 (E172A, R168A, K191A et D276A) affectent fortement la liaison de MIP-1 α mais ont peu d'effet sur la liaison de RANTES. Une chimère contenant l'extrémité amino-terminale de MIP-1 α et le cœur de RANTES se lie à ces mutants avec une affinité similaire à celle de RANTES. Des mutants des domaines transmembranaires de CCR5 affectant les hélices 2 et 3 (L104F, L104F/F109H/F112Y, F85L/L104F) réduisent de 10 à 100 fois la capacité de MIP-1 α à activer le récepteur, mais cet effet n'est pas observé avec RANTES. Néanmoins, la chimère MIP-1 α /RANTES active ces mutants avec une efficacité comparable à celle de MIP-1 α . A l'inverse, le variant d'épissage de MIP-1, LD78 β qui contient une proline en position 2 tout comme RANTES active ces mutants de la même façon que RANTES. Ces résultats suggèrent que le cœur des chimiokines MIP-1 α et RANTES se lie à différents résidus de CCR5 dans le domaine extracellulaire, alors que le domaine amino-terminal des chimiokines induit l'activation du récepteur en se liant dans la région transmembranaire du récepteur (Blanpain *et al.*, 2003).

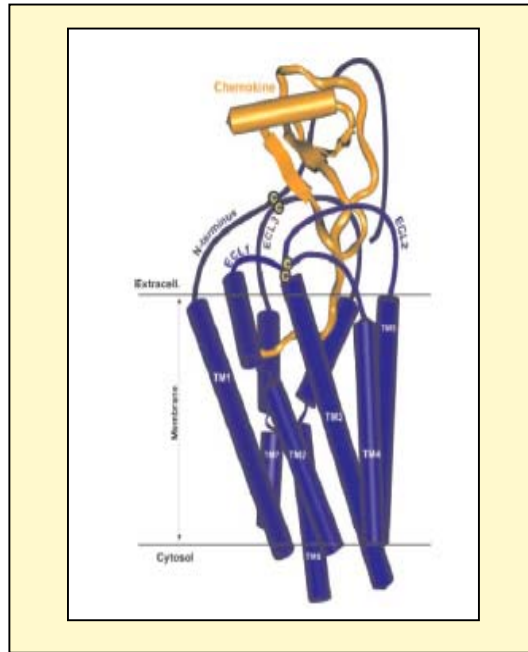


Figure 4 : Schéma d'interaction entre CCR5 et ses ligands

Le récepteur est représenté en bleu, les hélices transmembranaires étant symbolisées par des tubes solides. La chimiokine est représentée en orange, l'hélice carboxy-terminale étant symbolisée par un tube et le feuillet par des rubans. Le cœur de la chimiokine interagit avec les domaines extracellulaires, notamment le domaine amino-terminal et la deuxième partie de la deuxième boucle extracellulaire. La portion amino-terminale du ligand interagit elle plus spécifiquement avec des résidus situés dans la région transmembranaire du récepteur ce qui aboutit à l'activation du récepteur.

(Tiré de Blanpain *et al.*, 2003)

2.3.3. Rôle des glycosaminoglycanes

Il semblerait que les glycosaminoglycanes (GAGs) jouent également un rôle dans la liaison et/ou dans la modulation de la signalisation induite par les chimiokines sur CCR5 (Laurence *et al.*, 2001 ; Lortat-Jacob *et al.*, 2002). Les GAGs sont très abondants à la surface des cellules endothéliales. Ils servent de point d'ancrage aux chimiokines le long de la paroi vasculaire, les préservant de l'entraînement par le flux sanguin. Ils auraient aussi un rôle de présentation des chimiokines à leur récepteur.

RANTES se lie préférentiellement aux GAGs comme l'héparine (Martin *et al.*, 2001), ce qui entraîne l'oligomérisation de la chimiokine et l'augmentation de sa concentration locale. Des GAGs à la surface des cellules ne sont nécessaires ni pour la liaison de RANTES à CCR5, ni pour la signalisation, cependant des GAGs solubles peuvent inhiber la liaison de RANTES à CCR5 et la réponse fonctionnelle. Il semblerait que les GAGs permettent d'augmenter l'activité de faibles concentrations de RANTES par un mécanisme de séquestration du ligand à la surface cellulaire (Ali *et al.*, 2000). La structure de RANTES a récemment été obtenue en présence de GAGs. Cette structure montre que le motif BBXB (B pour résidu Basique) de RANTES dans la boucle 40s est important pour la liaison aux GAGs, notamment l'héparine, mais que d'autres résidus de

la boucle 30s et de l'extrémité amino-terminale sont également impliqués dans cette interaction (Shaw *et al.*, 2004).

2.4. Ponts disulfures

CCR5 possède le pont disulfure entre une cystéine de la seconde boucle extracellulaire et une cystéine du troisième TM qui constitue la signature des RCPG. De plus, les récepteurs de chimiokines présentent tous deux résidus cystéine supplémentaires hautement conservés qui semblent former un pont disulfure entre le domaine amino-terminal et la boucle e3. Ces deux ponts disulfures semblent imposer une contrainte structurale aux domaines extracellulaires du récepteur et stabiliser ainsi le récepteur dans une conformation capable de lier les ligands. La mutation en alanine de n'importe laquelle des cystéines extracellulaires résulte en une expression à la surface réduite de 40 à 70 %. Un mutant pour lequel les quatre cystéines sont mutées perd sa capacité à lier ses ligands naturels et ne répond plus aux antagonistes. Par contre un tel mutant est toujours capable de jouer le rôle de co-récepteur du VIH, avec tout de même une perte d'efficacité. Il semblerait donc que les ponts disulfures soient nécessaires pour maintenir une intégrité structurale du récepteur fondamentale à la liaison des ligands, alors que la liaison des glycoprotéines d'enveloppe est moins sensible à ces altérations de la conformation de CCR5 (Blanpain *et al.*, 1999b).

2.5. Modifications post-traductionnelles de l'extrémité amino-terminale

Le domaine amino-terminal de CCR5 contribue à la liaison des chimiokines avec une haute affinité, mais joue aussi un rôle crucial pour l'activité co-récepteur du VIH (Blanpain *et al.*, 1999a ; Dragic, 2001). CCR5 possède dans son domaine amino-terminal plusieurs résidus tyrosine adjacents à des acides aminés acides (Farzan *et al.*, 1999). Ces tyrosines, au moins une partie d'entre elles, sont sulfatées, ce qui confère à cette région des charges négatives supplémentaires et contribue à augmenter significativement la capacité de CCR5 à interagir physiquement avec ses ligands naturels et avec la gp120 (Blanpain *et al.*, 2002a). On ne connaît pas le nombre exact de tyrosines sulfatées dans le domaine amino-terminal, néanmoins seuls des peptides contenant au moins deux tyrosines sulfatées Tyr¹⁰ et Tyr¹⁴ sont capables de se substituer à l'extrémité amino-terminale dans les expériences de liaison de glycoprotéines de surface du VIH, alors que les tyrosines 3 et 15 semblent moins importantes (Cormier *et al.*, 2000 ; Farzan *et al.*, 2002b). L'absence de sulfatation ne modifie pas la capacité du récepteur à s'exprimer à la surface cellulaire, mais perturbe la liaison des ligands. Les

résidus acides en position 11 et 18 participent également à l'interaction entre CCR5 et des résidus conservés de la gp120 (Cormier *et al.*, 2001).

L'extrémité amino-terminale de CCR5 peut aussi être modifiée par les O-glycosylations principalement sur la Ser⁶ (Farzan *et al.*, 1999 ; Bannert *et al.*, 2001). La suppression des peptides liés par ce mécanisme de O-glycosylation interrompt la liaison de la chimiokine, mais ne semble pas affecter particulièrement l'infection par VIH. On trouve un deuxième site putatif de O-glycosylation sur la boucle e3, mais cette modification post-traductionnelle n'a jamais été observée sur CCR5. Il semblerait que ce site ne soit pas accessible à modification puisqu'il se situe à la proximité directe d'une cystéine impliquée dans la formation d'un pont disulfure.

2.6. Palmitoylation et localisation dans les radeaux lipidiques

L'extrémité carboxy-terminale de CCR5 contient plusieurs motifs structuraux impliqués dans la fonction du récepteur et son expression à la membrane. Plusieurs récepteurs de chimiokines, dont CCR5 possèdent une ou plusieurs cystéines susceptibles d'être palmitoylées dans la région carboxy-terminale. Aucune séquence consensus pour la palmitoylation des protéines n'est connue, mais il semblerait que les groupements d'acides aminés hydrophobes et chargés positivement qui sont en général localisés dans l'extrémité carboxy-terminale et proches de la membrane sont trouvés dans beaucoup de protéines palmitoylées. Dans le cas de CCR5, les trois cystéines sont palmitoylées en position 321, 323 et 324 (Blanpain *et al.*, 2001 ; Percherancier *et al.*, 2001). Il semblerait que cette modification permette d'ancrer la queue carboxy-terminale dans la membrane, créant ainsi une quatrième boucle intracellulaire. Un mutant non palmitoylé s'exprime moins bien à la membrane, mais ne perd pas sa capacité à lier les chimiokines (Blanpain *et al.*, 2001 ; Percherancier *et al.*, 2001). Même si on sait que la palmitoylation est un processus réversible augmenté suite à une stimulation par un agoniste dans le cas d'autres RCPG (Jin *et al.*, 1999), aucun résultat ne semble aller dans ce sens en ce qui concerne CCR5 (Kraft *et al.*, 2001).

La palmitoylation facilite le transport du récepteur à la membrane ainsi que l'endocytose médiée par l'agoniste, affecte l'habilité de couplage du récepteur aux voies de signalisation et semble nécessaire à la phosphorylation du récepteur médiée soit par les GRKs soit par la PKC (Blanpain *et al.*, 2001 ; Kraft *et al.*, 2001 ; Percherancier *et al.*, 2001). Les récepteurs non acylés qui échappent à la dégradation et arrivent à regagner la surface cellulaire perdent de leur capacité à signaler mais leur fonction de co-récepteur du VIH reste intacte (Blanpain *et al.*, 2001 ; Percherancier *et al.*, 2001). On ne sait pas par quel mécanisme l'acylation du récepteur contribue à moduler sa fonction, mais il est concevable de penser que la contrainte imposée à l'extrémité carboxy-

terminale par la palmitoylation facilite l'accès aux protéines G et aux protéines kinases. La palmitoylation pourrait aussi jouer un rôle dans l'adressage du récepteur aux rafts. Des mutants de ces cystéines ne semblent pas être localisés dans les rafts et sont internalisés par la voie des puits recouverts de clathrine (Venkatesan *et al.*, 2003).

La localisation des récepteurs couplés aux protéines G dans les radeaux lipidiques (rafts) est un sujet hautement controversé et les résultats obtenus à ce sujet sont en général contradictoires. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer les différentes observations :

- Les techniques utilisées sont souvent extrêmes et peuvent générer de gros artéfacts, notamment la déplétion des membranes en cholestérol par les cyclodextrines. A ce sujet, on peut également ajouter que le cholestérol ne se localise pas exclusivement dans les rafts.
- Les différentes observations peuvent également venir du fait que les méthodes d'isolement des rafts ne sont pas assez sélectives.
- Enfin les résultats sont souvent obtenus dans des systèmes de surexpression ce qui peut générer une localisation artéfactuelle du récepteur dans les rafts.

Certains groupes ont montré que la localisation de CCR5 dans les rafts semble être impliquée dans les processus d'entrée du VIH, et dans la formation de plateformes de signalisation pour la cellule (Manes *et al.*, 1999 ; Popik *et al.*, 2002 ; Gomez-Mouton *et al.*, 2004 ; Nguyen *et al.*, 2005).

D'autres équipes ont montré que CCR5 ne semble pas être localisé préférentiellement dans les rafts en dépit de la palmitoylation des résidus cystéines du domaine carboxy-terminal.

Néanmoins, l'absence de palmitoylation n'influe ni sur la capacité d'infection par VIH, ni sur la capacité à migrer des cellules (Blanpain *et al.*, 2001 ; Kraft *et al.*, 2001 ; Percherancier *et al.*, 2001). Le CD4 semble être localisé dans les rafts lorsqu'il est palmitoylé. L'exclusion de CD4 des rafts n'empêche pas l'infection à VIH. Par contre, la déplétion des membranes en cholestérol empêche l'infection par VIH. Le cholestérol pourrait jouer un rôle soit dans la fusion soit dans la conformation du récepteur (Percherancier *et al.*, 2003). L'altération de la membrane en cholestérol perturbe non seulement les radeaux lipidiques, mais modifie également la conformation et les propriétés de liaison de CCR5 (Nguyen et Taub, 2002a).

2.7. Oligomérisation

Le sujet de l'oligomérisation des RCPG est également très controversé, comme le montre une correspondance très récente à ce sujet (Lemay *et al.*, 2005). Des études récentes ont montré que CCR5 semble former des homo- et des hétérodimères. Des résultats contradictoires ont été obtenus quant au fait que CCR5 forme soit des dimères constitutifs ou alors des structures dynamiques modulées par les agonistes. Certains groupes suggèrent que la dimérisation de CCR5 se produit en réponse à la liaison du ligand. Les auteurs avancent également que ce processus semble jouer un rôle crucial et initiateur à la signalisation induite par les chimiokines (Rodriguez-Frade *et al.*, 2001). Dans le cas de CCR5, il a par ailleurs été suggéré que la dimérisation induite par un anticorps et/ou par les chimiokines aurait un effet préventif pour l'infection à VIH (Vila-Coro *et al.*, 2000 ; Rodriguez-Frade *et al.*, 2004).

A l'inverse d'autres groupes ont montré que la dimérisation de CCR5 n'est pas liée à la liaison des chimiokines. Des preuves d'une oligomérisation constitutive de CCR5 ont été obtenues en co-immunoprécipitant des récepteurs marqués par différents épitopes, et les résidus formant l'interface de l'oligomérisation ont été identifiés comme étant localisés dans les 58 premiers acides aminés de la région amino-terminale ainsi que dans le premier domaine transmembranaire du récepteur (Benkirane *et al.*, 1997). Un récepteur CCR5 dépourvu de ses 25 premiers acides aminés s'associe avec un récepteur CCR5 sauvage ou avec une chimère humain-souris qui possède le domaine amino-terminal du récepteur humain (Chelli et Alizon, 2002). Ces résultats vont dans le sens de l'oligomérisation constitutive indépendante de l'agoniste qui a été montrée par BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer). Dans cette étude les auteurs ont montré que le signal de BRET n'était pas augmenté suite à la stimulation par une chimiokine et ont obtenu des preuves que les oligomères de CCR5 se forment très tôt au niveau de la biosynthèse dans le réticulum endoplasmique (Blanpain *et al.*, 2002b ; Issafras *et al.*, 2002).

Dans la mesure où ces résultats ont été obtenus en surexprimant CCR5 dans des systèmes d'expression hétérologues, d'autres études ont été menées sur des macrophages et des lymphocytes T humains par microscopie électronique. Le but recherché était de déterminer la distribution subcellulaire du récepteur dans les cellules dans lesquelles il est naturellement exprimé pour mettre un terme au débat disant que les oligomérisations observées en système hétérologues dans lesquels le récepteur est surexprimé ne donnent que des résultats artéfactuels (Singer *et al.*, 2001). CCR5, tout comme CXCR4 et CD4, sont préférentiellement localisés dans des microdomaines des microvillosités, et semblent s'associer par paire. De plus, on a observé un regroupement de CCR5 dans les vésicules de sécrétion du réseau trans-

golgien, ce qui est en accord avec la notion que le récepteur dimérise avant son insertion dans la membrane plasmique.

Il semblerait que les résidus Ile⁵² du TMI et Val¹⁵⁰ du TMIV soient impliqués dans la dimérisation de CCR5 (Hernanz-Falcon *et al.*, 2004), mais ces observations sont contestées par un autre groupe (Lemay *et al.*, 2005). Des mutations de ces deux résidus génèrent des récepteurs non fonctionnels qui n'ont plus la capacité de dimériser ou d'induire une signalisation. Des peptides synthétiques contenant ces résidus bloquent les réponses induites par les ligands de CCR5 (Hernanz-Falcon *et al.*, 2004). De tels peptides peuvent être considérés comme une nouvelle classe d'antagonistes parce qu'ils agissent en évitant la formation d'une conformation active du récepteur. La nature hydrophobe de ces peptides facilite considérablement leur pénétration dans la bicouche membranaire et leur orientation dans la membrane est due à la capacité de docker l'hélice alpha. Cette étude montre que la stabilisation d'une conformation inactive du récepteur est une cible thérapeutique potentielle.

Il semblerait que CCR5 ait également la capacité de former des dimères avec d'autres récepteurs de chimiokines comme CCR2. Ces hétérodimères sont plus aptes à induire des réponses biologiques, illustré par le fait que la concentration en chimiokine requise est 10 à 100 fois plus faible. Cette augmentation est due à une synergie de chaque complexe recruté par chaque récepteur de l'hétérodimère (Mellado *et al.*, 2001 ; El-Asmar *et al.*, 2005). CCR5 forme également des hétérodimères avec des RCPG n'appartenant pas à la famille des récepteurs de chimiokines. On sait notamment que CCR5 forme des hétérodimères avec le récepteur des opiacés de type mu dans les cellules du système nerveux central et dans les cellules immunitaires (Chen *et al.*, 2003 ; Chen *et al.*, 2004a).

2.8. Signalisation et expression

2.8.1. Voies de signalisation

Il est admis de façon générale que les récepteurs de chimiokines sont couplés aux protéines G hétérotrimériques de la famille $G_{\alpha_i/o}$. Néanmoins, ce modèle simplifié et classique ne permet pas d'expliquer certaines fonctions biologiques des récepteurs de chimiokines. Il est donc communément admis que ce sont à la fois les sous-unités α et le dimère $\beta\gamma$ qui interagissent avec les effecteurs. Dans le cas de CCR5, on assiste donc à une inhibition de l'adénylate cyclase *via* la sous-unité α_i , et à une stimulation de la PLC- β par le dimère $\beta\gamma$ d'où une diminution d'AMPC et une production d'IP₃ avec mobilisation du calcium intracellulaire (Aramori *et al.*, 1997 ; Zhao *et al.*, 1998). Alors que la migration cellulaire en réponse à la liaison des chimiokines requiert le couplage du récepteur aux protéines G de la famille G_i , le relargage de la sous-unité $\beta\gamma$ est à l'origine du

chimiotactisme (Neptune et Bourne, 1997). L'activation de la PLC- β par CCR5 résulte en la formation de DAG et en l'activation consécutive de la PKC qui au final participe à la phosphorylation du récepteur (Li *et al.*, 2000). La liaison des ligands endogènes sur CCR5 active la majorité des voies de signalisation déjà décrites dans la première partie de ce chapitre, et je ne détaillerai pas plus ces mécanismes ici. De façon simplifiée, sont notamment activées les kinases de type PI₃ kinases, ou les GTPases de la famille Rho qui coordonnent la réorganisation du cytosquelette d'actine et la polarisation et la motilité cellulaire (Turner *et al.*, 1995 ; Bacon *et al.*, 1998), ou encore les kinases FAK et Pyk2 impliquées dans la motilité cellulaire (Bacon *et al.*, 1996 ; Ganju *et al.*, 1998). Enfin, les ligands de CCR5 activent les trois principaux membres de la famille des MAPkinases (ERK1/2, p38 et SAPK/JNK) qui semblent jouer un rôle critique dans la prolifération des lymphocytes T et dans l'activation transcriptionnelle des gènes codant pour les cytokines (Dairaghi *et al.*, 1998 ; Del Corno *et al.*, 2001 ; Kraft *et al.*, 2001 ; Misse *et al.*, 2001 ; Wong et Fish, 2003).

2.8.2. Phosphorylation

CCR5 est régulé par de multiples processus qui modulent de façon négative la fonction du récepteur et son expression de surface. Ces mécanismes incluent la désensibilisation (les récepteurs deviennent réfractaires à une stimulation continue par l'agoniste), l'internalisation (les récepteurs sont séquestrés dans des compartiments intracellulaires) et le recyclage qui fait suite à la dégradation du récepteur et qui se manifeste par une diminution du nombre de récepteurs à la surface cellulaire.

Alors que les kinases activées par les seconds messagers comme la PKC sont à l'origine de la désensibilisation hétérologue, les GRKs jouent un rôle crucial dans la phosphorylation induite par l'agoniste et dans la désensibilisation homologue. La surexpression de n'importe laquelle des GRKs non visuelles augmente la phosphorylation, la désensibilisation et l'internalisation de CCR5 (Aramori *et al.*, 1997 ; Olbrich *et al.*, 1999). L'inhibition de GRK2 et GRK3 qui sont fortement exprimées dans les leucocytes humains et dans les lignées cellulaires d'origine myéloïde ou lymphoïde abroge la phosphorylation de CCR5, ce qui suggère un rôle fondamental de ces deux kinases dans le processus de phosphorylation de CCR5 (Oppermann *et al.*, 1999).

CCR5 est aussi un substrat de la PKC. La phosphorylation de CCR5 ne se fait que sur des résidus sérine (jamais sur thréonine ou tyrosine) que le processus soit médié par la PKC ou par une GRK. Des expériences de mutagenèse dirigée ont permis de montrer que CCR5 possède quatre sites exclusifs de phosphorylation sur les sérines de l'extrémité carboxy-terminale en position 336, 337, 342 et 349 (Oppermann *et al.*, 1999). Alors que des expériences de phosphorylation réalisées dans des conditions de surexpression des

kinases suggèrent que ces quatre sérines sont phosphorylées, des résultats plus récents obtenus avec des niveaux physiologiques de kinases indiquent que les sites phosphorylés par la PKC ou par les GRKs sont différents. Des anticorps dirigés spécifiquement contre des résidus phosphorylés indiquent que la Ser³³⁷ est exclusivement phosphorylée par la PKC alors que la Ser³⁴⁹ est un site de phosphorylation par les GRKs (Pollok-Kopp *et al.*, 2003).

2.8.3. Interaction avec les arrestines

Les déterminants structuraux qui conditionnent la liaison des β -arrestines sur le récepteur CCR5 activé ont été déterminés en quantifiant la translocation des β -arrestines médiée par RANTES sur des mutants de CCR5, pour lesquels les sérines sont mutées en alanine (Huttenrauch *et al.*, 2002). Cette étude révèle que les mutants de CCR5 qui ont perdu au plus deux sites de phosphorylation maintiennent pleinement leur capacité à recruter les β -arrestines-1 et -2 à la membrane plasmique, alors que la mutation de trois ou quatre sérines abolit la capacité de CCR5 activé à induire la translocation des arrestines. Ceci implique que la liaison des arrestines sur CCR5 nécessite au moins deux sites de phosphorylation intacts, mais la position de ces sites ne semble pas être critique.

Un autre site de liaison des β -arrestines, mais qui est indépendant de la phosphorylation a été identifié sur CCR5 (Huttenrauch *et al.*, 2002). Cette étude révèle la liaison d'une β -arrestine-1 recombinante sur des peptides de synthèse correspondant à la deuxième boucle intracellulaire de CCR5, entourant le motif Arg-Arg-Tyr (DRYbox) qui semble impliqué directement dans l'activation de CCR5 (Gosling *et al.*, 1997). Une autre étude récente confirme l'importance de ce motif DRY, puisque qu'un mutant de ce motif semble interagir constitutivement avec les β -arrestines (Lagane *et al.*, 2005).

La troisième boucle intracellulaire qui est anormalement courte dans la famille des récepteurs de chimiokines (12 à 14 acides aminés) semble être moins importante pour le recrutement des β -arrestines, du moins pour les récepteurs de cette famille. Les β -arrestines jouent un rôle crucial dans tous les mécanismes de régulation des RCPG. Dans le cas de CCR5, la surexpression de mutants fonctionnels ou dominants négatifs d'arrestine influe sur l'endocytose du récepteur (Aramori *et al.*, 1997) et les récepteurs activés par les chimiokines n'internalisent pas dans des fibroblastes de souris déficientes en β -arrestines 1 et 2 (Fraile-Ramos *et al.*, 2003).

En plus de leurs rôles classiques dans les processus de régulation du récepteur, les β -arrestines jouent également un rôle dans la transduction du signal et de protéine d'échafaudage. Néanmoins, les β -arrestines ne semblent pas nécessaires à l'activation des différentes voies MAPkinases en réponse à l'activation du récepteur par RANTES

(Kraft *et al.*, 2001). Par contre, des mutants de CCR5 ayant perdu leur capacité à interagir avec les β -arrestines induisent une réponse calcique modérée mais une augmentation de l'activation de la voie ERK1/2. Des cellules dans lesquelles l'expression de la β -arrestine-2 a été supprimée perdent leur capacité à migrer en réponse à la fixation des chimiokines (Fong *et al.*, 2002 ; Sun *et al.*, 2002). On retrouve un lien similaire entre internalisation du récepteur et chimiotactisme dans des cellules exprimant un récepteur tronqué dans sa partie carboxy-terminale ou dans lequel les sérines constituant les sites putatifs de phosphorylation ont été mutées en alanine (Fan *et al.*, 2001 ; Roland *et al.*, 2003).

2.8.4. Endocytose et recyclage

La notion que CCR5 stimulé par un agoniste est rapidement redistribué dans les endosomes grâce à des mécanismes faisant intervenir la voie des puits recouverts de clathrine est confirmée par des études morphologiques et pharmacologiques, qui ont permis de mettre en évidence la colocalisation des récepteurs internalisés avec des récepteurs de la transferrine, marqueurs des endosomes de recyclage précoces (Signoret *et al.*, 2000 ; Mack *et al.*, 2001 ; Mueller *et al.*, 2002 ; Signoret *et al.*, 2004).

CCR5 a également la capacité d'internaliser par des voies différentes puisque des variants non phosphorylables de CCR5 ont toujours la faculté d'internaliser lentement (Kraft *et al.*, 2001). Dans des cellules déficientes en GRK et en β -arrestine on peut imaginer que CCR5 utilise l'endocytose par la voie des cavéoles, comme le suggèrent les résultats obtenus en présence d'inhibiteurs de l'internalisation par la voie des cavéoles (Mueller *et al.*, 2002). Il a été récemment suggéré que des résidus cystéines palmitoylés dans l'extrémité carboxy-terminale déterminent l'internalisation lente par des voies indépendantes de la clathrine dans des structures vésiculaires contenant des cavéoles (Venkatesan *et al.*, 2003). Une autre étude semble montrer l'importance du motif DRY pour l'endocytose du récepteur (Lagane *et al.*, 2005).

Suite à l'endocytose du récepteur, CCR5 s'accumule dans les endosomes de recyclage et retourne à la membrane sous forme déphosphorylée (Signoret *et al.*, 2000 ; Pollok-Kopp *et al.*, 2003 ; Signoret *et al.*, 2004). Le recyclage ne semble pas nécessiter la dissociation du ligand de son récepteur (Signoret *et al.*, 2000). Le recyclage des récepteurs internalisés est indépendant de la synthèse protéique et dépend uniquement des endosomes primaires (Mueller *et al.*, 2002). CCR5 semble être recyclé sans passer par l'appareil de Golgi.

Ainsi le récepteur peut subir plusieurs cycles d'internalisation et de recyclage jusqu'à ce que le ligand soit dissocié ou dégradé. CCR5 ne colocalise pas avec les endosomes tardifs et les marqueurs des lysosomes (Signoret *et al.*, 2000).

Plusieurs études ont montré que l'internalisation ou la signalisation de CCR5 n'étaient pas nécessaires à la fonction de co-récepteur du VIH. Néanmoins, la déplétion des récepteurs de la surface cellulaire contribue de façon significative à l'effet antiviral des chimiokines pour l'infection à VIH (Amara *et al.*, 1997 ; Mack *et al.*, 1998). Des mutants déficients pour l'internalisation et la phosphorylation présentent une totale activité de co-récepteur, mais l'entrée du virus dans la cellule exprimant de tels mutants est largement résistante à l'effet inhibiteur des chimiokines (Brandt *et al.*, 2002). La conclusion de cette étude montre que 80 % de l'activité antivirale de MIP-1 β peut être attribuée à la capacité de cette chimiokine à séquestrer le récepteur de la surface cellulaire dans les compartiments intracellulaires. Des lignées cellulaires exprimant des mutants de CCR5 déficients pour la phosphorylation et l'internalisation présentent une capacité migratoire normale, ce qui indique que ces deux mécanismes ne sont pas nécessaires aux voies de signalisation aboutissant au chimiotactisme (Kraft *et al.*, 2001).

2.8.5. Régulation hétérologue

Les leucocytes expriment CCR5 ainsi que de nombreux autres récepteurs de chimiokines, et d'autres RCPG. Dans la mesure où ces récepteurs peuvent être sollicités en même temps en réponse à divers médiateurs présents sur le site d'une inflammation, il est logique de penser que des réponses croisées peuvent se produire. Cette régulation croisée de CCR5 semble moduler de façon négative l'activité de co-récepteur du VIH, d'où l'intérêt porté par plusieurs groupes à l'étude du mécanisme de régulation hétérologue de CCR5 (Wang et Oppenheim, 1999). On connaît deux mécanismes impliqués dans la désensibilisation hétérologue des récepteurs de chimiokines : la phosphorylation des récepteurs sur des sites différents de ceux visés par les GRKs et une composante en aval du récepteur qui implique une diminution de l'activation de la PLC- β (Ali *et al.*, 1999).

Néanmoins, il a été montré que la stimulation de cellules exprimant CCR5 et CXCR1 ou CCR5 et FPR/FPRL1 (récepteurs du formyl peptide bactérien chimioattractant) induisait non seulement une phosphorylation croisée et une désensibilisation, mais aussi une internalisation croisée de CCR5 (Li *et al.*, 2000 ; Shen *et al.*, 2000 ; Richardson *et al.*, 2003). Ces effets sont sensibles à une inhibition de la PKC ce qui suggère que la régulation hétérologue de CCR5 est strictement dépendante des kinases activées par les seconds messagers. La stimulation hétérologue de cellules exprimant CCR5 avec soit le formyl peptide ou IL-8 résulte également en une inhibition significative de la fusion de l'enveloppe du VIH-1 et de l'infection virale (Szabo *et al.*, 2003). Néanmoins, la complexité du processus de désensibilisation *in vitro* laisse penser que le processus *in*

vivo est extrêmement plus complexe, ce qui rend cette piste quasiment inexploitable en matière de potentielle thérapie à VIH.

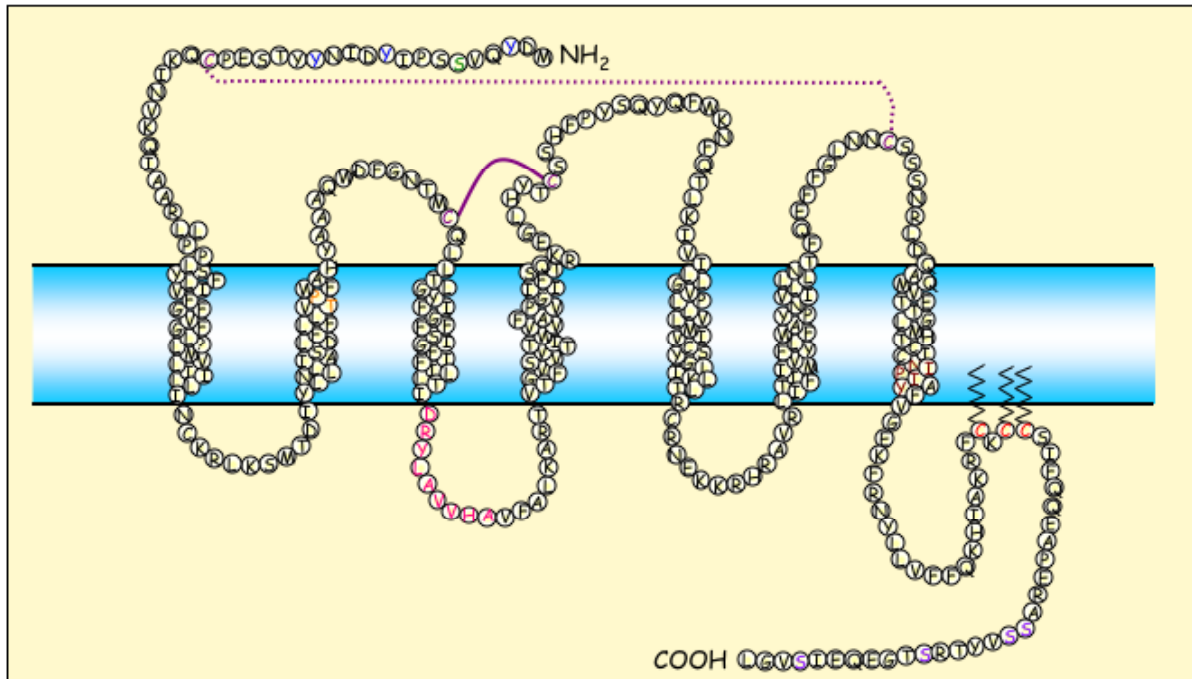


Figure 5 : Topologie en deux dimensions de la séquence du récepteur CCR5 humain

En bleu, les tyrosines représentant des sites potentiels de sulfatation dans l'extrémité amino-terminale. En vert la sérine O-glycosylée dans le domaine amino-terminal. En prune, les cystéines formant des ponts disulfures qui participent à la stabilité du récepteur. En orange, le motif TXP qui impose une angulation de 28 ° dans le deuxième TM. En rose, le motif DRYLAVVHA hautement conservé dans la famille des récepteurs de chimiokines (DRY box). En marron, le motif NPIIY qui semble impliqué dans l'interaction avec les petites protéines G. En rouge, les cystéines palmitoylées qui participent à la formation de la quatrième boucle intracellulaire. En violet, les sérines sites potentiels de phosphorylation par les GRKs et par les kinases activées par les seconds messagers.

(Tiré de Oppermann, 2004)

3. Le récepteur CXCR4

3.1. La chimiokine SDF-1

SDF-1 (Stromal cell-Derived Factor) a été initialement décrit comme un produit sécrété par les cellules de la moelle osseuse (bone marrow stromal cell line, d'où son nom). Contrairement aux chimiokines de type CC qui induisent le recrutement d'un large spectre de leucocytes, les chimiokines de la famille CXC sont cellules spécifiques et activent préférentiellement les neutrophiles et les lymphocytes T, les monocytes et les cellules lympho-hématopoïétiques. Les effets observés sur des cellules précoces suggèrent également un rôle de SDF-1 dans le trafic et le recrutement des lymphocytes et des cellules hématopoïétiques (Bleul *et al.*, 1996b).

Des souris knocked-out pour le gène de SDF-1 sont sévèrement déficientes dans les processus de lymphopoïèse et myélopoïèse. L'interruption du gène codant pour SDF-1 montre que cette chimiokine joue également un rôle dans le développement cardiaque (Nagasawa *et al.*, 1996).

SDF-1 possède quelques caractéristiques remarquables :

- L'expression de la plupart des chimiokines est induite par les cytokines, mais SDF-1 est produite de façon constitutive.

- Chez l'homme, le gène codant pour SDF-1 est localisé sur le chromosome 10, alors que les gènes codant pour toutes les autres chimiokines de type CXC sont portés par le chromosome 4 (Shirozu *et al.*, 1995).

- Le pourcentage d'identité entre les chimiokines humaines et murines avoisine les 69 %, mais SDF-1 est identique entre ces deux espèces, hormis une unique modification en position 18 d'une valine en isoleucine, ce qui suggère un rôle fondamental de SDF-1 au vu de cette conservation à travers l'évolution (Shirozu *et al.*, 1995).

Il existe deux variants d'épissage qui codent pour SDF-1 α (68 résidus) et SDF- β (72 résidus), la différence entre ces deux variants se situant au niveau des 4 résidus de l'extrémité carboxy-terminale. Ces deux protéines sont les deux seuls ligands endogènes connus pour CXCR4.

La structure de SDF-1 est caractéristique de la famille des chimiokines comprenant un feuillet β composé de trois brins antiparallèles (résidus 23 à 31, 35 à 42 et 47 à 51). Cet arrangement en clé grecque se termine avec un domaine carboxy-terminal organisé en hélice α (résidus 56 à 64). Les ponts disulfures relient la boucle amino-terminale au brin β 2 (Cys⁹-Cys³⁴) et au brin β 3 (Cys¹¹-Cys⁵⁰). SDF-1 présente une caractéristique particulière à l'intérieur de la famille des CXC chimiokines au niveau de l'orientation des ponts disulfures qui est identique à celle des chimiokines de la famille CC. Cette différence résulte sans doute de l'existence d'une proline entre les cystéines 9 et 11 (Crump *et al.*, 1997 ; Gozansky *et al.*, 2005).

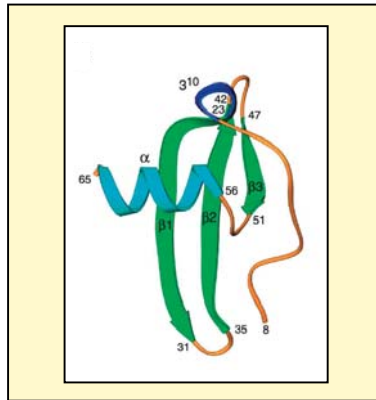


Figure 6 : Structure tridimensionnelle de SDF-1

Les brins β sont représentés en vert, l'hélice α carboxy-terminale en bleu ciel, les boucles 30s, 40s et 50s en marron et la boucle N en bleu foncé.

(Tiré de Gozansky *et al.*, 2005)

3.2. Généralités à propos du récepteur CXCR4

3.2.1. Historique

Si SDF-1 possède des caractéristiques remarquables au sein de la famille des chimiokines, l'histoire du clonage de CXCR4 est tout aussi surprenante. En 1993, Herzog et collaborateurs, lors de recherche sur les récepteurs orphelins, clonent un gène bovin qu'ils identifient comme un récepteur à sept domaines transmembranaires et classent ce récepteur dans la famille des récepteurs du neuropeptide Y en lui donnant le nom de NPY Y3 (Herzog *et al.*, 1993). L'équivalent humain est isolé à partir d'une banque de poumon. La séquence compte 1670 paires de bases et prédit une phase ouverte de lecture de 352 acides aminés.

En 1994, Loetscher et collaborateurs mettent en évidence les similarités entre ce récepteur putatif Y3 et le récepteur de l'interleukine 8 au niveau de la taille mais surtout en ce qui concerne la présence d'un deuxième pont disulfure extracellulaire. Le groupe isole alors un ADNc codant pour une protéine de 352 acides aminés compatible avec la séquence d'un RCPG à partir d'une banque de monocytes de sang humain (Loetscher *et al.*, 1994). Ils dénomment cette protéine LESTR (LEukocyte derived Seven Transmembrane domain Receptor).

En 1996, lorsque Feng et collaborateurs ont entrepris la caractérisation du cofacteur spécifique permettant la fusion et l'infection par VIH ils isolent un ADNc de 1.7 kb, possédant une phase ouverte de lecture de 352 codons prédisant un RCPG : ce récepteur identifié comme le cofacteur permettant la fusion de l'enveloppe du VIH est initialement appelé Fusin (Feng *et al.*, 1996). Enfin, lorsque le rôle protecteur de SDF-1

en matière d'infection à VIH a été mis en évidence (discuté chapitre 3), CXCR4 a été identifié comme étant le récepteur de SDF-1 et reclassé dans la famille des récepteurs de chimiokines.

3.2.2. Gène et expression

Le gène de CXCR4 contient deux exons de 103 et 1563 paires de bases séparés par une séquence intronique de 2132 paires de bases (Caruz *et al.*, 1998). La phase ouverte de lecture prédit un polypeptide de 352 acides aminés de poids moléculaire apparent de 37745 Da. Le gène codant pour CXCR4 est porté par le chromosome 2q21.

Il existe un variant d'épissage de CXCR4 dont la signification n'est pas claire, qui affecte la portion amino-terminale du récepteur, un peu avant le premier domaine transmembranaire, mais qui ne modifie pas l'affinité pour le ligand (Heesen *et al.*, 1997 ; Frodl *et al.*, 1998 ; Gupta et Pillarisetti, 1999).

3.2.3. Rôles physiologiques

CXCR4 est exprimé par un spectre de cellules hématopoiétiques relativement large incluant les neutrophiles, les monocytes, les lymphocytes B et T, les précurseurs des lymphocytes B, les macrophages, les cellules de Langerhans. Il est également exprimé à des niveaux très élevés dans les cellules endothéliales du système vasculaire et dans les neurones du système périphérique ou central, dans la microglie et les astrocytes (Feng *et al.*, 1996 ; Berson et Doms, 1998 ; Zou *et al.*, 1998).

CXCR4 est également exprimé sur les cellules dendritiques immatures, les progéniteurs des cellules B de la moelle osseuse et le cerveau embryonnaire.

Les principaux rôles physiologiques connus pour le couple SDF-1/CXCR4 sont :

- L'activation la migration et le recrutement des lymphocytes T
- L'hématopoïèse
- Le développement
- L'embryogenèse

3.2.4. Effets du knocked-out

En plus de son rôle dans le chimiotactisme des lymphocytes T, le couple SDF-1/CXCR4 est impliqué dans le développement des cellules B associées à la moelle osseuse. Ceci est mis en évidence dans des expériences sur des souris KO pour l'un des deux gènes qui résulte en des mutations létales. 50 % des mutants homozygotes de SDF-1 meurent dans les 15 premiers jours de l'embryogenèse et 50 % meurent dans les heures suivant la naissance avec une activité fortement réduite au niveau de la lymphopoïèse et de la myélopoïèse des lymphocytes B ainsi qu'avec un développement

cardiaque anormal (les animaux présentent notamment de sévères déficits au niveau du septum ventriculaire). Les animaux KO pour CXCR4 ont des anomalies du système vasculaire et gastro-intestinal et des malformations du tissu cérébelleux. CXCR4, tout comme SDF-1, semble donc vital, en tout cas chez la souris (Ma *et al.*, 1998 ; Tachibana *et al.*, 1998 ; Zhou *et al.*, 1998). Ces résultats suggèrent que ce couple est unique *in vivo*. Néanmoins les fonctions de CXCR4 chez l'adulte ne sont pas clairement définies. SDF-1 et CXCR4 ont des séquences hautement conservées (98 et 94 % respectivement) entre l'homme et la souris, ce qui est particulièrement atypique dans le système chimiokine.

3.3. Structure tridimensionnelle et site de fixation du ligand

3.3.1. Caractéristiques structurales

Ce récepteur possède les caractéristiques communes des récepteurs de chimiokines déjà mentionnées pour CCR5.

Comme c'est le cas pour CCR5, il n'existe pas de structure tridimensionnelle de CXCR4 et tous les résultats sont obtenus en utilisant comme modèle la structure de la rhodopsine.

Le motif TXP déjà décrit dans le cas de CCR5 est également retrouvé dans le deuxième segment transmembranaire de CXCR4 et semble hautement conservé au sein de la famille des récepteurs de chimiokines (il est absent seulement dans les récepteurs CXCR5 et XCR1 humains), et constitue une caractéristique structurale de cette famille de récepteurs puisqu'on ne le retrouve pas dans la rhodopsine (Govaerts *et al.*, 2001). Par contre, et contrairement à CCR5, une mutation de la thréonine de ce motif ne rend pas le récepteur constitutivement actif. Alors que cette même mutation rend CCR5 et CCR2 constitutivement actifs, elle n'affecte pas CCR1, CCR3, CCR4, CXCR2 et CXCR4 et n'est donc pas spécifique d'une famille de récepteurs de chimiokines (Arias *et al.*, 2003).

Par contre, une autre étude révèle l'importance du résidu Asn¹¹³, localisé dans le troisième segment transmembranaire, pour la signalisation de CXCR4. Une mutation en sérine ou en alanine de ce résidu rend CXCR4 constitutivement actif. A l'inverse, lorsque ce résidu est muté en lysine, CXCR4 devient réfractaire à la stimulation par SDF-1 et cette mutation semble donc stabiliser CXCR4 dans un état inactif (Zhang *et al.*, 2002).

3.3.2. Liaison du ligand endogène

L'obtention de la structure tridimensionnelle de SDF-1 par des études de résonance magnétique nucléaire et l'analyse de nombreux mutants et de chimères a permis d'établir un modèle d'interaction entre SDF-1 et son récepteur CXCR4.

Les auteurs proposent un modèle faisant intervenir deux sites de liaison sur SDF-1, localisés dans la partie amino-terminale de la chimiokine : leurs études mettent en

évidence qu'un peptide équivalent aux 17 premiers résidus de SDF-1 possède ces deux sites de liaison. Les auteurs identifient également un motif RFFESH (résidus 12 à 17 de la boucle N) qui semble fondamental pour une liaison optimale mais qui ne semble pas suffisant à l'activation du récepteur. Il a donc été supposé que cette région était à l'origine du contact initial entre la chimiokine et le récepteur, et que ce contact initial permettait un positionnement correct du ligand sur le récepteur.

Suite à cette étape initiatrice, l'extrémité amino-terminale de la chimiokine peut interagir avec les hélices transmembranaires du récepteur ce qui induit un changement dans la conformation de la partie transmembranaire du récepteur et permet l'interaction avec les protéines G hétérotrimériques. La région amino-terminale qui est désordonnée en solution, devient structurée pendant la liaison de SDF-1 au récepteur qui peut établir des contacts avec le cœur de CXCR4.

La Lys¹ et la Pro² sont indispensables à l'activation du récepteur, puisque la modification de ces deux résidus résulte en une activité antagoniste de la chimiokine, ces deux variants n'étant plus capables d'induire les changements conformationnels du récepteur nécessaires à son activation (Crump *et al.*, 1997 ; Gupta *et al.*, 2001).

Les auteurs, sur la base des résultats observés avec d'autres récepteurs de chimiokines proposent que le motif RFFESH de SDF-1 interagit avec l'extrémité amino-terminale de CXCR4. Ce n'est que très récemment qu'une autre étude a mis en évidence de façon plus précise cette interaction. En utilisant des peptides dérivés de l'extrémité extracellulaire de CXCR4 (CXCR4¹⁻²⁷, CXCR4¹⁻¹⁷, CXCR4⁷⁻²⁷ et CXCR4¹⁸⁻²⁷), les auteurs suggèrent que les déterminants principaux se situent au niveau des 17 premiers acides aminés de CXCR4, avec une contribution majeure des 6 premiers résidus dans la mesure où la liaison de CXCR4⁷⁻²⁷ est nettement plus faible que celle de CXCR4¹⁻²⁷ et CXCR4¹⁻¹⁷ (Gozansky *et al.*, 2005).

Cette liaison est suivie de la fixation des deux premiers acides aminés Lys¹-Pro² de SDF-1 sur la boucle e2, d'où une activation du récepteur. Il semblerait que les résidus de la boucle e3 jouent également un rôle important dans la mesure où SDF-1 ne se lie plus sur une chimère possédant la boucle e2 de CXCR2 (Crump *et al.*, 1997 ; Heveker *et al.*, 1998 ; Doranz *et al.*, 1999 ; Gupta *et al.*, 2001).

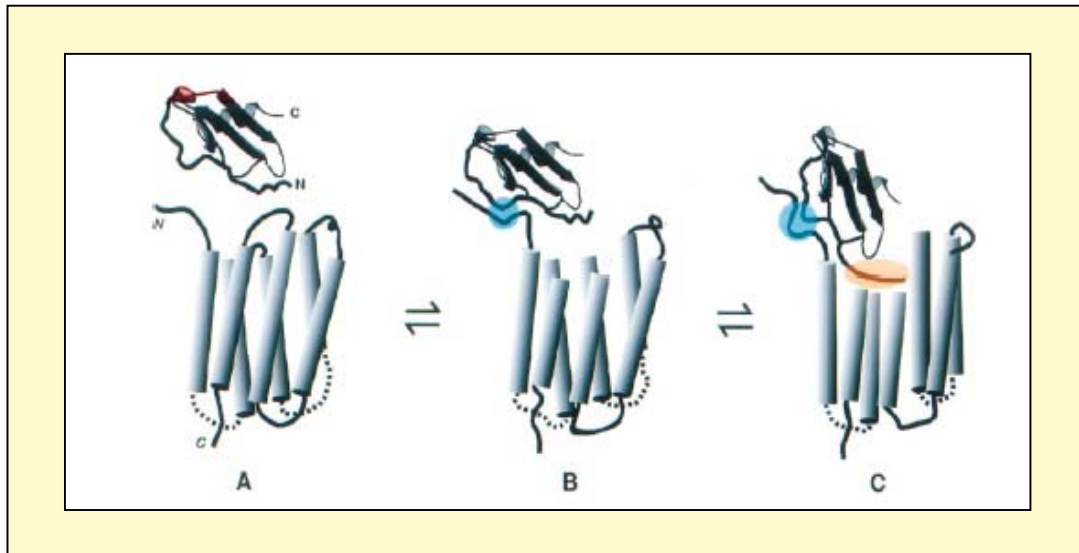


Figure 7 : Modèle d'interaction entre SDF-1 et CXCR4

- (A) Représentation schématique de SDF-1 (diagramme MOLSCRIPT) et CXCR4 (représentation en tubes) avant l'interaction
- (B) Interaction entre le motif RFFESH de SDF-1 avec l'extrémité amino-terminale du récepteur, la région de contact étant représentée en bleue
- (C) Suite à cette première interaction, SDF-1 se lie dans une poche de CXCR4 formée par le sommet des hélices transmembranaires (région de contact représentée en orange. Cette deuxième interaction induit des changements conformationnels du récepteur permettant son activation.

(Extrait de Crump *et al.*, 1997)

Remarque : ce schéma déjà ancien ne met pas en évidence l'importance des résidus Pro¹-Lys² de SDF-1

3.3.3. Rôle des glycosaminoglycanes

Il semblerait que beaucoup d'activités biologiques de chimiokines soient influencées par leur association avec les glycosaminoglycanes. Il a été suggéré que lors d'une inflammation, les chimiokines se lient aux GAGs par leur extrémité carboxy-terminale, présentant ainsi leur extrémité amino-terminale pour la liaison au récepteur. Ce procédé produirait un gradient de chimiokines à la surface des cellules endothéliales, assurant l'activation des leucocytes et la migration au travers de l'endothélium vers le site de l'inflammation. SDF-1 peut s'associer aux GAGs par son extrémité carboxy-terminale laissant ainsi l'extrémité amino-terminale libre pour la liaison sur CXCR4. On retrouve ce même processus dans les leucocytes et les cellules non hématopoïétiques expliquant le trafic des leucocytes dans les nœuds lymphoïdes, leur rôle dans le développement et la maturation des cellules B et l'activation des cellules non hématopoïétiques comme les cellules endothéliales et épithéliales lors des étapes de remodelage des tissus, la différenciation cellulaire et la vascularisation.

SDF-1 interagit spécifiquement avec l'héparine et les héparanes sulfates par des résidus basiques du premier brin β qui constituent le site de fixation aux GAGs. Cette interaction semble également jouer un rôle clé dans le pouvoir inhibiteur de SDF-1 en matière d'infection à VIH puisqu'un mutant ayant perdu sa capacité à interagir avec les

héparanes sulfates protéoglycanes HSPG présente une capacité réduite à inhiber la fusion. Il semblerait que la coopération avec les HSPGs augmente l'activité antivirale de SDF-1 en augmentant la concentration locale de SDF-1 dans l'environnement du récepteur et facilite ainsi l'occupation de ce dernier (Valenzuela-Fernandez *et al.*, 2001).

3.4. Ponts disulfures

Le récepteur CXCR4 possède comme tous les récepteurs de chimiokines quatre cystéines dans le domaine extracellulaire, formant entre elles des ponts disulfures essentiels à un repliement correct de la protéine et à son expression de surface.

Le premier pont disulfure s'établit entre les cystéines 109 et 186. La mutation en alanine de l'une de ces deux cystéines réduit considérablement l'expression de surface du récepteur qui est indétectable par les anticorps 12G5 (conformationnel) et 4G10. Néanmoins, un mutant pour lequel ces deux cystéines sont mutées en même temps permet de détecter le récepteur à la surface membranaire à hauteur de 10 % du taux d'expression du récepteur sauvage. Les auteurs émettent l'hypothèse que, lorsqu'une seule des cystéines est mutée, il se pourrait qu'un pont disulfure inapproprié s'établisse entre les trois cystéines restantes, résultant en un mauvais repliement de la protéine qui s'exprime plus mal à la surface cellulaire.

Le deuxième pont disulfure s'établit entre une cystéine du domaine amino-terminal en position 28 et une cystéine de la troisième boucle extracellulaire en position 274. Cette deuxième paire de cystéines est caractéristique des récepteurs de chimiokines, mais absente au sein des autres RCPG. Les auteurs ne se sont attachés qu'à l'étude de la liaison de la gp120. La mutation en alanine de la cystéine en position 28 réduit l'activité co-récepteur de 50 %, alors que la mutation de la cystéine 274, ou de ces deux cystéines en même temps génère une protéine exhibant toujours une activité de co-récepteur à hauteur de 75 % du récepteur sauvage, alors que ces mutants présentent un taux d'expression membranaire comparable à celui du récepteur sauvage. Néanmoins, la détection de surface par un anticorps conformationnel montre un taux d'expression nettement plus faible, suggérant que le récepteur est bien présent à la membrane, mais dans une conformation altérée en raison de la perte d'un pont disulfure (Chabot *et al.*, 1999).

3.5. Modifications post-traductionnelles de l'extrémité amino-terminale

On retrouve au niveau de l'extrémité amino-terminale de CXCR4 et comme dans quasiment tous les récepteurs de chimiokines utilisés comme co-récepteur par le VIH des résidus tyrosines, sites putatifs de sulfatation.

Tout comme cela a été démontré dans le cas de CCR5, il semblerait que CXCR4 soit également modifié post-traductionnellement par une sulfatation des tyrosines de l'extrémité amino-terminale. Le groupement sulfate lié à la tyrosine 21 contribue à la liaison de SDF-1 sur CXCR4. En ce qui concerne l'infection par VIH, il semblerait que la sulfatation de cette tyrosine joue un rôle moins important que dans le cas de CCR5 dans le processus d'entrée du virus (Farzan *et al.*, 1999).

Dans plusieurs types cellulaires, CXCR4 est également modifié par un groupement chondroïtine sulfate au niveau de la sérine 18, mais ni la liaison de SDF-1 ni celle de la gp120 ne semblent affectées par la perte de ce groupement (Farzan *et al.*, 2002a).

Une étude sur des mutants de CXCR4 montre que les résidus acides glutamiques chargés négativement dans l'extrémité amino-terminale et l'acide aspartique en position Asp⁹⁷ de la boucle e1 sont importants pour que CXCR4 puisse être utilisé comme co-récepteur par les souches X4. L'hypothèse émise est que les résidus chargés négativement établissent des liaisons électrostatiques avec les résidus chargés positivement dans la région V3 des enveloppes X4.

CXCR4 possède dans son domaine extracellulaire deux résidus asparagine en position 11 et 176 susceptibles d'être modifiés par une N-glycosylation. Il semblerait que seul le résidu en position 11 soit modifié. De plus il a été montré que la suppression de la N-glycosylation de l'asparagine en position 11 de CXCR4 permettait aux souches R5 d'utiliser cette protéine comme co-récepteur. Les auteurs proposent que la suppression des entités carbohydrates de CXCR4 résulte en une activité augmentée de co-récepteur pour les souches R5 en démasquant des structures existantes capables d'interagir avec ce type d'enveloppe. Probablement les enveloppes restreintes à l'utilisation de CCR5 sont aptes à reconnaître uniquement un récepteur ne possédant pas ces N-glycosylations alors que les souches X4 s'en accommodent. Il semblerait donc que cette N-glycosylation masque des structures extracellulaires conservées et importantes entre CXCR4 et CCR5 qui sont impliquées dans les interactions avec la glycoprotéine d'enveloppe (Chabot *et al.*, 2000).

CXCR4 ne semble pas être O-glycosylé, contrairement à CCR5.

3.6. Localisation dans les radeaux lipidiques

Ce sujet est autant controversé dans le cas de CXCR4 qu'il l'est pour CCR5 et la littérature est partagée à ce sujet. Le débat quant à la localisation des RCPG dans les radeaux lipidiques reste ouvert. Plusieurs groupes ont pu montrer une localisation des récepteurs de chimiokines dans les rafts avant ou après une stimulation par un agoniste alors que d'autres groupes affirment clairement le contraire (Manes *et al.*, 1999 ; Kovacs *et al.*, 2002 ; Popik *et al.*, 2002 ; Percherancier *et al.*, 2003). Ces différences de

résultats s'expliquent en partie à cause des divers moyens mis en œuvre pour isoler les rafts, mais aussi par la variabilité des types cellulaires étudiés, ainsi que par une différence de taux d'expression.

Certains auteurs, en mettant en évidence le rôle du cholestérol pour une fonction optimale, suggèrent que CXCR4 est localisé dans les radeaux lipidiques. Lorsque les membranes sont déplétées en cholestérol, SDF-1 perd sa capacité à se lier sur CXCR4, d'où une modification des réponses calciques et de l'internalisation normalement observées. L'incapacité à lier le ligand semble plutôt due à des changements conformationnels du récepteur qu'à une augmentation de l'internalisation. En effet, les réponses calciques et la liaison de SDF-1 peuvent être restaurées après la réintroduction de cholestérol dans les membranes (Nguyen et Taub, 2002b). Des expériences de microscopie ont montré que SDF-1 se liait sur CXCR4 dans les radeaux lipidiques contenant GM1. Par contre, l'expression de surface de CXCR4 ne colocalise que partiellement avec GM1. Il semblerait donc d'après cette étude que CXCR4 existe ailleurs que dans les rafts mais que la liaison de SDF-1 sur le récepteur se fasse préférentiellement dans les rafts (Nguyen et Taub, 2002b).

Il a initialement été suggéré que CXCR4 était largement exclu des rafts et que la liaison de la gp120 du VIH induisait une migration latérale du récepteur jusque dans les rafts (Manes *et al.*, 1999). Plusieurs groupes ont également montré que CD4 et les récepteurs de chimiokines colocalisaient dans les rafts en réponse à la liaison de gp120 (Manes *et al.*, 2000). De la même façon, les changements conformationnels induits par la déplétion en cholestérol inhibent la liaison du complexe CD4-Env sur CXCR4. Les auteurs proposent que les rafts constituent des sites de la surface cellulaire dans lesquels l'interaction entre CD4 et CXCR4 est la plus fonctionnelle. La modification de ces domaines réduit d'un facteur 2 l'efficacité d'infection. Il semble sortir d'une étude récente que la gp120, en se liant à CD4, favorise l'association de CXCR4 dans les rafts (Nguyen *et al.*, 2005).

Par contre, la multiplication du virus dans des cellules déjà infectées n'est pas altérée par ce type de traitement suggérant que le cholestérol joue un rôle critique au moment de l'infection (Nguyen et Taub, 2003).

D'autres groupes se sont plutôt intéressés à la signalisation du couple SDF-1/CXCR4 et rapportent que pour que la signalisation du couple SDF-1/CXCR4 soit efficace, CXCR4 doit être localisé dans les rafts (Manes *et al.*, 2000 ; Nguyen et Taub, 2002b). En effet, la protéine FAK est recrutée dans les rafts en réponse à une stimulation par SDF-1. FAK s'associe aux rafts de façon inductible et non constitutive, en réponse à la stimulation par SDF-1 cette translocation étant dépendante des protéines Gi et des kinases de la famille Src. Cette observation suggère un rôle des rafts en tant que plateforme de

signalisation. Une explication serait que CXCR4 pourrait, lorsqu'il est inclus dans les rafts, interagir de façon plus efficace avec d'autres récepteurs de surface et d'autres protéines impliquées dans la transduction du signal (Le *et al.*, 2005).

Dans d'autres types cellulaires, CXCR4 semble exclu des rafts, y compris suite à la liaison du VIH. Les auteurs montrent que CD4 est effectivement présent dans les domaines enrichis en cholestérol et résistants à l'extraction par des détergents du type TritonX-100. A l'inverse, CXCR4 semble complètement exclu de ces fraction préparées à partir de cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) et des cellules H9. Des études de microscopie confocale confirment que CD4 et CXCR4 ne colocalisent pas dans ces domaines : les patchs de CXCR4 peuvent être extraits des membranes en présence de TritonX-100, alors que les patchs de CD4 sont résistants à ce type de traitement. De plus, CD4, mais pas CXCR4, colocalise avec la toxine cholérique associée au sphingolipide GM1 associé aux rafts. Contrairement à ce qui a été montré par d'autres groupes, les auteurs observent que CXCR4 ne migre pas dans les rafts en réponse à la stimulation par SDF-1, dans la mesure où aucune redistribution cellulaire n'est observée ni pour CD4, ni pour CXCR4. La glycoprotéine d'enveloppe gp120 purifiée à partir de souches X4 ne stimule pas non plus de redistribution notable de CD4 et de CXCR4. Par contre, l'adsorption de virions contenant des multimères de gp120 semble déstabiliser les rafts contenant CD4, les virions adsorbés étant détectés par microscopie ailleurs que dans les rafts. Les auteurs avancent que le virus se lie initialement au CD4 localisé dans les rafts et que l'interaction avec CXCR4 nécessite la migration du complexe gp120/CD4 à l'extérieur des rafts. Il semblerait que ces changements dans les interactions entre lipides et protéines déstabilisent l'environnement de la membrane plasmique, favorisant ainsi le processus de fusion (Kovacs *et al.*, 2002).

3.7. Oligomérisation

Une étude ancienne montre que CXCR4 forme des dimères en réponse à l'activation par son ligand SDF-1 (Vila-Coro *et al.*, 1999). A l'inverse, des résultats obtenus par la technique de BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer) montrent que CXCR4 forme des multimères de façon naturelle dans des membranes intactes, en présence ou en l'absence de ligands. La liaison du ligand (SDF-1 ou gp120) n'altère pas le signal de BRET, suggérant que CXCR4 forme des oligomères constitutifs (Lapham *et al.*, 1999 ; Rodriguez-Frade *et al.*, 1999 ; Issafras *et al.*, 2002 ; Babcock *et al.*, 2003 ; Toth *et al.*, 2004). Les formes précurseurs de CXCR4 sont associées lors d'expériences de co-immunoprécipitation, suggérant que la dimérisation a lieu rapidement après la synthèse de CXCR4. Cette association spécifique de CXCR4 avec lui-même suggère qu'il existe dans la séquence du récepteur des régions spécifiques et uniques dans la famille des

RCPG qui sont à l'origine de cette dimérisation. Le TM5 de CXCR4 contient une cystéine supplémentaire par rapport aux autres récepteurs de chimiokines. Même si un pont disulfure ne semble pas impliqué dans la formation du dimère, cette cystéine pourrait jouer un rôle dans la dimérisation de CXCR4.

Une étude plus récente utilisant la technologie BRET montre que CXCR4 forme des dimères constitutifs et des hétérodimères avec CCR2 et que les ligands de ces récepteurs ont la capacité d'induire des changements conformationnels des dimères stables préalablement formés. Des peptides dérivés des domaines transmembranaires de CXCR4 bloquent l'activation du récepteur en réponse à la stimulation par MCP-1, un agoniste sélectif de CCR2, en empêchant le réarrangement des homodimères CXCR4 et des hétérodimères CXCR4/CCR2 qui se forment en réponse à la liaison de l'agoniste, et en stabilisant la conformation initiale du récepteur, empêchant les changements conformationnels qui se produisent normalement en réponse à la liaison du ligand. La présence d'une chimiokine sélective suffit à moduler la conformation du dimère, il s'agit donc visiblement d'une transmission en *trans* d'une unité à l'autre comme dans le cas des récepteurs du GABA (Percherancier *et al.*, 2005).

3.8. Signalisation et expression

3.8.1. Voies de signalisation

Les chimiokines se lient sur plusieurs récepteurs et un récepteur a en général la capacité de lier plusieurs chimiokines. Le couple SDF-1/CXCR4 constitue néanmoins une exception à cette règle. SDF-1 ne se lie que sur CXCR4 et CXCR4 ne lie que SDF-1, suggérant un rôle crucial de ce couple ligand récepteur.

Les deux variants d'épissage connus, SDF-1 α et SDF-1 β , qui ne diffèrent que par les quatre résidus carboxy-terminaux, ne sont pas différenciables fonctionnellement. Après son activation par SDF-1, CXCR4 s'associe aux protéines G hétérotrimériques de la famille $G\alpha_i$ (Ganju *et al.*, 1998 ; Vila-Coro *et al.*, 1999). Le chimiotactisme induit par SDF-1 est inhibé par la toxine pertussique, confirmant le couplage du récepteur aux protéines de la famille $G\alpha_i$. Plusieurs auteurs rapportent que suite à la liaison de SDF-1 sur CXCR4, l'activation débute par une oligomérisation du récepteur (Vila-Coro *et al.*, 1999).

Je ne détaillerai pas les voies de signalisation, simplement on note que les voies de signalisation principales impliquées suite à l'activation de CXCR4 incluent des flux calciques, des kinases du type Pyk-2, FAK, RAFTK, paxilline, PKC, PLC- γ , MAPK et PI $_3$ kinases (Ganju *et al.*, 1998 ; Wang *et al.*, 2000 ; Zhang *et al.*, 2001 ; Sloane *et al.*, 2005). La signalisation implique également des kinases de la famille Src et ZAP-70, un activateur des lymphocytes T (Kremer *et al.*, 2003). D'autres expériences semblent

montrer que les tyrosines phosphatases de la famille SHIP, ainsi que la phosphatase CD45 sont impliquées dans la modulation de la signalisation de CXCR4 (Fernandis *et al.*, 2003).

(pour revue Kucia *et al.*, 2004).

Les domaines impliqués dans la signalisation du récepteur ont été identifiés sur une série de mutants modifiés dans l'extrémité carboxy-terminale ou dans les boucles intracellulaires (Roland *et al.*, 2003). Ces résultats montrent que la boucle i3 seule suffit au couplage à la protéine G et est impliquée dans la mobilisation de calcium et dans l'activation de la voie MAPK p42/44, mais ne permet pas l'internalisation de CXCR4 suite à la liaison de SDF-1. La boucle i2 semble être facultative pour la signalisation par les protéines $G\alpha_i$. Les boucles i2 et i3 ainsi que le domaine carboxy-terminal sont essentiels au chimiotactisme induit par SDF-1.

3.8.2. Endocytose et recyclage

La notion que CXCR4 subit une endocytose par la voie des vésicules recouvertes de clathrine est confirmée par des études de mutagenèse. En effet, l'internalisation de CXCR4 en réponse à SDF-1 est inhibée par des mutants dominants négatifs de la dynamine et de l'arrestine-3. Des études morphologiques confirment également cette voie d'internalisation puisque la stimulation de CXCR4 par SDF-1 induit la redistribution de l'arrestine à la membrane plasmique et l'arrestine semble également colocaliser avec CXCR4 internalisé. Ce mécanisme d'endocytose induit par l'agoniste est de 5 à 10 fois plus rapide dans le cas de CXCR4 que dans le cas de CCR5. Cette différence pourrait provenir des différences structurales de l'extrémité carboxy-terminale (Venkatesan *et al.*, 2003).

L'intégrité du motif dileucine et des résidus sérine 324, 325, 338 et 339 de l'extrémité carboxy-terminale semble nécessaire à l'internalisation du récepteur (Orsini *et al.*, 1999).

Contrairement à CCR5, CXCR4 ne semble pas colocaliser avec la cavéoline et ne semble donc pas être internaliser en utilisant la voie des cavéoles.

3.8.3. Ubiquitylation

CXCR4 subit une dégradation rapide induite par l'agoniste par un processus faisant intervenir l'endocytose par les puits recouverts de clathrine. Il est ensuite dirigé vers les lysosomes. Il semblerait qu'il existe au niveau du récepteur CXCR4 un motif de dégradation ³²⁴SSLKILSKGK³³³ au niveau de l'extrémité carboxy-terminale du récepteur. Les deux premières sérines ainsi que le motif dileucine sont critiques pour l'endocytose induite par l'agoniste. Par contre il semblerait que les trois sérines mais pas

le motif dileucine de cette séquence soient importantes pour la dégradation du récepteur. La mutation des résidus lysines abolit totalement la dégradation du récepteur sans influencer sur l'endocytose. Les lysines sont des sites potentiels d'ubiquitinylation, c'est-à-dire des résidus sur lesquels peuvent se fixer des molécules d'ubiquitine. Il semblerait que cette ubiquitinylation joue un rôle clé dans le transport du récepteur endocyté vers les lysosomes (Marchese et Benovic, 2001). En effet, contrairement à CCR5, il semblerait que CXCR4 soit très faiblement recyclé.

Il semblerait que l'ubiquitinylation de CXCR4 n'interfère pas avec la liaison des arrestines et l'endocytose médiée par la voie des vésicules recouvertes de clathrine, mais qu'elle joue un rôle clé dans l'adressage du récepteur vers les compartiments lysosomiaux en vue de sa dégradation.

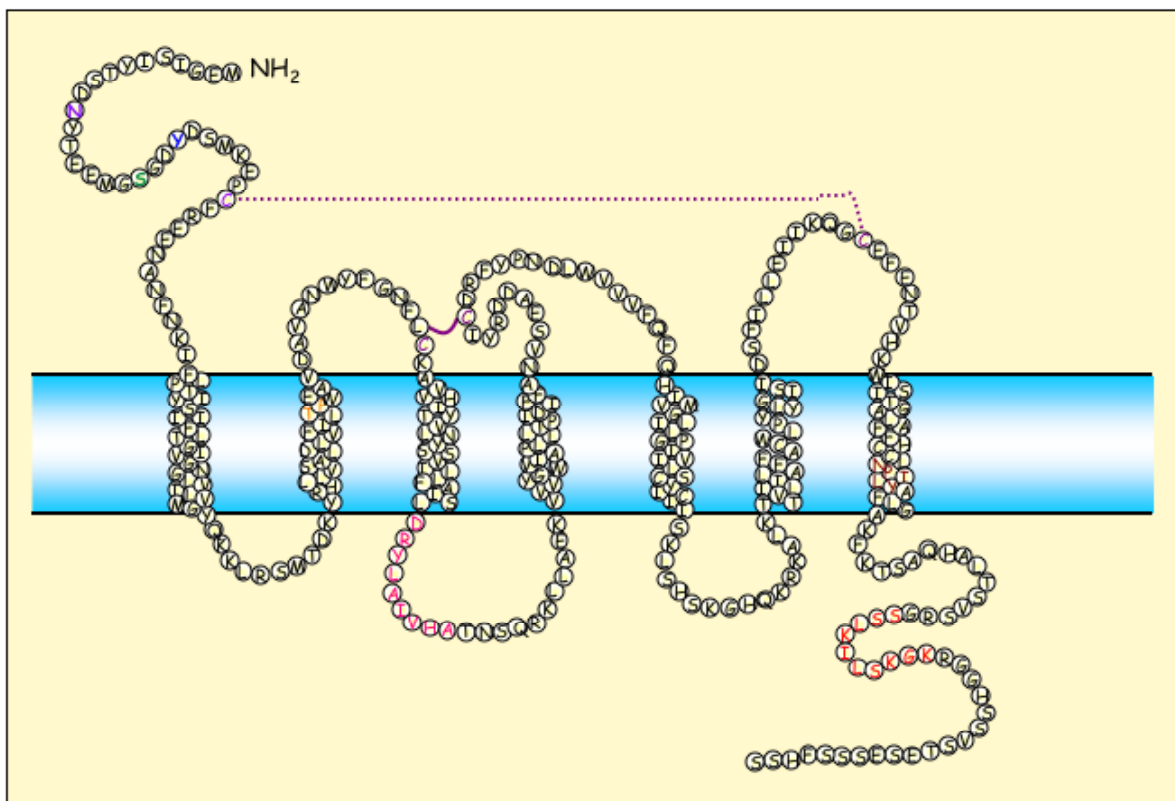


Figure 8 : Topologie en deux dimensions de la séquence du récepteur CXCR4 humain

En bleu, la tyrosine 21, site potentiel de sulfatation dans l'extrémité amino-terminale. En vert la sérine 18 modifiée par un groupement chondroïtine sulfate. En violet, l'asparagine modifiée par une N-glycosylation. En prune, les cystéines formant des ponts disulfures qui participent à la stabilité du récepteur. En orange, le motif TXP qui impose une angulation de 28° dans le deuxième TM. En rose, le motif DRYLAIVHA hautement conservé dans la famille des récepteurs de chimiokines (DRY box). En marron, le motif NPITY qui semble impliqué dans l'interaction avec les petites protéines G. En rouge le motif de dégradation du domaine carboxy-terminal, incluant trois sérines sites potentiels de phosphorylation et le motif dileucine.

(Adapté de Berson et Doms, 1998)

CHAPITRE 3

IMPLICATIONS DE CXCR4 ET CCR5 DANS L'INFECTION A VIH

1. Généralités

1.1. Historique

Au début des années 80, des données cliniques indiquaient l'émergence d'une nouvelle maladie, caractérisée par une détérioration profonde et progressive du système immunitaire conduisant à l'effondrement des défenses de l'organisme. Initialement appelée GRID (Gay Related ImmunoDeficiency syndrome) en raison de sa propagation dans les milieux homosexuels, elle fut renommée AIDS ou SIDA (Syndrome d'ImmunoDéfiance Acquis). La progression de l'épidémie et l'atteinte des hémophiles et des toxicomanes a très vite permis d'élucider les voies de contamination et les modes de transmission par le sang et les sécrétions sexuelles, lesquelles suggéraient une origine virale de la maladie. L'émergence de nouvelles techniques de biologie cellulaire et moléculaire pendant cette décennie a abouti à l'isolement d'un rétrovirus humain, le virus de l'immunodéfiance humaine (VIH) comme agent étiologique du SIDA.

C'est en 1983 que le virus a été isolé à partir d'une biopsie chez un patient présentant une lymphadénopathie persistante évocatrice du SIDA (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983). La détection de la transcriptase inverse a permis de classer le VIH dans la famille des rétrovirus. La capacité de ce virus à induire une maladie chronique à évolution lente, atteignant le système nerveux du patient indiquait son appartenance à la famille des lentivirus.

Le spectre de cellules infectées par le VIH est plutôt large. Il s'attaque aux lymphocytes T CD4+, aux cellules présentatrices d'antigènes (cellules dendritiques, monocytes et macrophages) et à certaines cellules du système nerveux central (macrophages de la microglie, astrocytes et oligodendrocytes). Les cellules du système nerveux central sont infectées précocement et forment un sanctuaire généralement à l'abri des effecteurs immunitaires et des chimiothérapies antirétrovirales.

1.2. Histoire naturelle de l'infection à VIH

L'histoire naturelle de l'infection à VIH se divise en trois phases distinctes sur le plan virologique, immunologique et clinique. La primo-infection, survenant quelques jours après l'infection est souvent dépourvue de symptômes spécifiques, éventuellement quelques signes de syndrome pseudo-grippal. Cette période est caractérisée par une forte réplication du virus, indiquée par une virémie élevée et une charge virale de l'ordre

de 10^6 à 10^7 copies/ml. Cette multiplication intense mène à la dissémination vers les organes lymphoïdes et le système nerveux central, et cause une chute brutale du taux de lymphocytes T CD4+. En quelques semaines des anticorps dirigés contre diverses protéines virales sont détectés, établissant la séropositivité de la personne infectée.

Pendant la phase asymptomatique s'établit une interaction entre le virus et l'hôte, impliquant des facteurs de virulence et des facteurs d'hôte de résistance, conditionnant la progression vers la maladie. On observe ainsi des profils d'évolution divers avec une phase asymptomatique de durée variable s'échelonnant de 1 à 15 ans, avec une moyenne aux environs de 10 ans. Cette phase de latence clinique n'est pas une phase de latence virologique, le virus persiste dans l'organisme, en particulier au niveau des organes lymphoïdes, et se multiplie de manière active et continue. De l'ordre de 10^8 à 10^{10} virus sont nouvellement produits et éliminés quotidiennement, tandis qu'une large fraction de lymphocytes T CD4+ est détruite. Cette destruction est contrebalancée par un renouvellement permanent des cellules à partir des précurseurs hématopoïétiques de la moelle osseuse. Par ailleurs les réponses immunitaires spécifiques maximales pendant cette phase, contribuent à réprimer la multiplication virale. Il s'établit ainsi une dynamique se traduisant par des paramètres cliniques relativement stables, une charge virale stationnaire et un taux de cellules T CD4+ diminuant lentement et progressivement. Plus tard, on assiste à une forte augmentation de la charge virale et à une chute drastique des lymphocytes T CD4+ en dessous d'un seuil critique ($<200/\text{mm}^3$), conduisant à un profond déficit immunitaire caractéristique du SIDA.

Au stade SIDA, l'immunodépression empêche l'organisme de lutter contre les agressions extérieures de telle sorte que surviennent diverses infections opportunistes récurrentes, à la fois virales, bactériennes, fongiques et parasitaires. L'apparition de ces infections ainsi que leur nombre dépend du degré d'immunodéficiência et constitue un critère diagnostique de l'avancement de la maladie. Par ailleurs, il semblerait que l'atteinte du système nerveux central entraîne des complications neurologiques aboutissant à des symptômes d'encéphalopathies et de démence.

1.3. Épidémiologie

Les analyses de ONUSIDA (Programme commun des Nations Unies sur le VIH/SIDA) et de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) montrent qu'il y a eu ces dernières années des augmentations régulières de personnes vivant avec le VIH/SIDA, ainsi que du nombre de décès liés au SIDA. Les statistiques de l'ONUSIDA estiment qu'en 2004, le nombre total de personnes vivant avec le VIH a atteint le plus haut niveau jamais enregistré : sur les 39,4 millions de personnes vivant avec le VIH fin 2004, on

compte 4,9 millions de personnes qui ont contacté le virus au cours de l'année 2004. L'épidémie mondiale de SIDA a tué 3,1 millions de personnes au cours de l'année écoulée.

Nombre de personnes dans le monde vivant avec le VIH/SIDA en 2004	TOTAL	39.4 millions
	Adultes	37.2 millions
	Femmes	17.6 millions
	Enfants de moins de 15 ans	2.2 millions
Nouveaux cas d'infection à VIH en 2004	TOTAL	4.9 millions
	Adultes	4.3 millions
	Enfants de moins de 15 ans	640 000
Décès dus au SIDA en 2004	TOTAL	3.1 millions
	Adultes	2.6 millions
	Enfants de moins de 15 ans	510 000

Tableau 1 : Tableau récapitulatif de l'épidémie de VIH et de SIDA dans le monde
 Décembre 2004
 (Données de l'ONUSIDA/OMS)

Le nombre des personnes vivant avec le VIH a augmenté dans toutes les régions du globe, les augmentations les plus importantes étant enregistrées en Asie de l'Est (augmentation de 50 % entre 2002 et 2004), en Europe orientale et en Asie centrale (augmentation de 40 % entre 2002 et 2004). L'Afrique subsaharienne reste de loin la région la plus touchée avec 25.4 millions de personnes vivant avec le VIH fin 2004, ce qui équivaut à environ 2/3 des cas mondiaux.

2. Biologie du virus

2.1. Structure du virus

2.1.1. Organisation du génome viral

Le génome viral codant pour l'information génétique du VIH est composé de deux brins d'ARN monocaténaux identiques de polarité positive de 9,2 à 9,4 kb. Dans la forme provirale intégrée le génome rétrotranscrit en ADN double brin encadré par deux séquences LTR (Long Terminal Repeat) qui contiennent les séquences permettant l'expression des gènes viraux : séquences promotrices et régulatrices de la transcription en 5' et éléments de terminaison et de maturation des ARNm en 3'. Ces séquences jouent également un rôle pour l'intégration du VIH dans l'ADN cellulaire.

La région codante comporte les trois gènes *gag*, *pol* et *env* qui codent respectivement pour les protéines structurales de la matrice (p17), de la capsid (p55, p40 et p24) et de la nucléocapside (p7) ; l'intégrase, la transcriptase inverse et la protéase virale ; la glycoprotéine gp160 précurseur des protéines gp120 et gp41.

En plus de ces trois gènes communs à la famille des rétrovirus, une série de gènes propres au VIH codent pour des protéines régulatrices Tat (transactivator), Nef (negative factor), Rev (regulator of viral protein expression), Vif (virion infectivity factor), Vpr (viral protein R), Vpu (viral protein U).

- Tat augmente l'activité transcriptionnelle de l'ARN polymérase II en se liant sur la séquence TAR (TransActing Response element)
- Rev régule la transcription des gènes viraux et est essentielle à la réplication du virus.
- Vif augmente l'infectivité des virions
- Vpu intervient au niveau du processus d'assemblage des particules virales.
- Vpr intervient au niveau du transport du génome viral dans le noyau de la cellule hôte.
- Nef semble avoir de multiples fonctions, incluant l'accélération de la maladie d'un point de vue clinique, l'augmentation de l'infectivité du virion, la régulation négative des molécules de surface CD4 et CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) de classe I, la modulation de la transduction du signal et favorise l'entrée du virus dans les cellules hôtes (Chinen et Shearer, 2002).

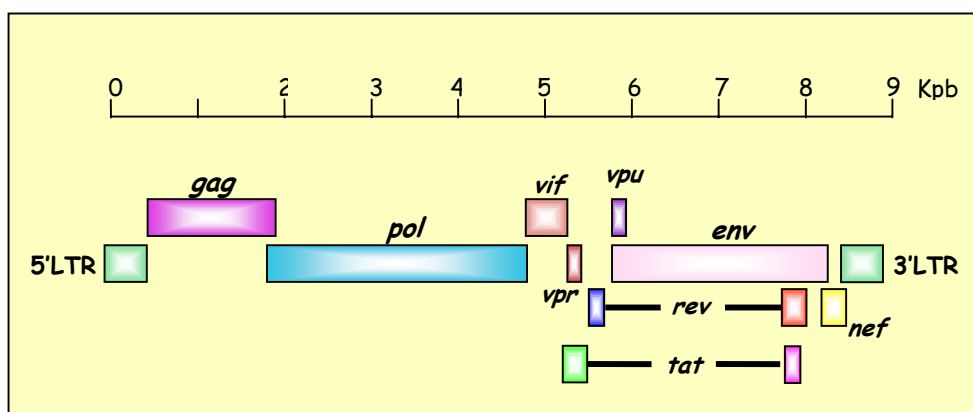


Figure 1 : organisation génomique de l'ADN proviral du VIH-1

gag : code pour les protéines de nucléocapside ; *env* : code pour les protéines d'enveloppe (gp41 et gp120) ; *pol* : code pour la transcriptase inverse, la protéase et l'intégrase virales ; *vif* : augmente l'infectivité ; *vpr* : active la transcription de l'ADN proviral ; *tat* : active fortement la transcription de l'ADN proviral ; *rev* : permet l'export de l'ARNm ; *nef* : augmente la réplication virale et régule négativement les cellules CD4+ ; *vpu* : permet l'assemblage des particules virales et le bourgeonnement

2.1.2. Structure des particules virales

L'enveloppe du virus est constituée d'une bicouche lipidique dérivée de la membrane de la cellule hôte. Les deux principales glycoprotéines de surface du virus, gp120 et gp41, dérivent d'un précurseur gp160. Le clivage protéolytique est assuré par des protéases cellulaires et génère les glycoprotéines de surface gp120 et transmembranaire gp41. La gp120 contient un domaine protéique variable dont la boucle V3 qui engendre une forte réponse immunitaire. Les protéines d'enveloppe sont organisées en épines oligomériques, sans doute en trimères, et sont ancrées dans la membrane virale par la gp41. La sous-unité gp120 est responsable de la liaison au récepteur alors que la gp41 joue un rôle critique aboutissant à la fusion des membranes virale et cellulaire (Briggs *et al.*, 2004).

Le cœur du virus est composé de trois protéines de structure, p24, p16 et p9. La protéine p24 forme la capside qui entoure les deux brins d'ARN génomique et les enzymes virales. La protéine de matrice p16 est ancrée dans la face interne de l'enveloppe. La protéine de nucléocapside p9 n'est pas liée covalamment à l'ARN viral (Chinen et Shearer, 2002).

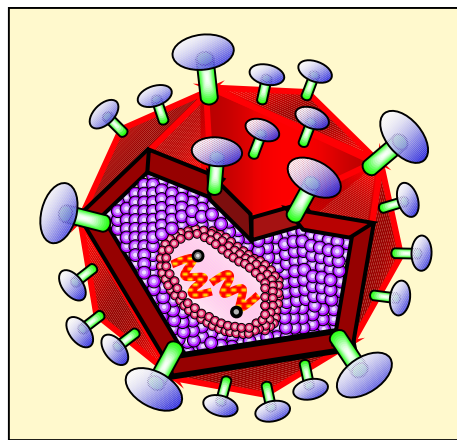


Figure 2 A: Représentation schématique d'une particule virale

En bleu, la glycoprotéine de surface gp120 (*env*). En vert, la glycoprotéine transmembranaire d'enveloppe gp41 (*env*). En violet, la protéine de matrice p17 associée à la membrane (*gag*). En rose, la protéine de capsid p24 (*gag*). En rouge moucheté de jaune, les deux molécules d'ARN. En noir, les enzymes codées par le gène *pol* (Protéase p9, Transcriptase inverse, Rnase H p66 et intégrase p32).

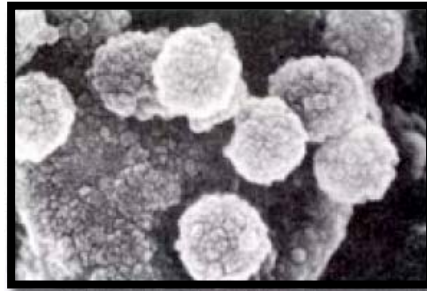


Figure 2 B : Particules virales à la surface des cellules
x80.000, microscopie électronique

2.2. Hétérogénéité du virus et sous-groupes

Le VIH présente une très forte hétérogénéité d'une part à cause des erreurs de la transcriptase inverse mais également à cause d'évènements de recombinaison. La réponse immunitaire de l'hôte semble également influencer ce processus. L'addition de tous ces mécanismes fait qu'il existe actuellement de nombreuses souches de VIH chez les patients infectés. Ces divergences génétiques constituent un avantage pour le virus incluant l'évasion aux réponses du système immunitaire de l'hôte, l'échappement aux traitements et une altération du tropisme cellulaire.

Groupe M	
Sous-type A	Afrique centrale
Sous-type B	Amérique du Sud, Etats-Unis, Europe, Thaïlande
Sous-type C	Brésil, Inde, Afrique du Sud
Sous-type D	Afrique centrale
Sous-type E	Thaïlande, République Centrafrique
Sous-type F	Brésil, Roumanie, Zaïre
Sous-type G	Zaïre, Gabon, Thaïlande
Sous-type H	Zaïre, Gabon
<hr/>	
Groupe N	Cameroun
<hr/>	
Groupe O	Afrique de l'Ouest

Tableau 2 : Sous-groupes de VIH-1 et zone géographique de prévalence

La plupart des souches du VIH-1 isolées dans les diverses régions du globe ne diffèrent que par des petites variations au niveau de l'information génétique, mais sont similaires sur le plan immunologique. Un second virus, appelé VIH-2 a été isolé chez des patients atteints du SIDA et présente une très forte homologie avec l'équivalent simien du virus SIV (Simian Immunodeficiency Virus). Je me limiterai dans ce manuscrit à parler de VIH-1.

3. Mécanisme d'entrée du virus dans la cellule hôte

Les rétrovirus ne sont pas capables de se répliquer à l'extérieur d'une cellule. Après avoir pénétré dans l'organisme, la particule virale se doit de trouver une cellule hôte pour se multiplier. Les cellules susceptibles d'être infectées par le virus sont les monocytes du sang, les macrophages des tissus, les lymphocytes T et B, les cellules NK, les cellules dendritiques, les cellules souches hématopoïétiques, les cellules endothéliales, les cellules de la microglie et du système gastro-intestinal.

3.1. Attachement du VIH-1

Le récepteur primaire pour le VIH est la molécule de CD4 qui est exprimée à la surface de plusieurs types de cellules T et par la lignée des monocytes et macrophages, ce qui explique la propension du virus à induire un dysfonctionnement du système immunitaire.

Le VIH-1 peut également s'attacher à la membrane cellulaire en utilisant d'autres molécules notamment les héparanes sulfates (Ji *et al.*, 2005). DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific ICAM-3 Grabbing Nonintegrin) est une lectine de type C indépendante du calcium exprimée à la surface de certaines cellules dendritiques et macrophages (pour revue Geijtenbeek *et al.*, 2001 ; Geijtenbeek et van Kooyk, 2003 ; Guo *et al.*, 2004).

Le VIH-1 peut se lier à DC-SIGN au travers d'interactions de haute affinité entre le domaine de reconnaissance carbohydate de DC-SIGN et les groupements mannose sur lesquels sont greffées des chaînes carbohydrates par N liaison de Env. La liaison à DC-SIGN n'est pas nécessaire à l'infection par le virus, mais cette molécule constitue un facteur d'attachement de haute affinité du virus qui peut intensifier l'infection, vraisemblablement en augmentant l'efficacité d'attachement du virus à la surface de la cellule. DC-SIGN a la capacité de transférer le virus lié à un type de cellule non permissive, en reliant les deux cellules entre elles. Ainsi le virus lié par DC-SIGN à une cellule peut être présenté au CD4 d'une autre cellule, résultant en une infection en *trans* (Geijtenbeek *et al.*, 2001 ; Turville *et al.*, 2001).

Même si dans le cas le plus général l'infection par VIH nécessite le récepteur CD4, des cas d'infection de cellules CD4⁻ ont été rapportés *in vivo*, notamment dans les astrocytes, les neurones, les cellules endothéliales du cerveau et les cellules épithéliales, les lymphocytes T CD4⁻, les thymocytes et les cardiomyocytes. Une étude visant à comprendre ce mécanisme a permis de montrer que le virus pouvait, *in vitro*, infecter ces différents types cellulaires lorsque ceux-ci sont co-cultivés avec des cellules CD4⁺, le processus nécessitant un contact entre la cellule possédant le co-récepteur et la cellule CD4⁺. Ce processus en *trans* permet l'infection de cellules primaires, notamment des astrocytes dérivés de cerveau humain (Speck *et al.*, 1999). Ce mécanisme doit être élucidé *in vivo*, mais pourrait être une explication à la génération des réservoirs latents. Une autre étude menée sur des neurones en culture n'exprimant pas CD4 suggère que ce récepteur n'est pas nécessaire à l'infection des cellules du système nerveux (Alvarez Losada *et al.*, 2002).

3.2. Engagement du co-récepteur

La liaison de la gp120 à son récepteur primaire CD4 ne permet pas à elle seule d'aboutir à la fusion des membranes. La liaison au CD4 induit des changements conformationnels de la gp120 qui démasquent des sites d'interaction avec un second récepteur appelé alors co-récepteur. Tous les isolats primaires étudiés jusqu'alors utilisent comme co-récepteur des récepteurs de chimiokines, principalement CCR5 et CXCR4. CCR5 a été mis en évidence comme co-récepteur du VIH peu de temps après son clonage en 1996 (Choe *et al.*, 1996 ; Deng *et al.*, 1996 ; Dragic *et al.*, 1996 ; Alkhatib *et al.*, 1997 ; Doranz *et al.*, 1997b), alors que dans le cas de CXCR4, c'est son rôle comme co-récepteur du VIH qui a permis d'identifier son ligand endogène et de le reclasser dans la famille des récepteurs de chimiokines (Feng *et al.*, 1996).

Néanmoins, plusieurs études *in vitro* montrent que le virus a la capacité d'utiliser d'autres récepteurs de chimiokines, CCR2b, CCR3, CCR8, D6 et CX3CR1 ainsi que le récepteur du cytomégalovirus US28 ou encore des récepteurs orphelins tels apj, gpr1, gpr15/BOB, dez/ChemR23 et strl33/BONZO avec des efficacités différentes (Choe *et al.*, 1996 ; Doranz *et al.*, 1996 ; Farzan *et al.*, 1997 ; Horuk, 1998).

De très faibles taux d'expression du récepteur peuvent suffire à l'entrée du virus (Chanel *et al.*, 2002).

3.2.1. Phénotype du virus lié à l'utilisation du co-récepteur

L'hétérogénéité de l'enveloppe définit des phénotypes biologiques et un tropisme cellulaire. Les souches dites M-tropiques (Macrophages), ou R5, utilisent CCR5 comme

co-récepteur et n'induisent en général pas la formation de syncytium (masse cytoplasmique étendue contenant de nombreux noyaux et résultant de la fusion d'une cellule infectée avec plusieurs cellules saines de son entourage), et grandissent dans les macrophages.

Les souches dites T-tropiques (lymphocytes T), ou X4, utilisent CXCR4 comme co-récepteur, induisent la formation de syncytium et se développent dans les cellules T. Les souches présentant les deux tropismes (R5X4) ont la faculté de se développer dans les deux types cellulaires.

Le récepteur CCR5 est souvent associé au processus de transmission d'homme à homme et à la primo-infection. L'émergence des souches X4 et des souches R5X4 dans les stades plus tardifs de l'infection est associée à une progression de la maladie vers le stade SIDA due notamment à une déplétion des lymphocytes T CD4+ et à une forte augmentation de la charge virale chez les individus infectés (voir Histoire naturelle). Néanmoins, un gain de l'utilisation de CXCR4 n'est pas observé chez tous les patients atteints. L'existence de souches R5 est maintenue après l'émergence de souches X4 indiquant que différents types de virus coexistent *in vivo*, et avec une utilisation différente des co-récepteurs (Maeda *et al.*, 2003).

Le choix de l'utilisation du co-récepteur est gouverné par des régions variables de la sous-unité gp120, en particulier la boucle V3, et dans une moindre mesure la région V1/2 (Choe *et al.*, 1996). Le mécanisme moléculaire par lequel les souches virales utilisent CXCR4 plus tardivement dans l'infection ne sont pas connus. Néanmoins, une étude visant à étudier le rôle des glycosylations de la gp120 a permis de montrer que la perte d'une N-glycosylation dans la région V3 de la gp120 était déterminante dans le choix d'utilisation du co-récepteur et que cette modification était à l'origine d'un changement de phénotype de R5 vers X4 (Pollakis *et al.*, 2001).

3.2.2. Conséquences de la mutation CCR5 Δ 32

L'importance de CCR5 pour la transmission du virus a été confirmée par la découverte d'un mutant de CCR5, consistant en une délétion de 32 paires de bases dans le gène codant pour CCR5 (Dean *et al.*, 1996 ; Huang *et al.*, 1996 ; Liu *et al.*, 1996 ; Samson *et al.*, 1996 ; Zimmerman *et al.*, 1997). La délétion de 32 paires de bases résulte en la formation d'une protéine tronquée au niveau du troisième domaine extracellulaire qui s'exprime moins bien à la surface cellulaire (Rana *et al.*, 1997). Les individus portant cette mutation sont résistants à l'infection par VIH-1. *In vitro*, les lymphocytes T CD4+ et les macrophages isolés de patients portant cette mutation sont réfractaires à l'infection par les souches R5 du VIH-1. Les individus homozygotes pour cette mutation qui représentent environ 1% de la population caucasienne, montrent une forte résistance

à l'infection par VIH-1 et sont par ailleurs en parfaite santé (Dean *et al.*, 1996 ; Samson *et al.*, 1996). Ceci suggère que la fonction de CCR5 est redondante ou bien compensée. Les individus hétérozygotes ont une expression réduite de CCR5 à la surface cellulaire en raison d'un effet dominant négatif de la protéine CCR5 Δ 32 (Benkirane *et al.*, 1997). La prévalence de cette mutation dans les pays du nord de l'Europe a permis d'émettre l'hypothèse que cette mutation a été véhiculée par les Vikings (Lucotte et Dieterlen, 2003).

Une autre étude visant à étudier l'importance des mutations de CCR5 porte sur l'analyse de 16 autres mutants naturels de CCR5 décrits dans diverses populations. Parmi ces 16 mutants, 10 lient les ligands naturels avec une affinité comparable au récepteur sauvage, répondent fonctionnellement aux chimiokines et agissent normalement en tant que co-récepteur. Par contre 6 mutants présentent une altération de leur capacité de réponse aux chimiokines : soit par séquestration intracellulaire ou faible taux d'expression à la membrane, soit par leur incapacité à activer le récepteur, soit par une perte d'affinité pour les ligands. Parmi ces mutants, 5 ont la capacité de jouer le rôle de co-récepteur. Seul le mutant C101X, tout comme CCR5 Δ 32 ne permet pas l'entrée du virus (Blanpain *et al.*, 2000). Ce mutant constitue un argument supplémentaire allant dans le sens de la recherche d'inhibiteurs de CCR5 en matière de traitement de l'infection à VIH.

3.3. Fusion des membranes

La liaison au CD4 induit des changements conformationnels de la gp120 qui permettent sa liaison au co-récepteur. La liaison à CCR5 ou à CXCR4 semble induire des changements conformationnels de gp41 qui permettent finalement la fusion entre la membrane virale et celle de la cellule hôte.

La sous-unité d'enveloppe gp41 contient un domaine amino-terminal hydrophobe appelé peptide de fusion. Ce peptide semble être exposé en conséquence à la liaison au co-récepteur et s'insérer dans la membrane de la cellule hôte. En conséquence, la sous-unité gp41 devient un composant intégral des membranes cellulaire et virale. Pour que la fusion entre les deux membranes puisse avoir lieu, la gp41 doit se replier sur elle-même afin de permettre le rapprochement du peptide de fusion et de la portion de la membrane cellulaire à laquelle il est associé. La formation de cette structure en épingle à cheveux est possible puisque l'ectodomaine de la gp41 contient deux régions hélicales, HR1 et HR2. Les domaines HR1 de chacune des sous-unités gp41 du trimère d'enveloppe semblent former une structure à trois brins en coiled-coil, projetant le peptide de fusion dans la direction de la membrane virale. Le domaine carboxy-terminal de HR2 s'insère alors dans les rainures de la structure en coiled-coil à trois brins, résultant en

la formation d'un tonneau à 6 hélices extrêmement stable. La transition de l'enveloppe d'une structure à 3 brins vers une structure en épingle à cheveux à 6 brins semble permettre la fusion des membranes en raison d'une variation significative de l'énergie libre.

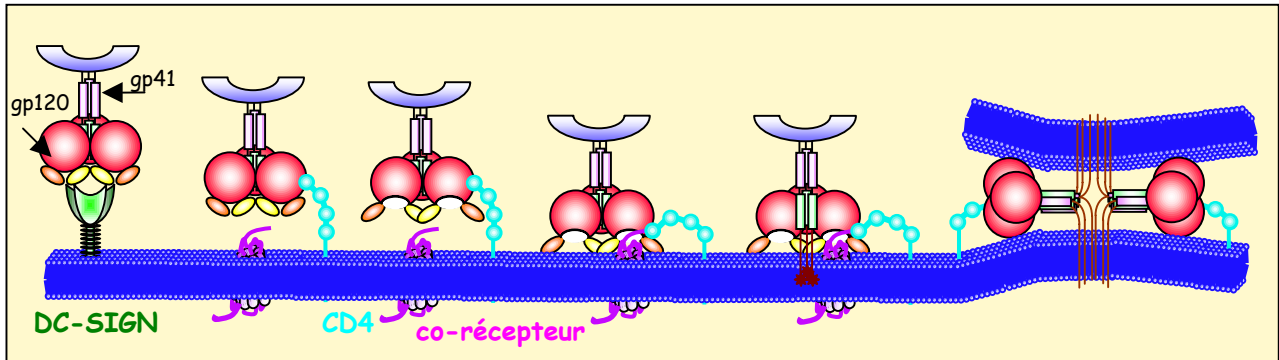


Figure 3 : Mécanisme d'entrée du VIH-1 dans la cellule hôte

- Etape 1 : Liaison du virus sur des facteurs d'attachement non spécifiques comme DC-SIGN
 - Etape 2 : Liaison de la particule virale au CD4
 - Etape 3 : Changements conformationnels de la gp120 suite à la liaison au CD4
 - Etape 4 : Liaison au co-récepteur
 - Etape 5 : Changements conformationnels de gp41 suite à la liaison au co-récepteur
 - Etape 6 : Formation de la structure en épingle à cheveux et fusion des membranes
- (Adapté de Pierson et Doms, 2003)

La fusion des membranes est un processus coopératif et on estime actuellement que quatre à six récepteurs de chimiokines ainsi que trois à six trimères d'enveloppe sont nécessaires pour former un pore de fusion (Pour revue Doms et Trono, 2000 ; Gallo *et al.*, 2003).

3.4. Cycle de réplication

Suite à la fusion de la membrane virale avec la membrane de la cellule hôte, l'acide nucléique viral est injecté dans la cellule hôte. L'ARN viral est alors rétrotranscrit en ADN grâce à la transcriptase inverse (RT) codée par le virus. La RT est une enzyme multifonctionnelle possédant les trois activités ADN-polymérase-ARN-dépendante, ADN-polymérase-ADN-dépendante et RNaseH. L'étape de transcription inverse aboutit à la formation d'un ADN bicaténaire délimité en 5' et en 3' par les séquences dupliquées formant les LTRs. On notera néanmoins que la transcriptase inverse ne possède pas d'activité correctrice 3' vers 5', ce qui génère des erreurs d'incorporation de nucléotides à une fréquence de 10^{-4} par base et par cycle.

Après cette étape de transcription inverse, l'ADN néosynthétisé est pris en charge et inclus dans un complexe nucléoprotéique de préintégration qui permet la migration vers le noyau et le passage des pores nucléaires.

Une fois dans le noyau, l'intégrase virale assure l'intégration du génome viral dans l'ADN cellulaire en des sites non spécifiques mais dans des régions préférentielles liées à la structure de la chromatine. De multiples copies peuvent s'intégrer dans l'ADN génomique, leur nombre dépendant notamment de la cellule cible et de la souche virale. A ce stade, le virus fait partie intégrante du génome cellulaire et persiste sous la forme de provirus pendant toute la durée de vie de la cellule. En tant qu'entité intégrée dans le génome cellulaire, il est donc transmis aux cellules filles au fil des mitoses.

Au sein des chromosomes, les gènes viraux se comportent comme des gènes cellulaires et seront exprimés au cours de la phase tardive du cycle de réplication grâce à la machinerie enzymatique de transcription et de traduction de la cellule hôte. La transcription de l'ADN proviral aboutit à la synthèse d'un ARN messenger entier de 9 kb. Des phénomènes d'épissage différentiel conduisent à l'apparition de plusieurs transcripts : les premiers permettent l'expression de Tat, Nef et Rev, protéines cruciales dans la réplication du VIH. Ensuite sous l'influence de ces protéines, un second transcript est traduit en un précurseur Env, qui, après maturation génère les glycoprotéines d'enveloppe gp120 et gp41. Le transcript non épissé représente l'ARN génomique et sert de messenger traduit en un précurseur polyprotéique ou en une protéine de fusion qui vont s'accumuler au niveau de la membrane plasmique là où débute l'assemblage de la particule virale. Au cours du processus de maturation qui s'initie lors du relargage des nouveaux virions, ces précurseurs seront clivés par la protéase virale pour donner naissance aux protéines structurales et enzymatiques du VIH.

La synthèse virale est suivie par la dimérisation et l'encapsidation de l'ARN viral associé aux précurseurs polyprotéiques, et localisé à la surface interne de la membrane cellulaire où se sont insérés les glycoprotéines d'enveloppe. Des particules immatures se forment et quittent la cellule par bourgeonnement. Elles subissent un processus de maturation lent qui implique le clivage séquentiel des précurseurs et l'organisation des protéines pour donner naissance à des virions matures capables d'infecter une nouvelle cellule cible.

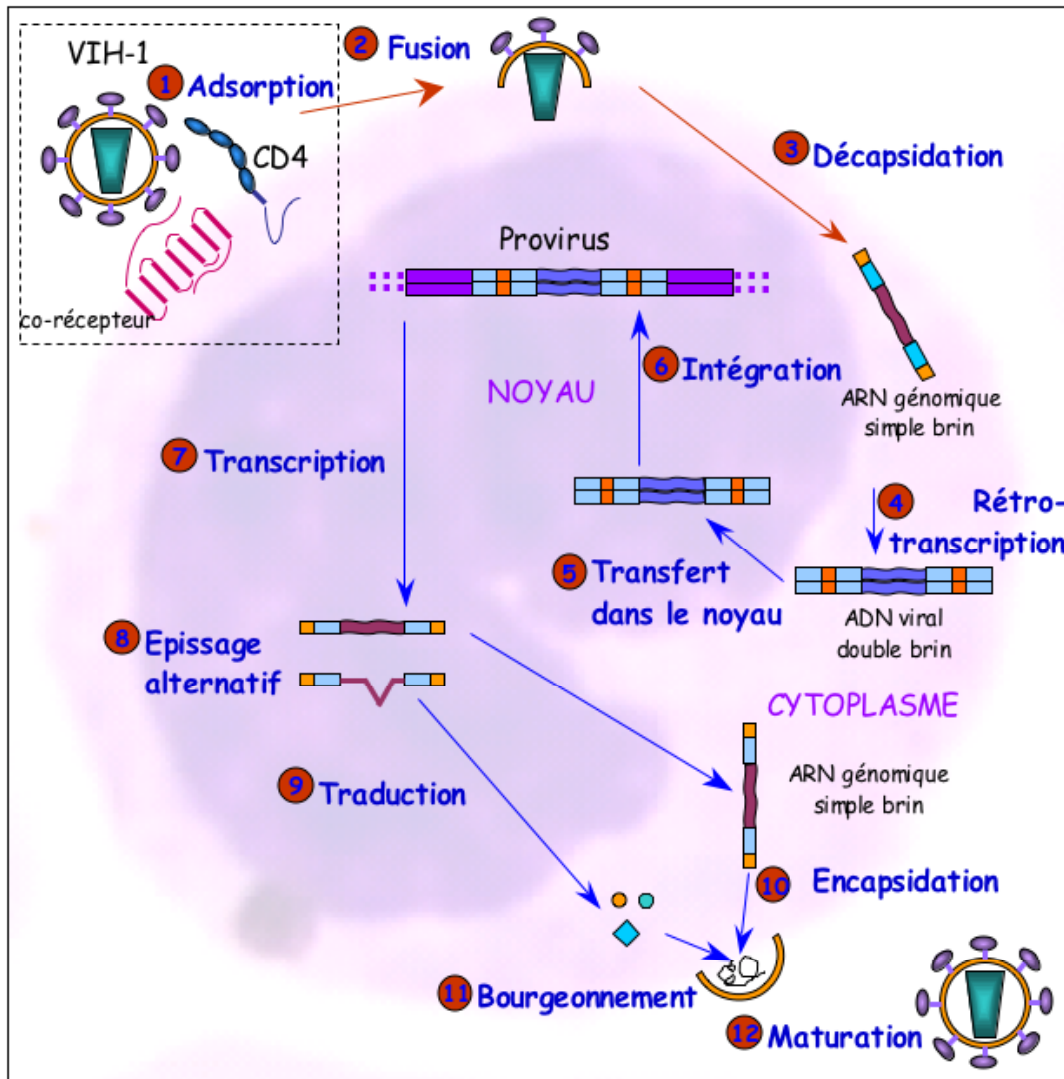


Figure 4 : Cycle de réplication du VIH

En résumé, on retiendra que le cycle de vie du VIH se compose de dix étapes majeures, chacune d'entre elles pouvant être considérée comme cible pour un traitement potentiel :

- 1) Adsorption
- 2) Fusion
- 3) Libération de l'acide nucléique viral
- 4) Transcription inverse
- 5) Intégration
- 6) Réplication
- 7) Transcription
- 8) Traduction
- 9) Bourgeoisement
- 10) Maturation

4. Importance des co-récepteurs

4.1. Implications des modifications post-traductionnelles de CCR5 et CXCR4 pour leur fonction de co-récepteur du VIH-1

Le mécanisme utilisé par le complexe gp120 associé au CD4 pour se lier au co-récepteur est complexe et semble mettre en jeu plusieurs domaines du co-récepteur. Des études utilisant des chimères de ces récepteurs ont permis de montrer que l'extrémité amino-terminale, les hélices transmembranaires ainsi que les boucles extracellulaires étaient impliquées dans la liaison du complexe au co-récepteur. Une partie de ces résultats a déjà été discutée dans le chapitre 2. On retiendra néanmoins que :

- L'architecture du récepteur liée notamment à la présence de ponts disulfures entre les cystéines extracellulaires est nécessaire à la liaison des chimiokines, mais ne semble pas être fondamentale pour l'interaction avec gp120 (Blanpain *et al.*, 1999b).

- Plusieurs expériences notamment la réalisation de chimères des récepteurs ou des expériences de mutagenèse dirigée ont permis de mettre en évidence le rôle crucial de l'extrémité amino-terminale de CCR5 pour la liaison de gp120 (pour revue Dragic, 2001). Les résidus chargés négativement dans la région amino-terminale notamment Asp², Asp¹¹ et Glu¹⁸, ainsi que les résidus tyrosine Tyr³, Tyr¹⁰, Tyr¹⁴ et Tyr¹⁵ semblent critiques à la fois pour la liaison de gp120 et pour l'entrée du virus. D'autres résidus de cette portion du récepteur incluant Ser⁶, Ile⁹, Asn¹³, Gln²¹ et Lys²² contribuent également à la fonction de co-récepteur (Rucker *et al.*, 1996 ; Dragic *et al.*, 1998 ; Farzan *et al.*, 1998 ; Blanpain *et al.*, 1999a).

- Des résidus de la boucle e2 de CCR5 contribuent également à l'entrée du virus. La Gly¹⁶³, qui semble être localisée dans le TMIV, ainsi que Tyr¹⁸⁴, Ser¹⁸⁵ et Arg¹⁹⁷ affectent la fonction de co-récepteur dans des expériences de mutagenèse. La boucle e2 semble particulièrement importante pour l'entrée du virus, mais pas nécessairement pour la liaison de gp120, comme le montrent des expériences d'inhibition de l'entrée du virus en utilisant des anticorps monoclonaux reconnaissant spécifiquement des épitopes de la boucle e2 (Wu *et al.*, 1997 ; Lee *et al.*, 1999). Ces résultats suggèrent que la boucle e2 semble jouer un rôle suite à la liaison de la gp120 sur l'extrémité amino-terminale, peut-être lors des changements conformationnels impliqués dans le processus d'oligomérisation de CCR5.

Dans le cas de CXCR4, des études sur des chimères CXCR4/CXCR2 montrent que les boucles e1 et e2 sont fondamentales à l'activité de co-récepteur (Lu *et al.*, 1997). A

l'inverse de CCR5, la boucle e2 de CXCR4 est riche en résidus chargés négativement, ce qui pourrait favoriser l'interaction avec les résidus basiques de la boucle V3 de la gp120. Des études de mutagenèse dirigée sur CXCR4 ont permis de montrer que le site de liaison de la gp120 sur CXCR4 varie en fonction des isolats considérés, mais que les résidus chargés et les tyrosines répartis sur les quatre domaines extracellulaires sont mis en jeu (Wang *et al.*, 1998 ; Chabot *et al.*, 1999 ; BreLOT *et al.*, 2000 ; Kajumo *et al.*, 2000 ; Zhou *et al.*, 2001). Une étude récente utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre les parties extracellulaires a mis en évidence que la boucle e2 de CXCR4 contribuait largement à la liaison de la gp120, alors que dans le cas de CCR5, la deuxième boucle extracellulaire mais également le domaine amino-terminal constituent le site de liaison de la gp120 (Carnec *et al.*, 2005).

- Le rôle de la boucle e3 de CCR5 est moins étudié, mais il semblerait que les résidus Asp²⁷⁶ et Gln²⁸⁰ soient importants (Doranz *et al.*, 1997b ; Farzan *et al.*, 1998).

- Certaines modifications post-traductionnelles du domaine extracellulaire sont fondamentales pour l'activité de co-récepteur et ont déjà été discutées dans le chapitre 2.

Glycosylations

CXCR4 possède deux sites putatifs de N-glycosylations, dans l'extrémité amino-terminale et dans la boucle e2, dont un seulement semble être glycosylé. La perte de cette glycosylation ne modifie pas la capacité de liaison de la gp120 des souche X4 sur CXCR4, mais de façon surprenante, des souches R5 ont la capacité de se lier sur CXCR4 non glycosylé.

CCR5 possède deux sites de O-glycosylations sur les Ser⁶ et Ser⁷, mais cette modification ne semble être critique que pour la liaison des chimiokines, et pas pour celle de la gp120. Ces modifications post-traductionnelles sont également fondamentales pour la fonction de co-récepteur puisque seul le récepteur sulfaté et O-glycosylé a la capacité de lier les complexes gp120/CD4 (Farzan *et al.*, 1999).

Sulfatations

Une caractéristique commune à tous les récepteurs de chimiokines pouvant servir de co-récepteur au VIH est la présence de résidus tyrosines au niveau de l'extrémité amino-terminale. La sulfatation des tyrosines de cette portion du récepteur est nécessaire à l'entrée du virus (Cormier *et al.*, 2000). En effet, cette modification apporte au récepteur des charges négatives qui semblent cruciales pour l'interaction avec les chimiokines mais aussi pour l'interaction avec gp120 qui possède dans sa boucle V3 une arginine extrêmement conservée (Wang *et al.*, 1998) : une interaction entre des résidus chargés positivement et les groupements sulfates pourrait stabiliser l'interaction entre gp120 et le co-récepteur. L'absence de sulfatation sur CCR5 et

CXCR4 entraîne une perte de leur capacité à être utilisé comme co-récepteur. De plus, des peptides sulfatés mimant l'extrémité amino-terminale de CCR5 ont la capacité de lier la gp120 avec des affinités de l'ordre du micromolaire (Farzan *et al.*, 2000).

- Les modifications post-traductionnelles de l'extrémité carboxy-terminale n'influencent pas directement la liaison de la gp120, mais participent indirectement à l'efficacité d'infection par VIH dans la mesure où elles régulent le taux d'expression de surface des co-récepteurs.

(pour revue Zaitseva *et al.*, 2003)

4.2. Site de liaison et signalisation induite par la fixation de gp120

Les régions impliquées dans la liaison des chimiokines et celles impliquées dans la liaison de la gp120 sur CCR5 ne semblent pas se recouvrir (Rabut *et al.*, 1998 ; Blanpain *et al.*, 1999a ; Lee *et al.*, 1999 ; Zhou *et al.*, 2000). La boucle e2 semble jouer un rôle clé dans la spécificité de liaison des chimiokines alors que le domaine amino-terminal pourrait être le déterminant majeur de la fonction de co-récepteur. Des mutants tronqués dans leur extrémité amino-terminale montrent néanmoins une perte drastique d'affinité pour les chimiokines et pour les glycoprotéines d'enveloppe R5. Certains résidus basiques de l'extrémité amino-terminale semblent également jouer un rôle crucial dans l'affinité de la liaison à la fois des chimiokines et de gp120 (Blanpain *et al.*, 1999a).

Les fonctions chimioattractantes de CXCR4 et son rôle de co-récepteur du VIH peuvent se produire indépendamment. CXCR4 est hautement hétérogène et différentes formes de poids moléculaires variables sont exprimées dans les cellules, sachant que certains types cellulaires expriment plusieurs isoformes. Ces isoformes résultent en partie de modifications post-traductionnelles du récepteur, comme des N-glycosylations, ou encore de l'oligomérisation du récepteur. En revanche et contrairement à SDF-1, la glycoprotéine d'enveloppe X4 ne se lie qu'à l'isoforme de 83 kDa. La réponse induite par SDF-1 est différente de celle induite par gp120 (Sloane *et al.*, 2005). Il semblerait au vu de cette étude que la réponse cellulaire induite par SDF-1 n'implique pas les mêmes isoformes que la réponse induite par la liaison de gp120.

La liaison de la gp120 sur les co-récepteurs engendre une signalisation dépendante des protéines G hétérotrimériques, notamment une mobilisation de calcium intracellulaire, l'activation des tyrosines kinases pyk2 et FAK et le chimiotactisme (Davis *et al.*, 1997 ; Del Corno *et al.*, 2001 ; Freedman *et al.*, 2003 ; Lee *et al.*, 2003a). L'activation de ces voies de signalisation joue sans doute un rôle d'une part dans la régulation des fonctions cellulaires, mais également dans les modifications du

cytosquelette visant à faciliter l'entrée du virus et sa propagation aux cellules saines. En effet, des protéines d'enveloppe recombinantes de type R5 ont la capacité d'induire le chimiotactisme des lymphocytes T *in vitro*, et il semblerait que ce processus soit applicable *in vivo* et favorise la propagation du virus qui a ainsi la faculté d'attirer les lymphocytes T sains sur le site de la réplication virale (Weissman *et al.*, 1997).

Néanmoins, il semblerait que cette capacité à signaler ne soit pas nécessaire pour que le co-récepteur puisse permettre l'entrée du virus dans la cellule cible. En effet, ni l'inhibition des protéines G par la toxine pertussique, ni la troncation des parties cytoplasmiques de CCR5, ni même l'introduction d'une mutation dans le motif DRY ne modifie la capacité de CCR5 à servir de co-récepteur à l'entrée du virus (Alkhatib *et al.*, 1997 ; Aramori *et al.*, 1997 ; Farzan *et al.*, 1997). Des mutations similaires introduites dans CXCR4 n'affectent pas non plus sa capacité de co-récepteur *in vitro* (Amara *et al.*, 1997). Des études menées sur différents types cellulaires donnent néanmoins des résultats contradictoires. Une analyse menée sur des macrophages prélevés sur des patients portant la mutation CCR5 Δ 32 à l'état homozygote en réintroduisant le gène CCR5 sauvage par un lentivirus montre que, lorsque CCR5 est reconstitué dans un environnement de cellules CD4+, la signalisation par les protéines G n'est pas nécessaire aux souches R5 pour infecter efficacement les lymphocytes T ou les macrophages (Amara *et al.*, 2003).

5. Effet protecteur des chimiokines et de leurs dérivés dans le cadre de l'infection à VIH

5.1. Effet de RANTES, MIP-1 α et MIP-1 β sur les souches R5 et de SDF-1 sur les souches X4

Les ligands de CCR5, RANTES, MIP-1 α et MIP-1 β sont des inhibiteurs potentiels des souches utilisant CCR5 comme co-récepteur même si cet effet peut varier en fonction de la souche du virus considérée (Neote *et al.*, 1993 ; Cocchi *et al.*, 1995).

SDF-1 inhibe l'entrée des souches utilisant CXCR4 (Bleul *et al.*, 1996a ; Oberlin *et al.*, 1996). Néanmoins, SDF-1 augmente également l'infektivité des particules virales de type R5, visiblement en augmentant le rôle transactivateur de Tat au niveau des LTRs (Marechal *et al.*, 1999). SDF-1 β a une activité antivirale supérieure à celle de SDF-1 α . Ces deux ligands ne diffèrent que par la longueur de l'extrémité carboxy-terminale, plus longue pour SDF-1 β . Des peptides mimant l'extrémité carboxy-terminale de SDF-1 β présentent une activité inhibitrice, mais pas un peptide dérivé de SDF-1 α . Il semblerait donc que l'extrémité carboxy-terminale soit impliquée dans l'effet inhibiteur de la chimiokine (Dettin *et al.*, 2004).

Certains types cellulaires semblent plus sensibles que d'autres à l'effet inhibiteur des chimiokines. L'infection de lymphocytes T CD4⁺ est généralement inhibée par de faibles concentrations de chimiokines (<1 ng/ml), alors que l'inhibition de l'entrée du virus dans les macrophages requiert des concentrations de chimiokines nettement plus élevées, de l'ordre du microgramme/ml (Dragic *et al.*, 1996 ; Simmons *et al.*, 1997).

L'inhibition de l'entrée du VIH médiée par les chimiokines semble résulter de la combinaison de trois mécanismes :

- Une gêne stérique entre la gp120 et le co-récepteur (Arenzana-Seisdedos *et al.*, 1996 ; Simmons *et al.*, 1997).
- Une internalisation du récepteur induite par le ligand qui a pour conséquence de réduire la capacité de la gp120 à se lier au récepteur (Alkhatib *et al.*, 1997 ; Amara *et al.*, 1997 ; Signoret *et al.*, 1997). Le processus d'internalisation des récepteurs par les chimiokines semble être un mécanisme majeur dans le rôle préventif des chimiokines en matière d'infection à VIH. En effet, sur un mutant de CCR5, M7-CCR5 ayant perdu des sites de phosphorylation dans le domaine carboxy-terminal et n'étant plus capable d'internaliser en réponse à la liaison des agonistes, mais présentant une activité de co-récepteur intact, l'effet inhibiteur des chimiokines est considérablement réduit (Brandt *et al.*, 2002).
- Une interférence dans le recyclage du récepteur (Mack *et al.*, 1998).

Les glycosaminoglycanes semblent influencer à la fois les effets physiologiques des chimiokines, mais également leur effet antiviral. La formation de complexes entre les chimiokines et les GAGs solubles augmente l'effet antiviral des chimiokines tout en diminuant leur efficacité de signalisation (Wagner *et al.*, 1998 ; Burns *et al.*, 1999 ; Mbemba *et al.*, 1999 ; Stantchev et Broder, 2001 ; Vives *et al.*, 2005).

5.2. Effets des dérivés de chimiokines

Les dérivés de chimiokines, en particulier les chimiokines modifiées au niveau de l'extrémité amino-terminale, ont un potentiel particulièrement élevé pour inhiber l'entrée du virus dans les cellules *in vitro* (Mack *et al.*, 1998). Le potentiel de ces molécules à bloquer l'entrée du virus résulte de leur pouvoir à induire l'internalisation du récepteur et à prévenir le recyclage des récepteurs à la surface de la cellule (Mack *et al.*, 1998 ; Signoret *et al.*, 2000).

Met-RANTES possède une méthionine additionnelle au niveau de l'extrémité amino-terminale et se comporte comme un antagoniste pur sur des monocytes exprimant CCR5. AOP-RANTES porte un groupement amino-oxy-pentane (AOP) et agit comme un

antagoniste partiel sur des monocytes exprimant CCR5. Ces deux dérivés de chimiokines ont la capacité d'induire une régulation négative de CCR5 et préviennent le recyclage de CCR5 à la membrane (Mack *et al.*, 1998). Elles bloquent à la fois l'interaction de la gp120 et des chimiokines avec CCR5 (Arenzana-Seisdedos *et al.*, 1996 ; Kledal *et al.*, 1997 ; Simmons *et al.*, 1997 ; Proudfoot *et al.*, 1999).

RANTES(9-68) se présente comme un inhibiteur potentiel des souches M-tropiques du VIH (Arenzana-Seisdedos *et al.*, 1996). Cette molécule n'induit ni mobilisation de calcium ni chimiotactisme, mais peut induire une régulation négative de CCR5 (Amara *et al.*, 1997).

AOP-MIP-1 α est un dérivé de MIP-1 qui s'avère être dix fois plus actif que AOP-RANTES pour inhiber l'entrée du virus et n'induit pas de signalisation (Townson *et al.*, 2000).

LD-78 α , qui ne diffère de MIP-1 α qu'au niveau de trois acides aminés, est plus efficace que MIP-1 α et RANTES pour prévenir l'infection virale, mais induit une signalisation dans la cellule (Aquaro *et al.*, 2001).

L'addition d'une méthionine au niveau de l'extrémité amino-terminale de SDF-1 résulte en une très forte activité antivirale, néanmoins cette molécule induit une intense signalisation dans les cellules (Yang *et al.*, 1999).

5.3. Les intrakines

Les intrakines sont des chimiokines modifiées délivrées par thérapie génique, et qui ont pour conséquence de séquestrer le récepteur néosynthétisé au niveau du réticulum endoplasmique afin de bloquer son expression à la surface de la cellule. Le récepteur séquestré à l'intérieur de la cellule est ensuite dégradé.

Les intrakines dérivées de MIP et de RANTES ont pour but de mimer les effets de la mutation CCR5 Δ 32 qui aboutit à une résistance naturelle à l'infection (Yang *et al.*, 1997). Des intrakines dérivées de SDF-1 sont à l'étude, mais peuvent poser des problèmes au vu des résultats observés sur des souris KO pour le gène CXCR4 (Chen *et al.*, 1997). Néanmoins, utilisées *in vitro* sur des cellules PBMC, ces intrakines inhibent l'infection par les souches X4 et R5 (Bai *et al.*, 1998). De telles molécules ont comme avantage de ne pas générer de réponse immunitaire puisqu'elles sont dérivées de chimiokines humaines.

6. Le traitement de l'infection à VIH

6.1. Les premiers médicaments

Les premiers médicaments développés dans le cadre de l'infection à VIH visaient à bloquer des enzymes propres au virus, et non des enzymes cellulaires.

6.1.1. Les inhibiteurs de la transcriptase inverse

La première cible fut la transcriptase inverse (RT) puisque son activité est essentielle au cycle de vie du virus, dans la mesure où elle seule peut convertir le génome viral porté par une molécule d'ARN en ADN bicaténaire qui sera alors intégré au génome de l'hôte. Les substrats de la RT sont des désoxyribonucléotides triphosphates (dNTPs) qui sont incorporés de façon séquentielle dans la molécule d'ADN naissante. Des analogues de ces nucléotides, appelés NRTIs ou NtRTIs (Nucleoside/Nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitors) qui sont des bioprécurseurs triphosphorylés mais dépourvus du groupement hydroxy libre permettant l'élongation de la chaîne d'ADN aboutissent à une terminaison prématurée de la réplication lorsqu'ils sont incorporés dans la molécule d'ADN naissante. Parmi ces analogues, on retrouve notamment le très célèbre AZT, plus six autres molécules actuellement utilisées en traitement et neuf molécules en essais cliniques (Barbaro *et al.*, 2005).

La deuxième classe de composés inhibant la RT sont les NNRTI (NonNucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors) : trois composés sont actuellement utilisés en clinique et deux autres sont en essais (Barbaro *et al.*, 2005). Ces composés, qui présentent des structures chimiques très variées, se lient à la RT sur un site allostérique différent du site de liaison du substrat sans subir de modifications. Lorsqu'ils sont utilisés seuls, ces composés génèrent rapidement des souches résistantes et sont en général administrés en combinaison avec un, le plus souvent deux NRTIs.

6.1.2. Les inhibiteurs de la protéase virale

La deuxième grande classe de molécules utilisées en clinique vise à bloquer une deuxième enzyme propre au virus qu'est la protéase virale. Les inhibiteurs de protéase (PIs) sont des analogues de peptides qui agissent comme inhibiteurs compétitifs du substrat naturel en mimant une liaison Phénylalanine-Proline clivée par la RT. Sept composés de ce type sont actuellement utilisés en clinique et de nombreux autres sont en essai (Barbaro *et al.*, 2005).

(pour revue Pomerantz et Horn, 2003)

Le traitement des patients atteints par le VIH par les HAART (Highly Active AntiRetroviral Therapy) fut un succès considérable dans la mesure où ces molécules ont la capacité de réduire la réplication virale, permettent un recouvrement des fonctions immunitaires des patients et globalement améliorent la qualité de vie des malades. Néanmoins, de nombreuses études suggèrent que l'efficacité de ces traitements est de plus en plus limitée en raison de l'émergence de virus résistants. Par ailleurs, la toxicité et les effets secondaires relativement lourds liés à la prise de ces médicaments font qu'il devient capital de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques, visant soit à améliorer les molécules existantes, soit à explorer la piste de nouvelles cibles. La connaissance plus approfondie des mécanismes d'entrée du virus dans les cellules cibles et du cycle de réplication du virus ont permis de mettre en évidence de nouvelles cibles potentielles d'action de nouveaux médicaments.

6.2. Les nouvelles cibles

Je me limiterai ici à présenter les stratégies thérapeutiques sans entrer dans le détail (pour revue De Clercq, 2001 ; Barbaro *et al.*, 2005).

6.2.1. Les inhibiteurs de l'intégrase virale

L'intégrase est une enzyme codée par le virus qui permet d'intégrer l'ADN proviral au génome de l'hôte ce qui constitue une phase essentielle au cycle de vie du virus. Cette enzyme a rapidement constitué une cible de choix dans la mesure où elle ne possède pas d'équivalent chez l'homme (Hong *et al.*, 1997). Un composé est actuellement en essai clinique.

6.2.2. Les inhibiteurs de la protéine de nucléocapside p7

Cette enzyme propre au virus a la particularité de posséder un motif en doigt à zinc et est essentielle au cycle de vie du virus dans la mesure où elle différencie l'ARN cellulaire de l'ARN viral au moment de la formation des particules virales. Un composé inhibant cette enzyme est en phase clinique chez des patients à un stade avancé de la maladie et semble donner des résultats encourageants.

6.2.3. Les inhibiteurs de l'entrée du virus

La première phase clé permettant l'entrée du virus dans les cellules hôtes est l'attachement de la gp120 au CD4. Un composé est actuellement en phase II/III.

La seconde étape clé est la liaison au co-récepteur qui sera discutée plus tard.

Enfin, la dernière étape cible des nouveaux traitements est la fusion (pour revue Baldwin *et al.*, 2003 ; Altmeyer, 2004).

Le T20 (Enfuvirtide) est un peptide inhibiteur de fusion qui même utilisé seul peut réduire considérablement la charge virale en étant injecté par voie sous-cutanée deux fois par jour (LaBranche *et al.*, 2001). La séquence de ce peptide est basée sur la séquence de la région HR2 de la gp41. Le T20 se lie à la structure en coiled-coil et prévient la formation de la structure en épingle à cheveux, et empêche ainsi la fusion, mais ne se lie pas à la protéine Env native (Kilby *et al.*, 1998). Le T20 a obtenu l'autorisation de mise sur le marché aux Etats-Unis en mars 2003 (Matthews *et al.*, 2004). Le T20 est utilisé en combinaison avec d'autres molécules antirétrovirales pour augmenter son efficacité. Néanmoins, la complexité de synthèse de ce peptide engendre des coûts de fabrication très élevés.

Le T1249, peptide de 39 acides aminés, dérivé de la région HR2 semble être encore plus puissant que le T20 (de 2 à 100 fois plus actif *in vitro*). Ce peptide est actuellement en développement clinique (Schneider *et al.*, 2005).

Un autre peptide, le 5-helix, dérivé de l'extrémité carboxy-terminale de la gp41, qui présente une activité inhibitrice de l'infection par VIH à des concentrations nanomolaires (Root *et al.*, 2001).

Dans la mesure où le coût de ces médicaments est excessivement élevé, de nouvelles stratégies visent à identifier des inhibiteurs de fusion non peptidiques. Certains de ces composés ont une activité antivirale *in vitro* (pour revue Barbaro *et al.*, 2005).

6.2.4. Les autres cibles

Toutes les étapes du cycle viral peuvent être considérées comme des cibles potentielles. Les protéines propres au virus notamment constituent des cibles de choix dans la mesure où le risque d'interactions croisées sur des protéines de l'hôte est limité. Parmi les stratégies évoquées, on notera que le tripeptide GPG qui semble se lier à la protéine de capsid p24 a permis une modeste réduction de la charge virale chez 9 patients traités par administration de 4 g de ce composé trois fois par jour.

6.2.5. Anticorps

PRO-542 est une protéine de fusion recombinante d'immunoglobuline humaine possédant les deux domaines distaux de CD4 et qui a la capacité de neutraliser plusieurs souches virales *in vitro* et qui est capable de réduire considérablement la charge virale sur un modèle murin. Les premiers essais cliniques montrent que PRO-542 est efficace chez l'adulte et l'enfant, bien toléré avec une demi-vie relativement longue de 3 à 4 jours (Vermeire *et al.*, 2004).

PRO140 (Progenics Pharmaceuticals Inc.), anticorps de souris humanisé dans le but de réduire les réponses immunitaires bloque un spectre assez vaste de souches *in vitro* sur des lymphocytes, macrophages et cellules dendritiques et *in vivo* sur un modèle de souris SCID. Cette molécule agit à des concentrations n'ayant pas d'effet sur la signalisation induite par les chimiokines. Cette molécule entre en phase I (Poli, 2001).

6.2.6. Vaccination

D'un point de vue historique, les vaccins vivants atténués ont connu un très grand succès pour éradiquer plusieurs maladies. En effet, ces vaccins induisent une réponse immunitaire forte et durable (pour revue Whitney et Ruprecht, 2004). La première tentative visait à réaliser un vaccin atténué délété de Nef, dans la mesure où un tel variant a été observé chez un non progresseur à long terme. Le virus simien SIV délété de Nef ne cause pas de maladie chez le macaque et induit une protection contre le SIV sauvage. Néanmoins, ce vaccin engendre un dysfonctionnement du système immunitaire, provoque la déplétion en cellules T et à plus long terme, 18 % des singes testés développent la maladie.

D'autres groupes ont tenté d'établir un vaccin contre certains épitopes de la gp120, accessibles à la surface du virus. Les premiers essais utilisant une gp120 monomérique n'ont malheureusement pas donné les résultats attendus. Les individus immunisés par un tel vaccin présentent un très faible taux d'anticorps neutralisants. En effet, les souches utilisées pour générer les vaccins sont des souches de laboratoire, et la variabilité génétique des souches trouvées actuellement chez les patients infectés est très grande. D'autres groupes ont tenté de développer des anticorps contre plusieurs parties de l'enveloppe. B12 et 2G12 sont dirigés contre des épitopes de gp120 et 2F5 contre des épitopes de gp41 : tous ces anticorps sont très faiblement immunogéniques. Il semblerait que les glycoprotéines d'enveloppe aient évolué de façon à échapper au système immunitaire.

Le problème de la vaccination est discuté par (Burton *et al.*, 2004 ; Dorrell *et al.*, 2005).

6.3. Les antagonistes des récepteurs de chimiokines

Je détaillerai d'avantage cette partie qui est plus liée à mon sujet de recherche.

6.3.1. Antagonistes de CCR5

CCR5 constitue une cible de choix pour la recherche de nouveaux médicaments dans la mesure où ce récepteur est utilisé par les isolats primaires et joue un rôle critique dans l'établissement et le maintien de l'infection. Par ailleurs, la mutation CCR5 Δ 32 montre que ce récepteur n'est pas indispensable à une bonne santé du patient.

Le TAK-779 (Société Takeda) fut la première molécule antagoniste de CCR5 découverte. Le TAK-779 est un composé non peptidique, de faible poids moléculaire qui antagonise la liaison de RANTES sur CCR5 et bloque la réponse calcique à des concentrations nanomolaires (1.6 à 3.7 nM). Il est actif à la fois sur les souches de laboratoire et sur des souches issues de patients infectés. Il est sans effet sur les souches X4 (Baba *et al.*, 1999). Cette molécule se lie à CCR5 au niveau d'une cavité formée par les hélices transmembranaires I, II, III et VII (Dragic *et al.*, 2000 ; Este, 2001).

Cette drogue est administrée par injection et des complications au niveau du site d'injection, visiblement liées à la structure ammonium quaternaire de la molécule ont mis fin à l'étude. D'autres composés dépourvus de ces charges positives sont actuellement en développement. Une nouvelle molécule, le TAK-220, qui inhibe sélectivement la liaison de RANTES et MIP-1 α (mais pas MIP-1 β) sur CCR5 est en phase pré-clinique (Takashima *et al.*, 2005).

Les molécules SCH-C et SCH-D (Société Schering-Plough) sont des oximes-pipéridines inhibiteurs spécifiques des souches R5 pour un large spectre de souches testées. SCH-C bloque également la réplication des souches R5 sur un modèle de souris SCID (Severe Combined ImmunoDeficiency). Le site de fixation semble se situer au niveau d'une cavité formée par les hélices transmembranaires I, II, III et VII. Il semblerait que cette molécule agisse non seulement en bloquant la liaison de la gp120 par gêne stérique, mais également en modifiant la conformation des domaines extracellulaires de CCR5. Ce composé présente un profil pharmacologique favorable, une bonne biodisponibilité orale et une demi-vie dans le sérum de 5 à 6 heures. Les premiers essais cliniques (25 mg par jour, voie orale pendant 10 jours, 12 patients) ont permis de mettre en évidence une réduction de la charge virale d'un demi-logarithme pour 10 patients (Strizki *et al.*, 2001). Néanmoins, une administration prolongée à forte dose de

la molécule engendre des problèmes cardiaques (Este, 2002). La compagnie s'est tournée vers le SCH-D qui a une meilleure activité antivirale que le SCH-C (0.1 à 0.3 nM). Cette molécule est en essai clinique.

La molécule UK-427,857 (Société Pfizer) est un antagoniste de CCR5 inhibiteur non compétitif des chimiokines, qui agit sur un large spectre de souches de laboratoires à des concentrations nanomolaires (Walker *et al.*, 2005). Le composé est administré par voie orale et bien toléré par les individus sains. L'activité antivirale chez les patients infectés n'a pas encore été rapportée.

Le E913 (Sociétés Ono Pharmaceuticals et GlaxoSmithKline) bloque la liaison de MIP-1 α sur CCR5 et la mobilisation de calcium et inhibe la réplication des souches de laboratoire, notamment des souches résistantes aux traitements par les HAART. Il s'agit d'un composé chef de file qui est administré par voie orale chez les rongeurs. Le AK602, composé dérivé, bloque l'infection à des concentrations nanomolaires *in vivo* (souris SCID) et *in vitro* (Nakata *et al.*, 2005). Il semblerait que le mode d'action soit différent de celui du TAK-779 et du SCH-C.

De nombreux composés sont à l'étude actuellement, mais il est impossible de les citer tous (Seibert et Sakmar, 2004 ; Princen et Schols, 2005).

6.3.2. Antagonistes de CXCR4

Ce co-récepteur est utilisé par des souches qui émergent plus tard au cours de l'évolution de la maladie chez 40 % des individus infectés. Contrairement à CCR5, l'absence de CXCR4 est mal tolérée. Des souris déficientes en CXCR4 ou SDF-1 ne survivent pas à l'embryogenèse et présentent une large variété de déficits cardiaques, neurologiques, hématopoïétiques.

L'AMD3100 fut la première molécule antagoniste des récepteurs de chimiokines à entrer en phase II, mais son développement a été arrêté en raison des effets cardiotoxiques de la molécule. L'AMD3100 (Société AnorMed) est un bicyclame, et plusieurs membres de cette famille chimique semblent se comporter comme antagonistes de CXCR4 (De Clercq, 2000). L'AMD3100 est en fait un agoniste partiel hautement sélectif de CXCR4 qui inhibe spécifiquement un large spectre de souches à des concentrations de 2 à 20 nM, mais nécessite une administration parentérale (musculaire, intraveineuse ou sous-cutanée). Dans un premier essai clinique sur 40 patients traités par perfusion continue pendant 10 jours, la molécule réduit la charge

virale d'environ un logarithme chez le seul patient ne possédant que des souches X4. Chez 19 patients possédant des souches R5X4 ou des souches R5 et X4, la molécule supprime les variants X4 sans diminution de la charge virale (Donzella *et al.*, 1998). Ce résultat montre que le phénotype est important pour l'administration du traitement et que selon toute vraisemblance il faudrait administrer des cocktails d'antagonistes X4 et R5. La toxicité cardiaque de cette molécule a interrompu les essais cliniques (De Clercq, 2003 ; Hendrix *et al.*, 2004). Une publication récente mentionne que la structure chimique à l'origine de l'activité antirétrovirale de l'AMD3100 n'est pas la structure bis-macrocyclique, puisqu'un autre composé, l'AMD3465, qui est un N-pyridinylméthylène cyclame ne possède pas de structure bis-macrocyclique, mais conserve pleinement son activité antivirale (Hatse *et al.*, 2005).

Le KRH-1636 (Université de Tokyo) inhibe la liaison de SDF-1 sur CXCR4 et la signalisation médiée par CXCR4 à des concentrations nanomolaires. Il bloque la réplication des souches X4 *in vitro* et *in vivo* sur un modèle murin (souris SCID). Ce composé est en phase pré-clinique (Ichiyama *et al.*, 2003).

Le T22 (Université de Kyoto) est un peptide de 18 acides aminés possédant une structure en brins β antiparallèles, maintenue par deux ponts disulfures ([Tyr⁵,12,Lys⁷]polyphemusin II). Ce peptide bloque l'infection par divers sous-types de souches X4, mais pose des problèmes de biodisponibilité liés à la présence de nombreux résidus basiques (Murakami *et al.*, 1997). D'autres composés dérivés de T22, comme T134 et T140 sont actuellement à l'étude (Tamamura *et al.*, 1998 ; Arakaki *et al.*, 1999 ; Xu *et al.*, 1999).

L'ALX40-4C a été testé chez des patients infectés avant la découverte des co-récepteurs du VIH et n'a pas permis d'observer une réduction de la charge virale ce qui a stoppé son développement clinique en phase I/II. Néanmoins c'est le seul composé qui est bien toléré par 39 des 40 patients asymptomatiques au-delà de 30 jours d'administration (Doranz *et al.*, 1997a ; Doranz *et al.*, 2001).

Les structures de quelques antagonistes des récepteurs de chimiokines sont représentées sur la figure 5.

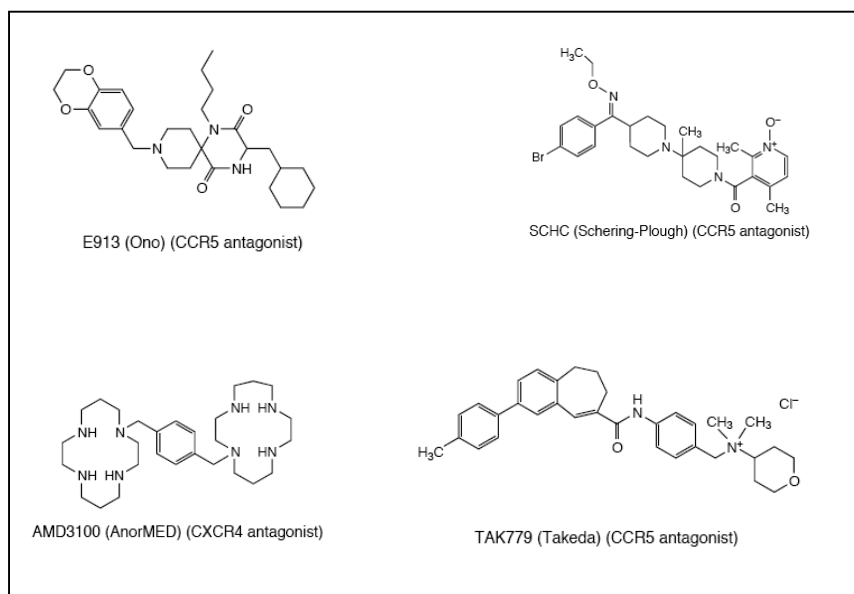


Figure 5 : Structures de quelques antagonistes des récepteurs de chimiokines
(Extrait de Onuffer et Horuk, 2002)

Toutes les molécules décrites ici sont des antagonistes sélectifs d'un récepteur. L'idéal serait de trouver une molécule qui soit efficace sur les souches R5, X4 et R5X4. Une seule étude mentionne un tel composé qui semble actif sur les souches de laboratoire des trois phénotypes (Princen *et al.*, 2004).

Remarque : le fait de cibler une protéine cellulaire plutôt qu'une protéine virale peut sans aucun doute générer des problèmes inévitables. On en revient toujours à cette mutation de CCR5 pour lesquels les porteurs sont sains. Néanmoins, les récepteurs de chimiokines sont impliqués dans un grand nombre de pathologies et de processus inflammatoires, et les conséquences de leur inhibition ne peuvent pas être mesurées sur des modèles de souris. Les conséquences doivent être évaluées sur le long terme, notamment chez les patients infectés.

Dans le cas de CXCR4, il s'agit d'autant plus d'un problème au vu de son rôle critique dans le développement mais aussi dans la vie adulte, notamment pour l'hématopoïèse. Ce problème se pose dans le cas de tous les traitements et la question est toujours de savoir si les bénéfices du traitement peuvent contrebalancer les effets secondaires des médicaments. Les récepteurs de chimiokines restent néanmoins des cibles de choix pour la recherche de nouveaux traitements de l'infection à VIH, mais aussi pour le traitement des autres pathologies liées à ces récepteurs et mentionnées tableau 3, chapitre 2. La recherche se heurte à de nombreux problèmes. On retiendra notamment que le modèle utilisé reste la rhodopsine, d'où des interactions croisées avec d'autres récepteurs de la

famille 1 des RCPG. La résolution de la structure tridimensionnelle des récepteurs de chimiokines pourrait permettre de connaître de façon plus précise les sites impliqués dans la liaison des ligands et d'améliorer les molécules déjà existantes pour les rendre plus spécifiques (pour revue Shaheen et Collman, 2004).

Mon travail de thèse est une faible contribution à l'étude structurale des récepteurs de chimiokines *CCR5* et *CXCR4*.

CHAPITRE 4

PROBLEMATIQUE DE LA THESE ET SITUATION DU SUJET DANS LE CONTEXTE DE RECHERCHE

1. Objectifs des recherches menées au laboratoire

L'intérêt porté par un grand nombre de sociétés pharmaceutiques et par de nombreux laboratoires académiques à l'étude des récepteurs de chimiokines CCR5 et CXCR4 se comprend aisément au vu des pathologies dans lesquelles ces récepteurs sont impliqués. De nouveaux antagonistes de ces récepteurs auraient un énorme potentiel thérapeutique, comme cela a déjà été discuté dans le chapitre 2.

La recherche d'inhibiteurs ou d'antagonistes repose classiquement sur deux approches :

- Le criblage à haut débit de banques de molécules, de composés chimiques ou naturels, méthode qui nécessite de disposer de tests fonctionnels adaptables à moyen voire haut débit.
- La détermination de la structure de la cible à l'échelle atomique, afin d'établir à l'échelle moléculaire les sites d'interaction ligand/récepteur et d'assister la conception d'un agent bloquant potentiel, ce qui nécessite de disposer d'importantes quantités de protéine pure et parfaitement repliée.

Les compétences de deux groupes de notre laboratoire ont été mises à profit dans le cadre de l'Action concertée 14.2 de l'ANRS pour identifier de nouveaux ligands des co-récepteurs du VIH. D'une part, le groupe de Jean-Luc Galzi, « Dynamique des Récepteurs Couplés aux Protéines G », est spécialisé en biologie moléculaire et cellulaire, spectroscopie de fluorescence (FRET) et microscopie. D'autre part, le groupe de « Biologie Structurale des Membranes », dirigé par Franc Pattus qui s'intéresse à l'étude structurale et fonctionnelle des protéines membranaires est expert en biochimie et biophysique structurale, développement de systèmes d'expression et cristallisation. Dans le cadre du réseau ANRS, le groupe de Jean-Luc Galzi a rejoint une action coordonnée visant à identifier de nouveaux ligands des récepteurs CCR5 et CXCR4, alors que le groupe de Franc Pattus a rejoint l'action coordonnée « Etudes des co-récepteurs » dont le but ultime est d'obtenir la structure tridimensionnelle des co-récepteurs du VIH CCR5 et CXCR4.

2. Présentation du réseau ANRS

L'obtention de la structure cristallographique d'une protéine nécessite de grandes quantités de cette protéine pure et parfaitement repliée, dans un état aussi proche que possible de son état natif. Hormis la rhodopsine qui est naturellement très abondante, le faible taux d'expression des récepteurs couplés aux protéines G rend impossibles des études structurales en système homologue, d'où l'intérêt de disposer d'un système de surexpression particulièrement efficace permettant de produire les grandes quantités de récepteurs nécessaires aux études structurales. C'est dans ce but que plusieurs laboratoires se sont réunis au sein d'un consortium soutenu par l'ANRS depuis juillet 2000.

Parmi le peu de protéines membranaires dont la structure cristallographique est résolue, on trouve un seul RCPG (Palczewski *et al.*, 2000), ce qui rend compte de la difficulté majeure de manier ces protéines. En effet, les RCPG sont naturellement très faiblement exprimés, et leur maniement se heurte à de nombreux problèmes expérimentaux au moment de la solubilisation et de la purification, comme le montre la littérature à ce sujet (Mirzabekov *et al.*, 1999 ; Hoffman *et al.*, 2000 ; Mirzabekov *et al.*, 2000 ; Staudinger et Bandres, 2000 ; Babcock *et al.*, 2001 ; Navratilova *et al.*, 2005). D'où l'intérêt de mettre à profit les compétences de plusieurs laboratoires regroupés en un réseau.

Le projet du réseau comporte deux phases :

- La première vise à identifier le système d'expression le plus efficace pour produire les récepteurs CCR5 et CXCR4 en termes de production, solubilisation et purification. Pour cela, quatre systèmes d'expression ont été testés dans le réseau.
- La deuxième est de produire d'importantes quantités de protéines dans le système choisi afin d'envisager les études cristallographiques.

Je me limiterai ici à présenter très brièvement les systèmes d'expression testés dans le cadre du réseau. Je décrirai plus précisément les systèmes d'expression utilisés dans le cadre de cette thèse dans les chapitres 5 et 7.

2.1. Expression dans *Escherichia coli*

Les systèmes bactériens ont pour principaux avantages leur simplicité de mise en œuvre et la rapidité d'optimisation, mais aussi le faible coût d'une production à grande échelle. Néanmoins, ces systèmes présentent trois inconvénients majeurs que sont le biais de codons, une composition en lipides membranaires différente de celle des membranes eucaryotes et l'absence de certaines modifications post-traductionnelles qui

contribuent souvent à la stabilité des protéines. Le problème du biais de codon peut être contrecarré en réalisant un gène synthétique possédant les codons optimisés pour *E. coli*. La composition en lipides membranaires peut être restaurée en solubilisant le récepteur et en le reconstituant dans des membranes modèles. Le problème des modifications post-traductionnelles doit être évalué selon la protéine considérée.

Les protéines membranaires exprimées chez *E.coli* ont souvent tendance à être produites sous forme de corps d'inclusion, soit de façon naturelle, soit en raison de la présence de séquences spécifiques favorisant la formation de ces amas de densité élevée formés de protéines mal repliées. Les corps d'inclusion sont résistants à la protéolyse, faciles à isoler et contiennent de grandes quantités de protéines. Par contre, la protéine ainsi produite doit nécessairement être repliée correctement, ce qui est souvent l'étape limitante de ce procédé.

Plusieurs RCPG ont néanmoins été exprimés avec succès dans ce système d'expression (Chen et Gouaux, 1996 ; Kiefer *et al.*, 1996 ; Mouillac *et al.*, 2002 ; Baneres *et al.*, 2003 ; Baneres et Parello, 2003 ; White *et al.*, 2004 ; Baneres *et al.*, 2005 ; Ishihara *et al.*, 2005), ce qui justifie le choix de tester ce système dans le cadre du réseau.

2.2. Expression dans la levure *Hansenula polymorpha*

Les levures classiquement utilisées pour la production de protéines sont *Saccharomyces cerevisiae* et *Pichia pastoris*. Les systèmes levure sont attrayants dans la mesure où ils ont les avantages de certains systèmes procaryotes, notamment la possibilité d'une production à grande échelle à faible coût, mais les levures restent des organismes eucaryotes, d'où l'intérêt de les utiliser pour la production de protéines hétérologues.

Ces deux systèmes ont été utilisés avec succès pour la production de plusieurs RCPG (King *et al.*, 1990 ; Weiss *et al.*, 1995 ; Sizmann *et al.*, 1996 ; Weiss *et al.*, 1998 ; Feng *et al.*, 2002 ; Duport *et al.*, 2003 ; Pausch *et al.*, 2004 ; De Rivoyre *et al.*, 2005 ; Macauley-Patrick *et al.*, 2005 ; Minic *et al.*, 2005).

Néanmoins pour des raisons qui seront discutées dans le chapitre 5, une autre levure, *Hansenula polymorpha*, a été choisie comme organisme hôte dans le cadre du réseau ANRS.

2.3. Expression en cellules d'insectes S2

Les systèmes d'expression utilisant comme organisme hôte des cellules d'insectes sont très attrayants dans la mesure où les cellules d'insectes sont des organismes eucaryotes supérieurs, capables d'effectuer la plupart des modifications post-

traductionnelles requises pour la stabilité et la fonctionnalité des protéines membranaires. Par ailleurs, la production à grande échelle en bioréacteur est bien maîtrisée.

Le système classiquement utilisé repose sur l'infection par un baculovirus recombinant de cellules *Sf9* (*Spodoptera frugiperda*). Plusieurs RCPG ont été exprimés avec succès par cette méthode (Massotte *et al.*, 1997 ; Massotte, 2003 ; Warne *et al.*, 2003 ; Asmann *et al.*, 2004 ; Dolby *et al.*, 2004 ; Filppula *et al.*, 2004 ; Matarazzo *et al.*, 2005). Néanmoins, la lourdeur liée à la production de virus recombinants et les résultats encourageants obtenus au laboratoire avec le système S2 (Perret *et al.*, 2003) ont conduit les membres du réseau à choisir ce système d'expression qui sera détaillé dans le chapitre 7.

2.4. Expression en cellules mammifères par le système SFV

Dans le cadre de la production d'une protéine humaine, les systèmes d'expression utilisant comme organisme hôte des cellules mammifères sont très attrayants dans la mesure où même si elles sont surexprimées, les protéines restent dans un environnement membranaire et cellulaire le plus proche de la réalité. Le virus de la forêt de Semliki (SFV) est un virus enveloppé à ARN simple brin. Le vecteur d'expression contient les gènes codant les protéines dites non structurales, les protéines dites de structure (enveloppe et capsid) étant portées par un second vecteur qui sera co-transfecté avec le vecteur d'expression, aboutissant à la formation de 10^9 à 10^{10} particules infectieuses par millilitre de culture.

Ces particules virales ont l'avantage de pouvoir infecter un large spectre de cellules mammifères, cellules d'insectes, d'amphibiens, de reptiles et même des cellules primaires. Suite à l'infection, seul l'ARN recombinant qui possède une séquence spécifique d'empaquetage sera empaqueté dans les nouvelles particules virales. L'expression du transgène s'effectue à des taux très élevés en réponse à l'infection des cellules hôtes, sans générer de particules virales infectieuses. Plusieurs RCPG ont déjà été produits avec succès dans ce système d'expression qui a donc été légitimement choisi dans le cadre du réseau (pour revue Scheer *et al.*, 1999 ; Hoffmann *et al.*, 2001 ; Lundstrom, 2003 ; Olson *et al.*, 2003 ; Hassaine *et al.*, 2005).

3. Problématique de la thèse

A mon arrivée au laboratoire, le projet soutenu par l'ANRS venait tout juste de débuter. Le groupe de Franc Pattus était en charge de l'expression des co-récepteurs CCR5 et CXCR4 dans le système levure *Hansenula polymorpha*. Les souches exprimant CXCR4 étaient construites et les premiers résultats encourageants. Mon travail dans le cadre de ce projet était de construire et de tester les souches exprimant différentes constructions de CCR5.

Malheureusement, nous nous sommes heurtés à divers problèmes techniques qui seront détaillés dans le chapitre 5, ce qui nous a amené à nous tourner vers un autre système d'expression.

Au vu des bons résultats obtenus au laboratoire pour l'expression du récepteur de opiacés de type mu dans le système S2, nous avons décidé de tester ce système pour exprimer les récepteurs CCR5 et CXCR4.

En parallèle, la technique de FRET a été mise au point pour le récepteur CXCR4 dans le groupe de Jean-Luc Galzi, en vue d'études fonctionnelles du récepteur exprimé en cellules mammifères. Nous avons donc décidé de réaliser des constructions de CCR5 et de CXCR4 fusionnées à l'étiquette EGFP pour des raisons :

- « Structurales » : l'étiquette EGFP peut être un outil puissant pour la détection, la quantification et la purification du récepteur surproduit
- « Fonctionnelles » : la technique de transfert d'énergie était déjà au point pour le récepteur CXCR4 fusionné à l'EGFP et nous nous proposons de mettre au point un test équivalent pour CCR5 afin de mesurer la quantité de récepteur fonctionnel produit dans notre système tout en s'affranchissant des techniques de liaison de ligand traditionnelles nécessitant des ligands radioactifs.

Ma thèse a été effectuée dans le cadre de ce réseau sous la direction de Franc Pattus, en collaboration et sous la co-direction de Jean-Luc Galzi.

Les résultats obtenus dans le système *Hansenula polymorpha* ainsi que les raisons qui nous ont conduit à abandonner ce système seront présentés dans le chapitre 5. Les résultats concernant l'expression de CCR5 et CXCR4 dans les cellules S2, ainsi que les essais de FRET seront détaillés dans le chapitre 7.

CHAPITRE 5

EXPRESSION DU RECEPTEUR DE CHIMIOKINES CCR5

DANS LE SYSTEME *Hansenula polymorpha*

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Présentation et originalité du système d'expression

Les études structurales envisagées dans le cadre du réseau ANRS nécessitent d'obtenir d'importantes quantités de protéines stables et pures, ce qui implique de disposer d'un système de surexpression particulièrement efficace. Si de tels systèmes existent pour la production de protéines solubles, ils sont beaucoup plus aléatoires en ce qui concerne l'expression de protéines membranaires et dépendent de la protéine considérée.

Les levures constituent des organismes de choix pour l'expression hétérologue. En effet, elles combinent les avantages des systèmes procaryotes dans la mesure où la levure est un microorganisme (manipulation de gènes aisée, temps de croissance courts, production à grande échelle maîtrisée et faible coût). La levure reste néanmoins un organisme eucaryote capable d'effectuer la plupart des modifications post-traductionnelles nécessaires à la fonctionnalité et à la stabilité des protéines exprimées. Certes, les levures n'effectuent pas les mêmes modifications que les eucaryotes supérieurs, et sont notamment connues pour ne pas réaliser les mêmes glycosylations qui sont souvent composées chez la levure de longues chaînes de mannose, mais les effets de ces modifications se doivent d'être évalués et sont souvent dépendants de la protéine considérée.

Il existe quatre familles de levures dites méthylotrophes, c'est-à-dire capables de croître en présence de méthanol comme seule et unique source de carbone (*Hansenula*, *Pichia*, *Candida*, *Torulopsis*). Cet aspect de leur physiologie constitue un avantage financier supplémentaire en vue d'une production à grande échelle, puisque le méthanol est une source de carbone peu onéreuse.

(pour revues Gellissen et Melber, 1996 ; Hollenberg et Gellissen, 1997 ; Cereghino et Cregg, 1999 ; Gellissen, 2000 ; Sarramegna *et al.*, 2003).

Au moment de la constitution du réseau ANRS, la levure *Hansenula polymorpha* n'avait encore jamais été décrite pour la production de RCPG, mais plusieurs résultats laissaient envisager que cet organisme pouvait être un hôte de choix pour la production

de protéines membranaires (Sudbery *et al.*, 1988 ; Gellissen *et al.*, 1992). En effet, *Hansenula polymorpha* est plus thermotolérante que d'autres levures (croissance entre 30 et 43 °C, contre 30 °C pour les trois autres familles de levure méthylotrophes), ce qui peut-être considéré comme un avantage pour la production de protéines hétérologues, notamment les protéines humaines. De plus, cette levure présente un profil très favorable pour la fermentation et la production en masse. Un vaccin contre l'hépatite B a d'ailleurs été produit à grande échelle dans cette levure (Gellissen et Melber, 1996 ; Lepetic A, 1996). Dans le cadre de la mise au point de ce système d'expression, le laboratoire a entamé une collaboration avec le groupe de Martin Veenhuis (Groningen, Pays-Bas), qui est spécialisé dans l'étude de la biogenèse des péroxisomes chez *Hansenula polymorpha* (pour revue van Dijk *et al.*, 2000).

Afin de contourner les problèmes courants de toxicité liés à l'encombrement des voies de sécrétion fréquemment observés dans le cas de la surexpression de protéines membranaires, l'originalité apportée au système est d'adresser les protéines surexprimées vers des compartiments internes de la cellule que sont les péroxisomes. Les péroxisomes sont de petits organelles entourés d'une membrane unique, qui contiennent notamment les enzymes impliquées dans l'utilisation du méthanol, en particulier des oxydases produisant du peroxyde d'hydrogène d'où leur nom (van der Klei et Veenhuis, 1997 ; Tabak *et al.*, 1999 ; Leao et Kiel, 2003). On trouve un ou quelques péroxisomes seulement dans une cellule au repos. Cependant, dans des conditions de cultures continues en présence d'une quantité adaptée de méthanol, ces organelles peuvent occuper jusqu'à 80 % du volume cellulaire, sans que cela ne soit toxique pour la cellule, ce qui permet d'augmenter considérablement le nombre de sites de stockage potentiels des récepteurs surexprimés. Les gènes d'intérêt étant placés sous contrôle du promoteur de la méthanol oxydase, l'induction par le méthanol, en stimulant l'activité du promoteur pMOX devrait permettre d'augmenter la synthèse des gènes placés sous son contrôle et donc de surexprimer efficacement le récepteur tout en augmentant simultanément les surfaces membranaires servant de sites d'adressage.

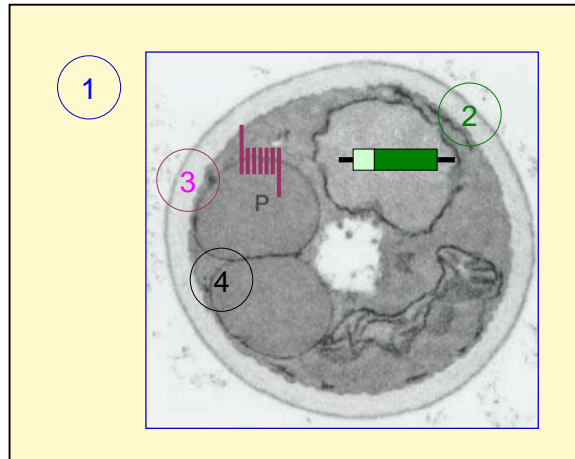


Figure 1 : Présentation du système d'expression *Hansenula polymorpha*

- (1) *Hansenula polymorpha* : levure méthylophile hyperproductrice
- (2) Intégration ciblée dans le génome de l'hôte sous contrôle d'un promoteur fort et inducible
- (3) Adressage des protéines surexprimées vers la membrane des péroxisomes
- (4) Induction de la prolifération des membranes péroxisomales

2. Résultats et discussion

2.1. Outils moléculaires

Pour tester et valider notre approche, il nous fallait réaliser différentes constructions de CCR5 fusionnées avec plusieurs séquences d'adressage vers les péroxisomes et/ou différentes séquences étiquettes afin d'identifier quelle construction donnerait les meilleurs résultats en termes d'expression et de fonctionnalité. Toutes les constructions utilisent un vecteur qui se maintient sous forme intégrée dans le génome de l'hôte. Le vecteur d'expression porte le gène *LEU2* de *Saccharomyces cerevisiae* qui est fonctionnel chez *Hansenula polymorpha* et qui complémente l'auxotrophie de la souche NCYC495A pour la leucine. Le gène d'intérêt est cloné sous contrôle d'un promoteur fort dont l'activité est inducible par le méthanol, mais réprimée par le glucose, le promoteur de la méthanol oxydase pMOX. Sous contrôle de ce promoteur, l'ADNc de CCR5 est fusionné avec des séquences permettant d'adresser le récepteur vers les membranes des péroxisomes. Les séquences testées sont issues des gènes *PEX3* et *PEX15* codant pour des protéines de la membrane péroxisomale de *Saccharomyces cerevisiae* et/ou de *Hansenula polymorpha* et sont fusionnées soit en amont (*pex3*) soit en aval (*pex15*) de l'ADNc codant pour CCR5 (Faber *et al.*, 1994 ; Elgersma *et al.*, 1997 ; Baerends *et al.*, 2000 ; Hetteima *et al.*, 2000 ; Birschmann *et al.*, 2003). Plusieurs séquences étiquettes ont également été testées (épitope c-myc et étiquette hexahistidine) afin de faciliter les étapes ultérieures de détection, mais aussi de purification des récepteurs surexprimés. Ces étiquettes sont

ajoutées du côté carboxy-terminal de la protéine afin de ne pas perturber l'extrémité amino-terminale impliquée dans la liaison des ligands.

Par ailleurs, les péroxisomes présentent l'avantage ou l'inconvénient d'être dépourvus d'enzymes de modifications, les protéines produites dans de tels compartiments ne sont donc entre autre ni phosphorylées ni glycosylées. Nous avons donc réalisé une construction ne possédant pas de séquence d'adressage aux péroxisomes, qui devrait donc selon toute vraisemblance être dirigée vers la membrane plasmique.

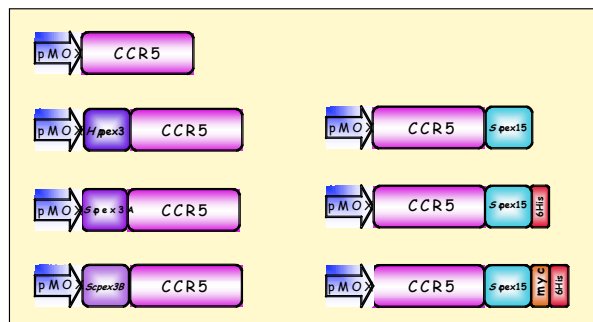


Figure 2 : Différentes constructions incluant le gène de CCR5

L'ADNc codant pour CCR5 est cloné sous contrôle du promoteur pMOX. Les séquences *Hppex3* et *Scpex3/Scpex15* proviennent des gènes *PEX3* de *Hansenula polymorpha* et *PEX15* de *Saccharomyces cerevisiae* respectivement, qui codent pour des protéines de membrane des péroxisomes. Les séquences *Scpex3A* et *Scpex3B* ne diffèrent que par leur longueur, *pex3B* étant la plus longue.

A mon arrivée au laboratoire, le sujet ayant débuté quelques mois auparavant, quatre vecteurs avaient déjà été réalisés et seules les trois constructions pMOX.*Hppex3.CCR5*, pMOX.*CCR5.Scpex15.6His* et pMOX.*CCR5.Scpex15.myc.6His* restaient à faire, selon une stratégie de PCR décrite dans le chapitre 6.

2.2. Construction des souches exprimant CCR5

2.2.1. Principe de la transformation intégrative chez la levure

Le vecteur d'expression est introduit par électroporation dans la souche NCYC495A de *Hansenula polymorpha* qui est auxotrophe pour la leucine et pour l'uracile. Il est possible chez la levure d'obtenir une intégration ciblée du gène d'intérêt dans le génome de l'hôte. Le plasmide d'expression est linéarisé au niveau de la séquence du promoteur de la méthanol oxydase qui est homologue à celle de l'hôte, la linéarisation étant un intermédiaire de recombinaison chez la levure. L'événement de recombinaison au locus pMOX aboutit à l'intégration du gène d'intérêt sous contrôle du promoteur de la méthanol oxydase endogène.

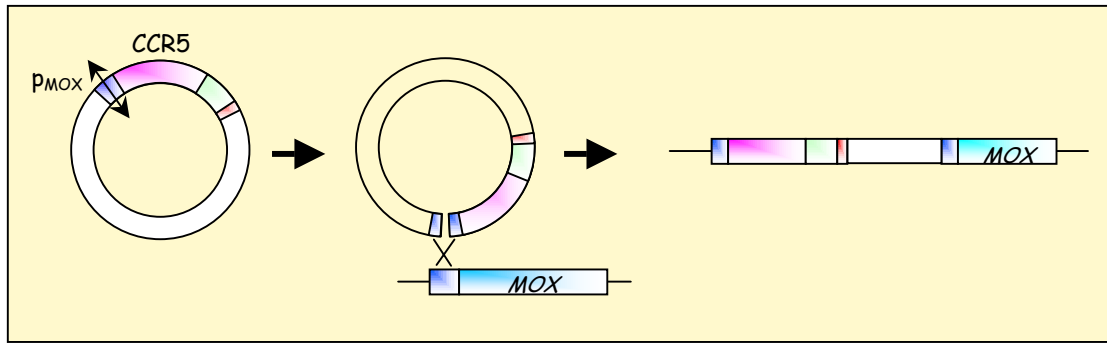


Figure 3 : Principe de la transformation intégrative chez la levure

- (1) Le vecteur d'expression est linéarisé au niveau de la séquence du promoteur de la méthanol oxydase
- (2) Cette linéarisation favorise la recombinaison avec la séquence du promoteur pMOX endogène
- (3) Cette recombinaison aboutit à l'intégration sous contrôle du promoteur endogène

Le gène *LEU2* porté par le vecteur d'expression complète l'auxotrophie pour la leucine de la souche NCYC495A, les levures transformées sont donc sélectionnées sur un milieu dépourvu de leucine.

2.2.2. Contrôle de l'intégration

Afin de générer une expression stable, nous avons choisi de cibler l'intégration du vecteur d'expression au niveau du promoteur de la méthanol oxydase endogène. Néanmoins, il a été rapporté que le plasmide d'expression utilisé avait la capacité de se maintenir sous forme non intégrée chez *Hansenula polymorpha*, en utilisant une portion du gène *LEU2* comme origine autonome de réplication. Afin d'induire la perte du plasmide chez les transformants n'ayant pas intégré l'insert de façon stable dans leur génome, les transformants sont cultivés pendant trois jours en phase exponentielle de croissance et sans pression de sélection en milieu liquide complet avant d'être à nouveau sélectionnés sur un milieu minimum supplémenté.

Par ailleurs, nous souhaitons contrôler le locus d'intégration de l'insert, mais également le nombre de copies intégrées. Pour se faire, l'ADN génomique de chacun des transformants est analysé par hybridation ADN/ADN de type Southern. La sonde utilisée correspond à la région *StuI-HindIII* du promoteur de la méthanol oxydase, marquée au ^{32}P . Après digestion totale de l'ADN génomique par *HindIII*, l'hybridation de la sonde révèle une bande correspondant au promoteur de la méthanol oxydase endogène pour une souche NCYC495A non transformée, deux bandes pour une souche ayant intégré une copie de l'insert, trois bandes pour une souche possédant deux copies ou plus

du gène d'intérêt. Plus le nombre de copies intégrées est élevé, plus l'intensité du deuxième fragment, quantifiée au Phosphorimager, augmente.

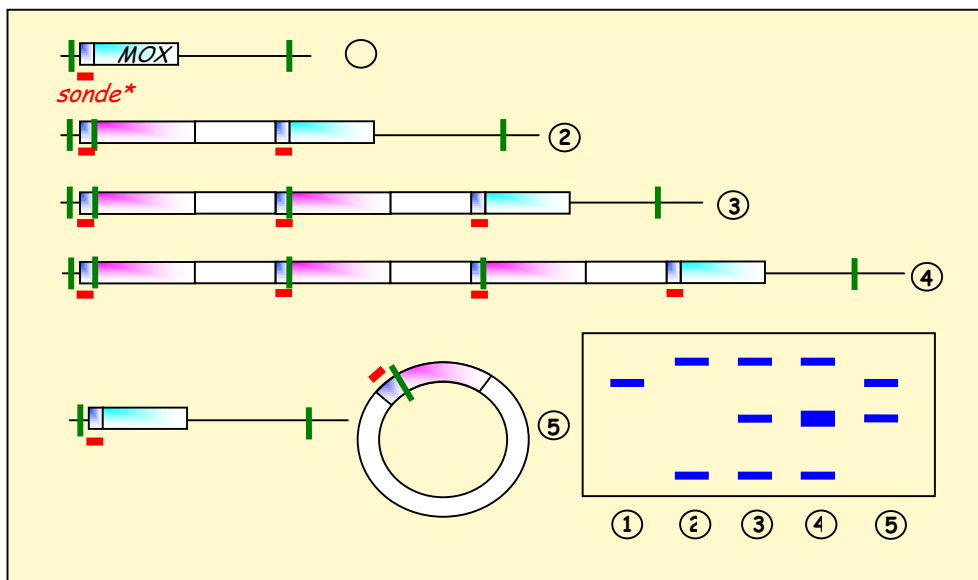


Figure 4 : Contrôle du locus d'intégration et du nombre de copies intégrées par hybridation ADN/ADN de type Southern

L'hybridation ADN/ADN de type Southern utilise une sonde marquée au ^{32}P dérivée de la région pMOX. L'hybridation est réalisée sur une préparation d'ADN génomique de levure préalablement digérée par *HindIII*. L'hybridation révèle :

- (1) Une bande correspondant à pMOX endogène pour les souches non transformées
 - (2) Deux bandes pour les transformants ayant intégré une copie du vecteur d'expression
 - (3) Trois bandes pour les transformants ayant intégré deux copies du vecteur d'expression
 - (4) Trois bandes pour les transformants ayant intégré trois copies du vecteur d'expression ou plus, l'intensité du deuxième fragment augmentant avec le nombre de copies intégrées
 - (5) Deux bandes de taille différentes lorsque le plasmide n'est pas intégré au génome de l'hôte
- Le trait rouge correspond à la sonde marquée au ^{32}P . Les traits verts représentent les sites *HindIII*. *MOX* représente le gène de la méthanol oxydase endogène.

Malgré la lourdeur de la technique, les différents résultats que nous avons obtenus lors de ce contrôle nous ont confortés dans l'idée que cette étape constituait un contrôle important et nécessaire avant de poursuivre par les expériences d'expression. Nous avons remarqué dans un premier temps que le taux de réversion était relativement élevé, ce qui nous a confortés dans notre idée de contrôler les souches avant toute tentative d'expression. En effet, l'idéal lorsque la sélection est basée sur une auxotrophie est de travailler avec un gène chromosomique muté par une délétion, qui ne peut réverter. Malheureusement, nous ne disposons pas d'une telle souche lorsque le projet a débuté. Dans le cas de la souche NYC495A, l'auxotrophie pour la leucine résulte d'une mutation ponctuelle dans le gène *LEU2* chromosomique. Les révertants ont donc la capacité de pousser sur un milieu dépourvu de leucine suite à une réversion du

gène *LEU2* chromosomique, et non parce qu'ils ont intégré une copie du vecteur d'expression qui porte ce gène. Ces clones sont donc inexploitable.

Par ailleurs, malgré le fait de cultiver les souches sans pression de sélection pendant plusieurs jours pour induire la perte du plasmide chez les transformants n'ayant pas intégré le vecteur d'expression dans leur génome, on observe toujours des souches pour lesquelles le plasmide n'est pas intégré. Il semblerait que le gène *LEU2* possède une séquence cryptique qui pourrait être utilisée comme origine autonome de réplication (M. Veenhuis, communication personnelle). Les effets du maintien du plasmide sous forme autorépliquative sur les résultats d'expression n'ont pas été évalués, mais dans la mesure où le risque de perdre le plasmide au fur et à mesure des divisions cellulaires est plutôt élevé, nous avons choisi de ne travailler qu'avec des souches ayant intégré le plasmide dans le génome.

Nous avons également observé des cas d'intégration aléatoire du plasmide. Là encore les effets de cette intégration aléatoire n'ont pas été quantifiés. A priori, la protéine devrait être produite puisqu'elle est toujours sous contrôle du promoteur de la méthanol oxydase pMOX porté par le plasmide, mais dans la mesure où la collection de clones incluant les fusions CXCR4 au locus pMOX endogène était déjà établie, nous nous devons de réunir la même collection pour les fusions CCR5 afin que les résultats obtenus quant à l'expression de ces deux récepteurs soient effectivement comparables. Pour obtenir des souches ayant intégré le plasmide au locus pMOX, nous avons dû contrôler un nombre important de clones, beaucoup plus que dans le cas de CXCR4. De plus, avec le récepteur CXCR4, plusieurs clones ayant intégré trois copies ou plus ont été obtenus. Dans le cas de CCR5 par contre, nous avons identifié de nombreux clones ayant intégré une copie du vecteur, et quelques-uns seulement ayant intégré deux copies. Par contre, nous n'avons jamais obtenu de clones ayant intégré trois copies ou plus.

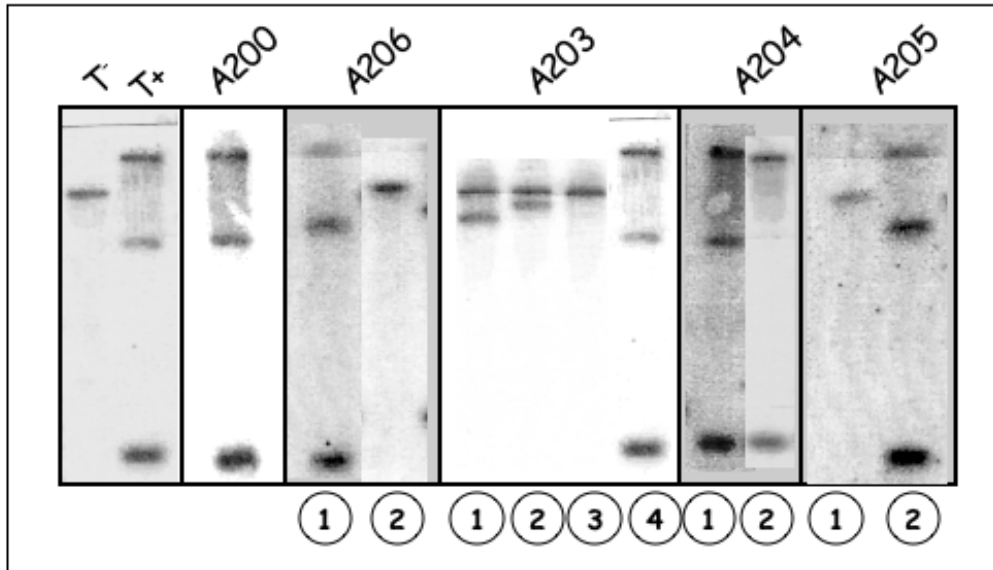


Figure 5 : Hybridation ADN/ADN de type Southern

T+ : souche NCYC495A non transformée

T- : souche NCYC495A transformée par le vecteur vide ayant intégré deux copies du vecteur

A200 (Insert *CCR5*) : 2 copies intégrées

A206 (Insert *Hppex3.CCR5*) ; piste 1 : 2 copies intégrées ; piste 2 : révertant

A203 (Insert *CCR5.Scpx15*) ; piste 1 : plasmide non intégré ; piste 2 : intégration aléatoire du plasmide ; piste 3 : révertant ; piste 4 : 2 copies intégrées

A204 (Insert *CCR5.Scpx15.6his*) ; piste 1 : 2 copies intégrées ; piste 2 : 1 copie intégrée

A205 (Insert *CCR5.Scpx15.myc.6his*) ; piste 1 : révertant ; piste 2 : 2 copies intégrées

Par ailleurs, au vu des premiers résultats obtenus au laboratoire avec les constructions *CXCR4*, il semblerait que le taux d'expression du récepteur augmente avec le nombre de copies intégrées.

Une hypothèse serait que plus le nombre de copies intégrées augmente, plus le taux d'expression augmente. Néanmoins, malgré l'adressage vers les péroxisomes, on peut se demander si une expression trop élevée ne pourrait pas être toxique pour la cellule. Nous avons donc décidé dans un premier temps de travailler avec les transformants ayant intégré de façon stable deux copies de l'insert dans leur génome. Néanmoins, l'effet des intégrations multiples doit être évalué à plus long terme.

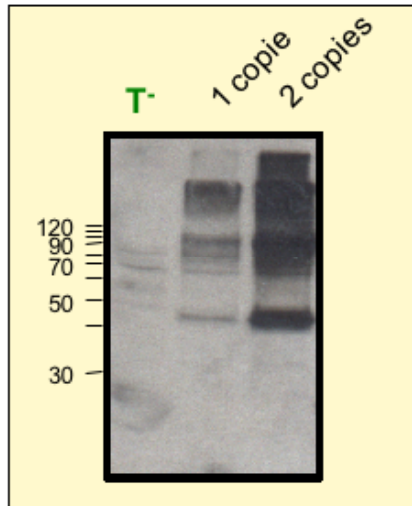


Figure 6 : Variation du taux d'expression en fonction du nombre de copies intégrées
 Western blot réalisé sur une préparation de membranes totales de deux clones ayant intégré une ou deux copies d'une fusion pMOX.*Hppex3 CXCR4*. Pour une même quantité de protéines totales déposées, l'intensité de la bande correspondant au récepteur est plus élevée lorsque deux copies du gènes sont intégrées, comme le montrent les résultats de la piste 2.
 Gel d'acrylamide à 10 %, sérum polyclonal anti-CXCR4.

2.3. Caractérisation biochimique du récepteur

2.3.1. Principe de l'induction

Les levures sont dans un premier temps cultivées pendant trois jours en phase exponentielle de croissance dans un milieu contenant des vitamines, des sels minéraux, de l'uracile (servant à compléter l'auxotrophie de la souche NCYC495A), ainsi que du glucose comme seule et unique source de carbone. Le but de cette étape est d'acclimater les levures à ce milieu de culture qui est relativement pauvre, en n'apportant que les éléments strictement essentiels à la croissance. Dans ces conditions les levures utilisent le glucose comme source de carbone.

Après cette culture de trois jours, le glucose est remplacé par du méthanol qui reste l'unique source de carbone disponible dans le milieu de culture, ce qui va stimuler l'activité du promoteur pMOX et donc induire la transcription des gènes qui sont sous son contrôle, en l'occurrence le gène de la méthanol oxydase endogène qui est impliquée dans la métabolisation du méthanol, mais également la fusion incluant l'ADNc de CCR5. Ces conditions de culture vont également stimuler la prolifération des péroxisomes, dont le nombre et la taille vont augmenter. Ce procédé devrait donc permettre d'obtenir une très grande quantité de récepteur dans les membranes des péroxisomes.

Les cellules sont récoltées après 18 heures d'induction : ce temps a été déterminé comme permettant d'obtenir des niveaux d'expression élevés pour la protéine

recherchée (optimisation réalisée avec les souches exprimant CXCR4). Par ailleurs, les cellules se trouvent encore en milieu de phase exponentielle de croissance, état favorable aux techniques de lyse (plus les levures sont avancées dans leur croissance, plus la paroi cellulaire est difficile à briser).

La croissance des cellules est optimale quelle que soit la construction testée, et la prolifération des péroxisomes ne semble pas être toxique pour la cellule.

2.3.2. Mise au point du protocole de détection du récepteur

La détection du récepteur par les techniques de Western blot et de Dot blot nous a posé de nombreux problèmes. De nombreux essais, visant à modifier individuellement chacun des paramètres ont été nécessaires avant de trouver des conditions qui permettent de détecter le récepteur. Nous avons notamment testé :

- Différentes méthodes de préparation des échantillons : lyse mécanique des cellules au désintégrateur de cellules ou préparation de protoplastes par une méthode enzymatique douce.
- Différents anticorps, à des concentrations variables
- Différentes conditions de migration : modification de la concentration des gels d'acrylamide, modification des conditions de migration
- Différents tampons pour la détection en Western blot

La mise au point du protocole de détection est décrite dans le chapitre 6.

2.4. Essais de liaison de ligands à l'équilibre

La liaison du ligand sur son récepteur peut donner plusieurs informations. Si le récepteur surexprimé lie son ligand, ce n'est pas une preuve indiscutable de sa fonctionnalité d'un point de vue pharmacologique, mais c'est une preuve que son repliement semble correct, notamment dans le cas des récepteurs de chimiokines pour lesquels le site de fixation du ligand est complexe (voir chapitre 2). Dans le cadre des études structurales envisagées, on considèrera néanmoins comme fonctionnel un récepteur capable de lier ses ligands. Par ailleurs, si le récepteur surexprimé lie son ligand, des expériences de saturation peuvent permettre de déterminer le nombre de récepteur exprimé par cellule, ce qui est une indication nécessaire dans le but d'études structurales.

Plusieurs tentatives de liaison de ligand ont été réalisées sans succès au laboratoire, ce qui nous a décidés à nous rendre dans le laboratoire de Marc Parmentier (IRIBHN, Bruxelles), où ces expériences de liaison ont été réalisées en collaboration avec Cédric Blanpain. Nous avons testé trois lots d'échantillons :

- Des membranes totales préparées mécaniquement au désintégrateur de cellules
- Des membranes préparées selon la méthode enzymatique douce à la zymolyase

Malheureusement, en présence de l'antagoniste froid TAK779 et des deux agonistes radiomarqués testés (RANTES ou MIP-1 β), les membranes, et ce quel que soit le mode de préparation, ne laissent apparaître aucun site de haute affinité.

Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer ce résultat :

- Soit le récepteur est mal orienté dans les membranes des péroxisomes et n'est pas accessible au ligand lors de l'expérience de liaison de ligand à l'équilibre : visiblement cette hypothèse est à éliminer puisque la souche A200 dans laquelle le récepteur n'est pas fusionné à une séquence d'adressage vers les péroxisomes ne présente pas non plus de site de haute affinité pour les chimiokines endogènes.

- Soit le récepteur est mal replié dans la membrane et ne possède pas la conformation active pour lier les ligands. Le rôle de la composition membranaire pourrait jouer un rôle dans le repliement du récepteur. En effet, l'importance du cholestérol dans le repliement du récepteur a été évoquée dans le chapitre 2 (Nguyen et Taub, 2002a). Les membranes de levure contiennent naturellement de l'ergostérol (24-méthyl, 7-8/22-23dihydrocholestérol) et non du cholestérol, ce qui peut perturber le repliement du récepteur (Saeki *et al.*, 1991 ; Sander *et al.*, 1994 ; Baenziger *et al.*, 2000). La littérature montre quelques exemples de récepteurs exprimés dans la levure qui ne lient pas leurs ligands dans des préparations de membranes de levure, mais la liaison est rétablie après reconstitution dans des membranes modèles (Lagane *et al.*, 2000).

(pour revue Opekarova et Tanner, 2003).

- Dans le cas de certains RCPG, il semblerait que le couplage aux protéines G hétérotrimériques puisse jouer un rôle pour la liaison des ligands. Or la levure ne contient pas toute la panoplie de protéines G humaines, et les protéines G sont très faiblement exprimées. Néanmoins, il semblerait que dans le cas des récepteurs de chimiokines, le couplage aux protéines G ne soit pas nécessaire à la liaison de ligand comme le montrent des expériences réalisées en présence de toxine pertussique (Cédric Blanpain, communication personnelle).

- Enfin, l'importance des modifications post-traductionnelles pour la liaison des ligands a déjà été détaillée dans le chapitre 2. Or nous ne savons pas si *Hansenula polymorpha* est capable de réaliser toutes ces modifications post-traductionnelles.

- Par ailleurs, le groupe de M. Veenhuis nous a fourni les séquences PEX3 pensant que les protéines Pex3p étaient intégrées dans la membrane par un domaine transmembranaire, l'extrémité amino-terminale étant exposée à l'intérieur des péroxisomes. Une étude plus récente qui a été publiée après l'arrêt du sujet semble montrer qu'en réalité, les protéines Pex3p ne sont pas des protéines membranaires, mais qu'elles sont étroitement liées à la membrane au niveau de sa face cytosolique (Haan *et*

a/, 2002). Néanmoins, même si ce résultat remet en cause une partie des résultats, nous avons travaillé sur les souches ne possédant aucune séquence d'adressage aux péroxisomes, et sur les souches possédant les séquences issues des gènes *PEX15*.

Nous ne savons pas à l'heure actuelle quelle est l'explication de ce phénomène. Il semblerait effectivement que l'on puisse d'ores et déjà écarter le rôle du couplage aux protéines *G*, ainsi que l'orientation dans les membranes. Nous pensions reconstituer le récepteur en membrane modèle ou bien tenter cette expérience sur le récepteur solubilisé, mais nous n'avons pas pu trouver les conditions de solubilisation du récepteur (voir plus loin).

Je mentionnerai également ici que des expériences de BIAcore ont été menées au laboratoire par le Docteur Gabrielle Zeder-Lutz, et qu'aucun site de haute affinité n'a pu être détecté par cette méthode sur des préparations de membranes exprimant CCR5 ou CXCR4.

2.5. Solubilisation

2.5.1. Principe de la solubilisation d'une protéine membranaire et critères de choix d'un détergent

L'une des difficultés majeure dans le maniement des protéines membranaires provient de la nécessité de solubiliser ces protéines, c'est-à-dire de substituer l'environnement lipidique de la membrane plasmique par un environnement mimétique soluble. En milieu aqueux, les protéines doivent donc être manipulées en présence de détergents, molécules amphiphiles qui préviennent leur agrégation. Tout comme les lipides, les détergents sont composés d'une tête polaire et d'une queue hydrophobe, cette caractéristique structurale leur permettant d'une part de déstabiliser la membrane en s'insérant dans la bicouche lipidique, et d'autre part de mimer cet environnement permettant ainsi le maintien de la structure de la protéine solubilisée.

On classe les détergents en fonction de leur structure, la tête hydrophile pouvant être anionique, cationique, zwitterionique ou non ionique.

Bien que les propriétés physico-chimiques des détergents soient connues, le détergent le plus adapté pour la solubilisation d'une protéine spécifique ne pourra être déterminé qu'après un processus d'« essai-erreur ». Différents paramètres doivent néanmoins être pris en compte lors du choix du détergent :

- La concentration micellaire critique (CMC) : il s'agit de la concentration à laquelle apparaissent les micelles, c'est-à-dire la concentration maximale de détergent sous la forme monomère dans l'eau. L'ajout de molécules de détergent au-delà de cette concentration se traduit par la mise en place de nouvelles micelles et non par

l'augmentation de la forme monomère qui reste alors bloquée à la CMC, ni par le grossissement des micelles qui ont un seul d'équilibre énergétiquement favorable.

- La facilité avec laquelle il sera possible d'éliminer ou d'échanger le détergent de l'échantillon à des fins de purification, de cristallisation et de reconstitution.

- La nature du détergent est également un critère de choix.

Le détergent idéal doit solubiliser complètement le récepteur et stabiliser les protéines solubilisées dans une conformation active.

En général, on utilise des détergents ioniques pour solubiliser les protéines membranaires intrinsèques et dissocier les complexes protéiques. Néanmoins beaucoup de détergents ioniques sont dénaturants et ne pourront donc pas être employés si l'activité fonctionnelle de la protéine est importante. Cependant leurs charges les rendent inappropriés pour les chromatographies par échange d'ions.

Les détergents non ioniques dissocient de manière moins efficace les protéines membranaires, mais permettent de conserver les structures natives et les activités enzymatique de la protéine.

Les détergents zwitterioniques sont souvent utilisés pour la solubilisation des protéines membranaires qui, par leur forte hydrophobicité ont tendance, une fois solubilisées, à s'associer de façon non spécifique avec d'autres protéines.

En tenant compte de ces paramètres qui ne sont pas des vérités absolues et dépendent souvent du détergent considéré, on se rend bien compte que le détergent idéal universel n'existe pas pour de telles études, d'où la nécessité de tester plusieurs détergents appartenant à chacune de ces trois grandes familles.

2.5.2. Efficacité de solubilisation du récepteur CCR5

Dans un premier temps, plusieurs détergents appartenant aux différentes familles mentionnées plus haut ont été testés en vue de trouver celui qui serait le plus approprié pour la solubilisation du récepteur. En tenant compte des propriétés des détergents, nous avons souhaité tester dans un premier temps des détergents permettant de maintenir la protéine dans une conformation active, donc des détergents non ioniques. Parmi les huit premiers détergents testés, le récepteur n'est détecté sous forme solubilisée qu'en présence de CHAPS.

NaCl	Détergent	Type	Concentration	Efficacité de solubilisation (protéines totales)	Détection du récepteur (Dot blot et/ou Western blot)
0	TritonX-100	NI	0.5 %	ND	faiblement
0	NP40	NI	0.5 %	ND	faiblement
0	Tween20	NI	0.5 %	ND	faiblement
0	Brij30	NI	0.5 %	ND	non
.....					
0	NP40	NI	0.1 %	30 %	très faible
0.5 M	DDM	NI	0.5 %	57 %	très faible
.....					
150 mM	Tween20	NI	1 %	70 %	très faible
150 mM	TritonX-100	NI	1 %	78 %	très faible
150 mM	NP40	NI	1 %	71 %	très faible
.....					
0 M	CHAPS	ZI	1 %	69 %	oui
0 M	CHS		1 %	93 %	non
.....					
150 mM	CYMAL-5	NI	4 mM	68 %	non
150 mM	CYMAL-5	NI	20mM	67 %	non

Tableau 1 : Premiers essais de solubilisation du récepteur CCR5

On considère que le récepteur est solubilisé lorsqu'il est détecté dans le surnageant après ultracentrifugation.

Le rendement de solubilisation est estimé selon le rapport : protéines totales surnageant/protéines totales culot à partir de trois expériences indépendantes.

ZI = zwitterionique ; NI : non ionique

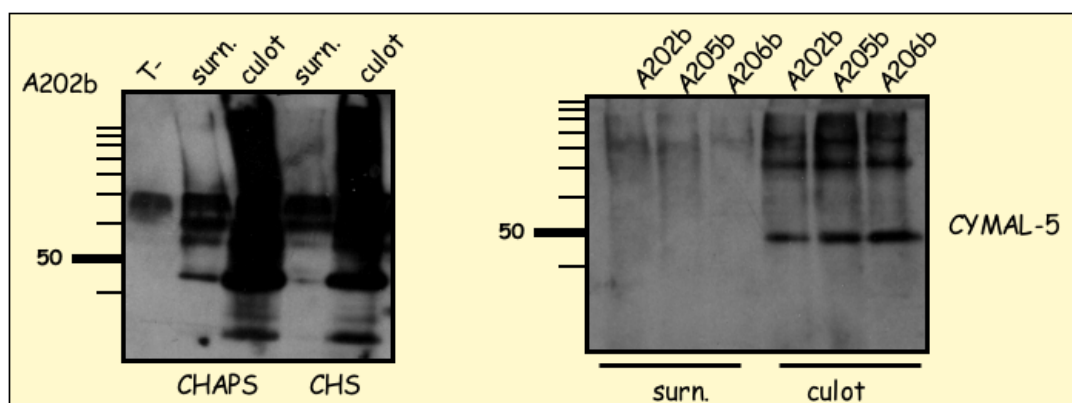


Figure 7 : Détection par Western blot du récepteur solubilisé

Le témoin négatif est une souche transformée par le vecteur vide. surn. = surnageant après ultracentrifugation.

Gel d'acrylamide à 12 %, détection par un sérum polyclonal dirigé contre l'extrémité carboxy-terminale de CCR5 (Santa-Cruz)

On notera néanmoins que dans le cadre du réseau ANRS, un protocole de solubilisation du récepteur CCR5 exprimé en cellules mammifères infectées par SFV a été mis au point et que ce résultat n'est absolument pas transposable au récepteur CCR5 produit dans la levure *Hansenula polymorpha*. Comme le montre le Western blot de la figure 7, tout le récepteur est détecté dans le culot, et le récepteur n'est pas détecté dans le surnageant de solubilisation, ce qui constitue une preuve que le choix du détergent est non seulement lié à la protéine étudiée, mais dépend également du système d'expression hétérologue utilisé.

Nous avons également tenté d'immunoprécipiter le récepteur en présence de différents détergents (DDM et CYMAL-5), toujours selon le protocole de l'Institut Pasteur, cette nouvelle tentative s'étant avérée infructueuse.

De ce premier essai, on observe que seul le CHAPS permet de solubiliser une faible proportion du récepteur, pour une même quantité de protéines totales déposées, le récepteur étant très majoritairement détecté dans le culot. Plusieurs essais ont par ailleurs été réalisés en parallèle par le Docteur Gabrielle Zeder-Lutz pour tenter de trouver un détergent approprié pour la solubilisation des récepteurs CCR5 et CXCR4, mais il semblerait que le CHAPS donne les meilleurs résultats (Octyl-POE, CHAPSO, Brij35, N-Hexyl β D-glucopyranoside, Mega8, Mega10, Octyl- β D-glucopyranoside, Decyl- β D-maltoside, en présence de concentrations variables de NaCl). Néanmoins, en se basant sur ce premier résultat encourageant, plusieurs essais ont été réalisés en vue d'améliorer les conditions de solubilisation. Chaque paramètre a été modifié individuellement afin d'étudier l'influence de chacun de ces paramètres dans le processus de solubilisation : modification de la concentration en sel pour une concentration fixe de détergent, modification de la concentration en détergent pour une concentration fixe de sel, modification de la température de solubilisation.

NaCl [M]	CHAPS	Température	Efficacité de solubilisation (protéines totales)	Détection du récepteur (Western blot)
0.5			87 %	oui
1	1 %	4 °C	79 %	oui
1.5			69 %	oui
.....				
	1 %		58 %	oui
0.5	2 %	4 °C	59 %	très faible
	5 %		46 %	très faible
.....				
0.5	1 %	RT	27 %	non

Tableau 2 : Optimisation de la solubilisation du récepteur CCR5 par le CHAPS
Etude de l'influence de la concentration en sel, de la concentration en détergent et de la température de solubilisation

Chaque essai est réalisé sur une préparation de membranes (25 µg de protéines totales) des souches A10b, A202b, A203b, A205b et A206b. L'efficacité de solubilisation est une moyenne de trois expériences indépendantes. Le rendement de solubilisation est estimé selon le rapport : protéines totales du surnageant/protéines totales du culot. RT= température ambiante

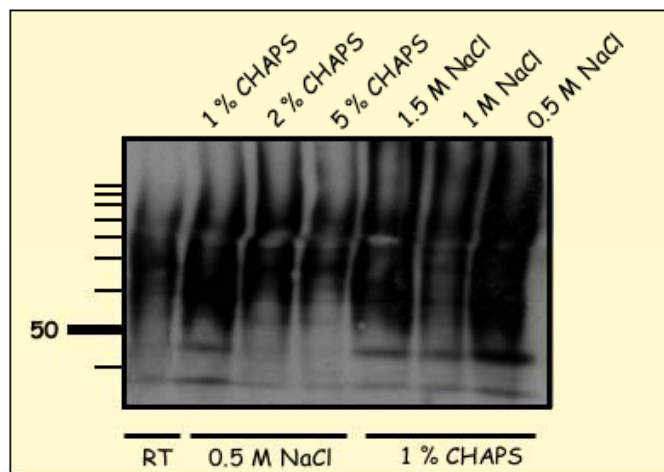


Figure 8 : Détection par Western blot du récepteur solubilisé en modifiant les paramètres de solubilisation par le CHAPS

L'essai est réalisé sur une préparation de membranes totales de la souche A206b. L'essai à température ambiante (RT) est réalisé en présence de 1 % de CHAPS et de 0.5 M NaCl.

Gel d'acrylamide à 12 %, détection par un sérum polyclonal dirigé contre l'extrémité carboxy-terminale du récepteur (Santa-Cruz)

De cet essai ressortent les conclusions suivantes : la solubilisation doit se faire à 4°C et non à température ambiante. Une concentration trop élevée de détergent n'améliore pas le processus de solubilisation, la concentration idéale au vu du Western blot étant de 1 % de CHAPS. L'augmentation de la concentration en sel ne semble pas améliorer significativement le processus de solubilisation du récepteur. Néanmoins, on observe que plus la concentration de sel augmente, plus la quantité de protéines totales solubilisées diminue.

Nous avons donc décidé de faire un nouveau test, dans lequel la solubilisation était effectuée pendant une heure à 4 °C en présence de 1 % de CHAPS. Seulement, il semblerait que ce cycle de solubilisation, même s'il ne semble pas solubiliser beaucoup de récepteur, permette d'extraire une grande partie des protéines de la membrane. Cette étape pourrait donc être considérée comme un enrichissement des membranes en récepteur. Nous avons donc décidé d'extraire dans un premier temps les protéines membranaires contaminantes et de refaire deux autres cycles de solubilisation sur les culots membranaires, issus des ultracentrifugations.

NaCl [M]	Cycle	Efficacité de solubilisation (protéines totales)	Détection du récepteur (Western blot)
0	1	84 %	faible
0.5		63 %	faible
0	2	7 %	non
0.5		2 %	non
0	3	2 %	non
0.5		1 %	non

Tableau 3 : Optimisation de la solubilisation du récepteur CCR5 par le CHAPS par trois extraction successives

Chaque essai est réalisé en présence de 1 % de CHAPS, 0 ou 0.5 M de NaCl à 4 °C, sur une préparation de membranes (25 µg de protéines totales) des souches A10b, A202b et A206b. L'efficacité de solubilisation est une moyenne de trois expériences indépendantes. Le rendement de solubilisation est estimé selon le rapport : protéines totales du surnageant/protéines totales du culot.

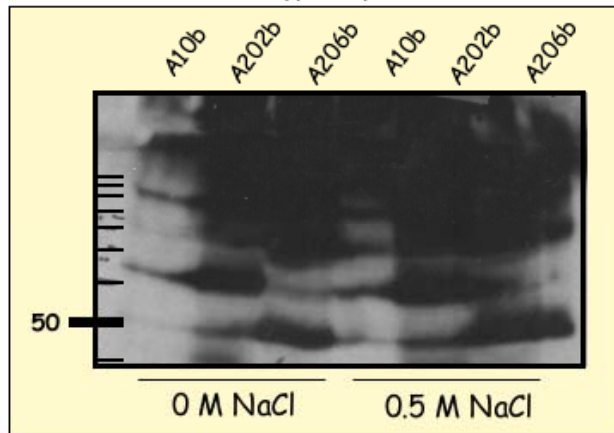


Figure 9 : Détection du récepteur par Western blot dans les culots de solubilisation après trois extractions successives en présence de 1 % de CHAPS

Le récepteur est détecté par un sérum polyclonal de lapin dirigé contre l'extrémité carboxy-terminale du récepteur (service de synthèse de l'IGBMC) sur un gel d'acrylamide à 12 %.

Ces résultats montrent que la majorité des protéines de la membrane sont extraites par le premier cycle de solubilisation en CHAPS, comme l'indiquent les pourcentages de solubilisation en protéines totales. Les deux cycles suivants ne permettent d'extraire que des quantités minimales de protéines.

Par ailleurs le récepteur est toujours très fortement détecté dans le dernier culot d'ultracentrifugation.

Au vu de ces résultats, nous nous sommes posé la question de savoir si le récepteur ne formait pas d'agrégats (on entend par agrégats des éléments qui sédimentent dès les basses vitesses de centrifugation) impossibles à dissocier en présence seulement de détergent.

Nous avons donc tenté de dissocier ces agrégats en présence d'urée.

2.5.3. Mise en évidence d'une agrégation irréversible du récepteur exprimé dans la levure *Hansenula polymorpha*

Afin de détecter une éventuelle agrégation du récepteur, une étape supplémentaire de centrifugation à basse vitesse est rajoutée avant l'ultracentrifugation, selon le protocole décrit dans le chapitre 6.

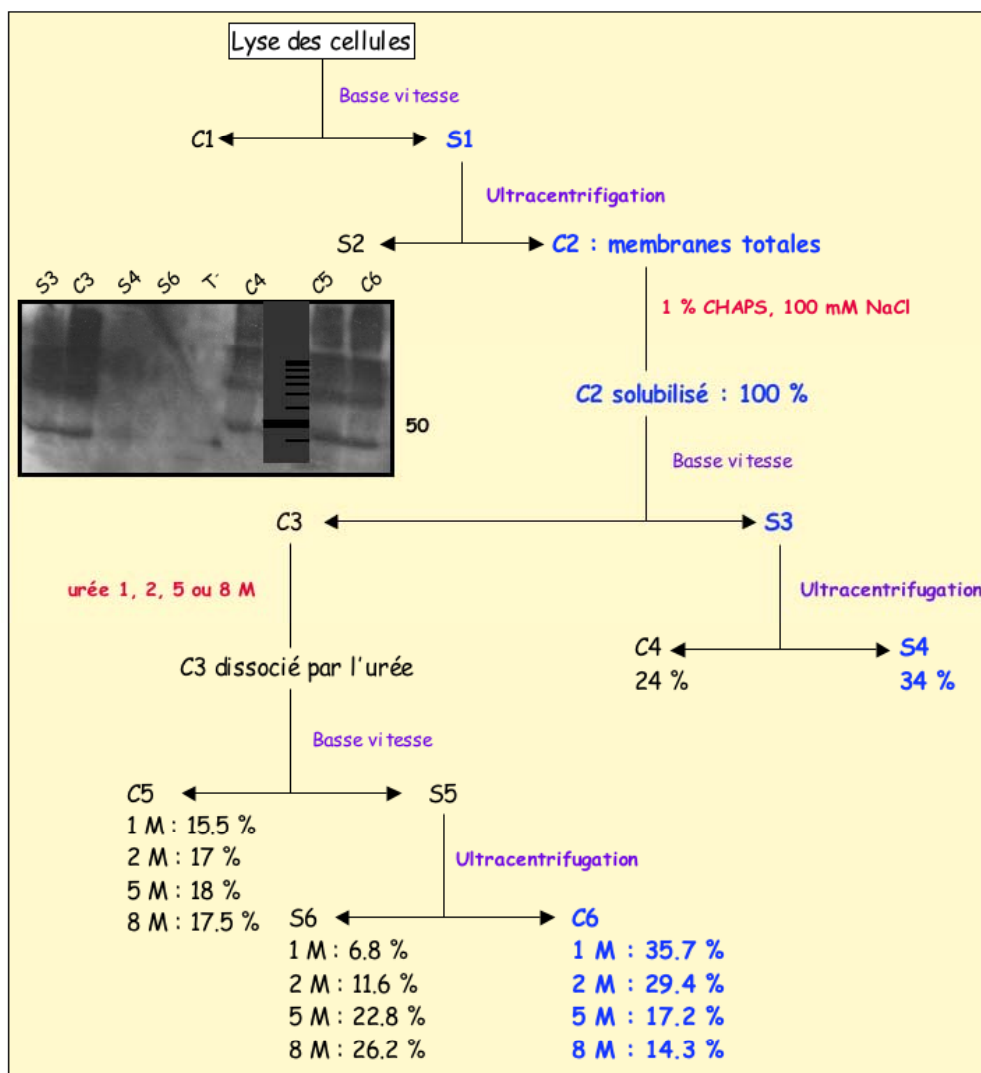


Figure 10 : Rendements de solubilisation du récepteur par l'urée

Chaque essai est réalisé sur une préparation de membranes totales des souches A10b et A206b, en présence de 1 % de CHAPS et 100 mM NaCl à 4 °C pendant une heure sous agitation. Le rendement de solubilisation est une moyenne de deux expériences indépendantes. Les rendements de solubilisation sont calculés par rapport à la quantité totale de protéines utilisée pour l'essai. Le Western blot est réalisé sur des échantillons préparés à partir de la souche A206b.

Gel d'acrylamide à 12 %, détection par un sérum polyclonal dirigé contre l'extrémité carboxy-terminale du récepteur (Santa-Cruz).

On détecte effectivement le récepteur dans le culot issu de la centrifugation à basse vitesse. Or ni le récepteur solubilisé, ni le récepteur inclus dans les membranes ne devrait centrifuger à 5000 g.

L'urée en concentration variable (1, 2, 5 et 8 M) est appliquée sur le culot issu de cette étape de centrifugation à basse vitesse, pendant au moins 1 heure à 4 °C sous agitation.

Le récepteur n'est pas détecté dans les fractions S6, mais très fortement dans les fractions C4, C5 et C6, et ce quelle que soit la quantité d'urée ajoutée. Il semblerait donc que l'addition d'urée ne permette pas de dissocier ces agrégats.

On voit d'ailleurs sur le blot une bande aux environs de 100 kDa qui pourrait correspondre à un dimère

Le même protocole a été appliqué avec d'autres détergents, et on retrouve à chaque fois le même résultat. Le récepteur est détecté dans les culots et n'est pas dissocié en présence d'urée 8 M, même lorsque l'urée est laissée pendant 48 heures.

Au vu de ces différents résultats, nous nous sommes posé la question de savoir ce qui pouvait être à l'origine de l'agrégation du récepteur. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ce résultat :

- L'agrégation pourrait être liée à la nature du récepteur : il semblerait que, dans notre cas, la nature même de la protéine ne puisse pas expliquer ce phénomène d'agrégation puisque la littérature décrit plusieurs protocoles de solubilisation de CCR5, et que le groupe de l'Institut Pasteur a mis au point les conditions de solubilisation des récepteurs CCR5 et CXCR4 exprimés en cellules mammifères infectées par SFV.

- L'agrégation du récepteur pourrait résulter d'une association covalente des récepteurs qui pourraient former des ponts disulfures anarchiques au niveau des cystéines libres du domaine extracellulaire voire intracellulaire. Nous avons donc appliqué le même protocole, mais cette fois-ci en ajoutant jusqu'à 1 M de β -mercaptoéthanol en plus de l'urée 8 M sur des échantillons préalablement « solubilisés » par 1 % de CHAPS. Même lorsque ce mélange est laissé pendant 48 heures, on n'observe pas de dissociation des agrégats. Il semblerait donc que la formation de ces ponts disulfures ne soit pas non plus l'explication à ce problème.

- Une dernière hypothèse serait que cette agrégation soit liée aux séquences d'adressage. En effet, dans notre système d'expression, le récepteur est adressé à la membrane des péroxisomes. Or les péroxisomes constituent le site de détoxification de la cellule et contiennent notamment les produits de dégradation du méthanol qui pourraient se lier au récepteur et former des agrégats. La levure *Hansenula polymorpha* avait déjà décrite pour la production de protéines solubles sécrétées ce qui n'impose pas de lyser les cellules et donc de libérer le contenu des péroxisomes. Néanmoins, nous avons d'emblée construit une souche dans laquelle CCR5 n'était pas fusionné à une séquence d'adressage vers les péroxisomes. Nous avons donc renouvelé l'expérience sur une préparation de membranes préparées selon une méthode enzymatique douce, de la souche exprimant CCR5 seul. Là encore, on observe le récepteur dans les culots, et il n'est pas détecté dans les surnageants après ultracentrifugation.

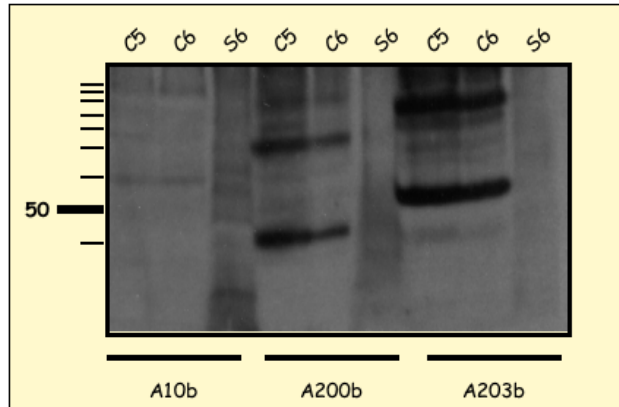


Figure 11 : Détection du récepteur par Western blot après test urée + β -mercaptoéthanol
 L'urée 8 M et jusqu'à 1 M β -mercaptoéthanol sont ajoutés pendant au moins 1 heure après solubilisation 1 heure par 1 % CHAPS. La souche A10b est transformée par le vecteur vide. La souche A200b est transformée par deux copies de la construction pHipX4.CCR5, sans séquence d'adressage aux péroxisomes. La souche A203b est transformée par deux copies du vecteur pHipX4.CCR5.Scpx15.
 Gel d'acrylamide à 12 %. Détection du récepteur par un sérum polyclonal de lapin dirigé contre l'extrémité carboxy-terminale de CCR5 (service de synthèse de l'IGBMC).

Quelle que soit la souche testée, quel que soit le mode de préparation des membranes, il semble impossible de dissocier ces agrégats. On observe d'ailleurs sur chaque blot une bande dont le poids moléculaire est compatible avec celui d'un dimère. Pourtant, les échantillons sont placés en présence d'urée et de β -mercaptoéthanol, et séparés par électrophorèse sur gel d'acrylamide en conditions dénaturantes, on ne devrait donc pas observer de dimères.

Il semblerait donc que le récepteur CCR5 produit dans la levure *Hansenula polymorpha* subisse une agrégation irréversible.

Par ailleurs, des études de microscopie électronique réalisées par le laboratoire de Martin Veenhuis à Groningen montrent des structures membranaires totalement atypiques aux alentours des péroxisomes, qui n'avaient encore jamais été observées dans leur laboratoire. On ne connaît pas à l'heure actuelle la composition de ces membranes particulières.

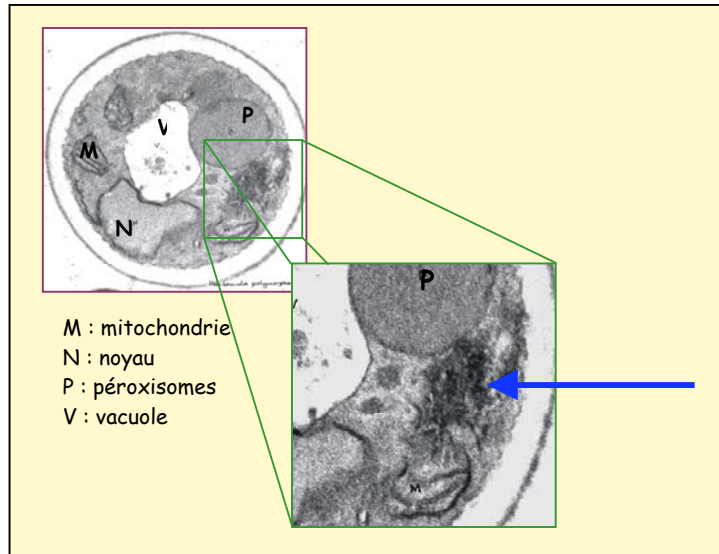


Figure 12 : Etudes de microscopie électronique

Etudes réalisées dans le laboratoire de M. Veenhuis à Groningen sur une souche exprimant *Hppex3*. *CXCR4*.

3. Discussion générale et conclusions

Autant le fait que le récepteur *CCR5* surexprimé dans la levure *Hansenula polymorpha* ne lie pas ses ligands ne constitue de loin pas un problème insurmontable, autant l'impossibilité de solubiliser le récepteur est un problème au vu des études structurales que nous envisageons. En effet, plusieurs équipes rapportent que les RCPG exprimés dans la levure ne lient pas leurs ligands en émettant l'hypothèse que la composition membranaire de la levure étant différente de celle des cellules mammifères, le récepteur pourrait être contraint dans une conformation empêchant la liaison des ligands endogènes (pour revue Opekarova et Tanner, 2003). Il a notamment été montré que le récepteur des opiacés de type mu n'avait pas la capacité de lier ses ligands lorsqu'il était exprimé dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*, mais que cette capacité était restaurée en remplaçant l'ergostérol par du cholestérol (Lagane *et al.*, 2000). Même s'il existe des cas où le récepteur surexprimé lie ses ligands lorsqu'il est exprimé dans la levure (pour revue Sarramegna *et al.*, 2003), le cholestérol notamment semble essentiel à un agencement correct de la protéine, notamment dans le cas de *CCR5* (Nguyen et Taub, 2002a). Par ailleurs, on ne connaît pas l'organisation des microdomaines chez *Hansenula polymorpha*, que ceux-ci soient des radeaux lipidiques ou d'autres domaines organisés. Le but n'étant pas que le récepteur soit fonctionnel au moment de son expression, mais au moment de sa purification, ce premier résultat ne nous a pas découragés.

Nous avons d'ailleurs tenté de mettre au point la culture à plus grande échelle en fermenteur, en pensant que le fait de pouvoir contrôler plus de paramètres pendant la culture devrait permettre de produire les quantités de protéines nécessaires aux études structurales envisagées. En parallèle, nous avons également construit tous les vecteurs d'expression incluant du côté carboxy-terminal l'étiquette C9 qui était déjà utilisée à l'Institut Pasteur.

Néanmoins, au vu des problèmes rencontrés par la suite, ces différents outils n'ont pas pu être utilisés. En effet, le fait de ne pas réussir à solubiliser le récepteur constitue un gros handicap pour les études structurales que nous envisageons. A ce moment, les deux groupes de Montpellier spécialistes de la production de RCPG en corps d'inclusion n'avaient pas encore rejoint notre réseau. Par ailleurs, un système d'expression visant à produire les récepteurs sous forme de corps d'inclusion dans *E. coli* était déjà testé dans le cadre du réseau.

Devant ces problèmes que je qualifierai d'insolubles, ce système d'expression a été arrêté dans le cadre du réseau ANRS pour produire les récepteurs de chimiokines CCR5 et CXCR4. Je pense malgré tout que ce système pourrait se révéler très prometteur en tant que système d'expression hétérologue, mais que les récepteurs de chimiokines ne constituent pas le meilleur modèle pour la mise au point et l'optimisation. Par ailleurs, les résultats obtenus dans le cadre du réseau MePNet (projet Européen d'étude des 100 RCPG, <http://www.mepnet.org>) tendent à prouver qu'il n'existe pas de système d'expression parfait dans le but de surexprimer les RCPG, et que le système à choisir est clairement dépendant de la protéine considérée. Plusieurs systèmes d'expression doivent souvent être testés avant de trouver celui qui sera le plus adapté à la production d'une protéine donnée.

Au vu des bons résultats obtenus au laboratoire avec le récepteur mu des opiacés produits dans les cellules Schneider S2, nous avons décidé de tester ce système d'expression pour surexprimer les récepteurs de chimiokines CCR5 et CXCR4.

CHAPITRE 6

MATERIELS ET METHODES

Hansenula polymorpha

1. Matériel

1.1. Organismes et milieux de culture

1.1.1. Bactéries

Le clonage est effectué dans les bactéries TOP10 de génotype $F^-mcrA \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC) \Phi80/lacZ\Delta M15 \Delta/lacX74 recA1 deoR araD139\Delta(ara-leu)7697 galN galK rpsL (Str^R) endA1 nupG$ fournies dans le kit TOPO TA cloning Invitrogen.

Le sous-clonage et l'amplification d'ADN sont réalisés dans la souche XL-1 blue de *Escherichia coli* de génotype $recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZDM15 Tn10 (Tet^R)]$ provenant de Biolabs.

Les bactéries sont cultivées dans du milieu complet LB (0.5 % NaCl, 1 % Tryptone, 0.5 % yeast extract +/- 2 % agar) éventuellement supplémenté par des antibiotiques.

1.1.2. Levure

La souche levure utilisée est la souche *Hansenula polymorpha* NCYC495A, auxotrophe pour la leucine et pour l'uracile ($Leu^- Ura^-$) qui nous a été procurée par le laboratoire de Martin Veenhuis (Groningen).

Elle est cultivée en milieu complet YPG (1 % yeast extract, 2 % peptone, 2 % glucose) ou en milieu minimum YNB (0,67 % yeast nitrogen base, 2 % glucose).

Pour l'expression, la souche est cultivée en milieu minéral additionné de vitamines et de sels minéraux (milieu Vishniac).

$(NH_4)_2SO_4$	2,5
$MgSO_4$	0,2
K_2HPO_4	0,7
NaH_2PO_4	3
Yeast extract	0,5

Tableau 1 : Composition du milieu minéral
(quantités exprimées en g/l)

D-biotine	0,2
Pantotenate de calcium	40
Acide folique	0,2
Myo-inositol	20
Niacynamide	40
Acide p-ammobenzoïque	20
Pyridoxin hydrochloridium	40
Riboflavine	20
Thiamine	40

Tableau 2 : Mélange de vitamines x1000
(quantités exprimées en mg pour 100 ml)

EDTA	10
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	4,4
MnCl ₂ , 4H ₂ O	1
CoCl ₂ , 6H ₂ O	0,32
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,315
(NH ₄) ₆ MoO ₂₄ , 4H ₂ O	0,22
CaCl ₂ , 7H ₂ O	1,47
FeSO ₄ , 7H ₂ O	1

Tableau 3 : Composition du milieu Vishniac x1000
(quantités exprimées en g/l)

1.1.3. Stockage et décongélation

Les souches de bactéries et de levures sont stockées à -80°C respectivement en milieu LB et YPG additionné de glycérol (20 % final).

La décongélation se fait en prélevant directement dans le tube ouvert à la flamme une petite noisette de milieu encore congelé avec une spatule préalablement flambée à l'éthanol. Les cellules sont étalées sur une boîte de milieu complet préalablement séchée.

1.2. Plasmides

Le clonage des fragments de PCR s'effectue grâce au kit TOPO TA cloning Invitrogen selon les recommandations du fournisseur.

Le plasmide d'expression pHipX4 est un vecteur navette *Escherichia coli* - *Hansenula polymorpha*. Il porte un gène qui confère la résistance à la kanamycine et une origine de répllication bactérienne pour la sélection et l'amplification chez *E. coli*. Le plasmide porte également le marqueur *LEU2* de *Saccharomyces cerevisiae* qui est fonctionnel chez *Hansenula polymorpha* et qui permet de compléter l'auxotrophie de la souche NCYC495A pour la leucine.

Ce plasmide nous a été fourni par le laboratoire de Martin Veenhuis (Groningen).

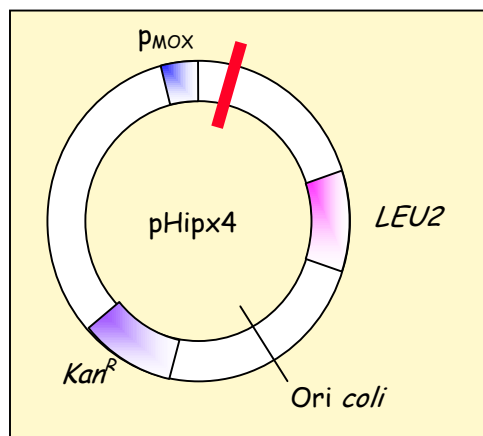


Figure 1 : Représentation du vecteur d'expression pHipX4 (navette bactérie-levure)
 La séquence *Ori* est utilisée comme origine de réplication chez *E. coli*. La séquence *Kan^R* confère la résistance à la kanamycine et permet la sélection des souches *E. coli* transformées. La séquence *LEU2* est un gène de *Saccharomyces cerevisiae* fonctionnel chez *Hansenula polymorpha* qui restaure la prototrophie de la souche transformée pour la leucine. pMOX est la séquence du promoteur de la méthanol oxydase sous contrôle duquel sont placées les fusions incluant l'ADNc de CCR5. Le trait rouge représente la cassette de clonage.

1.3. Enzymes de restriction et réactifs de clonage

Les enzymes de restriction proviennent du service commun de l'IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch).

L'élongase (mélange de polymérases recombinantes thermostables : polymérase *Taq* et *Pyrococcus GB-D*) provient de Gibco. Ce mélange d'enzymes garantit une amplification fidèle de l'ADN grâce à la processivité de la *Taq* et à l'activité correctrice 3' → 5' de *Pyrococcus GB-D*.

Le clonage des fragments de PCR est réalisé avec le kit TOPO TA cloning de Invitrogen, tous les réactifs étant fournis dans le kit à la fois pour le clonage, mais également pour la transformation des bactéries compétentes TOP10.

Les préparations d'ADN plasmidique (mini et midi préparation) sont réalisées avec les kits BIORAD selon les recommandations du fournisseur.

1.4. Produits divers

La synthèse des oligonucléotides et le séquençage d'ADN sont réalisés par les services communs de l'IGBMC.

Les détergents proviennent de chez Fluka, Anatrache ou Calbiochem.

2. Méthodes de biologie moléculaire

2.1. Clonage

2.1.1. Stratégies de PCR

2.1.1.1. Construction des vecteurs pHipX4.pMOX.CCR5.Scpx15tag

La construction pHipX4.pMOX.CCR5.Scpx15 avait déjà été réalisée et contrôlée à mon arrivée au laboratoire, et a été utilisée comme base pour la réaction de polymérisation en chaîne.

Construction pHipX4.pMOX.CCR5.Scpx15.6His

Le fragment pHipX4.pMOX.CCR5.Scpx15 est amplifié avec les oligonucléotides sens (5'-AATAACATAAGCTTATGGATTATCAAGTGTC AAGTCCAATCT-3') et antisens (5'-AATAAGATGTCGACGAGCTCTTATTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGTATACTCGCTAGAAGTTTTAG-3').

Cette réaction de PCR permet d'introduire les sites *Hind*III (a/agctt) en amont du gène et *Sa*I (g/tcgac) en aval de la fusion incluant l'ADNc de CCR5. L'oligonucléotide antisens porte également l'étiquette hexahistidine.

Construction pHipX4.pMOX.CCR5.Scpx15.myc.6His

Le fragment pHipX4.pMOX.CCR5.Scpx15 est amplifié avec les oligonucléotides sens (5'-AATAACATAAGCTTATGGATTATCAAGTGTC AAGTCCAATCT-3') et antisens (5'-AATAAGATGTCGACGAGCTCTTATTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGGCGGCCGCTTCAGGTCCTCCTCCGAGATCAGCTTCTGCTCTATACTCGCTAGAAGTTTTAGCAACCCTACAATC-3'). Cette réaction de PCR permet d'introduire les sites *Hind*III (a/agctt) en amont du gène et *Sa*I (g/tcgac) en aval de la fusion incluant l'ADNc de CCR5. L'oligonucléotide antisens porte également les étiquettes hexahistidine et c-myc.

2.1.1.2. Construction du vecteur pHipX4.pMOX.Hppex3.CCR5

La stratégie de clonage utilisée diffère de celle décrite précédemment.

Nous avons dans un premier temps amplifié le fragment CCR5 auquel a été fusionné en 5' une séquence de jonction qui est portée par l'oligonucléotide sens (5'-GAAACCTGTATTTCCAGGGTCATATGGATTATCAAGTGTC AAGTCCAATCT-3') alors que l'oligonucléotide antisens (5'-AATAACATGTCGACTTATTACAAGCCCACAGATATTT CCTG-3') permet d'introduire le site *Sa*I.

De la même façon, nous avons amplifié le fragment *Hppex3* auquel nous avons rajouté la même séquence de jonction du côté 3' par l'oligonucléotide antisens (5'-ACCTTGGAAGTACAAGTTTTCAAATTCTCCTCTTTAACCG-3'), l'oligonucléotide sens (5'-AATAACATAAGCTTATGTTCCAATATTGTAGAGATCTT-3') permettant d'introduire le site *Hind*III.

Une troisième réaction de PCR utilisant ces deux fragments comme matrice permet d'amplifier la fusion *Hppex3.CCR5* grâce à l'hybridation de ces deux fragments au niveau de la séquence de jonction.

2.1.2. Amplification des fragments d'ADN par PCR

La réaction de PCR est effectuée dans un volume réactionnel de 50 μ l contenant 50 ng de l'ADN à amplifier, 0.2 μ M de chaque oligonucléotide, 0.2 mM d'un mélange de dNTPs, 5 μ l de tampon de PCR + MgSO₄ fourni avec l'enzyme et une unité d'élongase (Gibco).

L'amplification se fait dans un thermocycler Perkin-Helmer selon la séquence suivante : un cycle de dénaturation de 5 minutes à 94 °C, puis 30 cycles de 1 minute de dénaturation à 94 °C, 1 minute d'hybridation à 55 °C et 1 minute 30 d'élongation à 72 °C, et enfin un cycle unique de post-élongation de 10 minutes à 72 °C. L'ADN linéaire est ensuite cloné dans le vecteur de clonage ou stocké à - 20 °C.

2.1.3. Clonage des fragments de PCR

2.1.3.1. Extraction et purification de l'ADN

2.1.3.1.1. Dépôt et migration

Les produits de PCR sont additionnés de tampon de charge (6x : 0.25 % bleu de bromophénol, 15 % Ficoll) puis séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1 % contenant 0.5 μ g/ml de bromure d'éthydiuim, à 100 V pendant 1 heure dans du tampon TAE (50x : 2 M Tris Base, 1 M acétate de sodium, 150 mM EDTA, pH8).

2.1.3.1.2. Extraction et purification de l'ADN

La bande correspondant au produit de PCR est extraite du gel d'agarose, de façon à récupérer seulement la bande d'intérêt.

La bande d'agarose est déposée sur de la laine de verre siliconée dans un tube percé, le tout étant placé sur un autre tube. L'ADN est élué de l'agarose par une centrifugation de 5 minutes à 2500 g. Le volume est complété à 100 μ l avec de l'eau stérile. L'ADN est séparé des protéines contaminantes par une étape d'extraction au phénol-chloroforme. Sur la suspension aqueuse d'ADN élué, on ajoute 50 μ l d'un mélange de chloroforme et d'alcool isoamylique (24 :1) et 50 μ l de phénol. Ce mélange est agité au vortex pendant une minute puis centrifugé 5 minutes à 15000 g. La phase aqueuse supérieure est ensuite soigneusement récupérée, puis précipitée à l'éthanol, par addition de 2 volumes d'éthanol froid et 1/10 de volume d'acétate de sodium 3M, pH5 pendant au moins 15 minutes à -20 °C. L'ADN précipité est récupéré par une centrifugation de 15

minutes à 15000 g à 4 °C, puis rincé par 500 µl d'éthanol à 70 %. L'ADN précipité et séché est repris dans 20 µl d'eau stérile.

2.1.3.2. Clonage dans le vecteur TOPO

La *Taq* polymérase possède une activité terminal transférase indépendante de la matrice, qui a pour conséquence l'addition de un ou plusieurs résidus A (désoxyadénosine) au niveau de l'extrémité 3' du produit de PCR. Le vecteur TOPO TA du kit Invitrogen est un vecteur optimisé pour le clonage de tels fragments de PCR, qui est linéarisé et possède des extrémités cohésives sur lesquelles sont ajoutées des résidus T (désoxythymidine) facilitant la ligation de l'insert dans le vecteur.

L'ADN amplifié est cloné dans le vecteur TOPO TA selon les recommandations du fournisseur. Le mélange de ligation est utilisé pour transformer des bactéries TOP10 compétentes pour le choc thermique, selon les recommandations du fournisseur. Les bactéries transformées sont étalées sur des boîtes de milieu sélectif LB contenant de 100 µg/ml d'ampicilline, préalablement séchées et placées à 37 °C pour la nuit.

2.1.3.3. Préparation d'ADN plasmidique pour les études analytiques

Les bactéries provenant de la transformation sont mises en culture pendant une nuit à 37 °C sous agitation dans du milieu liquide LB additionné d'ampicilline (100 µg/ml). Les bactéries provenant de 2 ml de ces cultures sont récupérées par centrifugation 2 minutes à 15000 g. Le culot bactérien est repris dans 350 µl de tampon STET froid (8 % saccharose, 5 % TritonX-100, 0.05 M EDTA, 50 mM TrisHCl pH8) additionné de 25 µl de lysozyme à 10 mg/ml, chauffé 1 minute à 100 °C, et refroidit dans la glace. La suspension est centrifugée 10 minutes à 15000 g. Après avoir retiré le précipité d'aspect glaireux, l'ADN est précipité par addition d'un volume d'isopropanol froid pendant au moins 15 minutes à -20 °C. L'ADN est récupéré par une centrifugation de 15 minutes à 15000 g à 4 °C, puis rincé par 500 µl d'éthanol à 70 %. L'ADN est repris dans 50 µl d'eau stérile.

L'ADN ainsi préparé (5 µl) est contrôlé par des digestions enzymatiques appropriées en présence de RNase. Toutes les digestions enzymatiques sont effectuées pendant 1 heure à 37 °C au bain-marie, dans un volume réactionnel de 30 µl, en présence de 1 µl d'enzyme de restriction dans le tampon approprié. Pour les digestions séquentielles, la première enzyme est toujours celle qui coupe dans le tampon le moins salin.

2.1.3.4. Préparation d'ADN plasmidique pour le séquençage et la transformation

L'ADN des clones présentant un profil de restriction correct est préparé selon une méthode permettant d'obtenir un ADN propre pour le séquençage à partir du kit de préparation d'ADN plasmidique Biorad selon les recommandations du fournisseur.

2.1.4. Clonage dans le vecteur d'expression

2.1.4.1. Ligation

Après contrôle de la séquence, l'ADN est extrait du vecteur TOPO par digestion enzymatique séquentielle *HindIII-SaI*. Le vecteur d'expression est ouvert par les mêmes enzymes, en commençant toujours par l'enzyme qui coupe dans le tampon le moins salin.

Après migration de l'ADN ainsi digéré, les bandes d'intérêt sont récupérées dans le gel, puis purifiées. La ligation s'effectue pendant une nuit à température ambiante, dans les conditions classiques la quantité d'insert étant trois fois supérieure à la quantité de vecteur, dans un volume réactionnel de 20 μ l, en présence de 1 μ M d'ATP, 2 μ l de tampon de ligation fourni avec l'enzyme et une unité de T4 DNA ligase (Boehringer).

2.1.4.2. Transformation des bactéries compétentes XL-1 Blue

Préparation de bactéries compétentes

A partir d'une préculture de 30 ml en milieu LB, on réalise une culture de 500 ml qui sera mise à pousser à 37 ° C sous agitation, jusqu'à ce que la densité optique de la culture soit comprise entre 0.4 et 0.6 unité de DO, c'est-à-dire lorsque les bactéries sont en phase exponentielle de croissance. La culture est ensuite refroidie sur la glace pendant 10 minutes avant d'être centrifugée 15 minutes à 4200 rpm (rotor SLA 300, Sorvall) à 4 ° C. Le culot bactérien est remis en suspension dans 100 ml de tampon TFB1 (50 mM $MnCl_2$, 100 mM KCl, 10 mM $CaCl_2$, 15 % glycérol, 30 mM acétate de sodium pH4.8) stérile puis immédiatement centrifugé pendant 8 minutes à 4200 rpm (rotor SLA 300, Sorvall) à 4 ° C. Le culot est repris dans 20 ml de tampon TFB2 (10 mM Na-MOPS (10X : 200 mM MOPS, 50 mM acétate de sodium, 10 mM EDTA pH7), 75 mM $NaCl_2$, 10 mM KCl, 15 % glycérol).

Les bactéries ainsi préparées sont compétentes pour la transformation par choc thermique. La compétence des bactéries est évaluée par une transformation avec des quantités définies d'ADN plasmidique. La compétence est idéale si le nombre de colonies obtenues est compris entre 10^6 et $10^8/\mu$ g d'ADN.

Les bactéries compétentes sont aliquotées par 100 μ l et stockées à -80 °C.

Méthode de transformation par choc thermique

Une suspension de 100 μl de bactéries XL-1Blue compétentes pour la transformation par choc thermique sont transformées avec 1/10 du volume de la ligation. Les bactéries sont laissées 30 minutes sur la glace, puis le choc thermique est réalisé 1 minute à 42 °C. Les bactéries sont ensuite replacées sur la glace pendant 5 minutes, puis régénérées pendant une heure à 37 °C sous agitation dans 900 μl de milieu SOB (20 g/l bactotryptone, 24 g/l yeast extract, 0.5 g/l NaCl). Après régénération, les bactéries sont centrifugées, 800 μl du surnageant sont éliminés. Le culot est repris dans les 200 μl restants puis étalé sur milieu sélectif LB contenant de la kanamycine (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

De la même façon que précédemment, on prépare l'ADN de ces transformants pour les contrôles par digestion enzymatique. L'ADN des clones présentant le profil correct est ensuite préparé par une méthode plus propre. Dans la mesure où l'ADN a été découpé sous lampe ultraviolette, il est reséquencé avant d'être utilisé pour transformer les levures.

La concentration de l'ADN est déterminée par mesure de la densité optique à 260 nm (une unité de D.O. correspondant à 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ d'ADN double brin).

La qualité de l'ADN est évaluée par mesure de densité optique à 280 nm, l'ADN étant dépourvu de contamination protéique si le rapport $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$ est compris entre 1.7 et 2.

2.2. Construction et contrôle des souches levures

2.2.1. Préparation de levures compétentes pour la transformation

A partir d'une pré-culture de 100 ml de la souche NCYC495A ($\text{Leu}^- \text{Ura}^-$) en milieu YPG, on réalise une culture de cellules à 37 °C sous agitation. Les cellules provenant d'une culture en phase exponentielle de croissance (DO à 600 nm aux alentours de 1, sachant qu'une unité de DO à 600 nm correspond à $5 \cdot 10^7$ cellules) sont refroidies pendant 30 minutes sur la glace. Les cellules sont récupérées par une centrifugation de 5 minutes à 5000 g à 4 °C, puis rincées dans de l'eau stérile. Le culot de levures est ensuite repris dans 12.5 ml de tampon KPi DTT 25 mM et incubé 15 minute à 37 °C sous agitation. Les cellules sont culottées par une centrifugation de 5 minutes à 5000 g à 4 °C, puis le culot est repris et lavé deux fois dans 50 ml de tampon STM (270 mM saccharose, 1 mM MgCl_2 , 10 mM Tris-HCl pH7.5) froid et stérile. Après ces deux étapes de rinçage, le culot est repris dans 400 μl de tampon STM froid et stérile.

Les levures ainsi obtenues sont compétentes pour la transformation par électroporation et sont utilisées immédiatement.

2.2.2. Transformation des souches levure par électroporation

Afin de cibler l'intégration du vecteur d'expression dans le locus du promoteur de la méthanol oxydase endogène, 500 ng de plasmide sont linéarisés au niveau du promoteur pMOX, par digestion *StuI* dans un volume réactionnel final de 30 μ l pendant une heure à 37 °C.

Une aliquote de 100 μ l de levures compétentes est mise en présence de 100 ng d'ADN linéarisé dans des cuves à électroporation stériles préalablement refroidies dans la glace. Après électroporation (400 Ω , 250 μ F, 450 V), les cellules sont régénérées dans 900 μ l de milieu YPG chauffé, pendant une heure à 37 °C sous agitation.

Les cellules sont ensuite centrifugées pendant 5 minutes à 5000 g, 800 μ l du surnageant sont retirés. Le culot est remis en suspension dans les 200 μ l restants, puis étalé sur des boîtes de milieu YNB + uracile (1 % v/v). Les boîtes sont ensuite placées à 37 °C pour plusieurs jours.

Les colonies issues de la transformation sont repiquées au cure-dent stérile sur une boîte de YPG (milieu complet) et remises à pousser pour une nuit à 37 °C.

Avec ces transformants, on ensemence 50 ml de milieu complet YPG pour une nuit sous agitation à 37 °C. Ensuite pendant trois jours consécutifs, on prélève 1 ml de la culture de la nuit pour ensemencer 50 ml de milieu complet YPG. Le but est de maintenir les cellules en phase exponentielle de croissance sans pression de sélection pendant plusieurs jours, afin d'induire la perte du plasmide chez les transformant n'ayant pas intégré le vecteur de façon stable dans leur génome.

Après ces trois jours de culture en phase exponentielle de croissance, la culture est diluée dans du milieu YPG de façon à étaler de 10 à 100 colonies sur boîte YPG (une unité de DO à 600 nm correspond à $5 \cdot 10^7$ cellules).

On effectue ensuite un test en gouttes afin de contre-sélectionner les transformants n'ayant pas intégré le vecteur dans leur génome. Pour cela, les levures de chaque colonie sont reprises dans 1 ml d'eau stérile, et 10 μ l de cette suspension sont étalées en parallèle sur trois boîtes YPG, YNB et YNB + uracile, chaque goutte étant déposée au même endroit de chacune des trois boîtes à l'aide d'un quadrillage déposé sous la boîte au moment du dépôt. Cette technique permet de ne retenir pour la suite des expériences que les clones ayant le plasmide dans leur génome, c'est-à-dire ceux qui poussent sur YNB + uracile.

2.2.3. Préparation d'ADN génomique de levure

Les colonies qui ont poussé sur milieu YNB supplémenté sont utilisées pour ensemencer 50 ml de milieu complet YPG. Les cellules provenant de cette culture d'une

nuit à 37 °C sous agitation sont récupérées par centrifugation 5 minutes à 5000 g. Le culot de levures est rincé dans 1 ml d'eau stérile, puis remis en suspension dans 250 µl de tampon de broyage (1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 2 % TritonX-100, 1 % SDS, 10 mM Tris-HCl pH8). Des billes de verre de 0.5 mm de diamètre sont ensuite ajoutées dans le tube de manière à laisser environ 1 mm de liquide au-dessus des billes, ainsi que 250 µl d'un mélange phénol-chloroforme-acide isoamylique (24 :24 :1). Les cellules sont ensuite lysées en vortexant le mélange pendant 3 minutes. L'ADN est récupéré dans la phase aqueuse supérieure par une centrifugation de 5 minutes à 15000 g.

Afin de purifier l'ADN ainsi récupéré, une deuxième extraction phénol-chloroforme est réalisée sur la phase aqueuse dans les mêmes conditions.

L'ADN récupéré dans la phase aqueuse est ensuite précipité par addition de 600 µl d'éthanol froid et de 20 µl d'acétate de sodium 3M, pH5 pendant au moins 30 minutes à -20 °C. L'ADN est récupéré par centrifugation 15 minutes à 15000 g, séché et le culot est remis en suspension dans 400 µl de tampon TE (10 mM Tris-HCl pH8, 1 mM EDTA) en présence de RNase. Le mélange est incubé pendant 10 minutes à 37 °C afin de digérer l'ARN présent dans la préparation. L'ADN est alors récupéré par une deuxième précipitation en présence d'1 ml d'éthanol froid et de 15 µl d'acétate de sodium 3 M, pH5 pendant 30 minutes à -20 °C. L'ADN est culotté par centrifugation 15 minutes à 15000 g puis rincé par 500 µl d'éthanol à 70 %. Le culot d'ADN est séché puis repris dans 50 µl d'eau ou de tampon TE.

2.2.4. Hybridation ADN/ADN de type Southern blot

Les transformants ayant la capacité de pousser sur un milieu dépourvu de leucine après l'étape de contre sélection ont normalement intégré le plasmide dans leur génome. Afin de contrôler le locus d'intégration mais également le nombre de copies intégrées, nous réalisons une hybridation ADN/ADN de type Southern blot grâce à une sonde radioactive qui s'hybride au niveau du promoteur de la méthanol oxydase.

2.2.4.1. Préparation de la sonde

La sonde est préparée à partir du vecteur d'expression vide pHipX4. 700 ng d'ADN sont digérés par les enzymes *StuI* et *HindIII* de façon séquentielle en commençant par l'enzyme qui coupe dans le tampon le moins salin. Le fragment de 850 paires de base est récupéré dans le gel après électrophorèse sur un gel d'agarose à 1 %. L'ADN est élué du gel selon le protocole déjà décrit (phénol-chloroforme puis précipitation alcoolique), et repris dans 50 µl d'eau.

Le marquage de la sonde s'effectue avec le kit HighPrime (Boehringer) selon les recommandations du fournisseur. Pour effectuer deux hybridations, on utilise 25 ng

d'ADN digéré que l'on reprend dans 11 μl d'eau. L'ADN est dénaturé pendant 10 minutes à 100 °C puis refroidi sur la glace. Sont ensuite ajoutés 4 μl du mélange HighPrime et 5 μl de dCTP marqués au ^{32}P (150 μCi). Le mélange est incubé pendant 10 minutes à 37 °C, puis la réaction est stoppée par addition de 2 μl d'EDTA à 0.2 M.

La sonde marquée est purifiée par gel filtration sur une colonne artisanale Séphadex G50. La résine gonflée pendant 24 heures dans du tampon TE est rincée deux fois puis dégazée à la trompe à vide pendant 15 minutes. Environ 2 ml de cette résine sont coulés dans une pipette Pasteur montée sur une potence. La colonne est rincée 8 fois par un mélange de tampon TE et de NaCl (10:1:100). La totalité de la sonde est ensuite déposée en haut de la colonne et éluée avec 12 fois 200 μl du même tampon. On mesure ensuite l'activité de 1 μl de chacune des fractions récupérées dans 5 μl d'eau, le tout étant placé dans une fiole de comptage, par un comptage Cerenkov.

Les fractions contenant la sonde marquée sont ensuite mélangées. Pour l'hybridation, on utilise 5.10^5 à 10^6 cpm/ml.

2.2.4.2. Préparation de la membrane

Environ 2 μg d'ADN génomique de levure sont digérés par 40 unités d'enzyme *HindIII* dans un volume réactionnel de 30 μl pendant au moins deux heures au bain-marie à 37 °C.

Le mélange de digestion est déposé sur gel d'agarose 1 % en tampon de charge. La migration s'effectue pendant environ 16 heures à 25 V afin de bien séparer les fragments d'ADN. L'efficacité de la digestion est contrôlée après avoir laissé le gel environ 30 minutes dans un bain de bromure d'éthyldium : si la digestion est correcte, tout l'ADN génomique a été digéré ce qui a permis de cliver tous les fragments *HindIII*-*HindIII*, on doit donc voir de l'ADN dans toute la piste (« smire »).

Le deuxième jour, le gel est transféré sur une membrane de nylon après plusieurs séries de traitements sur agitateur orbital : l'ADN est tout d'abord dépuriné en ajoutant sur le gel 2 volumes d'une solution d'HCl à 0.25 N jusqu'à ce que le colorant du tampon de charge vire au jaune (compter environ 45 minutes). Après un rinçage à l'eau déminéralisée, l'ADN est dénaturé par addition de 2 volumes d'une solution 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl jusqu'à ce que le colorant vire à nouveau au bleu (environ 45 minutes). Enfin, l'étape de neutralisation s'effectue avec deux volumes d'une solution à 1M de Tris-HCl pH7.5, 1.5 M NaCl pendant 45 minutes. L'ADN est ensuite transféré sur une membrane de nylon par capillarité pendant 16 heures, puis fixé sur la membrane au four à vide pendant 1 heure à 80 °C.

2.2.4.3. Hybridation de la sonde sur l'ADN génomique

La membrane est équilibrée dans une solution SSC 5X, puis préhybridée pendant 2 heures à 42 °C dans une solution d'hybridation (SSC 5X, denhardt's 5X [0,1 % BSA, 0,1 % Ficoll PVP], 50 % formamide, 0,1 mg/ml ssDNA, 20 mM tampon phosphate de sodium pH 6,5).

Pour procéder à l'hybridation, on remplace la solution du premier bain par 15 ml de solution d'hybridation contenant la sonde préalablement dénaturée par un chauffage de 5 minutes à 95 °C, puis refroidie dans la glace. Le tout est laissé sous agitation au bain-marie pendant 16 heures à 42 °C.

Le lendemain, la membrane est lavée par addition de quatre tampons de lavage successifs : 500 ml de tampon 1XSSC/0,1 % SDS pendant 20 minutes à 42 °C, puis 500 ml de 1XSSC/0,1 % SDS à 55 °C pendant 20 minutes, puis 500 ml de 0,1XSSC/0,1 % SDS pendant 20 minutes à 55 °C et enfin 500 ml de 0,1XSSC/0,1 % SDS pendant 20 minutes à 65 °C.

Après avoir soigneusement égoutté la membrane, celle-ci est enveloppée dans un film transparent puis exposée pendant une durée variant d'une nuit à 8 jours dans une cassette destinée à l'analyse au phosphorimager.

Les images sont analysées au phosphorimager qui permet notamment de quantifier l'intensité de la bande intermédiaire afin de déterminer le nombre de copies intégrées.

3. Culture et induction des souches *Hansenula polymorpha*

3.1. Adaptation au milieu minéral

Les levures sont adaptées au milieu minéral par une étape de culture de trois jours en phase exponentielle de croissance. Une culture de 100 ml de milieu minéral supplémenté de vitamines, de milieu Vishniac, d'uracile et de glucose (2 % final) est diluée régulièrement de façon à maintenir les cellules en phase exponentielle de croissance, c'est-à-dire que la densité optique à 600 nm doit se situer aux alentours de 0,8 à 1 unité de DO. Les cellules sont cultivées à 37 °C sous agitation.

3.2. Induction

Après trois jours de culture en phase exponentielle de croissance, le glucose du milieu est remplacé par du méthanol à hauteur de 1,5 % final, toujours en présence de vitamines, de milieu Vishniac et d'uracile, mais sans glucose. Les cellules sont cultivées à 37 °C sous agitation. Après 18 heures d'induction, les cellules sont récoltées par

centrifugation 5 minutes à 5000 g, rincées à l'eau stérile, puis stockées à -80 °C par aliquote de 500 OD (une unité de DO correspond à 100 OD).

3.3. Culture en fermenteur

Les cellules sont cultivées de la même façon que pour les cultures en erlemeyers. Le fermenteur permet en revanche de cultiver de plus gros volumes (cuve de 5 litres préalablement autoclavée avec tous les tuyaux au contact des cellules) et de contrôler plusieurs paramètres supplémentaires :

- Réglage fin de la température grâce à une sonde plongée dans la cuve
- Contrôle de l'oxygénation de la cuve
- Contrôle de l'agitation de la cuve grâce aux pales
- Possibilité d'introduire un produit antimousse

Les cellules sont d'abord adaptées pendant trois jours au milieu minéral puis le méthanol est injecté dans la cuve. Nous avons réalisé les premiers essais en culture continue, c'est-à-dire que du milieu frais est régulièrement ajouté dans la cuve, et dans le même temps, le même volume est retiré automatiquement de la cuve.

Cette méthode de culture continue présente l'avantage de fournir continuellement aux cellules du milieu frais, et de recueillir au final des volumes nettement supérieurs à la contenance de la cuve.

4. Méthodes de biochimie

4.1. Lyse des cellules et préparation de membranes

4.1.1. Lyse mécanique au désintégrateur de cellules

Les cellules culottées et aliquotées par 500 OD sont rincées dans 20 ml d'eau stérile. Après le lavage, les cellules sont récupérées par une centrifugation de 5 minutes à 7000 g à 4 °C. Le culot de cellules est repris dans 20 ml de tampon de lyse (320 mM saccharose, 50 mM Tris-HCl pH7.5), puis lysées par trois passages successifs à 2.7 kbars au désintégrateur de cellules (Basic Z, Constant system). La suspension cellulaire ainsi obtenue est ensuite centrifugée pendant 5 minutes à 5000 g à 4 °C pour éliminer les débris cellulaires, les cellules non lysées et les noyaux. Le surnageant est ensuite ultracentrifugé à 4 °C pendant une heure à 100000 g afin de culotter les membranes. Le culot de membranes est remis en suspension dans 2 ml de tampon de lyse (320 mM saccharose, Tris 50 mM, pH 7.5) grâce à un homogénéisateur manuel de type Potter, jusqu'à obtention d'une solution limpide.

La concentration en protéines est évaluée par un dosage protéique de type Bradford (Biorad) contre une gamme de BSA.

Remarque : la recette du tampon de lyse a été modifiée par la suite (10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 % glycérol, 100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH7.5 + détergent).

4.1.2. Méthode enzymatique douce à la zymolyase (préparation de protoplastes)

Un culot de cellules correspondant à 500 OD est lavé dans 20 ml d'eau stérile, puis les cellules sont récupérées par une centrifugation de 5 minutes à 5000 g. Les cellules sont remises en suspension dans le tampon de pré-incubation (50 mM EDTA, 1.2 M sorbitol, 100 mM Tris-HCl pH 8) à raison de 0.06 g de cellules par millilitre de tampon (sachant que 1 OD correspond à 1 mg), en présence de 140 mM de β -mercaptoéthanol. Les cellules sont incubées 15 minutes à 37 °C sous agitation. Les cellules sont collectées par 10 minutes de centrifugation à 6000 g à température ambiante. Les cellules sont ensuite rincées par 20 ml de tampon protoplaste (1.2 M sorbitol, 50 mM Kpi pH 7.2), puis culottées par une centrifugation de 5 minutes à 5000 g. Après avoir remis les cellules en suspension dans 10 ml de tampon protoplaste, on mesure la densité optique à 600 nm qui servira de zéro pour le test SDS permettant de suivre la formation des protoplastes. Après addition de zymolyase à raison de 1mg/ml, les cellules sont incubées à 37 °C sous agitation.

Le test SDS permettant de suivre l'évolution de la formation des protoplastes est réalisé toutes les 10 minutes en prélevant 20 μl de l'échantillon à doser additionnés de 800 μl de SDS 5 % et de 180 μl de tampon protoplaste. Cette mesure est renouvelée toutes les 10 minutes jusqu'à obtention de 85 à 90 % de lyse [méthode de calcul du pourcentage de lyse : $100 - (\text{DO}_t/\text{DO}_0) \times 100$]. Les cellules sont ensuite refroidies 15 minutes dans la glace et les protoplastes sont récupérés par une centrifugation de 8 minutes à 6000 g.

Les protoplastes sont alors remis en suspension dans le tampon d'homogénéisation (0.1 M EDTA, 1 mM KCl, 0.8 M sorbitol, 5 mM MES pH 5.5) contenant de la leupeptine à raison de 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. A ce stade les protoplastes doivent être maintenus sur la glace. La préparation des homogénats peut être améliorée par une homogénéisation avec un broyeur manuel de type Potter. L'homogénat ainsi obtenu est centrifugé pendant 10 minutes à 3000 g à 4 °C. Le culot C1 contient les débris cellulaires. Le surnageant (S1) est ensuite recentrifugé pendant 10 minutes à 3000 g à 4 °C. Ce deuxième surnageant (S2, appelé PNS pour Post Nuclear Supernatant) est alors ultracentrifugé pendant 30 minutes à 30000 g à 4 °C. Cette centrifugation permet d'éliminer les organelles qui seront récupérés dans le culot. Le troisième surnageant (S3) est ultracentrifugé

pendant une heure à 100000 g à 4 °C. Le surnageant contient les petites structures membranaires.

La quantité de protéines est évaluée par un dosage protéique de type Bradford (réactif Biorad) contre une gamme de BSA.

4.2. Immunodétection du récepteur

4.2.1. Dot blot en conditions non dénaturantes

Pour chaque souche construite, nous vérifions la présence du récepteur par une détection en conditions non dénaturantes par la méthode du Dot blot. Pour se faire, environ 1.5 µg de protéines totales sont déposées sur une fine bande de membrane de vinyle préalablement saturée pendant 30 minutes dans un tampon TBS (150 mM NaCl, 20 mM Tris-base pH8), 0.05 % tween, 3 % lait.

Les conditions de blot sont décrites dans le paragraphe 4.2.3.

4.2.2. SDS-PAGE et Western blot

Les échantillons de protéines sont analysés par électrophorèse en conditions dénaturantes sur gel SDS-PAGE.

Pour chaque échantillon, 15 à 20 µg de protéines totales sont déposés par puits additionnées de tampon Laemmli enrichi en SDS (1 % final), sans chauffage préalable.

Le gel de séparation contient un mélange acrylamide/bisacrylamide à 12 % (les premiers essais ont été réalisés sur des gels à 10 %), 425 mM Tris-HCl pH8.8, 0.2 % SDS, 0.03 % APS et temed. Le gel de concentration contient 5 % du mélange acrylamide/bisacrylamide, 425 mM Tris-HCl pH6.8, 0.2 % SDS, 0.03 % APS et temed (tampon d'électrophorèse 5X :192 mM glycine, 1 % SDS, 25 mM Tris-HCl pH8.3).

Plusieurs tentatives ont été faites dans le but de trouver les meilleures conditions de migration, les meilleurs résultats étant obtenus pour une migration à voltage constant (50 V).

Les protéines sont ensuite transférées sur membrane PVDF à voltage constant pendant une heure sur 90 à 100 V en refroidissant la cuve avec un bloc de glace dans un tampon de transfert (50 mM Tris-HCl, 50 mM acide borique). Après transfert, la membrane est colorée au rouge Ponceau afin de repérer les marqueurs de poids moléculaire et pour visualiser l'efficacité de transfert. La membrane est rincée à l'eau déminéralisée puis soit utilisée directement pour le blot, soit congelée à -20 °C.

4.2.3. Détection du récepteur

La membrane est saturée pendant 3 minutes dans un mélange TBS (150 mM NaCl, 20 mM Tris-base pH8), 0.05 % tween, 3 % lait (TBSTL).

La membrane est ensuite laissée une heure sous agitation en présence de l'anticorps primaire dilué dans ce même mélange TBSTL pendant une heure.

Après trois rinçages de 5 minutes sous agitation dans le tampon TBSTL, l'anticorps secondaire dilué en TBSTL est laissé en présence de la membrane pendant une heure.

Sont ensuite effectués deux rinçages de 5 minutes en TBSTL et un rinçage de 10 minutes en TBS seul. La membrane est ensuite bien séchée puis révélée, la méthode de révélation étant dépendante du couplage de l'anticorps secondaire utilisé. Dans notre cas, les anticorps secondaires sont couplés à la phosphatase alcaline et la membrane est révélée avec un kit de révélation Roche selon les recommandations du fournisseur.

Optimisation du protocole de détection

Le protocole de détection des échantillons a été optimisé à plusieurs niveaux :

- Nous avons tout d'abord testé plusieurs méthodes de préparation des échantillons : lyse mécanique des cellules au désintégrateur de cellules, ou préparation de protoplastes par une méthode enzymatique plus douce à la zymolyase. Les résultats obtenus ne diffèrent pas significativement. Par ailleurs, au vu du coût de revient de la méthode utilisant la zymolyase, cette méthode est difficilement applicable à une production à grande échelle. Nous avons donc opté pour une préparation des membranes sur des cellules lysées mécaniquement et avons testé plusieurs tampons pour la préparation des membranes. Du tampon (320 mM saccharose, Tris 50 mM, pH 7), nous sommes passés à un tampon (10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 % glycérol, 100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH7.5) contenant le détergent.

- Nous avons ensuite modifié les conditions de migration des échantillons. D'une migration à 100 V sur un gel à 10 %, nous sommes passés à une migration à 50 ou 60 V au maximum sur un gel à 12 %.

- Nous avons ensuite testé une large panoplie d'anticorps dirigés contre CCR5 à des concentrations variables, en modifiant également la concentration de l'anticorps secondaire : 2D7, monoclonal anti-myc, 3A9, 180-181-182-183 (R&D), qui ne détectent absolument rien. Nous avons ensuite testé le CTC5, qui est utilisé en routine par le groupe de l'Institut Pasteur, mais cet anticorps s'est avéré inutilisable dans la mesure où il révèle plus de 7 bandes dans le témoin négatif. Dans un premier temps, les meilleurs résultats ont été obtenus en détectant le récepteur grâce à un sérum polyclonal de chèvre dirigé contre l'extrémité carboxy-terminale du récepteur (Santa Cruz), utilisé en combinaison avec un sérum de lapin dirigé contre les immunoglobulines de chèvre (les anticorps sont dilués 1/1000 et 1/5000 respectivement). Nous avons

ensuite fait synthétiser un anticorps au service de synthèse de l'IGBMC (sérum polyclonal de lapin dirigé contre l'extrémité carboxy-terminale de CCR5, 1/1000) utilisé en combinaison avec un sérum polyclonal de chèvre dirigé contre les immunoglobulines de lapin (1/1000). Nous avons également légèrement modifié le tampon utilisé pour la Western blot : de TBS 0.05 % tween, 3 % lait, nous sommes passés à un tampon TBS 1 % tween 5 % lait.

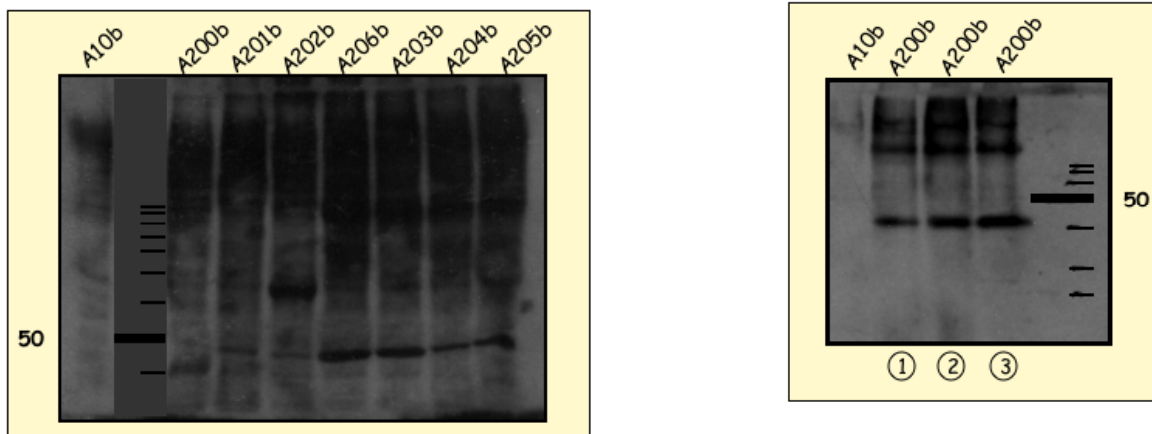


Figure 2 : Détection du récepteur par Western blot

A gauche, détection du récepteur avant optimisation

A10b : témoin négatif, souche NCYC495A transformée par deux copies du vecteur vide ; A200b : souche NCYC495A ayant intégré deux copies du vecteur pHipX4.CCR5 ; A201b : souche NCYC495A ayant intégré deux copies du vecteur pHipX4.Scpx3A.CCR5 ; A202b : souche NCYC495A ayant intégré deux copies du vecteur pHipX4.Scpx3B.CCR5 ; A206b : souche NCYC495A ayant intégré deux copies du vecteur pHipX4.Hppex3.CCR5 ; A203b : souche NCYC495A ayant intégré deux copies du vecteur pHipX4.CCR5.Scpx15 ; A204b : souche NCYC495A ayant intégré deux copies du vecteur pHipX4.CCR5.Scpx15.6His ; A205b : souche NCYC495A ayant intégré deux copies du vecteur pHipX4.CCR5.Scpx15.myc.6His.

A droite, détection du récepteur après optimisation

piste 1 : 15 µg de protéines totales ; piste 2 : 15 µg de protéines totales ; piste 3 : 20 µg de protéines totales

4.3. Solubilisation du récepteur

4.3.1. Solubilisation classique

La solubilisation consiste à extraire les protéines de la membrane par des détergents. La solubilisation est effectuée à partir de préparations de membranes totales, à une concentration de 10 mg de protéines totales par ml.

Les échantillons sont solubilisés dans un tampon (10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 % glycérol, 20 mM Tris-HCl pH7.5) en présence de concentration variable de sels (0, 0.5, 1 ou 1.5 M NaCl) et à différentes concentrations de détergents pendant au moins une heure à 4°C sur une roue permettant l'agitation des échantillons.

Les échantillons sont ensuite ultracentrifugés à 4 °C pendant une heure à 100000 g. Les protéines solubilisées présentes dans le surnageant sont ensuite analysées par Western blot après dosage protéique par la méthode Bradford (réactif Biorad) contre une gamme de BSA.

4.3.2. Test « urée »

Des membranes préparées à partir de 500 OD de cellules sont lysées au désintégrateur de cellules puis reprises dans le tampon de lyse (10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 % glycérol, 20 mM Tris-HCl pH7.5, concentration variable de NaCl additionné du détergent à tester). Les échantillons sont solubilisés pendant une heure sous agitation à 4 °C, puis centrifugés pendant 5 minutes à 5000 g à 4 °C. Afin de vérifier si les culots ne contiennent pas d'agrégats de récepteur, ceux-ci sont remis en suspension dans une solution d'urée à 1, 2, 5 ou 8 M éventuellement additionnée de β -mercaptoéthanol (jusqu'à 1 M) et placés sous agitation pendant une heure à 4 °C. Les échantillons sont ensuite centrifugés à basse vitesse 5 minutes à 5000 g, puis le surnageant est ultracentrifugé à 4 °C pendant 1 heure à 100000 g. Les culots sont repris dans 500 μl de tampon de lyse puis analysés (dosage des protéines totales et Western blot).

4.4. Immunoprécipitation

Préparation des billes : 50 μl de billes sont centrifugés pendant 2 minutes à 2000 g, puis rincées deux fois avec 500 μl d'eau. Les billes sont ensuite rincées deux fois par le tampon de lyse (10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 % glycérol, 100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH7.5) additionné de détergent. Les billes sont ensuite reprises dans 50 μl de tampon de lyse additionné de détergent.

Les billes sont ajoutées à 1 ml de surnageant de solubilisation, le tout est placé à 4 °C sous agitation pour la nuit. Le lendemain, cette suspension additionnée de billes est centrifugée pendant 2 minutes à 2000 g. A ce stade, les billes ont lié tout ce qui s'y lie de façon aspécifique dans le milieu.

Sur le surnageant on ajoute 2 μg d'anticorps 2D7, et on laisse incuber le tout sous agitation à 4 °C pendant 6 heures de façon à laisser se former les complexes entre le récepteur et l'anticorps. On ajoute ensuite les billes en tampon de lyse + détergent que l'on laisse toute la nuit sous agitation à 4 °C.

5. Caractérisation fonctionnelle du récepteur : liaison de ligands radiomarqués à l'équilibre

Les membranes sont incubées dans un tampon de binding (50 mM Hepes, 0.5 % BSA, 5 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 0.1 % NaN₃, pH7.4) en présence de radioligand (0.1 nM de [¹²⁵I] MIP-1β environ 25000 cpm) durant 30 minutes. La liaison non spécifique est déterminée dans les mêmes conditions en présence de 100 nM de l'antagoniste TAK779 froid ou de 30 nM de l'agoniste MIP-1β froid. Le milieu réactionnel est filtré dans un tampon de filtration (tampon de binding + 0.5 M NaCl) sur filtres GF/B (Millipore) préalablement saturés par 1 % de BSA pendant 4 heures. La radioactivité retenue sur les filtres est mesurée dans un compteur gamma (Packard) dans un cocktail de scintillation.

CHAPITRE 7

EXPRESSION DES RECEPTEURS CCR5 ET CXCR4 FUSIONNES A L'EGFP DANS LES CELLULES S2

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Introduction

Les résultats détaillés dans le chapitre 5 font état des différents problèmes que nous avons rencontrés au moment de l'expression du récepteur CCR5 dans la levure méthylotrophe *Hansenula polymorpha*. Devant ces problèmes « insolubles », nous devons trouver un nouveau système d'expression hétérologue plus approprié à l'expression des récepteurs de chimiokines CCR5 et CXCR4.

Comme cela a déjà été discuté, il n'existe pas de système idéal pour l'expression de RCPG. Néanmoins, les résultats encourageants obtenus au laboratoire avec le récepteur humain des opiacés de type mu (hMOR) exprimé dans les cellules d'insectes S2 nous ont conduits à tester ce système d'expression hétérologue pour l'expression des récepteurs CCR5 et CXCR4.

Nous avons également choisi de fusionner ces récepteurs à la protéine EGFP qui est un outil très puissant pour la détection, la quantification et la purification du récepteur, mais également pour la réalisation d'études pharmacologiques.

1.1. Les cellules S2 en tant que système d'expression hétérologue

Les cellules d'insectes constituent des organismes de choix pour la production de protéines hétérologues. En effet, ce sont des cellules issues d'organismes eucaryotes supérieurs capables d'effectuer de nombreuses modifications post-traductionnelles (glycosylation, acylation, phosphorylation) nécessaires à la stabilité et à la fonctionnalité des protéines surexprimées (Benting *et al.*, 2000). Par ailleurs, les cellules d'insectes sont facilement manipulables puisqu'elles sont semi-adhérentes, c'est-à-dire qu'elles ont la faculté de pousser soit en plaques, soit en suspension sous agitation, en bouteilles ou en bioréacteur, ce qui constitue un avantage majeur pour la production à grande échelle. Enfin, les cellules d'insectes se multiplient à température ambiante (de 23 à 27°C), et n'exigent pas d'équipements particuliers puisqu'elles se développent sans CO₂. Par ailleurs, il est possible de transfecter plusieurs lignées de cellules d'insectes par un

plasmide qui s'intègre de façon stable dans le génome de l'hôte, le gène d'intérêt étant cloné sous contrôle d'un promoteur inductible, permettant un taux d'expression élevé et bien contrôlé.

Les cellules d'insectes les plus fréquemment décrites dans la littérature sont les cellules *Sf9* infectées par un baculovirus recombinant. Néanmoins, ce système initialement utilisé au laboratoire pour produire le récepteur hMOR implique la réalisation régulière d'expériences d'infection des cellules par le virus, puisque les cellules ne survivent que trois à quatre jours après l'infection, et donc une production importante et continue de virus. Le récepteur hMOR a été exprimé de façon stable dans les cellules *Sf9* au laboratoire, à raison de 12000 récepteurs par cellule (Kempf *et al.*, 2002), ce qui est très nettement inférieur aux rendements obtenus lorsque le même récepteur est exprimé dans les cellules S2 (Perret *et al.*, 2003). Ces arguments nous ont donc conduits à tester les cellules S2 pour l'expression des récepteurs CCR5 et CXCR4.

Les cellules S2 dérivent de cultures primaires d'embryons de *Drosophila melanogaster* (Schneider, 1972). Elles présentent plusieurs avantages par rapport aux autres cellules d'insectes. Elles sont notamment capables d'atteindre des densités cellulaires 10 fois plus élevées que les cellules *Sf9* (de l'ordre de 30 millions de cellules par millilitre de culture sous agitation simple et jusqu'à 40 millions en bioréacteur), ce qui constitue un avantage dans le cadre d'une production à grande échelle (voir l'étude comparative de Bernard et collaborateurs (Bernard *et al.*, 1994). Par ailleurs, il existe plusieurs outils moléculaires bien caractérisés (promoteurs constitutifs ou inductibles, vecteurs d'expression), offrant différentes possibilités pour l'expression de protéines hétérologues.

La littérature donne quelques exemples de RCPG exprimés avec succès dans les cellules S2. Le système a initialement été utilisé en vue de la caractérisation pharmacologique des récepteurs aux neurotransmetteurs : récepteur du GABA, récepteur muscarinique de l'acétylcholine et récepteur dopaminergique D2 (Bernard *et al.*, 1994 ; Millar *et al.*, 1995 ; Buckingham *et al.*, 1996). Par ailleurs, le système avait déjà été décrit pour la production d'un RCPG en vue d'études structurales, le récepteur du glucagon, qui s'exprime d'ailleurs à un taux exceptionnel de 250 pmol/mg (Tota *et al.*, 1995).

Les résultats obtenus par ces différentes équipes montrent le potentiel de ce système d'expression qui possède plusieurs avantages des cellules mammifères, mais qui est applicable à moindre coût à une production à plus grande échelle. Les publications parues ces dernières années confirment que les cellules S2 constituent un système particulièrement bien adapté à l'expression des RCPG (Huang *et al.*, 2000 ; Torfs *et al.*, 2000 ; Cordova *et al.*, 2003 ; Perret *et al.*, 2003 ; Schetz *et al.*, 2003).

1.2. Choix de l'étiquette EGFP

1.2.1. Description de la protéine EGFP

La protéine fluorescente verte (GFP) de la méduse *Aequoria victoria* est une protéine autofluorescente qui émet une lumière verte à 507 nm lorsqu'elle est excitée dans l'ultraviolet (395 nm) ou le visible (475 nm). Sa fluorescence est due à l'existence au sein même de la protéine d'un fluorophore unique (p-hydroxybenzylidène imidazolinone) obtenu par autocyclisation des résidus Ser⁶⁵-Tyr⁶⁶-Gly⁶⁷. La structure cristallographique de la GFP a mis en évidence un repliement en tonneau β , composé de 11 brins β qui entourent une hélice α formant l'axe du cylindre, le chromophore se positionnant au centre du tonneau.

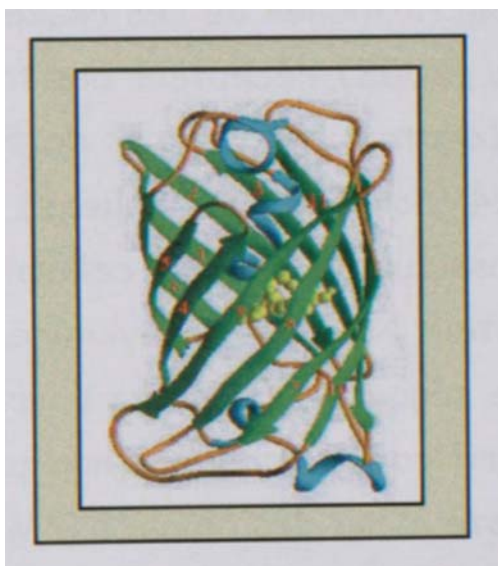


Figure 1 : Structure cristallographique de la GFP

Les brins β du tonneau sont représentés en vert (1 à 11). L'hélice α située au centre du tonneau est représentée en bleue. Le chromophore est représenté en jaune.

Parmi tous les variants de la GFP, l'EGFP (Enhanced GFP) est une GFP améliorée par mutagenèse dans le sens où son intensité de fluorescence est 35 fois supérieure à celle de la GFP sauvage. La mutation de la sérine 65 en thréonine modifie quelque peu les propriétés de fluorescence de la protéine, le pic d'excitation à 395 nm étant supprimé et le pic à 475 nm déplacé à 490 nm.

1.2.2. Applications à la biologie cellulaire

La GFP est particulièrement stable, soluble et maintient sa fluorescence en conditions dénaturantes et dans une large gamme de pH allant de 5.5 à 12, mais elle

résiste également au clivage par plusieurs protéases (Bokman et Ward, 1981). La GFP est un excellent marqueur pour l'étude de protéines sur cellules vivantes. La GFP est notamment utilisée pour suivre l'expression de certains gènes, en marquant la protéine d'intérêt pour suivre non seulement son expression, mais également sa compartimentalisation au sein de la cellule. Par exemple, la fusion de la GFP aux chaînes légères de la clathrine a permis de mettre en évidence le recrutement des molécules de clathrine à la membrane ainsi que son rôle dans les mécanismes d'endocytose (Gaidarov *et al.*, 1999). Malgré sa taille, ses caractéristiques font de la GFP un outil de choix pour suivre la production de protéines dans le cadre de la surexpression de protéines recombinantes pour des études structurales, la GFP étant alors utilisée comme un marqueur lors des étapes de détection, de quantification et de purification des protéines.

1.2.3. Utilisation de la GFP en fusion à des RCPG

L'EGFP est communément utilisée en fusion à des RCPGs au laboratoire, et ne semble pas perturber les propriétés fonctionnelles de ces récepteurs : récepteur muscarinique de l'acétylcholine M1 (Ilien *et al.*, 2003), récepteur des tachykinines NK2 (Vollmer *et al.*, 1999 ; Palanche *et al.*, 2001), récepteur des opiacés de type mu (Perret *et al.*, 2003) et récepteur de chimiokines CXCR4 (données non publiées). Dans tous les cas, la GFP peut être utilisée comme un outil classique de biologie cellulaire et a par exemple permis de suivre l'internalisation du récepteur NK2 des tachykinines (Vollmer *et al.*, 1999). La GFP a également été utilisée comme séquence étiquette pour détecter le récepteur mu des opiacés et pour faciliter sa purification (données non publiées). De plus, les premiers résultats obtenus avec le récepteur mu des opiacés (hMOR) fusionné à l'EGFP exprimé dans les cellules S2 ont permis de montrer que la protéine de fusion s'exprimait à des taux plus élevés que le récepteur seul (Perret *et al.*, 2003).

La GFP peut également être utilisée comme moyen alternatif à la radioactivité pour examiner la capacité de liaison d'un ligand sur son récepteur par la technologie de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer). Cette technique sera détaillée plus loin dans le texte. De façon simplifiée, le FRET consiste en un transfert d'énergie de fluorescence entre le récepteur fusionné à une protéine fluorescente (type GFP) du côté amino-terminal et un fluorophore greffé sur le ligand, sachant que les deux molécules fluorescentes doivent posséder certaines propriétés spectrales pour que le FRET puisse avoir lieu. La méthode est couramment utilisée au laboratoire, et s'avère être un outil pharmacologique extrêmement puissant pour déterminer le nombre total de récepteurs exprimés par cellule, pour mesurer les constantes d'affinité des ligands et ainsi vérifier la fonctionnalité du récepteur, pour réaliser des cinétiques de liaison de

ligands. Même si les techniques classiques de liaison de ligands à l'équilibre sont très bien maîtrisées dans le cas du récepteur hMOR, elles sont difficilement transposables sur le récepteur solubilisé par des détergents, dans la mesure où les méthodes classiques passent par une étape de filtration, et que le récepteur solubilisé est peu ou pas retenu sur les membranes de filtration.

Dans le cas des récepteurs de chimiokines, un autre problème tient au fait que les chimiokines ont tendance à se lier de façon très aspécifique, ce qui génère un très grand bruit de fond lors des expériences de liaisons de ligands à l'équilibre. De plus, les chimiokines radioactives n'existent que sous forme iodée, et sont excessivement onéreuses. D'où l'intérêt de mettre au point un test FRET.

En tenant compte de tous ces paramètres, nous avons décidé de fusionner les récepteurs CCR5 et CXCR4 à l'EGFP d'une part pour valider le système d'expression S2 en utilisant la GFP comme séquence étiquette pour suivre le récepteur lors des étapes d'expression, de solubilisation et de purification, et d'autre part pour suivre la fonctionnalité du récepteur au cours de toutes ces étapes.

Remarque : comme cela a déjà été mentionné dans le chapitre 5, on considèrera que le récepteur est fonctionnel lorsqu'il lie ses ligands, même si la définition n'est pas exacte d'un point de vue pharmacologique.

2. Résultats et discussion

2.1. Outils moléculaires

Parmi les différents promoteurs disponibles pour l'expression de protéines hétérologues dans les cellules S2, nous avons choisi d'utiliser le promoteur de la métallothionéine, inductible par le cuivre, qui permet une expression forte du gène d'intérêt dans les cellules S2.

L'ADNc codant pour CCR5 ou pour CXCR4 en fusion avec le gène de l'EGFP est cloné sous contrôle du promoteur pMT dans un vecteur dit d'expression pMT/BiP/V5-His, qui est un vecteur navette *E. coli*-S2 (voir chapitre 8).

Le vecteur d'expression contient également la séquence de sécrétion BiP, en amont de la cassette de clonage. La protéine de drosophile BiP code pour une protéine chaperone se liant aux immunoglobulines (Kirkpatrick *et al.*, 1995). La partie de la séquence utilisée comme peptide signal consiste en un peptide de 18 acides aminés. L'utilisation de cette séquence en tant que peptide signal est couramment décrite dans la littérature, et permet un adressage efficace des protéines exprimées vers la

membrane (Nilsen et Castellino, 1999 ; Perret *et al.*, 2003 ; Schamel *et al.*, 2003 ; Prosiase *et al.*, 2004).

Les lignées stables sont obtenues en co-transfectant le vecteur d'expression avec un vecteur dit de sélection qui confère aux cellules la résistance à l'hygromycine B (voir chapitre 8).

Dans un premier temps, nous avons donc réalisé les constructions incluant les ADNc de CCR5 et CXCR4 fusionnés à l'EGFP du côté amino-terminal. Au vu des différents résultats obtenus au laboratoire, nous avons choisi d'utiliser l'EGFP dite courte, c'est-à-dire tronquée de ses 35 derniers acides aminés. Cette version de l'EGFP conserve toutes ses propriétés de fluorescence et de transfert d'énergie, mais dans le cadre des études de FRET que nous envisageons, cette version de la protéine permet de rapprocher physiquement le donneur de fluorescence (c'est-à-dire l'EGFP fusionnée au récepteur) et l'accepteur (en l'occurrence le fluorophore greffé sur le ligand) et donc d'augmenter l'efficacité de FRET (Ilien *et al.*, 2003).

Par ailleurs, toujours pour les mêmes raisons, nous avons choisi d'utiliser un espaceur le plus court possible entre l'EGFP et CCR5, pour rapprocher physiquement l'EGFP de CCR5, mais cet espaceur a également été choisi de telle sorte qu'il ne contienne aucun acide aminé susceptible de perturber le transfert d'énergie, ou encore étant un site putatif de clivage par les protéases. Nous avons donc dessiné un espaceur de 5 acides aminés (AGVLI). Nous souhaitons par ailleurs mettre au point le test FRET entre CCR5 couplé à l'EGFP et un ligand rendu fluorescent. Dans la mesure où l'efficacité de transfert d'énergie est étroitement liée à la distance entre le donneur et l'accepteur (voir paragraphe sur le FRET), nous avons également réalisé des constructions dans lesquelles CCR5 était dépourvu de ses 15 premiers acides aminés, ce qui a pour effet de rapprocher physiquement l'EGFP des domaines intracellulaires. Nous souhaitons néanmoins conserver la première cystéine impliquée dans la formation d'un pont disulfure, et avons donc tronqué le récepteur juste avant ce résidu critique pour l'architecture du récepteur (voir chapitre 2).

Nous avons également réalisé ces constructions en rajoutant l'étiquette C9 en aval du récepteur. Cet épitope correspondant aux 9 acides aminés carboxy-terminaux de la rhodopsine bovine est reconnu par l'anticorps monoclonal 1D4 (produit par le NCCC, Etats-Unis).

Enfin, nous avons construit des vecteurs dépourvus de l'EGFP afin de mesurer l'effet de cette fusion sur le taux d'expression et sur les propriétés du récepteur.

Dans le cas de CXCR4, nous avons décidé de tester la construction utilisée dans le groupe de Jean-Luc Galzi qui avait déjà été optimisée pour le FRET, utilisant l'EGFP courte, avec un espaceur de 5 acides aminés (DIGSG). Nous avons également souhaité étudier l'effet de la séquence signal, et avons donc pour cela travaillé avec le peptide

signal utilisé pour l'adressage des protéines à la membrane plasmique en cellules HEK issu de la sous-unité $\alpha 7$ du récepteur nicotinique de poulet (31 acides aminés), qui permet un adressage efficace des récepteurs à la membrane plasmique (Vollmer *et al.*, 1999 ; Palanche *et al.*, 2001 ; Ilien *et al.*, 2003).

Le travail que je présenterai ici n'exposera que les résultats sur les constructions incluant l'EGFP. En effet, nos efforts se sont principalement concentrés sur l'étude des récepteurs en fusion à l'EGFP, dans la mesure où la mise au point du test FRET nous a semblé très importante pour la suite de nos études. Toutes les autres constructions ont été réalisées par différentes stratégies de PCR décrites dans le chapitre 8, contrôlées et transfectées de façon stable dans les cellules S2.

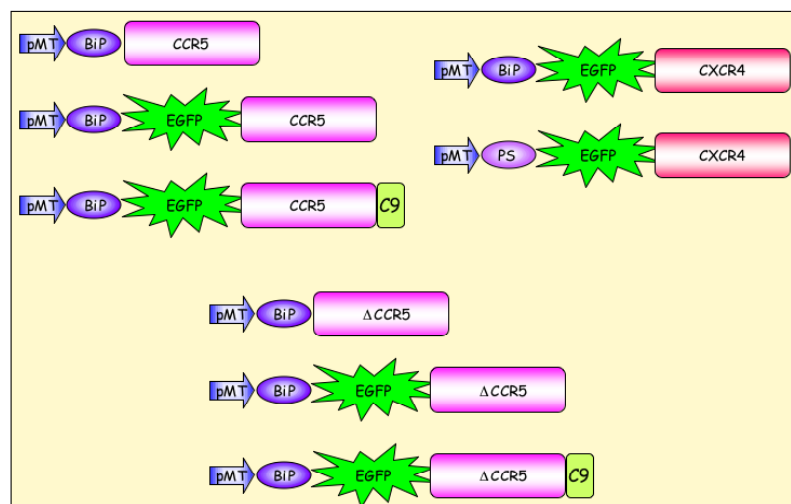


Figure 2 : Représentation schématique des protéines de fusion exprimées dans les cellules S2
 pMT est le promoteur de la méthallothionéine, inducible par la cuivre. BiP est une séquence signal issue de la protéine BiP de drosophile. PS est un peptide signal dérivé de la sous-unité $\alpha 7$ du récepteur nicotinique de poulet. EGFP représente la protéine fluorescente verte améliorée. CCR5 est le gène codant pour CCR5, Δ CCR5 est le gène codant pour CCR5 tronqué de ses 15 premiers acides aminés, CXCR4 est le gène codant pour CXCR4. C9 est l'étiquette C9, dérivée d'un épitope de la rhodopsine.

2.2. Quantification totale des récepteurs CCR5 et CXCR4 fusionnés à l'EGFP exprimés en cellules S2

Les lignées stables de cellules S2 exprimant les récepteurs CCR5 et CXCR4 en fusion à l'EGFP sont obtenues en co-transfectant les cellules par le vecteur d'expression pMT-BiP-Récepteur et le vecteur de sélection pCO-Hygro, qui confère la résistance à l'hygromycine B. Après établissement de lignées polyclonales stables sur la base de la résistance à l'hygromycine B, les cellules sont amplifiées, puis l'expression des gènes sous contrôle du promoteur de la méthallothionéine pMT est induite par addition d'une solution de sulfate de cuivre à 700 μ M, selon une période de temps allant de une nuit à 72 heures. L'induction est stoppée par un rinçage des cellules, qui sont alors comptées

en présence de bleu Trypan, afin d'évaluer d'une part la viabilité des cellules, mais aussi le nombre total de cellules en fin d'induction. L'expression du récepteur est mesurée soit par des méthodes de spectrofluorimétrie basée sur l'émission de fluorescence de la GFP, soit par des méthodes biochimiques visant à détecter le récepteur dans des expériences de Western blot.

2.2.1. Influence du temps d'induction

Les résultats obtenus au laboratoire avec le récepteur EGFP.hMOR montrent que la fluorescence totale augmente avec le temps d'induction. Nous avons donc étudié l'influence du temps d'induction sur le taux d'expression des récepteurs EGFP.CCR5 et EGFP.CXCR4.

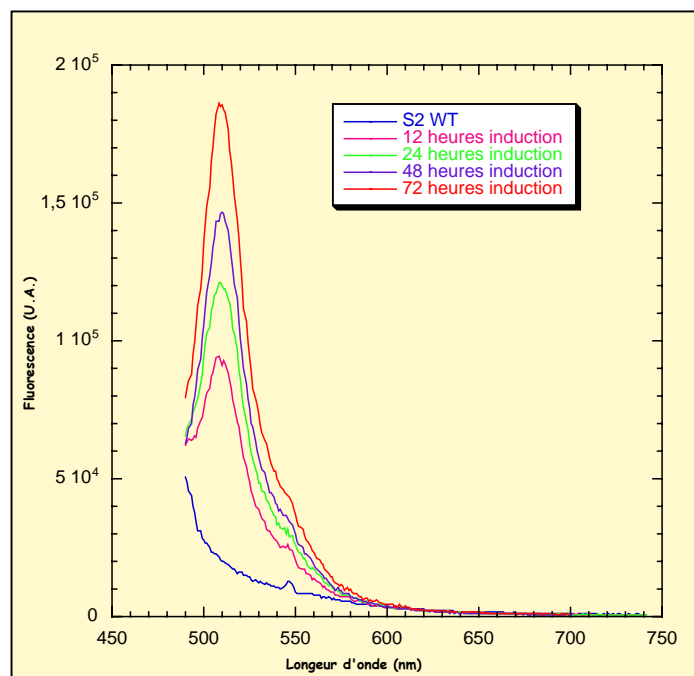


Figure 3 : Etude de l'influence du temps d'induction sur la fluorescence totale
Les mesures sont réalisées sur 10 millions de cellules S2 transfectées exprimant la fusion EGFP. Δ CCR5.
L'émission de fluorescence de l'EGFP est mesurée à 510 nm après excitation à 470 nm.
U.A. : Unité Arbitraire

La figure 3 montre des résultats obtenus pour des cellules exprimant la fusion EGFP. Δ CCR5, mais des résultats similaires sont observés avec les autres constructions. Comme l'illustre la figure 3, la fluorescence totale de l'EGFP augmente avec le temps d'induction. Au-delà de 72 heures d'induction, la mortalité des cellules évaluée par le comptage des cellules au bleu Trypan, augmente considérablement. Cette mortalité est sans doute liée soit à un effet toxique de la solution de sulfate de cuivre lorsque celle-ci est laissée trop longtemps au contact des cellules, soit à une trop forte densité

cellulaire. Par ailleurs, il semblerait qu'il soit préférable d'attendre 24 heures après la dilution pour induire les cellules. En effet, la dilution constitue un stress pour les cellules, tout comme l'addition de la solution de cuivre. Il semble donc logique de n'infliger qu'un stress à la fois aux cellules.

L'estimation du nombre total de récepteurs exprimés par cellule se fait en mesurant la fluorescence de l'EGFP en fusion au récepteur contre une gamme de GFP purifiée. La fluorescence totale rapportée à cette gamme étalon permet d'estimer grossièrement la quantité de récepteur produite à partir du système S2. On estime que la quantité totale de protéines est d'environ 400.000 récepteurs par cellule après 72 heures d'induction. Ces premiers résultats nous ont semblé très encourageants, puisque dans le cas du récepteur EGFP.hMOR, le taux d'expression moyen dans les cellules S2 se situe aux alentours de 200.000 récepteurs par cellule.

Nous avons souhaité vérifier si c'est bien le récepteur que nous détectons par mesure de fluorescence et non pas une forme clivée de l'EGFP. Nous avons pour cela réalisé une expérience de détection de la protéine par Western blot, en utilisant des anticorps primaires dirigés soit contre le récepteur, soit contre la GFP.

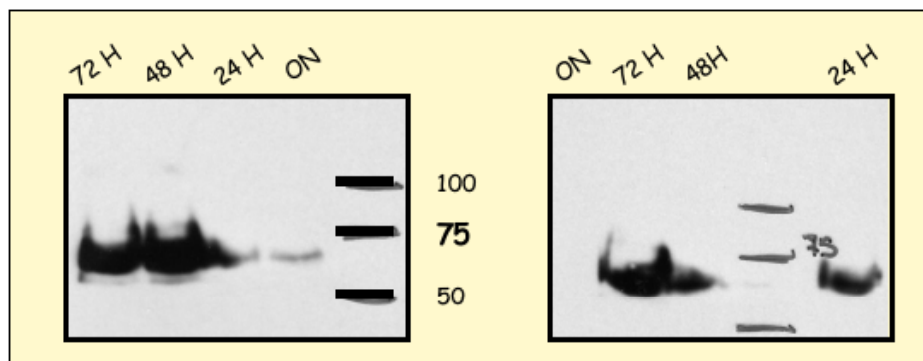


Figure 4 : Augmentation du taux d'expression du récepteur en fonction du temps d'induction

Le Western blot est réalisé sur une préparation de membranes totales réalisées à partir de $200 \cdot 10^6$ cellules exprimant le récepteur BiP.EGFP.CXCR4.

Le gel de droite est révéillé par un anticorps monoclonal de souris dirigé contre l'EGFP, le gel de gauche par un anticorps dirigé contre l'extrémité amino-terminale de CXCR4 (4G10).

ON : induction sur la nuit.

Ce Western blot montre que sur une préparation de membranes totales, pour une même quantité de protéines totales déposées, la quantité de récepteur détectée augmente quel que soit l'anticorps utilisé. De plus, dans les deux cas, la bande détectée correspond avec la taille attendue, ce qui indique que les mesures de fluorescence réalisées détectent bien la fusion EGFP-récepteur.

2.2.2. Influence des additifs ajoutés au milieu de culture

Les résultats obtenus au laboratoire ont permis de mettre en évidence que certains additifs ajoutés au milieu de culture permettaient d'augmenter très significativement le taux d'expression du récepteur fonctionnel, c'est-à-dire capable de lier ses ligands. Il a notamment été montré que l'addition de diméthylsulfoxyde (DMSO) au milieu de culture au moment de l'induction permettait d'améliorer la proportion de récepteurs actifs pour la plupart des récepteurs exprimés dans *Pichia pastoris*, sans modification du nombre total de récepteurs exprimés.

Dans la mesure où les outils pharmacologiques sont plus diversifiés pour les récepteurs des opiacés, la mise au point a été effectuée sur la fusion EGFP.hMOR. Même si des concentrations élevées en DMSO sont en général toxiques pour les cellules, plusieurs essais ont permis de montrer que l'addition de 4 % de DMSO dans les 12 dernières heures de l'induction, permettait d'augmenter d'un facteur huit le taux d'expression total du récepteur EGFP.hMOR, en augmentant d'une part la fluorescence totale de l'EGFP, mais également la proportion de récepteurs fonctionnels quantifiés par la liaison des agonistes opiacés.

Malheureusement, dans le cas de toutes nos constructions incluant les récepteurs de chimiokines, le DMSO n'a eu comme seule conséquence que d'augmenter considérablement la mortalité des cellules, sans améliorer significativement le taux d'expression des récepteurs.

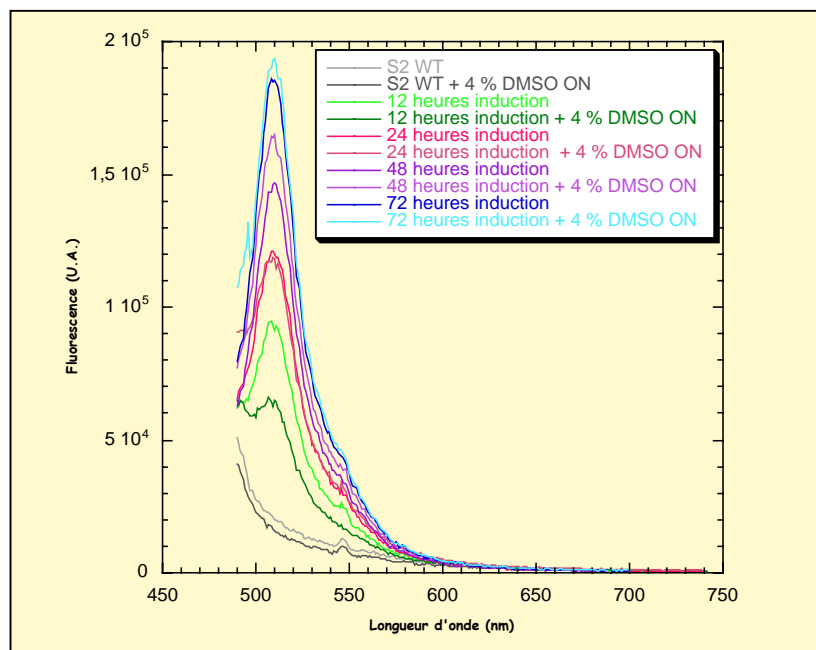


Figure 5 : Etude de l'influence du DMSO sur la fluorescence totale

Les mesures sont réalisées sur 10 millions de cellules S2 exprimant la fusion EGFP. Δ CCR5. L'émission de fluorescence de l'EGFP est mesurée à 510 nm après excitation à 470 nm.

Il semblerait que l'effet du DMSO soit extrêmement dépendant de la protéine considérée. En effet, les résultats obtenus dans le cadre du réseau MePNet montrent que la quantité de DMSO à ajouter au milieu de culture après induction est variable selon le récepteur considéré (données non publiées).

Mais ce qui est d'autant plus surprenant, est que l'effet du DMSO observé sur le récepteur EGFP.hMOR n'a pu être reproduit sur le récepteur EGFP. Δ hMOR, qui est tronqué au niveau de l'extrémité amino-terminale. Ce récepteur ainsi tronqué garde la capacité de lier ses ligands, mais l'addition de DMSO est sans effet sur le taux d'expression de ce récepteur et ne modifie pas la proportion de récepteurs actifs.

Dans le cas des récepteurs de chimiokines CCR5 et CXCR4, les premiers essais présentés ici ont été réalisés sur des cellules exprimant la fusion EGFP. Δ CCR5. Nous pensions que le DMSO pouvait augmenter le taux d'expression du récepteur en modifiant la fluidité de la membrane, et que peut-être le récepteur tronqué n'était pas le meilleur modèle d'étude. Des résultats similaires ont été obtenus sur les formes entières des récepteurs CCR5 et CXCR4. Dans le cas des récepteurs de chimiokines, la délétion de plusieurs résidus de l'extrémité amino-terminale n'est donc pas l'explication de ce phénomène. Il semblerait que la quantité de DMSO soit donc extrêmement dépendante de la protéine considérée, puisque dans un même système d'expression, les résultats obtenus pour le récepteur hMOR ne sont pas applicables pour les récepteurs de chimiokines.

2.3. Localisation cellulaire du récepteur

2.3.1. Microscopie sur cellules vivantes

Afin de déterminer la localisation cellulaire des récepteurs de chimiokines exprimés dans les cellules S2, nous avons débuté des expériences de microscopie sur cellules vivantes, dans la mesure où les premiers essais de fixation réalisés sur cellules S2 fixées exprimant le récepteur EGFP.hMOR laissaient supposer que la fixation perturbait la membrane plasmique (B. Perret, communication personnelle).

Les premiers essais ont été réalisés sur une aliquote de cellules prélevées directement dans le milieu de culture et placées simplement entre lame et lamelle.

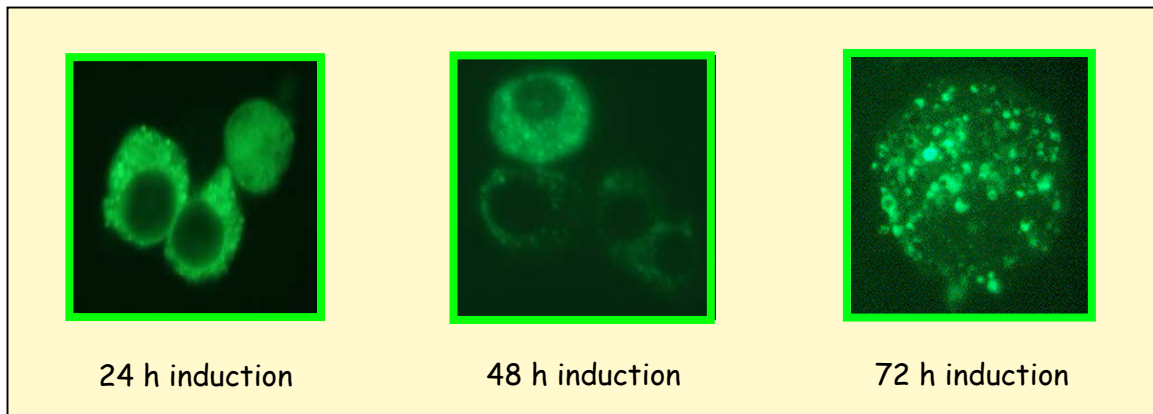


Figure 6 : Observation de cellules vivantes exprimant le récepteur EGFP.ΔCCR5

Les images sont obtenues à partir d'une aliquote de cellules prélevées directement dans le milieu de culture et placées entre lame et lamelle. Les cellules sont observées au microscope à épifluorescence, en suivant la fluorescence de l'EGFP.

On remarque qu'après 24 heures d'induction, on peut encore observer de la fluorescence tout autour de la cellule, même s'il y a déjà des spots fluorescents à l'intérieur de la cellule. Plus le temps d'induction augmente, plus le nombre de ces spots fluorescents intracellulaires augmente, et dans le même temps la fluorescence localisée à la membrane diminue.

On pourrait penser que ce phénomène est lié à la troncation de l'extrémité amino-terminale du récepteur, qui pourrait perturber son adressage à la membrane. Nous avons donc reproduit la même expérience sur des cellules exprimant les fusions EGFP.CCR5 et EGFP.CXCR4.

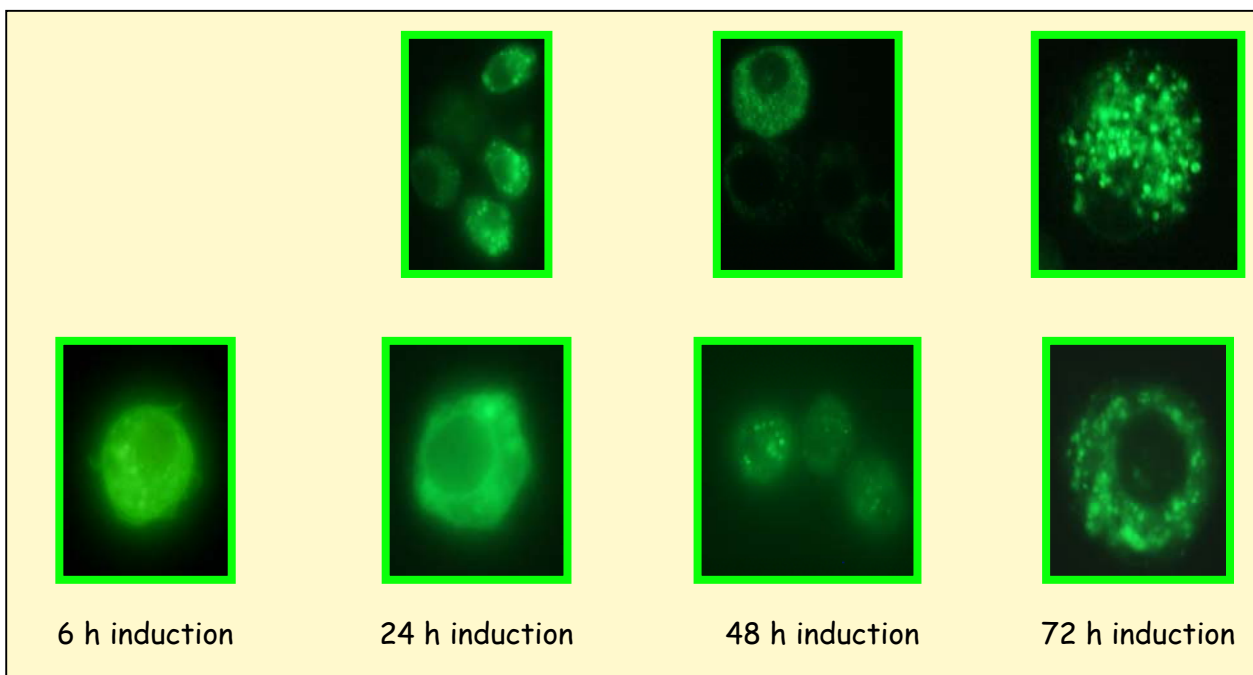


Figure 7 : Observation de cellules vivantes exprimant les récepteurs EGFP.CCR5 et EGFP.CXCR4

Les images sont obtenues à partir d'une aliquote de cellules prélevées directement dans le milieu de culture et placées entre lame et lamelle. Les cellules sont observées au microscope à épifluorescence, en suivant la fluorescence de l'EGFP. Haut : cellules exprimant EGFP.CCR5. Bas : cellules exprimant EGFP.CXCR4

Même dans le cas de cellules exprimant le récepteur dans sa forme entière, on peut faire exactement les mêmes observations. Plus le temps d'induction augmente, plus le nombre de spots fluorescents à l'intérieur de la cellule augmente et plus la fluorescence localisée à la membrane diminue.

Dans le cas de CXCR4, nous avons réalisé l'expérience après seulement 6 heures d'induction, et on observe déjà de la fluorescence à l'intérieur de la cellule.

2.3.2. Observation de cellules fixées

Nous avons souhaité renouveler l'expérience sur des cellules fixées, en modifiant les conditions de fixation initialement testées sur le récepteur EGFP.hMOR qui semblaient perturber la structure de la membrane des cellules. Nous avons testé différentes méthodes de fixation, en collaboration avec le Docteur Denis Dujardin (UMR7100, ESBS, Illkirch). Le méthanol semble perturber à la fois la membrane plasmique de la cellule qui a un aspect déformé, mais éteint également la fluorescence de l'EGFP. Le paraformaldéhyde est très autofluorescent, même après un traitement NH_4Cl . Ce sont finalement les deux méthodes de fixation faisant appel au glutaraldéhyde (glutaraldéhyde seul ou combiné au paraformaldéhyde) qui donnent les meilleurs résultats.

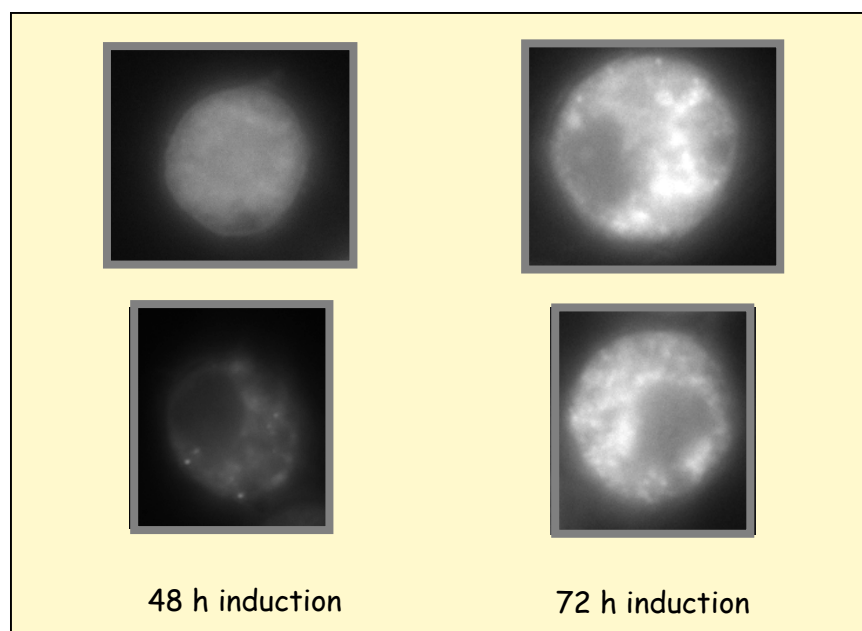


Figure 8 : Observation de cellules fixées exprimant le récepteur EGFP.CXCR4

Les images sont obtenues à partir de cellules fixées observées au microscope à épifluorescence, en suivant la fluorescence de l'EGFP.

Haut : cellules fixées au glutaraldéhyde

Bas : cellules fixées par un mélange glutaraldéhyde + paraformaldéhyde

Les résultats n'étant pas significativement meilleurs, et surtout vu le coût et la lourdeur de la technique, nous avons décidé de poursuivre en continuant à examiner les cellules vivantes directement entre lame et lamelle.

2.3.3. Etude de l'influence de la séquence signal

Nous avons également souhaité étudier l'effet de la séquence signal BiP par rapport à la séquence PS. En effet, la séquence BiP est issue de la protéine de drosophile BiP. La séquence d'adressage PS, classiquement utilisée dans le groupe de Jean-Luc Galzi, provient de la sous-unité $\alpha 7$ du récepteur nicotinique de poulet, et permet d'adresser le récepteur à la membrane plasmique dans les cellules HEK293.

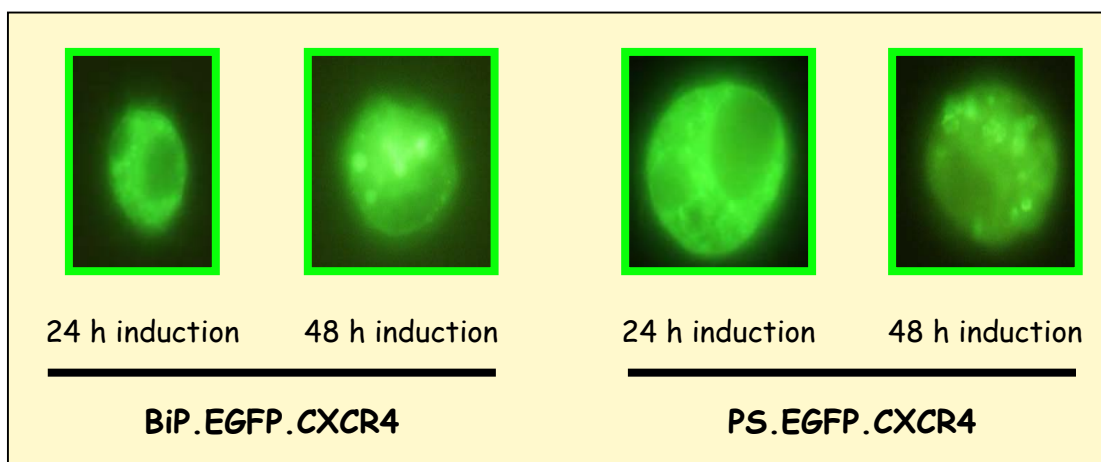


Figure 9 : Observation de cellules vivantes exprimant le récepteur EGFP.CXCR4
Les images sont obtenues à partir d'une aliquote de cellules prélevées directement dans le milieu de culture et placées entre lame et lamelle. Les cellules sont observées au microscope à épifluorescence, en suivant la fluorescence de l'EGFP.

On obtient le même type d'images, quelle que soit la séquence signal utilisée.

On sait que la fluorescence totale, et donc a priori le nombre total de récepteurs exprimés, augmente avec le temps d'induction. Le fait que le récepteur soit séquestré à l'intérieur de la cellule n'est pas lié à la séquence signal, ni à la troncation du récepteur. Or il a déjà déjà mentionné que le taux d'expression du récepteur était significativement plus élevé que celui du récepteur hMOR dans les mêmes conditions. Il semblerait donc que lorsqu'il est trop surexprimé, le récepteur soit séquestré à l'intérieur de la cellule. Deux questions se posent alors :

- Il faudrait déterminer le temps d'induction idéal auquel la fluorescence localisée à l'intérieur de la cellule est minoritaire par rapport à la fluorescence membranaire.

- Il faudrait déterminer la nature des compartiments intracellulaires dans lesquels est localisé le récepteur.

Pour répondre à ces deux questions, nous avons d'une part souhaité réaliser une cinétique sur cellules vivantes, afin de suivre l'évolution de la localisation de ces structures fluorescentes au cours du temps, en collaboration avec le Professeur Jan De Mey (UMR7100, Illkirch). D'autre part, pour étudier la répartition du récepteur entre les membranes légères et les membranes lourdes dans les cellules S2, nous avons entrepris des expériences de séparation des membranes cellulaires sur gradient discontinu de saccharose.

2.3.4. Analyse de la localisation cellulaire des récepteurs en fonction du temps d'induction par microscopie sur cellules vivantes

Le groupe de Jan De Mey réalise couramment des cinétiques sur cellules vivantes afin de suivre l'évolution du réseau de microtubules dans la cellule au cours de la mitose. Nous avons souhaité mettre à profit cette technique afin de visualiser la synthèse du récepteur sur cellules vivantes pour déterminer à quel moment ces structures intracellulaires commencent à apparaître au détriment d'une localisation à la membrane plasmique.

Le principe de l'expérience est relativement simple. Les cellules en culture non induites sont placées sous le microscope, et immédiatement après l'addition de la solution de sulfate de cuivre, on suit l'apparition de la fluorescence de l'EGFP par une excitation à 470 nm. L'appareillage permet de suivre soit une seule cellule, soit de rentrer les coordonnées de plusieurs cellules qui seront suivies à chaque excitation de la GFP. L'intervalle de temps entre chaque excitation peut être réglé selon une échelle de temps allant de la milliseconde à plusieurs minutes voire plusieurs heures.

Malheureusement, après quelques essais préliminaires, nous n'avons pu trouver les conditions satisfaisantes pour réaliser notre cinétique. Dans le premier essai, les intervalles de temps entre deux excitations étaient trop courts et le faisceau trop puissant, ce qui a rapidement abouti à une extinction de fluorescence de l'EGFP. Il semblerait par ailleurs que les cellules S2 ne supportent pas une irradiation trop fréquente. Enfin, nous avons été confrontés à un problème propre aux cellules qui tient à leur propriété de semi-adhérence. Le microscope est réglé au début de la cinétique, mais les cellules se décollent et commencent rapidement à se retrouver en suspension, induisant des problèmes de mise au point du microscope. Par ailleurs dès que la boîte est déplacée pour observer une autre cellule (les lignées étant polyclonales, les cellules ne se trouvent pas toutes à un même stade de développement), la boîte est soumise à une très légère agitation qui suffit à décoller les cellules. Nous sommes donc retournés à

des expériences de cinétiques plus classiques en prélevant une aliquote de cellules vivantes à différents temps d'induction, cette aliquote étant observée directement au microscope entre lame et lamelle. En fait, il semblerait que dès le début de l'induction, on voit apparaître des amas de fluorescence dans la cellule. Dans tous les cas, une induction au-delà de 24 heures tout au plus 48 heures semble favoriser largement l'apparition de structures intracellulaires au détriment des structures localisées à la membrane plasmique. Il serait néanmoins souhaitable de renouveler ces expériences de microscopie avec des marqueurs spécifiques de ces différents compartiments pour identifier précisément la localisation cellulaire du récepteur, en réalisant notamment des expériences de microscopie confocale.

Afin de déterminer la nature de ces structures intracellulaires, nous avons souhaité caractériser le type de membrane dans lesquelles se localisaient ces structures intracellulaires en séparant les membranes sur un gradient discontinu de saccharose.

2.3.5. Analyse de la localisation des récepteurs par flottaison des membranes sur un gradient discontinu de saccharose

2.3.5.1. Introduction

Les études de microscopie ont montré qu'une large proportion du récepteur semble être localisée dans des structures intracellulaires. De plus, les premiers résultats obtenus avec le récepteur EGFP.hMOR estimaient la quantité totale de récepteur à 900 $\mu\text{g/L}$ de culture selon la fluorescence de l'EGFP, mais à seulement 90 $\mu\text{g/L}$ de culture selon la liaison des ligands agonistes opiacés (Perret *et al.*, 2003). Les expériences de séparation de membranes sur gradient de saccharose ont permis de montrer que la majorité du récepteur EGFP.hMOR était localisée dans des membranes de densité élevée (correspondant sans doute aux membranes du réticulum endoplasmique), mais que toute l'activité mesurée par la liaison des ligands agonistes opiacés se trouvait dans les membranes de faible densité (membrane plasmique). Il semblerait donc qu'une importante partie du récepteur soit localisée dans des structures membranaires lourdes, et que le récepteur ainsi produit soit dans une conformation non fonctionnelle. Nous avons donc entrepris le même type d'expérience sur les cellules exprimant les récepteurs de chimiokines.

2.3.5.2. Principe

Les cellules lysées sont déposées au fond d'un tube à ultracentrifuger dans un tampon adapté de telle sorte que la concentration finale de saccharose soit de 1.5 M. Deux autres phases contenant du saccharose à 1.2 M puis 0.8 M sont ensuite déposées

au-dessus des cellules, de façon à établir un gradient non linéaire. Après ultracentrifugation, les membranes sédimentent aux interfaces du gradient selon leur composition lipidique. On peut ainsi séparer les membranes de faible densité (membrane plasmique et peut-être membrane de l'appareil de Golgi) des membranes de forte densité (membranes du réticulum endoplasmique).

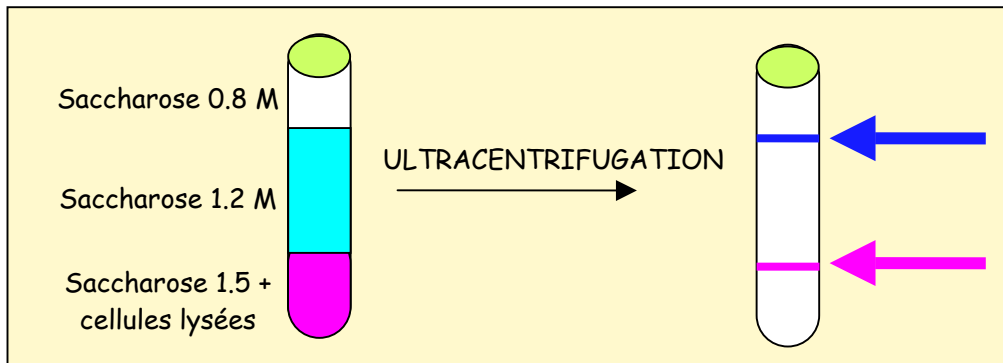


Figure 10 : Principe de la séparation de membranes par flottaison sur un gradient discontinu de saccharose

Les cellules lysées sont déposées dans le fond du tube dans un tampon contenant 1.5 M de saccharose. Après ultracentrifugation, la différence entre les concentrations de saccharose provoque des interfaces dans lesquelles sédimentent les membranes de faible densité (flèche bleue) et les membranes de forte densité (flèche rose).

Après ultracentrifugation, les membranes localisées aux interfaces des tampons sont visibles en suivant la fluorescence de l'EGFP. L'interface supérieure située entre les phases contenant 0.8 et 1.2 M de saccharose contient les membranes de faible densité qui pourraient correspondre aux membranes plasmiques, à celles des endosomes et à celles de l'appareil de Golgi. Les membranes de plus forte densité qui pourraient correspondre aux membranes du réticulum endoplasmique sédimentent au niveau de la phase inférieure située à l'interface des tampons à 1.2 et 1.5 M de saccharose.

2.3.5.3. Résultats

Après l'ultracentrifugation, les fractions de 500 μ l sont récoltées en commençant par la haut du tube. La fluorescence de l'EGFP est mesurée pour chaque fraction, la fraction 1 correspondant au haut du tube.

Comme le montrent les quatre graphiques présentés sur la figure 11, le profil obtenu est similaire, et ce quelle que soit la construction considérée. On retrouve toujours un pic de faible intensité aux alentours de la fraction 6, correspondant aux membranes de faible densité, un pic largement majoritaire aux alentours de la fraction 22, correspondant aux membranes de forte densité. Ce qui est par contre très surprenant est le fait que l'on retrouve une partie très importante de la fluorescence dans la

dernière fraction, qui correspond toujours au culot remis en suspension. Or, le récepteur inclus dans un contexte lipidique devrait flotter sur le gradient, et non pas se retrouver dans le culot. Il semblerait donc qu'une partie très importante du récepteur ne soit pas dans un contexte lipidique qui reste à identifier. On peut aussi émettre l'hypothèse que le récepteur qui sédimente au niveau du culot est localisé dans des fractions membranaires fortement enrichies en protéines contaminantes, ce qui empêche ces fractions de flotter.

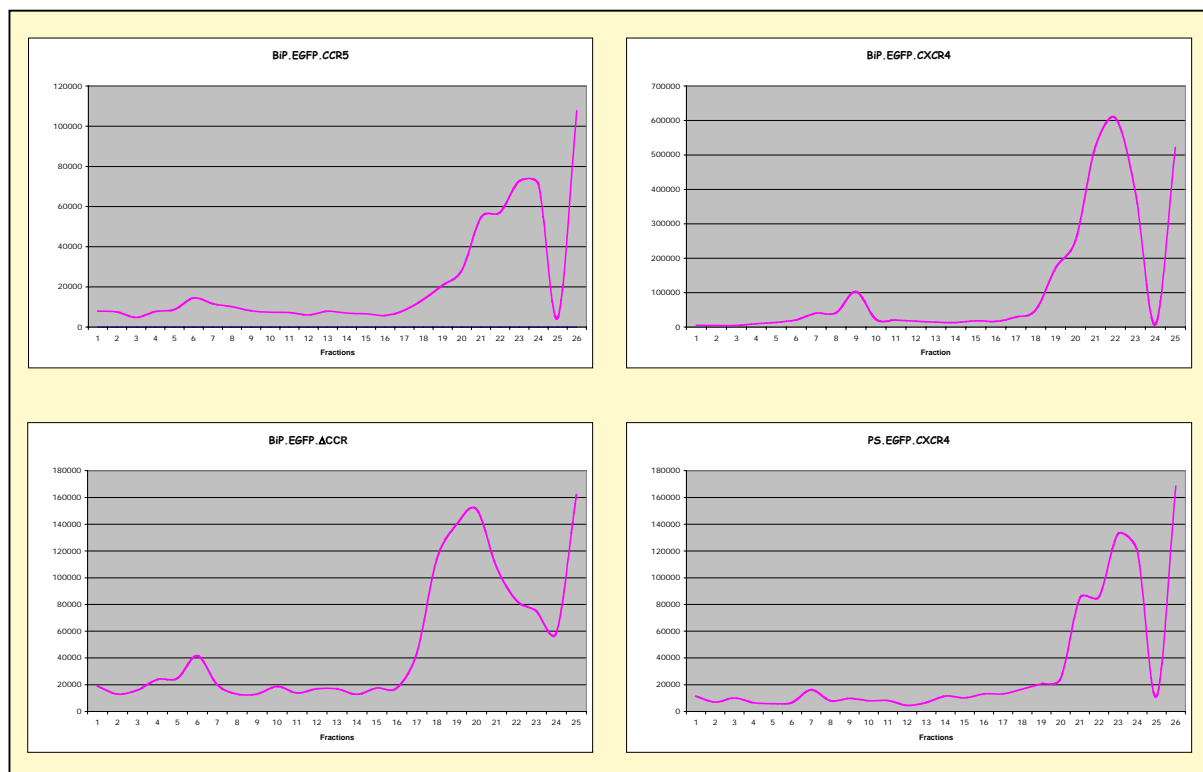


Figure 11 : Mesure de la fluorescence de chaque fraction issue de la préparation de membranes par flottaison sur gradient discontinu de saccharose

Cette expérience est réalisée sur des cellules lysées 24 heures après le début de l'induction. La mesure de la fluorescence de chaque fraction est effectuée sur la fraction de 500 μ l, en suivant l'émission de fluorescence de l'EGFP après excitation à 470 nm. La fraction 1 correspond au haut du tube, les fractions 25 ou 26 correspondent au culot.

Les études réalisées au laboratoire avec le récepteur EGFP.hMOR montrent des résultats similaires. Le pic de fluorescence de faible intensité correspondant aux membranes de faible densité est très largement minoritaire, mais le récepteur lie les ligands opiacés. Le pic correspondant aux membranes de forte densité est très majoritaire, et le récepteur ne lie pas les ligands, et semble se présenter sous forme agrégée ou oligomérique.

Il semblerait donc que, quel que soit le RCPG étudié (CCR5, CXCR4 ou hMOR), la plus grande partie du récepteur ne soit pas insérée dans les membranes de faible densité qui pourraient correspondre aux membranes plasmiques et golgiennes, ce qui reste à confirmer à l'aide de marqueurs spécifiques de ces différents compartiments cellulaires. De plus, comme le montrent les quatre graphiques présentés ici, les membranes ne sédimentent pas toujours au niveau de la même fraction, et il faudrait sans doute modifier la composition du gradient afin d'obtenir une meilleure séparation des membranes, en testant soit un gradient continu de saccharose, soit en rajoutant des couches de densité intermédiaires, soit en testant un chargement par le haut et non par le bas du gradient. Il faudrait mener des expériences complémentaires pour savoir si le récepteur produit dans ces membranes de forte densité est utilisable pour les études structurales que nous envisageons. Le choix du système S2 pour produire les récepteurs CCR5 et CXCR4 avait initialement été guidé par les résultats obtenus avec le récepteur hMOR, dont on savait qu'une partie du récepteur était produite sous forme fonctionnelle, au sens pharmacologique de terme, c'est-à-dire capable de lier ses ligands, mais aussi d'induire des réponses cellulaires (Perret *et al.*, 2003). Néanmoins, peut-être que le récepteur produit dans ces compartiments cellulaires peut être solubilisé, et que sa capacité à lier ses ligands pourrait être retrouvée après solubilisation.

2.4. FRET

2.4.1. Introduction

Les différentes études menées au laboratoire dans le groupe de Jean-Luc Galzi ont permis de montrer que le FRET était un outil pharmacologique extrêmement puissant, présentant de nombreux avantages par rapport aux méthodes classiques faisant appel aux ligands radioactifs. En effet, le FRET permet d'obtenir des données pharmacologiques au même titre que les mesures classiques de liaison de ligands radioactifs à l'équilibre, et donne des informations quant à la quantité de récepteurs produits, mais aussi de mesurer la fonctionnalité des récepteurs exprimés.

Dans le cadre d'expériences classiques de pharmacologie sur les récepteurs de chimiokines, le FRET est plus approprié pour la caractérisation fonctionnelle des récepteurs exprimés en cellules S2, pour des raisons économiques au vu du coût des chimiokines radioactives, mais également pour des raisons pratiques dans la mesure où les chimiokines ont tendance à se lier de façon très aspécifique, ce qui génère un énorme bruit de fond.

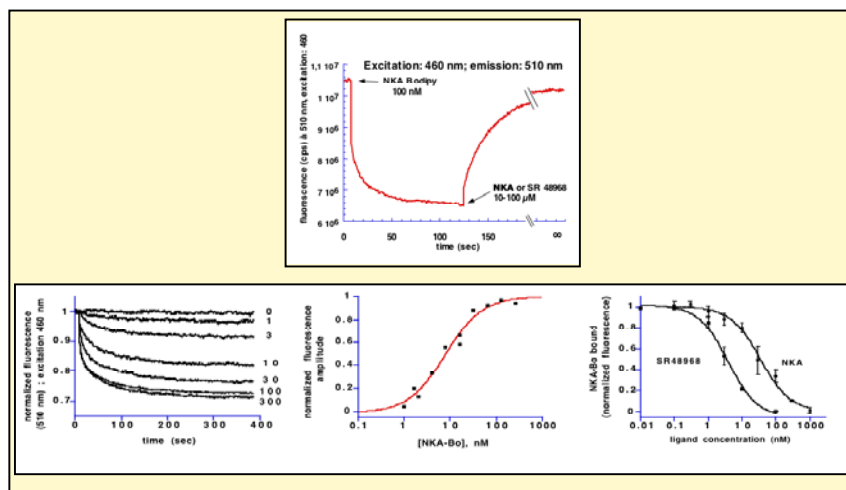


Figure 12 : Illustration de l'utilisation du FRET comme outil pharmacologique

Le FRET peut être utilisé au même titre que la radioactivité pour les mesures de liaison de ligands à l'équilibre, dans des expériences de saturation et de compétition.

(Extrait de Vollmer *et al.*, 1999)

Par ailleurs, dans le cadre des études structurales envisagées, ce test FRET est bien plus approprié que les tests classiques pour vérifier la fonctionnalité du récepteur solubilisé en détergents. En effet, les méthodes classiques de liaison de ligands à l'équilibre passent par une étape de filtration qui est souvent très mal adaptée au récepteur solubilisé. Le test FRET devrait permettre de déterminer les conditions nécessaires au maintien de l'activité du récepteur au cours des processus de solubilisation et de purification des récepteurs.

Pour toutes ces raisons, il nous a semblé indispensable de développer le test FRET sur les récepteurs CCR5 et CXCR4 exprimés dans le système S2, avant même de débiter les études structurales.

2.4.2. Principe

Le principe du transfert d'énergie de fluorescence met en jeu deux molécules fluorescentes, un donneur et un accepteur, qui doivent être physiquement proches l'un de l'autre. Ce phénomène est le résultat d'une interaction dipôle-dipôle entre ces deux partenaires et ne peut avoir lieu qu'à condition que le spectre d'émission du donneur recouvre le spectre d'absorption de l'accepteur.

Le FRET dépend :

- De la distance entre les fluorophores, l'efficacité de FRET étant décrite par l'équation $E = R_0^6 / (R_0^6 + r^6)$, où R_0 est la distance à laquelle la moitié de l'énergie est transférée du donneur à l'accepteur (cette valeur étant fixe pour un couple donneur-accepteur) et où r est la distance qui sépare physiquement le donneur de l'accepteur.

Pour une efficacité maximale, la distance entre les deux fluorophores doit être très petite, puisque l'efficacité du transfert d'énergie est inversement proportionnelle à cette distance à la puissance 6.

- Du rendement quantique du donneur EGFP ($Q = 0.66$)
- Du coefficient d'absorption de l'accepteur
- De l'orientation relative des deux fluorophores

La technologie FRET est particulièrement bien adaptée à l'étude des RCPG selon une méthode mise au point par Jean-Luc Galzi (Galzi et Alix, 1997 ; Vollmer *et al.*, 1999 ; Weill *et al.*, 1999a ; Weill *et al.*, 1999b ; Ilien *et al.*, 2003). L'EGFP est fusionnée à l'extrémité amino-terminale du récepteur et constitue le donneur d'énergie de fluorescence. Le ligand du récepteur est couplé à un fluorophore dont les propriétés spectrales sont en accord avec le FRET. Après excitation à 470 nm, l'EGFP transmet une partie de son énergie de fluorescence à 510 nm. Si la distance entre l'EGFP et le fluorophore couplé au ligand est compatible avec le FRET, et si les spectres de fluorescence du fluorophore et de l'EGFP sont compatibles avec celui de l'EGFP.

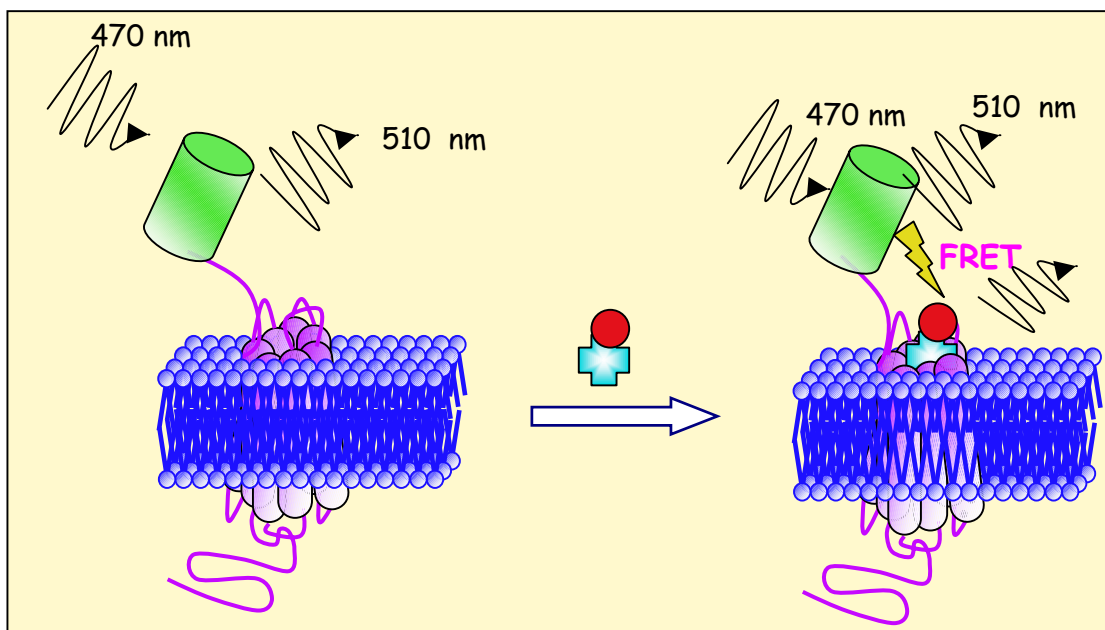


Figure 13 : Principe du FRET

Lorsque la GFP (en vert) est excitée à 470 nm, elle émet de la lumière à 510 nm. Lorsque le ligand couplé à un fluorophore se lie au récepteur couplé à la GFP, la lumière à 510 nm émise par la GFP va exciter le fluorophore couplé au ligand.

Le FRET peut être détecté soit en mesurant l'augmentation de l'intensité de la fluorescence émise par le donneur, ou la diminution de l'intensité de fluorescence de l'accepteur. Pour des raisons techniques, c'est la diminution de fluorescence du donneur qui est mesurée. En effet, il est possible d'exciter directement l'accepteur lorsqu'on excite l'EGFP à 470 nm. Le ligand fluorescent libre étant en large excès par rapport au

ligand lié au récepteur, même si l'excitation directe est très faible, elle peut générer du bruit de fond. Alors qu'en mesurant la diminution de fluorescence de l'EGFP, on ne mesure que l'énergie qui est transférée lors du transfert d'énergie.

2.4.3. Résultats obtenus avec le récepteur CXCR4

Le test FRET était déjà au point au laboratoire sur des cellules HEK293 transfectées de façon stable par le récepteur CXCR4 fusionné à l'EGFP courte, en utilisant du SDF-1 marqué au Texas Red sur la lysine carboxy-terminale (synthétisé par Françoise Balleux, Institut Pasteur). Nous disposons de lignées de cellules S2 stables exprimant exactement les mêmes constructions fusionnées soit à la séquence BiP de *Drosophile*, soit au même peptide signal issu de la sous-unité $\alpha 7$ du récepteur nicotinique de poulet, utilisé dans les cellules HEK (PS). Nous avons dans un premier temps utilisé exactement le même protocole que celui mis au point sur cellules HEK et avons travaillé sur cellules entières.

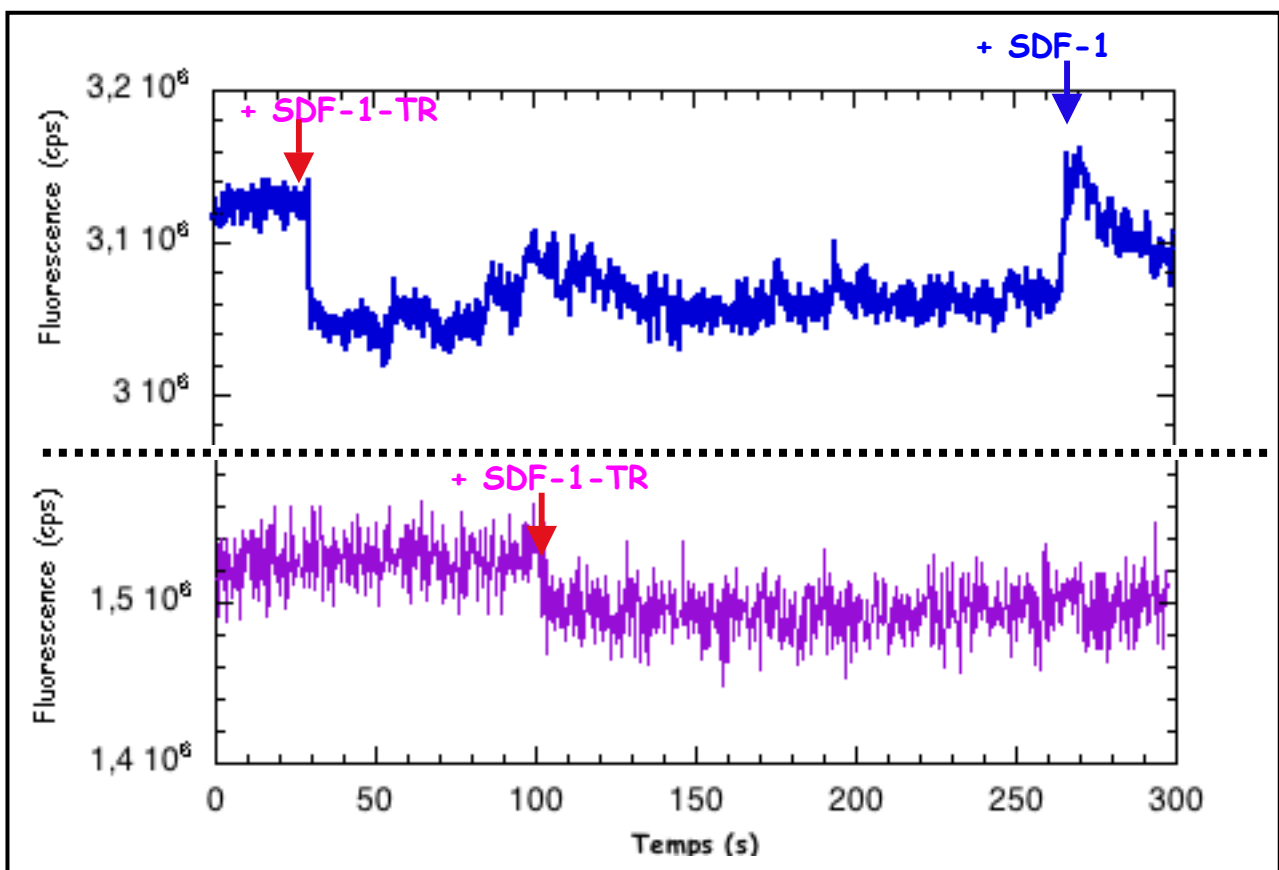


Figure 14 : Détection de l'interaction entre les récepteurs EGFP.CXCR4 et SDF-1-TR par FRET sur cellules entières

Chaque expérience est réalisée sur 10 millions de cellules S2 exprimant le récepteur EGFP.CXCR4 en fusion avec soit la séquence BiP de *drosophile* (en haut, bleu) soit le PS (en bas, violet).

La flèche rouge représente le moment où est ajouté le ligand fluorescent (100 nM de SDF-1-TR). Sur le graphe du haut, le SDF-1 fluorescent est chassé par du SDF-1 froid.

Il s'agit ici d'expériences très préliminaires, les résultats sont encourageants, mais de nombreuses mises au point sont nécessaires pour améliorer la détection du signal de FRET. Quelle que soit la séquence signal utilisée on observe un très faible transfert d'énergie, comme le montre la très faible diminution de la fluorescence de l'EGFP. Néanmoins, cette diminution de fluorescence peut être réversée par addition de SDF-1 froid, ce qui est une preuve qu'il y a bien du transfert d'énergie entre le ligand fluorescent et le récepteur couplé à l'EGFP.

Plusieurs hypothèses pourraient expliquer un si faible transfert d'énergie :

- Peut-être que la proportion de récepteurs fonctionnels (c'est-à-dire liant les ligands) exprimés à la surface des cellules est très faible.
- Peut-être que l'importante quantité de fluorescence à l'intérieur de la cellule constitue un important bruit de fond qui masque le transfert d'énergie (voir résultats de microscopie).

Néanmoins, la même expérience réalisée dans les mêmes conditions sur des préparations de membranes totales n'a pas permis de mettre en évidence de transfert d'énergie qui est pourtant observé sur cellules entières. Il semblerait néanmoins que la méthode de préparation de membranes totales soit largement perfectible, dans la mesure où les rendements sont très faibles.

De la même façon, nous n'avons pu détecter aucun transfert d'énergie sur des membranes légères préparées par flottaison sur un gradient discontinu de saccharose. Dans la mesure où du FRET est détecté sur cellules entières, il semblerait que le problème vienne des différentes méthodes de préparation de membrane, qui doivent être largement optimisées.

2.4.4. Résultats de FRET sur CCR5

Le transfert d'énergie sur le récepteur CCR5 fusionné à l'EGFP n'a pas pu être mis au point au laboratoire. Les premières expériences ont été réalisées au laboratoire par le Docteur Jean-Yves Vollmer (données non publiées). Deux ligands fluorescents ont été testés : d'une part un dérivé fluorescent de RANTES, marqué à la fluorescéine au niveau de l'acide glutamique carboxy-terminal (synthétisé par Claudio Vita, CEA, Orsay), d'autre part un dérivé fluorescent de MIP-1 α , marqué à la fluorescéine sur une thréonine substituant l'alanine amino-terminale de MIP-1 α (synthétisé au laboratoire). Ces ligands évoquent des réponses calciques en réponse à la liaison sur ECFP.CCR5 exprimés en cellules HEK293. La faible efficacité du FRET, et le manque de reproductibilité de l'expérience nous ont conduits à tester un autre ligand fluorescent.

Nous avons donc testé un nouveau ligand dérivé de MIP-1 β , couplé au Texas-Red en position amino-terminale (synthétisé par Françoise Balleux, Institut Pasteur, Paris). Malheureusement, quelle que soit la construction testée, récepteur CCR5 entier ou tronqué de ses 15 premiers acides aminés, nous n'avons pas pu détecter de FRET entre ce ligand et le récepteur CCR5.

Dans le cas du récepteur CCR5 tronqué de ses 15 premiers acides aminés, il se pourrait que la délétion de certains résidus de l'extrémité amino-terminale, notamment les tyrosines sulfatées soit à l'origine du problème (Farzan *et al.*, 1999). Néanmoins, il n'y a pas non plus de FRET sur les cellules exprimant le récepteur entier. Au vu des résultats de microscopie, il semblerait qu'une importante partie du récepteur soit séquestrée à l'intérieur de la cellule. Mais c'est également le cas pour CXCR4, et pourtant il est possible de mettre en évidence du FRET sur des cellules exprimant CXCR4. Il se pourrait que le problème vienne du ligand fluorescent : peut-être que la position du fluorophore sur la chimiokine n'est pas compatible avec le FRET. Comme cela a déjà été mentionné plus haut, l'efficacité de FRET décroît très rapidement lorsque la distance entre les fluorophores augmente. Pourtant d'après le modèle décrit par Blanpain et collaborateurs (Blanpain *et al.*, 2003), il semblerait que la portion amino-terminale de la chimiokine vienne s'enfouir dans la poche du récepteur formée par les domaines transmembranaires. Dans le cas de SDF-1, la chimiokine est modifiée au niveau de son extrémité carboxy-terminale, peut-être que cette modification de RANTES ou de MIP-1 permettrait de détecter du FRET sur CCR5.

Au vu des problèmes rencontrés pour les préparations de membrane, le résultat n'a pas été amélioré avec des préparations de membrane exprimant CCR5, sous forme entière ou tronquée.

2.5. Essai d'optimisation de l'expression des récepteurs CCR5 et CXCR4 fusionnés à l'EGFP dans les cellules S2

Les lignées stables exprimant les récepteurs CCR5 et CXCR4 fusionnés à l'EGFP sont des lignées polyclonales. Les études de microscopie nous ont montré que le taux d'expression des récepteurs était très variable selon la cellule considérée. Dans la mesure où les cellules S2 ont besoin d'une densité cellulaire minimale pour se développer, les méthodes classiques d'isolation clonale ne sont pas applicables aux cellules S2 (il est impossible de cultiver les cellules S2 en dessous d'une densité de 50.000 à 100.000 cellules/ml). Nous avons donc décidé de trier les cellules exprimant les récepteurs membranaires afin d'obtenir une population plus homogène.

2.5.1. Enrichissement des lignées polyclonales exprimant les récepteurs CCR5 et CXCR4 fusionnés à l'EGFP par tri sur billes immunomagnétiques

Dans la mesure où le tri par FACS des cellules S2 exprimant le récepteur EGFP.hMOR a posé de nombreux problèmes, liés notamment à la contamination des cellules, nous avons décidé de trier les cellules sur la base de l'expression membranaire des récepteurs fusionnés à l'EGFP. Cette technique devrait permettre d'enrichir la population en cellules exprimant le récepteur à la surface cellulaire. Cette méthode présente l'avantage par rapport au tri par cytométrie en flux (FACS) de ne retenir que les cellules exprimant le récepteur à la membrane plasmique.

Le principe du tri sur billes immunomagnétiques repose sur un marquage de la sous-population à isoler par un anticorps spécifique, dirigé ici contre l'EGFP, cet anticorps étant reconnu par un anticorps secondaire couplé à une bille magnétique (Miltenyi *et al.*, 1990). Les cellules reconnues par l'anticorps sont retenues sur une colonne aimantée alors que les cellules non marquées sont éluées.

2.5.2. Influence du tri sur billes sur le taux d'expression du récepteur

Pour être triées sur billes immunomagnétiques, les cellules doivent exprimer le récepteur en fusion à l'EGFP. Il faut donc induire les cellules. Nous avons choisi de tester deux temps d'induction différents avant d'effectuer le tri, soit 5 heures soit 24 heures après l'induction. Après le tri, les cellules sont récoltées en plaque 12 puits, puis amplifiées, et induites une nouvelle fois pour évaluer l'efficacité du tri

Comme le montre la figure 15, le tri est plus efficace lorsqu'il est effectué après 24 heures d'induction. Si on compare la fluorescence totale émise par 10 millions de cellules avant le tri et après le tri, on voit que cette méthode permet d'améliorer d'un facteur 2 la fluorescence totale, et ce quelle que soit la construction considérée.

Cette méthode de tri ne prend normalement en compte que la fluorescence liée à l'expression de surface de l'EGFP. Les cellules ne possédant pas de GFP à la membrane ne devraient donc pas être retenues par les billes.

Donc en toute logique cette technique devrait permettre d'enrichir la population en cellules exprimant les récepteurs membranaires, à condition de trouver le temps d'induction idéal.

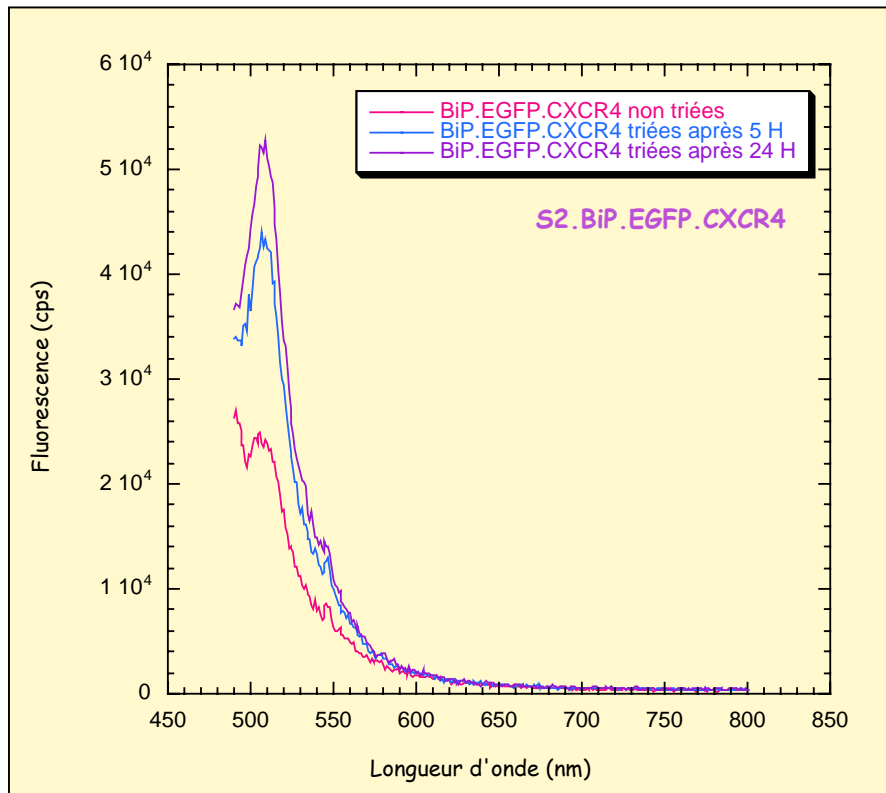


Figure 15 : Etude de l'influence du tri sur billes immunomagnétiques sur le taux d'expression. Cette expérience est réalisée sur 10 millions de cellules exprimant la fusion BiP.EGFP.CXCR4. Les cellules ont été triées soit 24 heures soit 5 heures après le début de l'induction, puis amplifiées jusqu'à confluence, et induites pendant 24 heures. L'EGFP est excitée à 470 nm.

2.5.3. Influence du tri sur billes immunomagnétiques sur la localisation cellulaire du récepteur

Contrairement au tri cellulaire utilisant un cytomètre en flux, le tri sur billes immunomagnétiques ne devrait retenir que les cellules exprimant les récepteurs à la surface, les cellules étant reconnues par un anticorps dirigé contre l'EGFP, les cellules n'exprimant pas le récepteur à la membrane ne devraient pas être retenues lors du tri. Nous avons vérifié si le tri sur billes immunomagnétiques avait une influence sur la localisation cellulaire du récepteur par des expériences de microscopie.

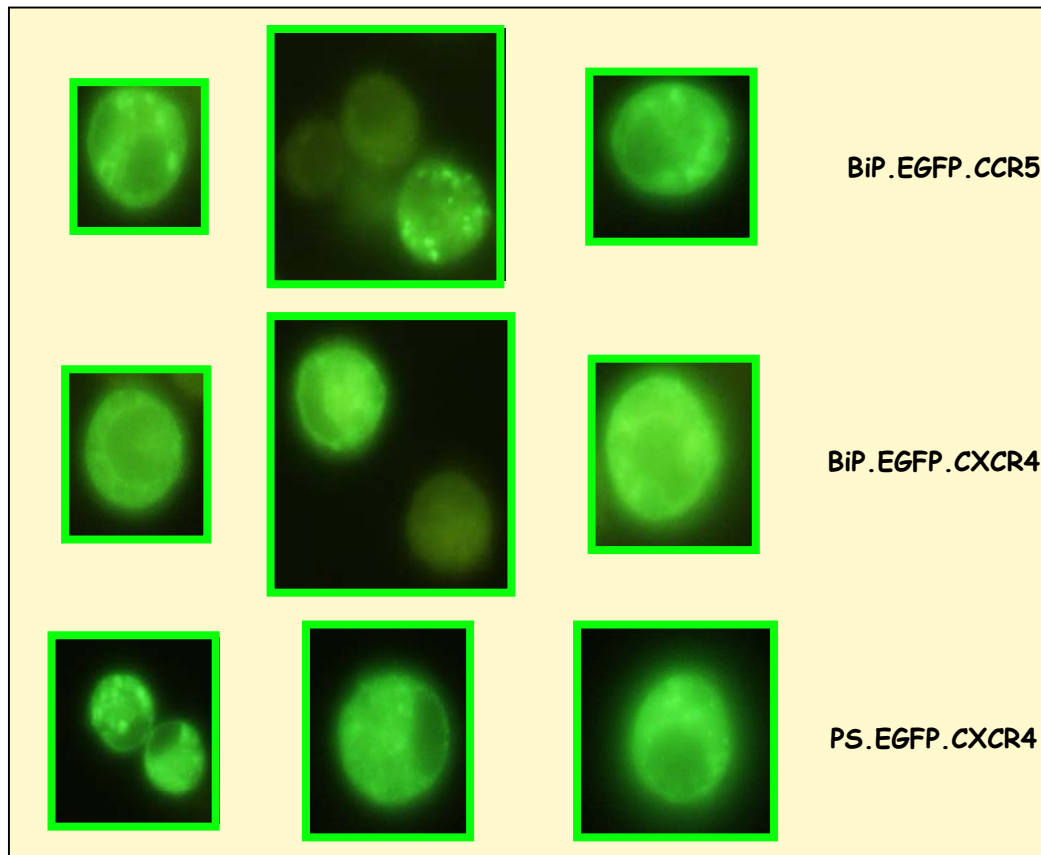


Figure 16 : Observation de cellules vivantes exprimant les récepteur EGFP.CXCR4 et EGFP.CCR5 après tri cellulaire sur billes immunomagnétiques

Les images sont obtenues à partir d'une aliquote de cellules triées, induites 24 heures prélevées directement dans le milieu de culture et placées entre lame et lamelle. Les cellules sont observées au microscope à épifluorescence, en suivant la fluorescence de l'EGFP.

A peu de choses près, on observe les mêmes profils que pour des cellules non triées. La microscopie en épifluorescence ne semble pas être un outil suffisamment puissant pour vérifier une localisation correcte du récepteur. Il faudrait pour être plus précis observer les cellules en utilisant un marquage indirect à l'aide d'un anticorps couplé à un fluorophore non vert. Des expériences préliminaires de ce type ont été réalisées en microscopie confocale sur des cellules S2 vivantes exprimant le récepteur EGFP.hMOR, incubées en présence d'un anticorps dirigé contre l'EGFP et d'un anticorps secondaire dirigé contre les immunoglobulines de souris couplé à la rhodamine. Ces expériences ont permis de montrer que le récepteur EGFP.hMOR était bien situé à la membrane plasmique, mais qu'une importante partie du récepteur était séquestrée à l'intérieur de la cellule.

Les mêmes expériences devraient être réalisées sur les cellules S2 exprimant les récepteurs CCR5 et CXCR4 afin de confirmer une localisation membranaire du récepteur. En effet, il semblerait que la fluorescence intracellulaire soit d'une telle intensité qu'elle masque la fluorescence à la membrane plasmique.

2.5.4. Influence du tri sur billes immunomagnétiques sur le FRET

Nous avons renouvelé nos expériences de FRET sur des cellules triées sur billes immunomagnétiques afin de voir si ce tri pouvait permettre d'augmenter le signal de FRET très faible observé sur cellules non triées.

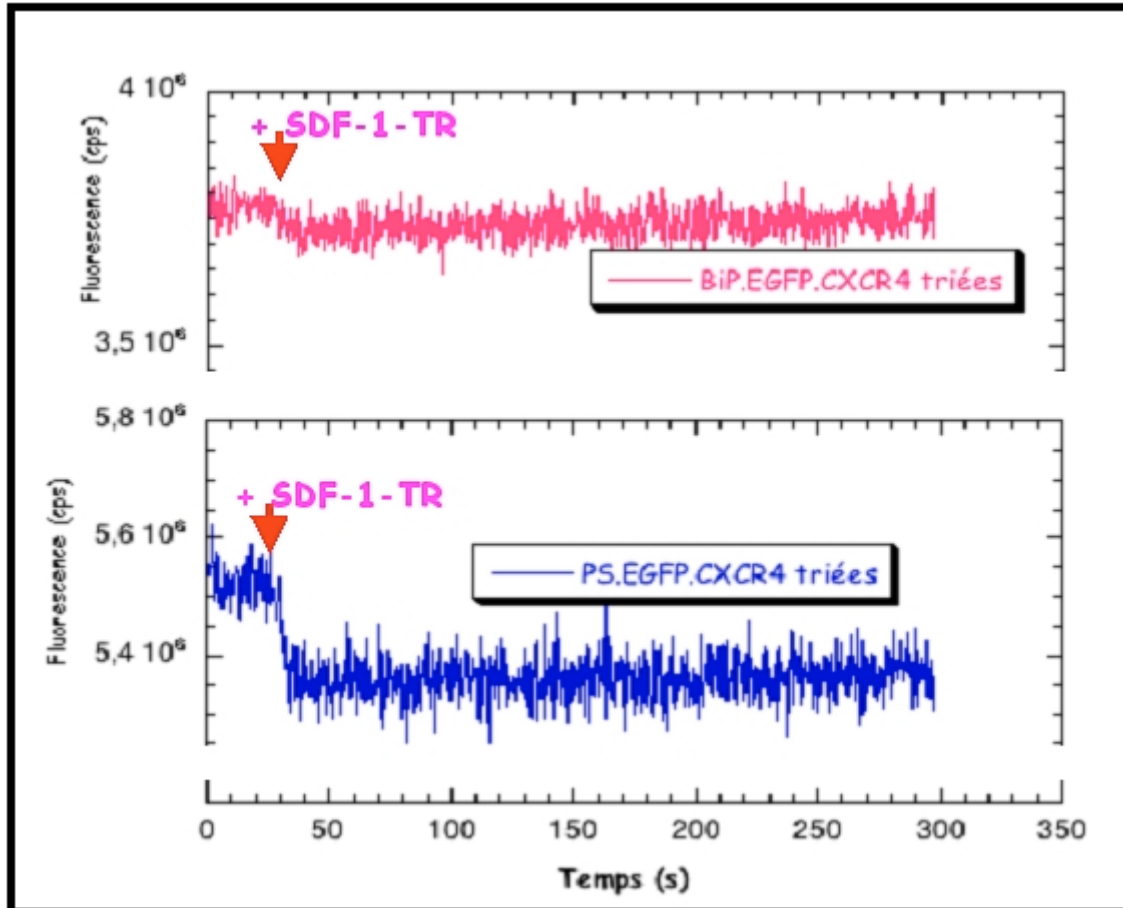


Figure 17 : Influence du tri cellulaire sur billes immunomagnétiques sur l'efficacité de FRET. Chaque expérience est réalisée sur 10 millions de cellules S2 exprimant le récepteur EGFP.CXCR4 en fusion avec soit la séquence BiP de drosophile (en haut, rose) soit le PS (en bas, bleu). La flèche rouge représente le moment où est ajouté le ligand fluorescent (100 nM de SDF-1TR).

Comme le montre la figure 17, le tri sur billes immunomagnétiques permet d'augmenter sensiblement l'efficacité du FRET, notamment dans le cas de la construction possédant le PS où l'efficacité de FRET passe de 2 % à 4.5 %. Le résultat est nettement moins significatif dans le cas de la séquence signal BiP. Néanmoins, il ne s'agit là que d'expériences très préliminaires, réalisées dans les conditions identiques à celles utilisées pour les cellules HEK et qui se doivent donc d'être largement optimisées pour les cellules S2. En effet, les cellules HEK expriment le récepteur de façon constitutive, alors que le promoteur pMT est inductible : il faut donc trouver les conditions d'induction optimales en envisageant les tests FRET à des temps d'induction variables courts de 4 à 24 heures. Ensuite les cellules S2 sont beaucoup plus petites, il faut donc faire plusieurs essais pour savoir quelle est la concentration idéale de cellules à utiliser. Dans la mesure où les cellules S2 sont dix fois plus petites que les cellules HEK, nous effectuons les mesures sur 10 millions de cellules contre 1 million pour les

cellules HEK. Néanmoins, d'autres paramètres sont à prendre en compte, notamment le taux d'expression du récepteur. Enfin, des paramètres tels que l'agitation des cellules dans la cuve, les tampons, la température se doivent d'être optimisés.

Dans le cas de CCR5, l'enrichissement de la population par le tri n'a pas permis de mettre en évidence un transfert d'énergie. Sans doute le récepteur est-il trop faiblement exprimé à la membrane, ou alors la position du fluorophore sur la chimiokine n'est pas compatible avec un transfert d'énergie.

Dans le cas du récepteur CXCR4, la construction PS.EGFP.CXCR4 s'exprime nettement mieux à la membrane en cellules HEK293 que dans les cellules S2. Nous avons donc décidé de tester les constructions incluant l'ADNc de CCR5 en fusion à l'EGFP dans les cellules HEK293 (CCR5 entier et CCR5 tronqué, avec un espaceur AGVLI), en utilisant comme peptide signal la sous-unité $\alpha 7$ du récepteur nicotinique de poulet. En effet, la technique de FRET est au point sur les cellules HEK293, et nous voulions être sûr que l'absence de détection d'un signal FRET n'était pas liée à des problèmes techniques engendrés par la manipulation des cellules S2.

Nous avons transfecté la construction de EGFP. Δ CCR5, dans laquelle CCR5 est tronqué de ses 15 premiers acides aminés, mais il n'a jamais été possible de maintenir une expression stable de ce récepteur, y compris après isolation clonale. L'expression est très importante tout de suite après la transfection, mais dès le début de la sélection, les cellules meurent. Nous avons testé trois lignées différentes de cellules HEK293, ainsi que différentes méthodes de transfection, mais sans succès.

En ce qui concerne les cellules exprimant le récepteur EGFP.CCR5 entier, l'expression du récepteur est rapidement perdue, y compris après isolation clonale, ou tri cellulaire au cytomètre en flux. Nous avons testé différentes méthodes de transfection, pour aboutir toujours au même résultat. Nous n'avons pas d'explication à propos de ce phénomène puisque les récepteurs de chimiokines sont classiquement exprimés dans ces types cellulaires. Il faudrait renouveler l'expérience en utilisant un autre type cellulaire.

2.6. Solubilisation des récepteurs EGFP.CCR5 et EGFP.CXCR4

Les essais très préliminaires de solubilisation ont été réalisés avec le Nonidet NP-40, qui a donné de très bons résultats pour la solubilisation du récepteur EGFP.hMOR. Ce détergent semble solubiliser entre 85 et 95 % du récepteur EGFP.hMOR d'après l'intensité de fluorescence de la GFP.

Au vu des mauvais rendements des préparations de membrane, les récepteurs ont été solubilisés à partir de cellules entières, comme cela a été fait pour le récepteur EGFP.hMOR.

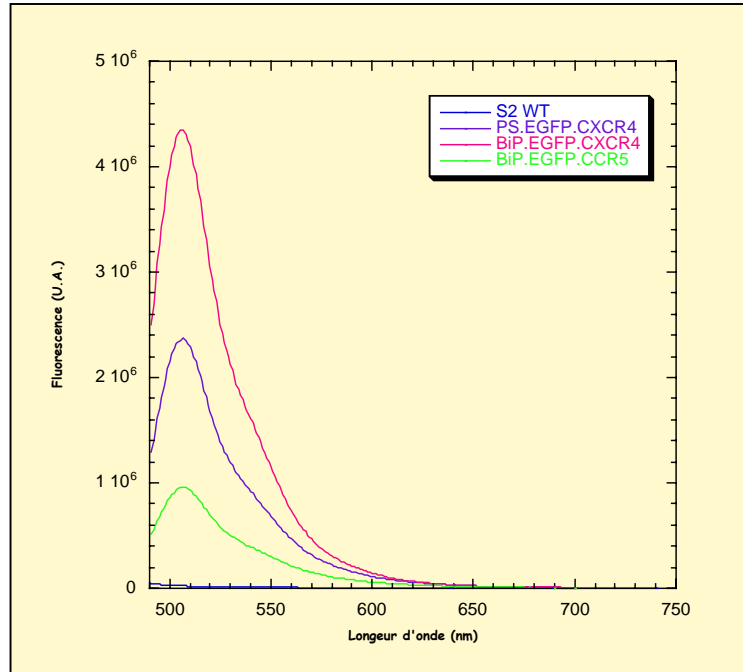


Figure 18 : Solubilisation des récepteurs EGFP.CCR5 et EGFP.CXCR4 par le NP-40
Chaque expérience est réalisée à partir de cellules S2 exprimant les récepteurs PS.EGFP.CXCR4, BiP.EGFP.CXCR4 et BiP.EGFP.CCR5. La fluorescence est mesurée sur le surnageant après solubilisation par mesure de fluorescence de l'EGFP à 510 nm après excitation à 470 nm..

Comme le montrent les graphes de la figure 18, il semblerait que le NP-40 solubilise les récepteurs EGFP.CCR5 et EGFP.CXCR4. Il s'agit là de résultats très préliminaires et l'expérience doit être renouvelée afin de confirmer l'efficacité de ce détergent. Néanmoins ce résultat est encourageant, notamment au vu des problèmes rencontrés lors de l'expression du récepteur CCR5 dans le système levure *Hansenula polymorpha*. Par ailleurs, il faudra vérifier que le récepteur solubilisé par le NP-40 est toujours fonctionnel.

3. Discussion générale et conclusions

3.1. Validation du système d'expression S2

Le but du projet décrit ici visait à valider le système S2 en tant que système d'expression hétérologue pour surexprimer les récepteurs CCR5 et CXCR4 en vue d'études structurales. Nous souhaitons également mettre au point un test FRET sur les récepteurs exprimés dans ce système d'expression pour vérifier la fonctionnalité des

récepteurs au cours des différentes étapes de solubilisation et de purification du récepteur.

Ces objectifs ont en partie été atteints. En effet, les récepteurs EGFP.CCR5 et EGFP.CXCR4 s'expriment bien dans le système S2, de l'ordre de 400.000 récepteurs par cellule, soit environ 9 mg de récepteur par litre de culture, selon la mesure de fluorescence de l'EGFP. De telles quantités sont compatibles avec les études structurales envisagées. De plus, les résultats obtenus avec le récepteur EGFP.hMOR exprimé dans ce système montrent que ce taux d'expression est largement supérieur à celui obtenu pour le récepteur mu, et qu'il est possible d'apporter au système des améliorations afin d'augmenter la proportion de récepteurs fonctionnels.

Nous avons également montré par des expériences de microscopie à fluorescence et par des méthodes de séparation de membranes sur gradient discontinu de saccharose que le récepteur était majoritairement localisé dans des structures membranaires internes de forte densité.

Néanmoins, comme le montrent les résultats de FRET sur cellules entières, une partie du récepteur EGFP.CXCR4 est localisée dans la membrane plasmique, et ce récepteur est fonctionnel puisqu'il lie son ligand agoniste SDF-1. Si le test FRET a pu être transposé des cellules HEK293 aux cellules S2, il n'a malheureusement pas été possible de mettre au point un test FRET sur le récepteur CCR5 exprimé soit en cellules HEK293, soit en cellules S2.

Enfin, nous avons pu montrer par des expériences préliminaires de solubilisation qu'une partie du récepteur pouvait être solubilisée à l'aide du Nonidet NP-40. On peut donc en déduire que les récepteurs exprimés dans le système S2 se comportent différemment de ceux exprimés dans le système *Hansenula polymorpha*.

3.2. Optimisations à apporter au système d'expression S2

Les résultats présentés ici sont obtenus pour un système non optimisé. La première amélioration que nous avons apportée au système consiste en un tri sur billes immunomagnétiques, permettant de ne retenir que les récepteurs exprimés à la membrane. Ce tri permet d'augmenter d'un facteur 2 la fluorescence totale. Néanmoins, des expériences menées en parallèle sur le récepteur EGFP.hMOR ont permis de montrer que d'autres paramètres permettaient d'améliorer d'autant plus le taux d'expression total du récepteur, mais également la proportion de récepteurs fonctionnels.

Ces optimisations portent notamment sur le test de nouveaux additifs à ajouter au milieu de culture. Il faudrait notamment tester différentes concentrations de DMSO

dans le milieu de culture, ajoutées à différents moments de l'induction, mais également étudier l'effet du tréhalose, qui semble améliorer l'expression de certaines protéines membranaires (Singer et Lindquist, 1998). Par ailleurs, les essais réalisés avec le récepteur EGFP.hMOR montrent que l'addition d'un antagoniste opiacé, la naloxone, durant les 24 dernières heures de l'induction permettait d'augmenter l'expression du récepteur EGFP.hMOR de 300 %, mesuré par la liaison des ligands, sans modification de la fluorescence totale, donc d'augmenter la proportion de récepteurs fonctionnels. Il faudrait renouveler l'expérience sur les récepteurs EGFP.CCR5 et EGFP.CXCR4 en présence d'antagonistes de ces récepteurs afin de mesurer l'effet de ces ligands sur le taux d'expression et sur la fonctionnalité des récepteurs surexprimés. Nous disposons de l'antagoniste de CCR5 TAK779, mais également de deux nouvelles molécules, mises très récemment à disposition du laboratoire :

- Le NBIR-1182, un antagoniste de CCR5 qui nous a été procuré par Gebhard Thoma de la société Novartis.

- Le 4F-benzoyl-TN14003, un antagoniste de CXCR4, fourni par la Professeur Nobukata Jujii de l'Université de Kyoto. Cette molécule a d'ailleurs déjà été testée dans le cadre du réseau MePNet pour déplacer SDF-1 dans des expériences de compétition sur des récepteurs CXCR4 exprimés dans des cellules BHK infectées par le virus SFV, et semble donner de bons résultats.

Néanmoins, afin d'étudier plus précisément l'effet de ces différents additifs (antagonistes ou autres additifs ajoutés au milieu de culture), il faudrait soit mettre au point le test FRET, soit développer un test de liaison de ligand, pour mettre en évidence l'effet de ces composés sur la fluorescence totale, mais également sur la proportion de récepteurs capables de lier les ligands.

Il nous reste également à caractériser le récepteur produit dans les compartiments intracellulaires afin de déterminer si les récepteurs ainsi produits sont utilisables pour les études structurales envisagées. La localisation précise du récepteur passe par des études plus précises de microscopie confocale, et par l'amélioration de la méthode de préparation des membranes, totales ou sur gradient de saccharose.

Nos résultats préliminaires sont encourageants pour le FRET. Les études réalisées au laboratoire avec le récepteur EGFP.hMOR montrent que ce type cellulaire permet de réaliser des études fonctionnelles, les réponses étant d'intensité plus faible que dans d'autres types cellulaires, mais tout à fait interprétables (Perret *et al.*, 2003). Il faudrait pouvoir améliorer le tri sur billes afin d'enrichir encore la population en cellules exprimant le récepteur membranaire.

Enfin en vue d'une production à plus grande échelle, il faudrait mettre au point les conditions de culture des cellules en bioréacteur, notamment optimiser différents

paramètres tels, l'agitation de la cuve, l'oxygénation et le choix des additifs anti-mousse. Ces optimisations sont en cours avec le récepteur EGFP.hMOR. Enfin il serait souhaitable de pouvoir cultiver les cellules sans sérum. Il semblerait en effet que les cellules S2 soient capables de se développer dans un milieu dépourvu de sérum, sans modification du taux d'expression, du moins dans le cas de protéines solubles (Carlos Peireira, communication personnelle).

3.3. Conclusions

Autant nous avons été confrontés à des problèmes insurmontables dans le système *Hansenula polymorpha*, autant le système S2 me semble très prometteur pour l'expression des récepteurs de chimiokines CCR5 et CXCR4 fusionnés à l'EGFP. En effet, les premiers résultats obtenus dans le système non optimisé permettent d'obtenir des quantités de récepteurs de l'ordre du milligramme de protéine par litre de culture, ce qui est compatible avec les études structurales envisagées dans le cadre du réseau ANRS. Par ailleurs, nos résultats permettent de valider l'utilisation de l'étiquette EGFP, autant pour la caractérisation du système d'expression, que pour les études fonctionnelles du récepteur utilisant la technologie FRET.

CHAPITRE 8

MATERIELS ET METHODES

CELLULES SCHNEIDER et HEK

Une partie des méthodes ont déjà été décrites dans le chapitre 6. Je ne détaillerai ici que les méthodes différentes.

1. Matériel

1.1. Organismes et milieux de culture

1.1.1. Bactéries (voir chapitre 6)

1.1.2. Cellules d'insectes

Les cellules S2 sont des lignées cellulaires immortalisées isolées à partir d'embryons précoces de *Drosophila melanogaster* et proviennent d'Invitrogen.

Elles sont cultivées en milieu Insect Express (Biowittaker-Cambrex, Belgique), supplémenté par 10 % de sérum de veau fœtal préalablement décomplémenté 30 minutes à 65°C, 0.2 % de pluronic F68 (Invitrogen) uniquement dans le cas des cellules en suspension, et 50 µg/ml de Gentamycine.

1.1.3. Cellules mammifères

Les cellules HEK293 proviennent du stock ATCC de l'IGBMC.

Elles sont cultivées en milieu MEM (Minimum Eagle's Medium, Gibco) supplémenté de 10 % de sérum de veau fœtal (Gibco) + 100 µg/ml de streptomycine + 100 U/ml pénicilline + 2 mM glutamine à 37 °C sous 5 % de CO₂.

1.2. Plasmides

1.2.1. Plasmides pour les cellules d'insectes

Le plasmide d'expression pMT-BiP-V5/His et le plasmide de sélection pCO-Hygro proviennent de Invitrogen. Ces deux plasmides sont des vecteurs navettes *E. coli* - S2, permettant l'amplification chez *E. coli*.

Le gène d'intérêt est cloné dans le vecteur pMT-Bip-V5/His sous contrôle du promoteur pMT.

Le plasmide pCO-Hygro confère aux cellules S2 transfectées la résistance à l'hygromycine B.

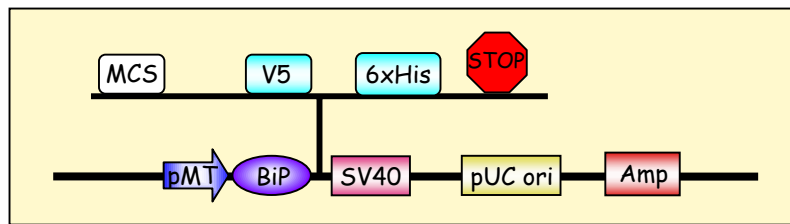


Figure 1 : Représentation schématique du vecteur pMT-Bip-V5/His

pMT est le promoteur de la méthallothionéine de *D. melanogaster* inductible par le cuivre. BiP constitue la séquence signal de sécrétion. MCS est le site de clonage multiple. V5 est l'épitope V5 pouvant être utilisé comme séquence étiquette. 6xHis est une étiquette polyhistidine. SV40 est un signal de polyadénylation augmentant l'efficacité de terminaison de la transcription et la polyadénylation des ARNm. L'origine pUC permet la répllication chez *E.coli*. Amp code pour la β -lactamase et confère aux bactéries la résistance à l'ampicilline.

1.2.2. Plasmides pour les cellules mammifères

Le plasmide d'expression pCEP4 provient de Invitrogen. Le gène d'intérêt est cloné sous contrôle du promoteur constitutif pCMV (cytomégalovirus humain). Le plasmide est un vecteur navette bactéries-cellules mammifères qui possède une origine de répllication bactérienne et un gène conférant la résistance à l'ampicilline (β -lactamase). La sélection des cellules transfectées se fait grâce au gène conférant la résistance à l'hygromycine B.

1.3. Enzymes de restriction et matériel de biologie moléculaire

Pour cette deuxième partie, toutes les enzymes de restriction proviennent de Fermentas.

Nous avons donc utilisé les kits mini et maxi-préparation d'ADN plasmidique provenant de Qiagen.

L'enzyme utilisée pour les réactions de polymérisation en chaîne est la Pfx de Invitrogen.

2. Méthodes de biologie moléculaire

2.1. Clonage

2.1.1. Stratégies de PCR

2.1.1.1. Constructions pour S2

Amplification du fragment *KpnI*.EGFP.espaceur.CCR5.XhoI

Dans une première réaction de PCR, l'ADNc de CCR5 est amplifié à partir du plasmide pHipX4.CCR5 en ajoutant en amont du gène la séquence espaceur AGVLI par l'oligonucléotide sens ADQ304 (5'-GCCGGCGTGCTGATCGATTATCAAGTGTCAAGTCCAATCTATGAC-3') et en aval du gène le codon stop et le site *XhoI* par l'oligonucléotide antisens ADQ306 (5'-CTCGAGTCATCACAAGCCCACAGATATTTCTGCTCCCCAGT-3'). Une deuxième réaction de PCR permet d'amplifier l'EGFP à partir du plasmide pMT.BiP.EGFP.hMOR en ajoutant en amont du gène le site *KpnI* par l'oligonucléotide sens ADQ302 (5'-GGGGTACCCGTGAGCAAGGGCGAGGAGCT-3') et en aval du gène l'espaceur AGVLI par l'oligonucléotide antisens ADQ303 (5'-GATCAGCACGCCGGCGATCCCCGGCGGC GGTCACGAACTCCAGCAG-3').

Une troisième réaction de PCR permet d'amplifier le fragment *KpnI*.EGFP.espaceur.CCR5.XhoI en utilisant comme matrice les deux premiers fragments qui vont s'hybrider au niveau de l'espaceur et les oligonucléotides ADQ302 et ADQ306.

Amplification du fragment *KpnI*.EGFP.espaceur.ΔCCR5.XhoI

Dans une première réaction de PCR, l'ADNc de CCR5 est amplifié à partir du plasmide pHipX4.CCR5 en ajoutant en amont du gène la séquence espaceur AGVLI par l'oligonucléotide sens ADQ305 (5'-GCCGGCGTGCTGATCTCGGAGCCCTGCCAAAAAATCAATGTGAAG-3') et en aval du gène le codon stop et le site *XhoI* par l'oligonucléotide antisens ADQ306 (5'-CTCGAGTCATCACAAGCCCACAGATATTTCTGCTCCCCAGT-3'). L'oligonucléotide ADQ305 s'hybride sur CCR5 de telle sorte que les 15 premiers acides aminés de CCR5 sont tronqués.

Une deuxième réaction de PCR permet d'amplifier l'EGFP à partir du plasmide pMT.BiP.EGFP.hMOR en ajoutant en amont du gène le site *KpnI* par l'oligonucléotide sens ADQ302 (5'-GGGGTACCCGTGAGCAAGGGCGAGGAGCT-3') et en aval du gène l'espaceur AGVLI par l'oligonucléotide antisens ADQ303 (5'-GATCAGCACGCCGGCGATCCCCGGCGGC GGTCACGAACTCCAGCAG-3').

Une troisième réaction de PCR permet d'amplifier le fragment *KpnI*.EGFP.espaceur.ΔCCR5.XhoI en utilisant comme matrice les deux premiers fragments qui vont s'hybrider au niveau de l'espaceur et les oligonucléotides ADQ302 et ADQ306.

Amplification des fragments *KpnI*.EGFP.espaceur. CCR5.C9.XhoI

Les plasmides TOPO.*KpnI*.EGFP.(+/- Δ)CCR5 sont utilisés comme matrice afin d'ajouter en aval de CCR5 l'étiquette C9. L'oligonucléotide sens est ADQ302 (voir plus haut), l'oligonucléotide antisens AEF115 (5'-CTCGAGTTATTAGGCTGGGGCCACCTGAGAGGTCTCGGTATCCCAAGCCCACAGATATTTCTGCTCCCCAGT-3') permet d'ajouter l'étiquette C9 du côté 3' de CCR5.

Amplification des fragments *NotI*.CCR5.XhoI et *NotI*. Δ CCR5.XhoI

Le fragment est amplifié en une étape de PCR à partir de pHipX4.CCR5 avec les oligonucléotides sens AEF113 (5'-GCGGCCGCGATTATCAAGTGTCAAGTCCAATCTATGAC-3') pour CCR5 et AEF114 (5'-GCGGCCGCTCGGAGCCCTGCCAAAAAATCAATGTGAAG-3') pour Δ CCR5 permettant d'introduire le site *NotI* en amont de l'insert, l'oligonucléotide antisens étant dans les deux cas AEF115 (5'-CTCGAGTTATTAGGCTGGGGCCACCTGAGAGGTCTCGGTATCCCAAGCCCACAGATATTTCTGCTCCCCAGT-3').

Amplification du fragment *KpnI*.EGFP.espaceurCXCR4.XhoI

Le fragment est amplifié en une étape de PCR à partir de la construction pCEP4.PS.EGFP.CXCR4 en utilisant l'oligonucléotide sens ADQ302 (voir plus haut) afin d'introduire le site *KpnI* en amont de l'insert, et de l'oligonucléotide antisens TP3 (5'-CTCGAGTTATACCGGTAAGCTGGAGTGAAAACCTTGAAGACTCAGAC-3') afin d'introduire le site *XhoI* en aval de l'insert.

2.1.1.2. Constructions pour HEK

Amplification des fragments *NotI*.EGFP.espaceur.CCR5.XhoI

Les fragments sont amplifiés en une seule étape de PCR à partir des fragments EGFP.espaceur.(+/- Δ)CCR5 clonés dans pMT en utilisant l'oligonucléotide sens (5'-GCGGCCGCGATGGGCTCCGGGCGCTGATGCTGTGGTTG-3') qui permet d'introduire le site *NotI* en amont de l'insert et l'oligonucléotide antisens ADQ306 (voir plus haut) qui permet d'introduire le site *XhoI* en aval de l'insert.

2.1.2. Amplification des fragments par réaction de polymérisation en chaîne

La réaction d'amplification s'effectue à partir de 100 ng de l'ADN à amplifier dans un volume réactionnel de 50 μ l en présence de 0.2 μ M de chaque oligonucléotide, 0.2 mM d'un mélange de dNTPs, 10 μ l de solution enhanceur (fournie avec l'enzyme), 1 μ l de MgSO₄ (fourni avec l'enzyme), 5 μ l de tampon (fourni avec l'enzyme) et 0.5 unité d'enzyme Pfx.

L'amplification se fait dans un thermocycler Perkin-Helmer selon la séquence suivante : un cycle de dénaturation de 3 minutes à 94 °C, puis 20 cycles de 15 secondes de dénaturation à 94 °C, 30 secondes d'hybridation à 55 °C, avec incrémentation de 0.5 °C par cycle et 1 minute à 68 °C, suivis de 15 cycles dans les mêmes conditions avec une hybridation à température fixe à 65 °C, et enfin un cycle unique de post-élongation de 7 minutes à 68 °C. L'ADN linéaire est ensuite cloné dans le vecteur de clonage ou stocké à - 20 °C.

2.1.3. Clonage des fragments de PCR

2.1.3.1. Extraction et purification des fragments d'ADN

2.1.3.1.1. Dépôt et migration (voir chapitre 6)

2.1.3.1.2. Extraction et purification de l'ADN

Après migration sur gel d'agarose 1 %, la bande d'intérêt est découpée dans le gel avec un scalpel propre. L'ADN est élué et purifié selon les recommandations du fournisseur avec le kit « Gel extraction kit » de Qiagen.

L'ADN est élué par 30 µl de tampon BE fourni dans le kit puis soit utilisé immédiatement, soit stocké à -20 °C.

2.1.3.2. Clonage dans le vecteur TOPO

L'enzyme Pfx utilisée pour la réaction de polymérisation en chaîne ne possède pas d'activité terminal transférase. Les fragments obtenus par ce type de PCR ont des extrémités franches et sont clonés dans le vecteur TOPO Blunt de Invitrogen selon les recommandations du fournisseur. Ce vecteur est le même que le vecteur TOPO TA décrit dans le chapitre 6, à la différence que les extrémités ne possèdent pas de résidus T, les extrémités du vecteur étant franches. De plus, les transformants sont ici sélectionnés sur milieu LB + kanamycine (voir chapitre 6).

2.1.3.3. Préparation d'ADN plasmidique pour les études analytiques (voir chapitre 6)

2.1.3.4. Préparation d'ADN plasmidique pour le séquençage et la transfection

Après une série de digestions contrôles, l'ADN est contrôlé par séquençage au service commun de l'IGBMC.

Les kits utilisés pour cette partie de mon projet proviennent de Qiagen (kit mini et maxi préparation d'ADN plasmidique).

2.1.4. Construction des vecteurs d'expression

2.1.4.1. Ligation et amplification

Le vecteur pMT-BiP-V5/His est ouvert par les enzymes *KpnI* ou *NofI* et *XhoI* (Fermentas) selon une digestion séquentielle en commençant par l'enzyme qui coupe dans le tampon le moins salin.

Le vecteur pCEP4 est ouvert par les enzymes *XhoI* et *NofI* (Fermentas) selon une digestion séquentielle en commençant par l'enzyme qui coupe dans le tampon le moins salin.

L'insert est extrait du vecteur TOPO selon les mêmes digestions, dans un volume réactionnel final de 30 μ l pendant 1 heure pour chaque enzyme à 37 °C. Dans le cas de la construction PS.EGFP.CXCR4, l'insert est extrait directement du vecteur pCEP4.PS.EGFP.CXCR4 par digestion séquentielle *NofI* et *XhoI*, puis sous-cloné dans le vecteur pMT dépourvu de séquence BiP ouvert par les enzymes *NofI* et *XhoI* selon une digestion séquentielle.

Après migration sur gel d'agarose à 1 %, les bandes correspondant au vecteur ouvert et à l'insert sont découpées dans le gel et l'ADN est élué avec le kit « Gel extraction kit » de Qiagen selon les recommandations du fournisseur.

L'insert et le vecteur sont ligués par la T4 DNA ligase de Roche (« Rapid DNA ligation kit »), dans un volume réactionnel de 20 μ l, la quantité d'insert étant trois fois supérieure à la quantité de vecteur.

Des bactéries TOP10 compétentes pour la transformation par choc thermique sont transformées par 1/10 du volume de la ligation (voir chapitre 6) et sélectionnées sur milieu complet contenant de l'ampicilline (marqueur de sélection du vecteur pMT et du vecteur pCEP4).

2.1.4.2. Contrôle de la ligation par réaction de polymérisation en chaîne

Afin de contrôler que l'insert est correctement ligué dans le vecteur, les bactéries issues de la transformation sont utilisées pour ensemercer des minicultures en milieu LB + ampicilline en plaques 96 puits.

Un contrôle par réaction de PCR est réalisé directement sur les minicultures, sans passer par une étape de préparation d'ADN. L'enzyme utilisée n'ayant pas besoin d'être fidèle, on utilise une simple *Taq* polymérase dépourvue d'activité correctrice. On utilise un oligonucléotide sens qui s'hybride à l'EGFP, et un oligonucléotide antisens qui

s'hybride au niveau du récepteur CCR5 ou CXCR4. La réaction d'amplification s'effectue dans un volume réactionnel de 50 μ l, sur 5 μ l de la miniculture, en présence de 0.2 μ M de chaque oligonucléotide, 0.2 mM d'un mélange de dNTPs, 0.4 mM de $MgCl_2$, 5 μ l de tampon (fournie avec l'enzyme) et 1 unité de *Taq* polymérase Eurobio.

L'amplification se fait dans un thermocycler Perkin-Helmer selon la séquence suivante : un cycle de dénaturation de 3 minutes à 94 °C, puis 20 cycles de 15 secondes de dénaturation à 94 °C, 30 secondes d'hybridation à 50 °C, avec incrémentation de 0.5 °C par cycle et 1 minute à 68 °C, suivis de 15 cycles dans les mêmes conditions avec une hybridation à température fixe à 60 °C, et enfin un cycle unique de post-élongation de 7 minutes à 68 °C.

Après migration sur gel d'agarose 1 %, on obtient une bande de 1500 paires de bases correspondant à la région située entre les deux oligonucléotides.

L'ADN des transformants présentant un profil correct est préparé selon une méthode plus propre (maxipréparation d'ADN plasmidique Qiagen). La concentration de l'ADN est déterminée par mesure de la densité optique à 260 nm (une unité de D.O. correspondant à 50 μ g/ μ l d'ADN double brin).

La qualité de l'ADN est évaluée par mesure de densité optique à 280 nm, l'ADN étant dépourvu de contamination protéique si le rapport DO_{260}/DO_{280} est compris entre 1.7 et 2.

La séquence de l'ADN est à nouveau contrôlée au séquençage avant que celui-ci ne soit utilisé pour la transfection.

3. Culture des cellules S2

3.1. Congélation, décongélation et maintien

Congélation

Les cellules provenant d'une boîte contenant 1 à $2 \cdot 10^7$ cellules/ml en phase exponentielle de croissance sont comptées en présence de bleu trypan afin de déterminer la viabilité des cellules qui doit se situer entre 95 et 99 % (concrètement une boîte T25 cm^2 à confluence). Les cellules sont culottées par une centrifugation de 5 minutes à 1000 g, puis le culot est remis en suspension à une densité de $1 \cdot 10^7$ cellules/ml dans 90 % sérum décomplémenté plus 10 % DMSO. La suspension est répartie en cryotubes à raison de 1 ml par cryotube qui seront préalablement refroidis lentement en Bicell (pour permettre une diminution progressive de la température) à -80 °C avant d'être stocké dans l'azote liquide.

Décongélation

Le cryotube est rapidement décongelé dans les mains. Dès que les parois se décollent, les cellules sont transvasées dans un tube contenant 5 ml de milieu de culture

complet préalablement chauffé à 27 °C. Les cellules sont immédiatement centrifugées 5 minutes à 1000 g pour éliminer rapidement le DMSO. Le culot de cellules est remis en suspension dans 5 ml de milieu chaud. Les cellules sont placées en boîte T25 cm² à 27 °C pendant 24 heures. Après ces 24 heures, le milieu est délicatement retiré, puis remplacé par 5 ml de milieu neuf préalablement chauffé.

Conditions de culture

Les cellules sont diluées deux fois par semaine. La concentration minimale est de 5.10⁵ cellules /ml et la densité maximale de 2.10⁷ cellules/ml en boîte ou 4.10⁷ cellules/ml en suspension. Le temps de génération est d'environ 20 heures.

Les cultures en boîte sont réalisées soit en plaques 24, 12 ou 6 puits dans des volumes de 500 µl, 1 ml ou 2.5 ml respectivement dans un incubateur sans CO₂ à 27 °C, dans un milieu complet (Insect Express, 10 % sérum de veau fœtal décomplémenté, 50 µg/ml Gentamycine). Les cultures de cellules en suspension sont réalisées dans des bouteilles de 250 ml contenant 50 ml de milieu complet supplémenté de 0.2 % de Pluronic F68.

Les cellules sont cultivées au maximum trois mois (30 passages environ).

L'induction de l'expression se fait par addition de 700 µM d'une solution de sulfate de cuivre dans la suspension cellulaire.

3.2. Transfection

Le protocole de transfection utilisé au laboratoire permettait d'obtenir un grand maximum de 20 % de cellules transfectées, ce qui pouvait s'avérer très insuffisant au moment de la sélection, au vu des densités minimales requises pour la culture ces cellules S2. Nous avons donc optimisé ce protocole à plusieurs niveaux : ces améliorations ont été faites en collaboration avec le Docteur Patrick Erbacher de la société Polyplus-transfection (Illkirch) qui commercialise le JetPEI. La transfection faisant intervenir un vecteur d'expression et un vecteur de sélection, il a d'abord fallu trouver le meilleur rapport entre ces deux vecteurs. Le JetPEI est un agent de transfection chargé positivement qui forme des complexes avec l'ADN chargé négativement : ce type d'agent de transfection est caractérisé par le rapport N/P qui établit un ratio entre les groupements amine du PEI chargés positivement et les groupements phosphate négatifs de l'ADN. Pour la majorité des cellules, la transfection se fait pour un rapport N/P de 5. Or dans le cas des cellules Schneider, il s'avère que la transfection est plus efficace pour un rapport N/P de 8. Nous avons également remarqué que la transfection était plus efficace lorsque le volume de milieu était minimal. Après plusieurs séries d'expériences pour tenter d'optimiser le protocole, c'est celui décrit ci après qui a été retenu.

La veille du jour prévu pour la transfection, des cellules fraîches (passage trois ou quatre) sont diluées en plaque 6 puits à raison de 1.5 à 2.10^6 cellules/ml.

Au moment de la transfection, la préparation des solutions de transfection s'effectue de la façon suivante. Le tube A contient $10 \mu\text{g}$ de plasmide d'expression, $0.5 \mu\text{g}$ de plasmide de sélection (meilleur rapport 1/20) dans $200 \mu\text{l}$ de NaCl 150 mM . Le tube B contient $32 \mu\text{l}$ de JetPEI dans $200 \mu\text{l}$ final de NaCl 150 mM (meilleur rapport N/P = 8). Le contenu du tube B est versé sur le tube A (et pas l'inverse), le tout est immédiatement vortexé puis incubé 15 à 30 minutes à température ambiante.

Pendant ce temps, le milieu de culture est délicatement enlevé en veillant à ne pas décoller les cellules, puis 1 ml (au lieu de 2.5 ml) de milieu neuf préalablement chauffé est délicatement rajouté sur les cellules en plaques 6 puits.

Après incubation, le mélange de transfection contenant les complexes ADN-JetPEI est déposé au goutte-à-goutte sur les cellules à raison de $200 \mu\text{l}$ par puits. La boîte est délicatement homogénéisée puis incubée 12 à 24 heures à 27°C .

3.3. Etablissement de lignées polyclonales stables

Le lendemain de la transfection, le milieu de transfection est délicatement retiré de façon à ne pas décoller les cellules. La sélection débute par addition d'hygromycine B à raison de 300 à $500 \mu\text{g/ml}$, en plaques 6 puits contenant 2.5 ml de milieu par puits. Les cellules sont observées tous les jours pendant la sélection. Le surnageant est régulièrement renouvelé par du milieu neuf préalablement chauffé et additionné d'antibiotique. Lorsque les cellules ne meurent plus, on considère que la lignée est stable (compter deux à trois semaines).

L'efficacité de la transfection est estimée par mesure de la fluorescence totale des cellules issues d'une boîte $T25 \text{ cm}^2$ à confluence après induction.

3.4. Tri sur billes immunomagnétiques

Le tri est effectué sur environ 10^7 cellules totales.

Les cellules induites pendant 24 ou 48 heures sont récupérées par une centrifugation de 5 minutes à 1000 g , puis le culot est remis en suspension dans $20 \mu\text{l}$ de tampon PEB (PBS, 5 mM EDTA, 0.5% BSA). L'anticorps monoclonal de souris dirigé contre l'EGFP (anti-GFP, Roche) est ajouté aux cellules de telle sorte que sa dilution finale soit de 1/500. Le mélange est incubé 10 minutes sur la glace. Après addition de $680 \mu\text{l}$ de tampon PEB, les cellules sont centrifugées 5 minutes à 1000 g . Après un second rinçage avec $680 \mu\text{l}$ de tampon PEB, le culot est remis en suspension dans $25 \mu\text{l}$ de tampon PEB, puis $20 \mu\text{l}$ de billes immunomagnétiques (Miltény BIOTEC) sont ajoutées

au mélange. Sur ces billes sont greffées des immunoglobulines de chèvre dirigées contre les immunoglobulines de souris. Après une incubation de 15 minutes à 4 °C, on rajoute 680 µl de tampon PEB avant de centrifuger les cellules pendant 5 minutes à 1000g. Le culot formé par les cellules et les billes est remis en suspension dans 500 µl de tampon PEB.

La colonne d'élution est placée sur le socle aimanté puis rincée par 500 µl de tampon PEB. Les cellules sont alors déposées en haut de la colonne. Les cellules qui tombent sont celles qui ne sont pas couplées aux billes magnétiques, elles ne sont donc pas retenues par l'aimant. La colonne est ensuite rincée trois fois par 500 µl de tampon PEB.

La colonne est alors retirée du socle aimanté. Les cellules ne sont donc plus retenues par les billes et sont récoltées par addition de 1 ml de tampon PEB en appliquant une pression modérée. Les cellules sont culottées par une centrifugation de 5 minutes à 1000 g avant d'être reprises dans 1 ml de milieu de culture neuf préalablement chauffé, puis incubées en plaque 12 puits à 27 °C.

Quelques heures après le tri, les cellules adhèrent à nouveau au fond de la boîte et l'efficacité du tri est estimée au microscope à fluorescence.

4. Culture des cellules HEK

4.1. Congélation, décongélation et conditions de culture

Congélation

Les cellules provenant d'une boîte ronde de 10 cm de diamètre à confluence sont décollées à la trypsine. Les cellules sont culottées par une centrifugation de 5 minutes à 1000 g, puis le culot cellulaire est remis en suspension dans 90 % sérum plus 10 % DMSO. La suspension est répartie en cryotubes, à raison de 1 ml par cryotube, qui seront préalablement refroidis lentement en Bicell à -80 °C avant d'être stocké dans l'azote liquide.

Décongélation

Le cryotube est rapidement décongelé dans les mains. Dès que les parois se décollent, les cellules sont transvasées dans un tube contenant 5 ml de milieu de culture complet préalablement chauffé à 37 °C. Les cellules sont immédiatement centrifugées 5 minutes à 1000 g pour éliminer rapidement le DMSO. Le culot de cellules est remis en suspension dans 10 ml de milieu chaud. Les cellules sont placées en boîte de culture ronde à 37 °C sous 5 % de CO₂ pendant 24 heures. Après ces 24 heures, le milieu est délicatement retiré, puis remplacé par 10 ml de milieu neuf préalablement chauffé.

Conditions de culture

Les cellules sont diluées au tiers deux fois par semaine. Les cellules sont décollées soit par de la trypsine (Gibco) soit par du versène (1X PBS, 5 mM EDTA) à raison de 2 ml par boîte T75 cm².

Les cultures en boîte sont réalisées soit en plaques 24, 12 ou 6 puits dans des volumes de 500 μ l, 1 ml ou 2.5 ml respectivement, soit en boîte T75 cm², T175 cm² ou des boîtes rondes de 10 cm de diamètre contenant 10, 25 ou 10 ml de milieu respectivement dans un incubateur sous 5 % de CO₂ à 37 °C, dans un milieu complet (MEM, 10 % sérum de veau fœtal + antibiotiques). Les cellules sont cultivées au maximum trois mois (30 passages environ).

4.2. Transfection

La veille de la transfection, une boîte ronde de cellules à confluence est diluée de façon à ce que les cellules soient de 50 à 70 % de confluence le jour de la transfection (soient 3 à 4 millions de cellules par boîte), sachant que le temps de génération est de 24 heures.

Deux à trois heures avant la transfection, le milieu de culture est retiré, les cellules sont rincées par 10 ml de PBS, puis on rajoute 10 ml de milieu complet à 37 °C. Au moment de la transfection, environ 10 μ g d'ADN sont remis en suspension dans de l'eau stérile pour un volume final de 450 μ l. On rajoute ensuite 50 μ l de la solution de transfection CaCl₂ à 2.5 M. Ce tube est placé sur un vortex, en agitation sur vitesse 3/4. On rajoute ensuite au goutte-à-goutte et sous agitation 500 μ l d'une solution de BBS (25 mM acide *N,N*-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonique, 140 mM NaCl, 0.75 M Na₂HPO₄.2H₂O, 1.25 mM CaCl₂.2H₂O, pH7). Le mélange est laissé 15 minutes à température ambiante. La solution de transfection est ensuite rajoutée au goutte-à-goutte dans chaque boîte à raison de 1 ml par boîte, puis la boîte est légèrement agitée pour homogénéiser le mélange.

Les cellules sont placées dans un incubateur sous 3 % de CO₂ pendant 12 à 24 heures. Les cellules sont sorties à la dernière minute de l'incubateur sous 5 % de CO₂ et placées dans l'incubateur sous 3 % de CO₂ immédiatement après la transfection. Le lendemain, les cellules sont rincées sans les décoller dans 5 ml de PBS, puis reprises dans 10 ml de milieu complet préalablement chauffé à 37 °C. Elles sont replacées dans un incubateur sous 5 % de CO₂. L'efficacité de la transfection est quantifiée en observant les cellules au microscope à fluorescence après excitation de l'EGFP.

4.3. Etablissement de lignées polyclonales stables

Deux jours après la transfection, on débute la sélection antibiotique à l'hygromycine B afin d'établir les lignées stables. Les cellules non transfectées vont mourir en présence de cet antibiotique. Les cellules sont décollées, non diluées, puis mises en présence de doses croissantes d'hygromycine que l'on laisse agir 24 heures après lesquelles le milieu est remplacé par du milieu neuf sans antibiotique. La dose supérieure est ajoutée une fois que les cellules sont à confluence. Le processus se poursuit ainsi jusqu'à ce que toutes les cellules résistent à la dose supérieure d'hygromycine.

4.4. Isolation clonale

Les cellules issues d'une boîte à confluence sont décollées et comptées au bleu trypan 0.1 %, puis diluées en plaque 96 puits de telle sorte qu'il n'y ait qu'une cellule tous les trois puits. Les cellules sont observées tous les jours au microscope à fluorescence afin de détecter les puits dans lesquels repartent les cellules fluorescentes. Au fur et à mesure des divisions cellulaires, les clones ainsi isolés sont cultivés en plaques 24 puits, 12 puits, 6 puits, et en boîte T25 cm², T75 cm².

5. Méthodes de biochimie pour les cellules S2

5.1. Préparation des échantillons

5.1.1. Lyse et préparation de membranes totales

La préparation de membranes se fait à partir de culot de cellules S2 congelées à -80 °C, préalablement rincées en tampon IEB (5.44 mM KCl, 129.7 mM NaCl, 1.2 mM MgCl₂.6H₂O, 4.2 mM NaHCO₃, 7.3 mM NaH₂PO₄, 63 mM saccharose, 20 mM HEPES pH6.8).

Les culots cellulaires sont remis en suspension dans un tampon de lyse (4 mM EDTA, 1 mM PMSF, 50 mM Tris-HCl pH7.4) de façon à ce que la concentration finale soit de 200 .10⁶ cellules/ml. Les cellules sont lysées aux ultrasons sur glace (petite sonde, pulse 40, intensité 3 pendant 1 minute). Les débris cellulaires et les cellules non lysées sont éliminés par une centrifugation de 3 minutes à 4 °C à 1000 g.

Le surnageant est ensuite ultracentrifugé pendant 45 minutes à 100000 g à 4 °C.

Les culots de membranes sont remis en suspension dans 2 ml de tampon pour membranes (4 mM EDTA, 1 mM PMSF, 150 mM NaCl, 20 % glycérol, 50 mM Tris-HCl pH7.4) grâce à un homogénéiseur de type Potter. Pour obtenir une préparation plus homogène, les membranes en suspension sont ensuite passées 5 fois à travers une seringue 18 G, 5 fois à travers une seringue 23 G et 5 fois à travers une seringue 26 G.

La quantité de protéines est calculée par un dosage protéique de type Bradford (réactif Biorad) contre une gamme de BSA.

5.1.2. Séparation des membranes par flottaison sur un gradient discontinu de saccharose

La séparation des membranes par flottaison sur un gradient discontinu de saccharose est effectuée sur des culots de cellules congelées à -80 °C, préalablement rincées en tampon IEB (5.44 mM KCl, 129.7 mM NaCl, 1.2 mM MgCl₂.6H₂O, 4.2 mM NaHCO₃, 7.3 mM NaH₂PO₄, 63 mM saccharose, 20 mM HEPES pH6.8).

Les culots cellulaires sont remis en suspension dans un tampon 1 (4 mM EDTA, 250 mM saccharose, 1mM PMSF, 50 mM Tris-HCl pH7.4) de façon à ce que la concentration finale de cellules soit de 200.10⁶ cellules/ml, en veillant bien à ce que le volume ne soit pas inférieur à 10 ml.

Les cellules sont lysées aux ultrasons sur glace (petite sonde, pulse 40, intensité 3 pendant 1 minute). Les débris cellulaires et les cellules non lysées sont éliminés par une centrifugation de 3 minutes à 4 °C à 1000 g. Ensuite, 2.67 ml du surnageant sont prélevés puis complétés avec 3.33 ml de tampon 2 (EDTA 4mM, 2.5 M saccharose, 50 mM Tris-HCl pH7.4) de telle sorte que la concentration finale de saccharose soit de 1.5 M dans un volume final de 6 ml.

On dépose 3 ml de cette suspension au fond d'un tube à ultracentrifuger. Au-dessus de cette phase de 3 ml de la suspension à 1.5 M de saccharose contenant les cellules, on dépose d'abord très délicatement 6.5 ml de tampon 3 (1.2 M saccharose, 4 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH7.4) de façon à voir nettement l'interface se former. Ensuite on dépose toujours très délicatement 2.5 ml de tampon 4 (0.8 M saccharose, 4 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH7.4).

Les tubes sont ultracentrifugés pendant 20 heures à 35000 rpm à 4 °C (rotor SW41, Beckmann), sans frein.

Les fractions de 500 µl sont ensuite délicatement récupérées en commençant par la haut du tube, puis analysées (mesure de fluorescence, dosage des protéines totales, FRET).

5.2. Immunodétection du récepteur

5.2.1. SDS-PAGE et Western blot

Les conditions mises au point dans le système *Hansenula polymorpha* n'étant toujours pas satisfaisantes, nous avons apporté de nouvelles modifications au protocole afin d'améliorer les conditions de Western blot.

Après optimisation, nous avons obtenu un très bon résultat sur une préparation de membranes totales déposées sur un gel à 10 % de SDS (voir chapitre 6). Une amélioration significative est observée en rajoutant entre les deux gels du SDS à concentration finale de 0.4 %. La migration est effectuée à ampérage constant sur 15 mA.

Le tampon de transfert a également été modifié. D'un tampon tris-acide borique, nous sommes passé à un tampon tris-glycine (20 mM Tris, 190 mM glycine, 0.01 % SDS, 20 % éthanol). Le transfert est effectué sur la nuit à voltage constant sur 30 V, en présence de glace.

5.2.2. Détection du récepteur

Les anticorps utilisés pour la détection du récepteur sont :

- L'anticorps monoclonal de souris dirigé contre l'EGFP de Roche, dilué à 1/1000
- L'anticorps 4G10 dirigé contre l'extrémité amino-terminale de CXCR4, dilué à 1/1000 (procuré par C. Broder, Département de Virologie et de Microbiologie, Bethesda, Etat-Unis)
- Le sérum polyclonal de chèvre dirigé contre l'extrémité carboxy-terminale de CCR5 de Santa Cruz, dilué à 1/5000

Tous les anticorps sont dilués dans un mélange PBSTL (1X PBS, 0.01 % tween et 5 % lait).

L'anticorps secondaire couplé à la peroxydase est dilué à 1/10000. La révélation se fait par le kit anti-HRP (Horse Raddish Peroxidase) de Pierce selon les recommandations du fournisseur.

6. Fluorescence

6.1. Mesure de fluorescence sur cellules entières

Après des temps variables d'induction, les cellules sont décollées puis comptées. Après trois rinçages en tampon Insect Elliott Buffer IEB (5.44 mM KCl, 129.7 mM NaCl, 1.2 mM MgCl₂.6H₂O, 4.2 mM NaHCO₃, 7.3 mM NaH₂PO₄, 63 mM saccharose, 20 mM HEPES pH6.8), les cellules sont diluées en tampon IEB de façon à ce que la concentration finale soit de 10.10⁶ cellules/ml.

Les mesures de fluorescence sont réalisées à l'aide d'un spectrofluorimètre PTI (Photon Technology International TimeMaster, Bioritech), les fentes d'excitation et d'émission étant réglées à 4 nm. Les suspensions cellulaires sont placées sous agitation dans une chambre thermostatée à 20 °C. La mesure se fait sur 10 millions de cellules. Pour les fractions issues de la préparation de membranes sur gradient de saccharose, la

fluorescence de la totalité de la fraction est mesurée. L'émission de fluorescence de l'EGFP est mesurée à 510 nm en réponse à une excitation à 470 nm.

L'émission de fluorescence d'une quantité connue d'EGFP purifiée a été mesurée dans les mêmes conditions, en présence de suspension de cellules S2 non transfectées, à raison de $10 \cdot 10^6$ cellules, traitées dans les mêmes conditions pour tenir compte de l'éventuelle autofluorescence des cellules.

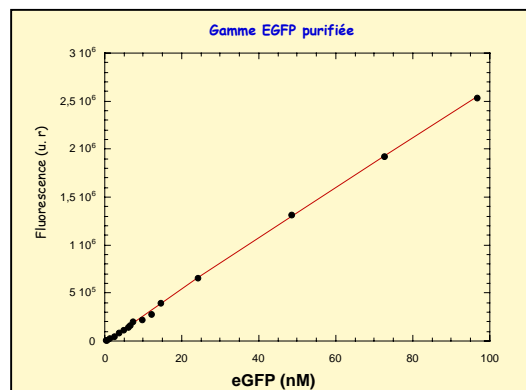


Figure 2 : Gamme étalon de l'EGFP purifiée

La fluorescence total de l'EGFP en concentrations variable est mesurée à 510 nm après excitation à 470 nm

6.2. FRET

Les mesures de FRET sont effectuées sur un spectrofluorimètre Fluorolog (SPEX), les fentes d'émission et d'excitation étant réglées sur 4 nm. Les mesures sont effectuées sur une suspension cellulaire de 1 ml contenant $10 \cdot 10^6$ cellules en tampon IEB. Les cellules sont placées dans une chambre thermostatée à 20 °C sous agitation constante. Le transfert d'énergie de fluorescence est mesuré par diminution de fluorescence de l'EGFP excitée à 470 nm.

Pour les cellules HEK, on travaille dans les mêmes conditions sur $1 \cdot 10^6$ cellules/ml en HEPES/BSA (137.5 mM NaCl, 1.25 mM MgCl₂, 1.25 mM CaCl₂, 6 mM KCl, 5.6 mM glucose, 10 mM HEPES, 0.4 mM NaH₂PO₄, 1 % BSA).

7. Microscopie

7.1. Fixation des cellules S2

Les lamelles préalablement lavées à l'alcool puis recouvertes d'une solution de collagène à 60 µg/ml sont placées dans le fond d'une plaque 24 puits au moment de la dilution des cellules. Le lendemain, les cellules sont induites par addition d'une solution de sulfate de cuivre à 700 µM final.

Après des temps d'induction variable, le milieu de culture est délicatement retiré, et les cellules sont rincées deux fois en PBS. Plusieurs conditions de fixation ont ensuite été testées :

- Fixation au méthanol : sur les cellules rincées, on rajoute 300 μ l de méthanol froid, que l'on laisse agir 4 minutes à -20 °C. Les cellules sont rincées trois fois avec du PBS puis montées entre lame et lamelle (Prolong antifade kit, Molecular Probes).

- Fixation au paraformaldéhyde (PFA) : sur les cellules rincées par du PBS pH7.5, on rajoute 300 μ l de PFA à 4 % en PBS pH7.5 que l'on laisse agir pendant 20 minutes à température ambiante. Après deux lavages de 5 minutes en PBS pH7.5, on rajoute 200 μ l d'une solution à 50 mM de NH_4Cl en PBS pH7.5 que l'on laisse agir pendant 15 minutes pour neutraliser l'autofluorescence du PFA. Les cellules sont rincées trois fois dans du PBS pH7.5 puis montées entre lame et lamelle (Prolong antifade kit, Molecular Probes).

- Fixation au glutaraldéhyde : sur les cellules rincées on rajoute 300 μ l d'une solution de glutaraldéhyde à 2 % que l'on laisse agir pendant 20 minutes à température ambiante. Après deux rinçages en PBS, les cellules sont traitées pendant 10 minutes par addition d'une solution de NaBH_4 à 1 mg/ml dilué en PBS pH8 préparée au dernier moment pour diminuer l'autofluorescence du glutaraldéhyde. Après un deuxième traitement dans les mêmes conditions, les cellules sont rincées trois fois en PBS pH8, puis montées entre lame et lamelle (Prolong antifade kit, Molecular Probes).

- Fixation par un mélange paraformaldéhyde/glutaraldéhyde : sur les cellules rincées on rajoute 200 μ l d'une solution de 4 % PFA + 0.05 % glutaraldéhyde en PBS pendant 20 minutes à température ambiante. Après deux rinçages en PBS, les cellules sont traitées pendant 10 minutes par addition d'une solution de NaBH_4 à 1 mg/ml dilué en PBS pH8 préparée au dernier moment pour diminuer l'autofluorescence du glutaraldéhyde. Après un deuxième traitement dans les mêmes conditions, les cellules sont rincées trois fois en PBS pH8, puis montées entre lame et lamelle (Prolong antifade kit, Molecular Probes).

7.2. Epifluorescence

Pour les observations sur cellules vivantes, les cellules sont prélevées directement dans le milieu de culture et placées simplement entre lame et lamelle sans rinçage. Les échantillons sont observés sur un microscope à épifluorescence droit Leica ou Zeiss.

8. Solubilisation des récepteurs

La solubilisation est réalisée directement sur cellules S2 entières. Après induction, les cellules sont collectées par une centrifugation de 5 minutes à 1000 rpm (rotor Jouan GR412), et lavées trois fois dans un tampon Tris-saccharose 320 mM. Le culot est remis en suspension dans 9 volumes de tampon de solubilisation (4 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 10 % glycérol, 1 % Nonidet P-40, 50 mM Tris pH 7.4). La solubilisation est effectuée pendant deux heures à 4 °C sous agitation. Les échantillons sont centrifugés pendant 1 heure à 100000 g à 4 °C puis la quantité de protéines solubilisées est estimée par mesure de la fluorescence de l'EGFP dans les surnageant.

CHAPITRE 9

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

L'obtention de la structure cristallographique d'une protéine nécessite d'obtenir de grandes quantités de cette protéine pure et fonctionnelle, aussi proche que possible de son état natif. De nombreux systèmes d'expression sont décrits dans la littérature pour la production de protéines membranaires, mais le choix du système doit être guidé par la protéine considérée.

Dans le cadre des études structurales envisagées, plusieurs laboratoires se sont réunis afin de former un consortium soutenu et financé par l'ANRS depuis juillet 2000, en testant plusieurs systèmes d'expression hétérologues pour produire les récepteurs de chimiokines CCR5 et CXCR4, principaux co-récepteurs du VIH-1. Chaque groupe était initialement en charge de tester un système d'expression utilisant comme hôte des organismes appartenant aux quatre familles principales : bactéries, levures, cellules d'insectes et cellules mammifères.

Dans le cadre de ce réseau nous avons choisi de tester un système innovant utilisant comme organisme hôte la levure méthylotrophe *Hansenula polymorpha*, en adressant les protéines surexprimées vers des organelles intracellulaires que sont les péroxisomes. Nos différents résultats ont prouvé que ce système n'était pas du tout adapté à la production des récepteurs de chimiokines, qui n'ont pas pu être solubilisés, et qui semblent être produits sous forme d'agrégats indissociables. Ce système d'expression n'avait encore jamais été décrit pour la production de RCPG, et même s'il n'a pas été retenu pour la production des récepteurs CCR5 et CXCR4, le concept de prolifération des membranes péroxisomales reste très attractif. Néanmoins, ce système ne pourra être validé que lorsque les processus de biogenèse des péroxisomes chez *Hansenula polymorpha* seront mieux maîtrisés. Dans le but de valider ce système, nous avons choisi d'exprimer différentes constructions des récepteurs NK2 des tachykinines et hMOR des opiacés fusionnés à l'EGFP. Néanmoins, avant d'entreprendre de telles expériences, il faudra tester l'efficacité de la séquence *Hppex3* qui a été décrite comme une protéine localisée au niveau de la face interne des péroxisomes, mais ne possédant pas de domaine transmembranaire.

Face aux problèmes insolubles rencontrés avec ce système levure, nous avons testé un deuxième système d'expression déjà utilisé au laboratoire pour produire le récepteur mu des opiacés (hMOR), reposant sur une expression stable et inductible du récepteur dans les cellules de drosophile S2. Nous avons également choisi de fusionner ces récepteurs à la GFP améliorée (EGFP), d'une part pour valider le système d'expression S2 en utilisant l'EGFP comme séquence étiquette au moment des différentes étapes d'expression, de solubilisation et de purification, mais également en utilisant l'EGFP comme outil pharmacologique dans le cadre d'un test FRET.

Malheureusement, toutes les optimisations réalisées au laboratoire avec le récepteur EGFP.hMOR n'ont pas été directement transposables aux récepteurs CCR5 et CXCR4, et un long travail d'optimisation a tout de même dû être réalisé avant d'aboutir à des taux d'expression satisfaisants. Nous avons montré dans un premier temps que le taux d'expression total du récepteur augmentait avec le temps d'induction, mais cette augmentation semblait corrélée avec une apparition de structures fluorescentes intracellulaires. Nous avons pu montrer qu'en effet, une partie du récepteur semble être séquestrée à l'intérieur de la cellule, et que ce récepteur semble se localiser au niveau des membranes lourdes. Il existerait deux voire trois populations de récepteurs, une très faible partie correspondant aux membranes de faible densité, et deux populations très importantes correspondant aux membranes lourdes, mais aussi à d'autres structures qui ne sédimentent pas sur le gradient de saccharose, et dont la nature reste à identifier. Nous avons également observé par mesure de fluorescence de l'EGFP que le tri sur billes immunomagnétiques permettait d'augmenter significativement le taux d'expression total du récepteur. Enfin, un résultat très préliminaire semble montrer que le NP-40 pourrait solubiliser une partie des récepteurs CCR5 et CXCR4 exprimés dans les cellules S2. Il semblerait également qu'une partie du récepteur produit en cellules S2 soit dans une conformation lui permettant de lier ses ligands comme le montrent les premiers résultats de FRET observés pour le récepteur EGFP.CXCR4.

Néanmoins de nombreuses améliorations doivent être apportées au système afin d'obtenir des quantités de récepteurs plus importantes pour les études structurales envisagées dans le cadre du réseau ANRS. Il faudrait notamment caractériser les trois populations de récepteurs produites en identifiant les compartiments dans lesquels le récepteur est séquestré par des études de microscopie confocale plus poussées en utilisant des marqueurs spécifiques des différents compartiments intracellulaires. Il faudrait également tenter de solubiliser le récepteur produit dans ces membranes lourdes et tester sa capacité à lier ses ligands lorsqu'il est solubilisé.

Par ailleurs, les essais très préliminaires ont permis de montrer qu'il était possible d'observer un faible transfert d'énergie sur des cellules exprimant le récepteur EGFP.CXCR4 incubées en présence de SDF-1-TR. La technique se doit d'être très largement optimisée notamment en améliorant la méthode de préparation de membranes totales, ou par flottaison, afin de s'affranchir de l'importante fluorescence intracellulaire qui contribue sans doute à masquer une partie du signal FRET. Dans le cas de CCR5, aucun transfert d'énergie n'a pu être mis en évidence avec le ligand dont nous disposons.

Ce système pourrait être développé afin d'être utilisé pour des études de criblage menées par un second consortium financé par l'ANRS et coordonné par Jean-Luc Galzi qui vise à identifier de nouveaux ligands des récepteurs CCR5 et CXCR4. Le test FRET mis au point pour le criblage utilise le récepteur EGFP.CXCR4 exprimé en cellules HEK293. Or ces cellules sont très bien adaptées pour un criblage à petit voire moyen débit, mais la lourdeur liée à la culture de ces cellules les rend difficilement utilisables pour un criblage à grande échelle, du moins avec les moyens dont nous disposons dans nos laboratoires. Les cellules S2 pourraient être un bon outil pour un tel criblage, puisqu'il est facile de les cultiver à grande échelle.

Pour toutes ces étapes, l'EGFP sera un outil indispensable pour détecter le récepteur au moment de l'expression, de la solubilisation et de la purification, mais aussi pour caractériser le récepteur en utilisant la technologie FRET.

BIBLIOGRAPHIE

- Ali, H., R. M. Richardson, B. Haribabu and R. Snyderman (1999). "Chemoattractant receptor cross-desensitization." J Biol Chem **274**(10): 6027-30.
- Ali, S., A. C. Palmer, B. Banerjee, S. J. Fritchley and J. A. Kirby (2000). "Examination of the function of RANTES, MIP-1alpha, and MIP-1beta following interaction with heparin-like glycosaminoglycans." J Biol Chem **275**(16): 11721-7.
- Alkhatib, G., M. Locati, P. E. Kennedy, P. M. Murphy and E. A. Berger (1997). "HIV-1 coreceptor activity of CCR5 and its inhibition by chemokines: independence from G protein signaling and importance of coreceptor downmodulation." Virology **234**(2): 340-8.
- Allen, J. A., J. Z. Yu, R. J. Donati and M. M. Rasenick (2005). "Beta-adrenergic receptor stimulation promotes G alpha s internalization through lipid rafts: a study in living cells." Mol Pharmacol **67**(5): 1493-504.
- Altmeyer, R. (2004). "Virus attachment and entry offer numerous targets for antiviral therapy." Curr Pharm Des **10**(30): 3701-12.
- Alvarez Losada, S., C. Canto-Nogues and M. A. Munoz-Fernandez (2002). "A new possible mechanism of human immunodeficiency virus type 1 infection of neural cells." Neurobiol Dis **11**(3): 469-78.
- Amara, A., S. L. Gall, O. Schwartz, J. Salamero, M. Montes, P. Loetscher, M. Baggiolini, J. L. Virelizier and F. Arenzana-Seisdedos (1997). "HIV coreceptor downregulation as antiviral principle: SDF-1alpha-dependent internalization of the chemokine receptor CXCR4 contributes to inhibition of HIV replication." J Exp Med **186**(1): 139-46.
- Amara, A., A. Vidy, G. Boulla, K. Mollier, J. Garcia-Perez, J. Alcami, C. Blanpain, M. Parmentier, J. L. Virelizier, P. Charneau and F. Arenzana-Seisdedos (2003). "G protein-dependent CCR5 signaling is not required for efficient infection of primary T lymphocytes and macrophages by R5 human immunodeficiency virus type 1 isolates." J Virol **77**(4): 2550-8.
- Andres, P. G., P. L. Beck, E. Mizoguchi, A. Mizoguchi, A. K. Bhan, T. Dawson, W. A. Kuziel, N. Maeda, R. P. MacDermott, D. K. Podolsky and H. C. Reinecker (2000). "Mice with a selective deletion of the CC chemokine receptors 5 or 2 are protected from dextran sodium sulfate-mediated colitis: lack of CC chemokine receptor 5 expression results in a NK1.1+ lymphocyte-associated Th2-type immune response in the intestine." J Immunol **164**(12): 6303-12.
- Angers, S., A. Salahpour, E. Joly, S. Hilairet, D. Chelsky, M. Dennis and M. Bouvier (2000). "Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET)." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(7): 3684-9.
- Angers, S., A. Salahpour and M. Bouvier (2002). "Dimerization: an emerging concept for G protein-coupled receptor ontogeny and function." Annu Rev Pharmacol Toxicol **42**: 409-35.
- Ansari-Lari, M. A., X. M. Liu, M. L. Metzker, A. R. Rut and R. A. Gibbs (1997). "The extent of genetic variation in the CCR5 gene." Nat Genet **16**(3): 221-2.

- Appay, V. and S. L. Rowland-Jones (2001). "RANTES: a versatile and controversial chemokine." Trends Immunol **22**(2): 83-7.
- Aquaro, S., P. Menten, S. Struyf, P. Proost, J. Van Damme, E. De Clercq and D. Schols (2001). "The LD78beta isoform of MIP-1alpha is the most potent CC-chemokine in inhibiting CCR5-dependent human immunodeficiency virus type 1 replication in human macrophages." J Virol **75**(9): 4402-6.
- Arakaki, R., H. Tamamura, M. Premanathan, K. Kanbara, S. Ramanan, K. Mochizuki, M. Baba, N. Fujii and H. Nakashima (1999). "T134, a small-molecule CXCR4 inhibitor, has no cross-drug resistance with AMD3100, a CXCR4 antagonist with a different structure." J Virol **73**(2): 1719-23.
- Aramori, I., S. S. Ferguson, P. D. Bieniasz, J. Zhang, B. Cullen and M. G. Cullen (1997). "Molecular mechanism of desensitization of the chemokine receptor CCR-5: receptor signaling and internalization are dissociable from its role as an HIV-1 co-receptor." Embo J **16**(15): 4606-16.
- Arenzana-Seisdedos, F., J. L. Virelizier, D. Rousset, I. Clark-Lewis, P. Loetscher, B. Moser and M. Baggiolini (1996). "HIV blocked by chemokine antagonist." Nature **383**(6599): 400.
- Arias, D. A., J. M. Navenot, W. B. Zhang, J. Broach and S. C. Peiper (2003). "Constitutive activation of CCR5 and CCR2 induced by conformational changes in the conserved TXP motif in transmembrane helix 2." J Biol Chem **278**(38): 36513-21.
- Asmann, Y. W., M. Dong and L. J. Miller (2004). "Functional characterization and purification of the secretin receptor expressed in baculovirus-infected insect cells." Regul Pept **123**(1-3): 217-23.
- Baba, M., O. Nishimura, N. Kanzaki, M. Okamoto, H. Sawada, Y. Iizawa, M. Shiraishi, Y. Aramaki, K. Okonogi, Y. Ogawa, K. Meguro and M. Fujino (1999). "A small-molecule, nonpeptide CCR5 antagonist with highly potent and selective anti-HIV-1 activity." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(10): 5698-703.
- Babcock, G. J., T. Mirzabekov, W. Wojtowicz and J. Sodroski (2001). "Ligand binding characteristics of CXCR4 incorporated into paramagnetic proteoliposomes." J Biol Chem **276**(42): 38433-40.
- Babcock, G. J., M. Farzan and J. Sodroski (2003). "Ligand-independent dimerization of CXCR4, a principal HIV-1 coreceptor." J Biol Chem **278**(5): 3378-85.
- Bacon, K. B., M. C. Szabo, H. Yssel, J. B. Bolen and T. J. Schall (1996). "RANTES induces tyrosine kinase activity of stably complexed p125FAK and ZAP-70 in human T cells." J Exp Med **184**(3): 873-82.
- Bacon, K. B., T. J. Schall and D. J. Dairaghi (1998). "RANTES activation of phospholipase D in Jurkat T cells: requirement of GTP-binding proteins ARF and RhoA." J Immunol **160**(4): 1894-900.
- Baenziger, J. E., M. L. Morris, T. E. Darsaut and S. E. Ryan (2000). "Effect of membrane lipid composition on the conformational equilibria of the nicotinic acetylcholine receptor." J Biol Chem **275**(2): 777-84.
- Baerends, R. J., K. N. Faber, A. M. Kram, J. A. Kiel, I. J. van der Klei and M. Veenhuis (2000). "A stretch of positively charged amino acids at the N terminus of

- Hansenula polymorpha Pex3p is involved in incorporation of the protein into the peroxisomal membrane." J Biol Chem **275**(14): 9986-95.
- Baggiolini, M., B. Dewald and B. Moser (1997). "Human chemokines: an update." Annu Rev Immunol **15**: 675-705.
- Bai, M. (2004). "Dimerization of G-protein-coupled receptors: roles in signal transduction." Cell Signal **16**(2): 175-86.
- Bai, X., J. D. Chen, A. G. Yang, F. Torti and S. Y. Chen (1998). "Genetic co-inactivation of macrophage- and T-tropic HIV-1 chemokine coreceptors CCR-5 and CXCR-4 by intrakines." Gene Ther **5**(7): 984-94.
- Baldwin, C. E., R. W. Sanders and B. Berkhout (2003). "Inhibiting HIV-1 entry with fusion inhibitors." Curr Med Chem **10**(17): 1633-42.
- Baldwin, J. M. (1993). "The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors." Embo J **12**(4): 1693-703.
- Baldwin, J. M., G. F. Schertler and V. M. Unger (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.
- Baneres, J. L., A. Martin, P. Hullot, J. P. Girard, J. C. Rossi and J. Parello (2003). "Structure-based analysis of GPCR function: conformational adaptation of both agonist and receptor upon leukotriene B4 binding to recombinant BLT1." J Mol Biol **329**(4): 801-14.
- Baneres, J. L. and J. Parello (2003). "Structure-based analysis of GPCR function: evidence for a novel pentameric assembly between the dimeric leukotriene B4 receptor BLT1 and the G-protein." J Mol Biol **329**(4): 815-29.
- Baneres, J. L., D. Mesnier, A. Martin, L. Joubert, A. Dumuis and J. Bockaert (2005). "Molecular characterization of a purified 5-HT4 receptor: a structural basis for drug efficacy." J Biol Chem **280**(21): 20253-60.
- Bannert, N., S. Craig, M. Farzan, D. Sogah, N. V. Santo, H. Choe and J. Sodroski (2001). "Sialylated O-glycans and sulfated tyrosines in the NH2-terminal domain of CC chemokine receptor 5 contribute to high affinity binding of chemokines." J Exp Med **194**(11): 1661-73.
- Barbaro, G., A. Scozzafava, A. Mastrolorenzo and C. T. Supuran (2005). "Highly active antiretroviral therapy: current state of the art, new agents and their pharmacological interactions useful for improving therapeutic outcome." Curr Pharm Des **11**(14): 1805-43.
- Barnett-Norris, J., D. Lynch and P. H. Reggio (2005). "Lipids, lipid rafts and caveolae: Their importance for GPCR signaling and their centrality to the endocannabinoid system." Life Sci **77**(14): 1625-39.
- Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dautquet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum and L. Montagnier (1983). "Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." Science **220**(4599): 868-71.
- Benjamin, D. R., D. W. Markby, H. R. Bourne and I. D. Kuntz (1995). "Solution structure of the GTPase activating domain of alpha s." J Mol Biol **254**(4): 681-91.

- Benkirane, M., D. Y. Jin, R. F. Chun, R. A. Koup and K. T. Jeang (1997). "Mechanism of transdominant inhibition of CCR5-mediated HIV-1 infection by ccr5delta32." J Biol Chem **272**(49): 30603-6.
- Benting, J., S. Lecat, D. Zacchetti and K. Simons (2000). "Protein expression in Drosophila Schneider cells." Anal Biochem **278**(1): 59-68.
- Bernard, A. R., T. A. Kost, L. Overton, C. Cavegn, J. Young, M. Bertrand, Z. Yahia-Cherif, C. Chabert and A. Mills (1994). "Recombinant protein expression in a Drosophila cell line: comparison with the baculovirus system." Cytotechnology **15**(1-3): 139-44.
- Berson, J. F. and R. W. Doms (1998). "Structure-function studies of the HIV-1 coreceptors." Semin Immunol **10**(3): 237-48.
- Bhatnagar, A., D. J. Sheffler, W. K. Kroeze, B. Compton-Toth and B. L. Roth (2004). "Caveolin-1 interacts with 5-HT_{2A} serotonin receptors and profoundly modulates the signaling of selected G α q-coupled protein receptors." J Biol Chem **279**(33): 34614-23.
- Birschmann, I., A. K. Stroobants, M. van den Berg, A. Schafer, K. Rosenkranz, W. H. Kunau and H. F. Tabak (2003). "Pex15p of *Saccharomyces cerevisiae* provides a molecular basis for recruitment of the AAA peroxin Pex6p to peroxisomal membranes." Mol Biol Cell **14**(6): 2226-36.
- Blanpain, C., B. J. Doranz, J. Vakili, J. Rucker, C. Govaerts, S. S. Baik, O. Lorthioir, I. Migeotte, F. Libert, F. Baleux, G. Vassart, R. W. Doms and M. Parmentier (1999a). "Multiple charged and aromatic residues in CCR5 amino-terminal domain are involved in high affinity binding of both chemokines and HIV-1 Env protein." J Biol Chem **274**(49): 34719-27.
- Blanpain, C., B. Lee, J. Vakili, B. J. Doranz, C. Govaerts, I. Migeotte, M. Sharron, V. Dupriez, G. Vassart, R. W. Doms and M. Parmentier (1999b). "Extracellular cysteines of CCR5 are required for chemokine binding, but dispensable for HIV-1 coreceptor activity." J Biol Chem **274**(27): 18902-8.
- Blanpain, C., I. Migeotte, B. Lee, J. Vakili, B. J. Doranz, C. Govaerts, G. Vassart, R. W. Doms and M. Parmentier (1999c). "CCR5 binds multiple CC-chemokines: MCP-3 acts as a natural antagonist." Blood **94**(6): 1899-905.
- Blanpain, C., B. Lee, M. Tackoen, B. Puffer, A. Boom, F. Libert, M. Sharron, V. Wittamer, G. Vassart, R. W. Doms and M. Parmentier (2000). "Multiple nonfunctional alleles of CCR5 are frequent in various human populations." Blood **96**(5): 1638-45.
- Blanpain, C., V. Wittamer, J. M. Vanderwinden, A. Boom, B. Renneboog, B. Lee, E. Le Poul, L. El Asmar, C. Govaerts, G. Vassart, R. W. Doms and M. Parmentier (2001). "Palmitoylation of CCR5 is critical for receptor trafficking and efficient activation of intracellular signaling pathways." J Biol Chem **276**(26): 23795-804.
- Blanpain, C., F. Libert, G. Vassart and M. Parmentier (2002a). "CCR5 and HIV infection." Receptors Channels **8**(1): 19-31.
- Blanpain, C., J. M. Vanderwinden, J. Cihak, V. Wittamer, E. Le Poul, H. Issafras, M. Stangassinger, G. Vassart, S. Marullo, D. Schlindorff, M. Parmentier and M. Mack (2002b). "Multiple active states and oligomerization of CCR5 revealed by functional properties of monoclonal antibodies." Mol Biol Cell **13**(2): 723-37.

- Blanpain, C., B. J. Doranz, A. Bondue, C. Govaerts, A. De Leener, G. Vassart, R. W. Doms, A. Proudfoot and M. Parmentier (2003). "The core domain of chemokines binds CCR5 extracellular domains while their amino terminus interacts with the transmembrane helix bundle." J Biol Chem **278**(7): 5179-87.
- Bleul, C. C., M. Farzan, H. Choe, C. Parolin, I. Clark-Lewis, J. Sodroski and T. A. Springer (1996a). "The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry." Nature **382**(6594): 829-33.
- Bleul, C. C., R. C. Fuhlbrigge, J. M. Casasnovas, A. Aiuti and T. A. Springer (1996b). "A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)." J Exp Med **184**(3): 1101-9.
- Bockaert, J. and J. P. Pin (1999). "Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success." Embo J **18**(7): 1723-9.
- Bokman, S. H. and W. W. Ward (1981). "Renaturation of *Aequorea* green-fluorescent protein." Biochem Biophys Res Commun **101**(4): 1372-80.
- Bouvier, M. (2001). "Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors." Nat Rev Neurosci **2**(4): 274-86.
- Brandt, S. M., R. Mariani, A. U. Holland, T. J. Hope and N. R. Landau (2002). "Chemokine-mediated block to HIV entry is associated with CCR5 internalization efficiency." J Biol Chem **277**: 8.
- Brelot, A., N. Heveker, M. Montes and M. Alizon (2000). "Identification of residues of CXCR4 critical for human immunodeficiency virus coreceptor and chemokine receptor activities." J Biol Chem **275**(31): 23736-44.
- Briggs, J. A., M. N. Simon, I. Gross, H. G. Krausslich, S. D. Fuller, V. M. Vogt and M. C. Johnson (2004). "The stoichiometry of Gag protein in HIV-1." Nat Struct Mol Biol **11**(7): 672-5.
- Brzostowski, J. A. and A. R. Kimmel (2001). "Signaling at zero G: G-protein-independent functions for 7-TM receptors." Trends Biochem Sci **26**(5): 291-7.
- Buckingham, S. D., K. Matsuda, A. M. Hosie, H. A. Baylis, M. D. Squire, S. J. Lansdell, N. S. Millar and B. Sattelle (1996). "Wild-type and insecticide-resistant homo-oligomeric GABA receptors of *Drosophila melanogaster* stably expressed in a *Drosophila* cell line." Neuropharmacology **35**(9-10): 1393-401.
- Bulenger, S., S. Marullo and M. Bouvier (2005). "Emerging role of homo- and heterodimerization in G-protein-coupled receptor biosynthesis and maturation." Trends Pharmacol Sci **26**(3): 131-7.
- Burns, J. M., G. K. Lewis and A. L. DeVico (1999). "Soluble complexes of regulated upon activation, normal T cells expressed and secreted (RANTES) and glycosaminoglycans suppress HIV-1 infection but do not induce Ca(2+) signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(25): 14499-504.
- Burton, D. R., R. C. Desrosiers, R. W. Doms, W. C. Koff, P. D. Kwong, J. P. Moore, G. J. Nabel, J. Sodroski, I. A. Wilson and R. T. Wyatt (2004). "HIV vaccine design and the neutralizing antibody problem." Nat Immunol **5**(3): 233-6.
- Canals, M., J. Burgueno, D. Marcellino, N. Cabello, E. I. Canela, J. Mallol, L. Agnati, S. Ferre, M. Bouvier, K. Fuxe, F. Ciruela, C. Lluís and R. Franco (2004). "Homodimerization of adenosine A2A receptors: qualitative and quantitative

- assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer." J Neurochem **88**(3): 726-34.
- Carnec, X., L. Quan, W. C. Olson, U. Hazan and T. Dragic (2005). "Anti-CXCR4 monoclonal antibodies recognizing overlapping epitopes differ significantly in their ability to inhibit entry of human immunodeficiency virus type 1." J Virol **79**(3): 1930-3.
- Carrington, M., T. Kissner, B. Gerrard, S. Ivanov, S. J. O'Brien and M. Dean (1997). "Novel alleles of the chemokine-receptor gene CCR5." Am J Hum Genet **61**(6): 1261-7.
- Caruz, A., M. Samsom, J. M. Alonso, J. Alcami, F. Baleux, J. L. Virelizier, M. Parmentier and F. Arenzana-Seisdedos (1998). "Genomic organization and promoter characterization of human CXCR4 gene." FEBS Lett **426**(2): 271-8.
- Cereghino, G. P. and J. M. Cregg (1999). "Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis." Curr Opin Biotechnol **10**(5): 422-7.
- Chabot, D. J., P. F. Zhang, G. V. Quinnan and C. C. Broder (1999). "Mutagenesis of CXCR4 identifies important domains for human immunodeficiency virus type 1 X4 isolate envelope-mediated membrane fusion and virus entry and reveals cryptic coreceptor activity for R5 isolates." J Virol **73**(8): 6598-609.
- Chabot, D. J., H. Chen, D. S. Dimitrov and C. C. Broder (2000). "N-linked glycosylation of CXCR4 masks coreceptor function for CCR5-dependent human immunodeficiency virus type 1 isolates." J Virol **74**(9): 4404-13.
- Chanel, C., I. Staropoli, F. Baleux, A. Amara, A. Valenzuela-Fernandez, J. L. Virelizier, F. Arenzana-Seisdedos and R. Altmeyer (2002). "Low levels of co-receptor CCR5 are sufficient to permit HIV envelope-mediated fusion with resting CD4 T cells." Aids **16**(17): 2337-40.
- Chasse, S. A. and H. G. Dohlman (2003). "RGS proteins: G protein-coupled receptors meet their match." Assay Drug Dev Technol **1**(2): 357-64.
- Chelli, M. and M. Alizon (2002). "Rescue of HIV-1 receptor function through cooperation between different forms of the CCR5 chemokine receptor." J Biol Chem **277**(42): 39388-96.
- Chen, C., J. Li, G. Bot, I. Szabo, T. J. Rogers and L. Y. Liu-Chen (2004a). "Heterodimerization and cross-desensitization between the mu-opioid receptor and the chemokine CCR5 receptor." Eur J Pharmacol **483**(2-3): 175-86.
- Chen, G. Q. and J. E. Gouaux (1996). "Overexpression of bacterio-opsin in Escherichia coli as a water-soluble fusion to maltose binding protein: efficient regeneration of the fusion protein and selective cleavage with trypsin." Protein Sci **5**(3): 456-67.
- Chen, J. D., X. Bai, A. G. Yang, Y. Cong and S. Y. Chen (1997). "Inactivation of HIV-1 chemokine co-receptor CXCR-4 by a novel intrakine strategy." Nat Med **3**(10): 1110-6.
- Chen, L. E., C. Gao, J. Chen, X. J. Xu, D. H. Zhou and Z. Q. Chi (2003). "Internalization and recycling of human mu opioid receptors expressed in Sf9 insect cells." Life Sci **73**(1): 115-28.

- Chen, W., X. R. Ren, C. D. Nelson, L. S. Barak, J. K. Chen, P. A. Beachy, F. de Sauvage and R. J. Lefkowitz (2004b). "Activity-dependent internalization of smoothed mediated by beta-arrestin 2 and GRK2." Science **306**(5705): 2257-60.
- Chinen, J. and W. T. Shearer (2002). "Molecular virology and immunology of HIV infection." J Allergy Clin Immunol **110**(2): 189-98.
- Choe, H., M. Farzan, Y. Sun, N. Sullivan, B. Rollins, P. D. Ponath, L. Wu, C. R. Mackay, G. LaRosa, W. Newman, N. Gerard, C. Gerard and J. Sodroski (1996). "The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates." Cell **85**(7): 1135-48.
- Civelli, O. (2005). "GPCR deorphanizations: the novel, the known and the unexpected transmitters." Trends Pharmacol Sci **26**(1): 15-9.
- Claing, A., S. A. Laporte, M. G. Caron and R. J. Lefkowitz (2002). "Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins." Prog Neurobiol **66**(2): 61-79.
- Clapham, D. E. and E. J. Neer (1997). "G protein beta gamma subunits." Annu Rev Pharmacol Toxicol **37**: 167-203.
- Cocchi, F., A. L. DeVico, A. Garzino-Demo, S. K. Arya, R. C. Gallo and P. Lusso (1995). "Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells." Science **270**(5243): 1811-5.
- Combadiere, C., S. K. Ahuja and P. M. Murphy (1996). "Cloning and functional expression of a human eosinophil CC chemokine receptor." J Biol Chem **271**(18): 11034.
- Cordova, D., V. R. Delpech, D. B. Sattelle and J. J. Rauh (2003). "Spatiotemporal calcium signaling in a Drosophila melanogaster cell line stably expressing a Drosophila muscarinic acetylcholine receptor." Invert Neurosci **5**(1): 19-28.
- Cormier, E. G., M. Persuh, D. A. Thompson, S. W. Lin, T. P. Sakmar, W. C. Olson and T. Dragic (2000). "Specific interaction of CCR5 amino-terminal domain peptides containing sulfotyrosines with HIV-1 envelope glycoprotein gp120." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(11): 5762-7.
- Cormier, E. G., D. N. Tran, L. Yukhayeva, W. C. Olson and T. Dragic (2001). "Mapping the determinants of the CCR5 amino-terminal sulfopeptide interaction with soluble human immunodeficiency virus type 1 gp120-CD4 complexes." J Virol **75**(12): 5541-9.
- Cotecchia, S., S. Exum, M. G. Caron and R. J. Lefkowitz (1990). "Regions of the alpha 1-adrenergic receptor involved in coupling to phosphatidylinositol hydrolysis and enhanced sensitivity of biological function." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(8): 2896-900.
- Couet, J., S. Li, T. Okamoto, T. Ikezu and M. P. Lisanti (1997). "Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins." J Biol Chem **272**(10): 6525-33.
- Couty, J. P. and M. C. Gershengorn (2004). "Insights into the viral G protein-coupled receptor encoded by human herpesvirus type 8 (HHV-8)." Biol Cell **96**(5): 349-54.
- Craft, C. M., D. H. Whitmore and A. F. Wiechmann (1994). "Cone arrestin identified by targeting expression of a functional family." J Biol Chem **269**(6): 4613-9.

- Crump, M. P., J. H. Gong, P. Loetscher, K. Rajarathnam, A. Amara, F. Arenzana-Seisdedos, J. L. Virelizier, M. Baggiolini, B. D. Sykes and I. Clark-Lewis (1997). "Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1." Embo J **16**(23): 6996-7007.
- Dairaghi, D. J., K. Franz-Bacon, E. Callas, J. Cupp, T. J. Schall, S. A. Tamraz, S. A. Boehme, N. Taylor and K. B. Bacon (1998). "Macrophage inflammatory protein-1 β induces migration and activation of human thymocytes." Blood **91**(8): 2905-13.
- Davis, C. B., I. Dikic, D. Unutmaz, C. M. Hill, J. Arthos, M. A. Siani, D. A. Thompson, J. Schlessinger and D. R. Littman (1997). "Signal transduction due to HIV-1 envelope interactions with chemokine receptors CXCR4 or CCR5." J Exp Med **186**(10): 1793-8.
- De Clercq, E. (2000). "Inhibition of HIV infection by bicyclams, highly potent and specific CXCR4 antagonists." Mol Pharmacol **57**(5): 833-9.
- De Clercq, E. (2001). "new developments in anti-HIV chemotherapy." il farmaco **56**: 3-12.
- De Clercq, E. (2003). "The bicyclam AMD3100 story." Nat Rev Drug Discov **2**(7): 581-7.
- De Rivoyre, M., F. Bonino, L. Ruel, M. Bidet, P. Therond and I. Mus-Veteau (2005). "Human receptor Smoothed, a mediator of Hedgehog signalling, expressed in its native conformation in yeast." FEBS Lett **579**(6): 1529-33.
- Dean, M., M. Carrington, C. Winkler, G. A. Huttley, M. W. Smith, R. Allikmets, J. J. Goedert, S. P. Buchbinder, E. Vittinghoff, E. Gomperts, S. Donfield, D. Vlahov, R. Kaslow, A. Saah, C. Rinaldo, R. Detels and S. J. O'Brien (1996). "Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the *CCR5* structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study." Science **273**(5283): 1856-62.
- Dean, M. K., C. Higgs, R. E. Smith, R. P. Bywater, C. R. Snell, P. D. Scott, G. J. Upton, T. J. Howe and C. A. Reynolds (2001). "Dimerization of G-protein-coupled receptors." J Med Chem **44**(26): 4595-614.
- Del Corno, M., Q. H. Liu, D. Schols, E. de Clercq, S. Gessani, B. D. Freedman and R. G. Collman (2001). "HIV-1 gp120 and chemokine activation of Pyk2 and mitogen-activated protein kinases in primary macrophages mediated by calcium-dependent, pertussis toxin-insensitive chemokine receptor signaling." Blood **98**(10): 2909-16.
- Deng, H., R. Liu, W. Ellmeier, S. Choe, D. Unutmaz, M. Burkhart, P. Di Marzio, S. Marmon, R. E. Sutton, C. M. Hill, C. B. Davis, S. C. Peiper, T. J. Schall, D. R. Littman and N. R. Landau (1996). "Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1." Nature **381**(6584): 661-6.
- Detton, M., A. Pasquato, C. Scarinci, M. Zanchetta, A. De Rossi and C. Di Bello (2004). "Anti-HIV activity and conformational studies of peptides derived from the C-terminal sequence of SDF-1." J Med Chem **47**(12): 3058-64.
- Dikic, I. and A. Blaukat (1999). "Protein tyrosine kinase-mediated pathways in G protein-coupled receptor signaling." Cell Biochem Biophys **30**(3): 369-87.

- Dinger, M. C., J. E. Bader, A. D. Kobor, A. K. Kretzschmar and A. G. Beck-Sickinger (2003). "Homodimerization of neuropeptide γ receptors investigated by fluorescence resonance energy transfer in living cells." J Biol Chem **278**(12): 10562-71.
- Dixon, R. A., B. K. Kobilka, D. J. Strader, J. L. Benovic, H. G. Dohlmans, T. Frielle, M. A. Bolanowski, C. D. Bennett, E. Rands, R. E. Diehl and et al. (1986). "Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin." Nature **321**(6065): 75-9.
- Dolby, V., A. Collen, A. Lundqvist and P. Cronet (2004). "Overexpression and functional characterisation of the human melanocortin 4 receptor in Sf9 cells." Protein Expr Purif **37**(2): 455-61.
- Dolph, P. J., R. Ranganathan, N. J. Colley, R. W. Hardy, M. Socolich and C. S. Zuker (1993). "Arrestin function in inactivation of G protein-coupled receptor rhodopsin in vivo." Science **260**(5116): 1910-6.
- Doms, R. W. and D. Trono (2000). "The plasma membrane as a combat zone in the HIV battlefield." Genes Dev **14**(21): 2677-88.
- Donzella, G. A., D. Schols, S. W. Lin, J. A. Este, K. A. Nagashima, P. J. Maddon, G. P. Allaway, T. P. Sakmar, G. Henson, E. De Clercq and J. P. Moore (1998). "AMD3100, a small molecule inhibitor of HIV-1 entry via the CXCR4 co-receptor." Nat Med **4**(1): 72-7.
- Doranz, B. J., J. Rucker, Y. Yi, R. J. Smyth, M. Samson, S. C. Peiper, M. Parmentier, R. G. Collman and R. W. Doms (1996). "A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors." Cell **85**(7): 1149-58.
- Doranz, B. J., K. Grovit-Ferbas, M. P. Sharron, S. H. Mao, M. B. Goetz, E. S. Daar, R. W. Doms and W. A. O'Brien (1997a). "A small-molecule inhibitor directed against the chemokine receptor CXCR4 prevents its use as an HIV-1 coreceptor." J Exp Med **186**(8): 1395-400.
- Doranz, B. J., Z. H. Lu, J. Rucker, T. Y. Zhang, M. Sharron, Y. H. Cen, Z. X. Wang, H. H. Guo, J. G. Du, M. A. Accavitti, R. W. Doms and S. C. Peiper (1997b). "Two distinct CCR5 domains can mediate coreceptor usage by human immunodeficiency virus type 1." J Virol **71**(9): 6305-14.
- Doranz, B. J., M. J. Orsini, J. D. Turner, T. L. Hoffman, J. F. Berson, J. A. Hoxie, S. C. Peiper, L. F. Brass and R. W. Doms (1999). "Identification of CXCR4 domains that support coreceptor and chemokine receptor functions." J Virol **73**(4): 2752-61.
- Doranz, B. J., L. G. Filion, F. Diaz-Mitoma, D. S. Sitar, J. Sahai, F. Baribaud, M. J. Orsini, J. L. Benovic, W. Cameron and R. W. Doms (2001). "Safe use of the CXCR4 inhibitor ALX40-4C in humans." AIDS Res Hum Retroviruses **17**(6): 475-86.
- Dorrell, L., H. Yang, A. K. Iversen, C. Conlon, A. Suttill, M. Lancaster, T. Dong, I. Cebere, A. Edwards, S. Rowland-Jones, T. Hanke and A. J. McMichael (2005). "Therapeutic immunization of highly active antiretroviral therapy-treated HIV-1-infected patients: safety and immunogenicity of an HIV-1 gag/poly-epitope DNA vaccine." Aids **19**(12): 1321-3.
- Dragic, T., V. Litwin, G. P. Allaway, S. R. Martin, Y. Huang, K. A. Nagashima, C. Cayanan, P. J. Maddon, R. A. Koup, J. P. Moore and W. A. Paxton (1996). "HIV-1 entry into

- CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5." Nature **381**(6584): 667-73.
- Dragic, T., A. Trkola, S. W. Lin, K. A. Nagashima, F. Kajumo, L. Zhao, W. C. Olson, L. Wu, C. R. Mackay, G. P. Allaway, T. P. Sakmar, J. P. Moore and P. J. Maddon (1998). "Amino-terminal substitutions in the CCR5 coreceptor impair gp120 binding and human immunodeficiency virus type 1 entry." J Virol **72**(1): 279-85.
- Dragic, T., A. Trkola, D. A. Thompson, E. G. Cormier, F. A. Kajumo, E. Maxwell, S. W. Lin, W. Ying, S. O. Smith, T. P. Sakmar and J. P. Moore (2000). "A binding pocket for a small molecule inhibitor of HIV-1 entry within the transmembrane helices of CCR5." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(10): 5639-44.
- Dragic, T. (2001). "An overview of the determinants of CCR5 and CXCR4 co-receptor function." J Gen Virol **82**(Pt 8): 1807-14.
- Duport, C., J. Loeper and A. D. Strosberg (2003). "Comparative expression of the human beta(2) and beta(3) adrenergic receptors in *Saccharomyces cerevisiae*." Biochim Biophys Acta **1629**(1-3): 34-43.
- El-Asmar, L., J. Y. Springael, S. Ballet, E. U. Andrieu, G. Vassart and M. Parmentier (2005). "Evidence for negative binding cooperativity within CCR5-CCR2b heterodimers." Mol Pharmacol **67**(2): 460-9.
- Elgersma, Y., L. Kwast, M. van den Berg, W. B. Snyder, B. Distel, S. Subramani and H. F. Tabak (1997). "Overexpression of Pex15p, a phosphorylated peroxisomal integral membrane protein required for peroxisome assembly in *S.cerevisiae*, causes proliferation of the endoplasmic reticulum membrane." Embo J **16**(24): 7326-41.
- Este, J. A. (2001). "TAK-779 (Takeda)." Curr Opin Investig Drugs **2**(3): 354-6.
- Este, J. A. (2002). "Sch-351125 and Sch-350634. Schering-Plough." Curr Opin Investig Drugs **3**(3): 379-83.
- Faber, K. N., P. Haima, C. Gietl, W. Harder, G. Ab and M. Veenhuis (1994). "The methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* contains an inducible import pathway for peroxisomal matrix proteins with an N-terminal targeting signal (PTS2 proteins)." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(26): 12985-9.
- Fan, G. H., W. Yang, X. J. Wang, Q. Qian and A. Richmond (2001). "Identification of a motif in the carboxyl terminus of CXCR2 that is involved in adaptin 2 binding and receptor internalization." Biochemistry **40**(3): 791-800.
- Farzan, M., H. Choe, K. A. Martin, Y. Sun, M. Sidelko, C. R. Mackay, N. P. Gerard, J. Sodroski and C. Gerard (1997). "HIV-1 entry and macrophage inflammatory protein-1beta-mediated signaling are independent functions of the chemokine receptor CCR5." J Biol Chem **272**(11): 6854-7.
- Farzan, M., H. Choe, L. Vaca, K. Martin, Y. Sun, E. Desjardins, N. Ruffing, L. Wu, R. Wyatt, N. Gerard, C. Gerard and J. Sodroski (1998). "A tyrosine-rich region in the N terminus of CCR5 is important for human immunodeficiency virus type 1 entry and mediates an association between gp120 and CCR5." J Virol **72**(2): 1160-4.
- Farzan, M., T. Mirzabekov, P. Kolchinsky, R. Wyatt, M. Cayabyab, N. P. Gerard, C. Gerard, J. Sodroski and H. Choe (1999). "Tyrosine sulfation of the amino terminus of CCR5 facilitates HIV-1 entry." Cell **96**(5): 667-76.

- Farzan, M., N. Vasilieva, C. E. Schnitzler, S. Chung, J. Robinson, N. P. Gerard, C. Gerard, H. Choe and J. Sodroski (2000). "A tyrosine-sulfated peptide based on the N terminus of CCR5 interacts with a CD4-enhanced epitope of the HIV-1 gp120 envelope glycoprotein and inhibits HIV-1 entry." J Biol Chem **275**(43): 33516-21.
- Farzan, M., G. J. Babcock, N. Vasilieva, P. L. Wright, E. Kiprilov, T. Mirzabekov and H. Choe (2002a). "The role of post-translational modifications of the CXCR4 amino terminus in stromal-derived factor 1 alpha association and HIV-1 entry." J Biol Chem **277**(33): 29484-9.
- Farzan, M., S. Chung, W. Li, N. Vasilieva, C. E. Schnitzler, R. J. Marchione, C. Gerard, N. P. Gerard, J. Sodroski and H. Choe (2002b). "Tyrosine-sulfated peptides functionally reconstitute a CCR5 variant lacking a critical amino-terminal region." J Biol Chem **14**: 14.
- Federman, A. D., B. R. Conklin, K. A. Schrader, R. R. Reed and H. R. Bourne (1992). "Hormonal stimulation of adenylyl cyclase through Gi-protein beta gamma subunits." Nature **356**(6365): 159-61.
- Feng, W., J. Cai, W. M. Pierce, Jr. and Z. H. Song (2002). "Expression of CB2 cannabinoid receptor in *Pichia pastoris*." Protein Expr Purif **26**(3): 496-505.
- Feng, Y., C. C. Broder, P. E. Kennedy and E. A. Berger (1996). "HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor." Science **272**(5263): 872-7.
- 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.
- Fernandis, A. Z., R. P. Cherla and R. K. Ganju (2003). "Differential regulation of CXCR4-mediated T-cell chemotaxis and mitogen-activated protein kinase activation by the membrane tyrosine phosphatase, CD45." J Biol Chem **278**(11): 9536-43.
- Fielding, C. J. and P. E. Fielding (2000). "Cholesterol and caveolae: structural and functional relationships." Biochim Biophys Acta **1529**(1-3): 210-22.
- Filizola, M. and H. Weinstein (2002). "Structural models for dimerization of G-protein coupled receptors: the opioid receptor homodimers." Biopolymers **66**(5): 317-25.
- Filppula, S., S. Yaddanapudi, R. Mercier, W. Xu, S. Pavlopoulos and A. Makriyannis (2004). "Purification and mass spectroscopic analysis of human CB2 cannabinoid receptor expressed in the baculovirus system." J Pept Res **64**(6): 225-36.
- Fong, A. M., R. T. Premont, R. M. Richardson, Y. R. Yu, R. J. Lefkowitz and D. D. Patel (2002). "Defective lymphocyte chemotaxis in beta-arrestin2- and GRK6-deficient mice." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(11): 7478-83.
- Foord, S. M., T. I. Bonner, R. R. Neubig, E. M. Rosser, J. P. Pin, A. P. Davenport, M. Spedding and A. J. Harmar (2005). "International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list." Pharmacol Rev **57**(2): 279-88.
- Fraile-Ramos, A., T. A. Kohout, M. Waldhoer and M. Marsh (2003). "Endocytosis of the viral chemokine receptor US28 does not require beta-arrestins but is dependent on the clathrin-mediated pathway." Traffic **4**(4): 243-53.
- Fredriksson, R., M. C. Lagerstrom, L. G. Lundin and H. B. Schioth (2003). "The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints." Mol Pharmacol **63**(6): 1256-72.

- Freedman, B. D., Q. H. Liu, M. Del Corno and R. G. Collman (2003). "HIV-1 gp120 chemokine receptor-mediated signaling in human macrophages." Immunol Res **27**(2-3): 261-76.
- Freedman, N. J., A. S. Ament, M. Oppermann, R. H. Stoffel, S. T. Exum and R. J. Lefkowitz (1997). "Phosphorylation and desensitization of human endothelin A and B receptors. Evidence for G protein-coupled receptor kinase specificity." J Biol Chem **272**(28): 17734-43.
- Frodl, R., P. Gierschik and B. Moepps (1998). "Genomic organization and expression of the CXCR4 gene in mouse and man: absence of a splice variant corresponding to mouse CXCR4-B in human tissues." J Recept Signal Transduct Res **18**(4-6): 321-44.
- Fuki, I. V., M. E. Meyer and K. J. Williams (2000). "Transmembrane and cytoplasmic domains of syndecan mediate a multi-step endocytic pathway involving detergent-insoluble membrane rafts." Biochem J **351 Pt 3**: 607-12.
- Gaidarov, I., F. Santini, R. A. Warren and J. H. Keen (1999). "Spatial control of coated-pit dynamics in living cells." Nat Cell Biol **1**(1): 1-7.
- Gallo, S. A., C. M. Finnegan, M. Viard, Y. Raviv, A. Dimitrov, S. S. Rawat, A. Puri, S. Durell and R. Blumenthal (2003). "The HIV Env-mediated fusion reaction." Biochim Biophys Acta **1614**(1): 36-50.
- Galvez, T., B. Duthey, J. Kniazeff, J. Blahos, G. Rovelli, B. Bettler, L. Prezeau and J. P. Pin (2001). "Allosteric interactions between GB1 and GB2 subunits are required for optimal GABA(B) receptor function." Embo J **20**(9): 2152-9.
- Galzi, J. L. and P. Alix (1997). "Utilisation d'une protéine fluorescente pour la détection d'interactions entre une protéine cible et son ligand." Brevet français n° 9706977.
- Ganju, R. K., P. Dutt, L. Wu, W. Newman, H. Avraham, S. Avraham and J. E. Groopman (1998). "Beta-chemokine receptor CCR5 signals via the novel tyrosine kinase RAFTK." Blood **91**(3): 791-7.
- Gao, J. L. and P. M. Murphy (1994). "Human cytomegalovirus open reading frame US28 encodes a functional beta chemokine receptor." J Biol Chem **269**(46): 28539-42.
- Geijtenbeek, T. B., S. J. van Vliet, G. C. van Duijnhoven, C. G. Figdor and Y. van Kooyk (2001). "DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1 receptor present in placenta that infects T cells in trans—a review." Placenta **22 Suppl A**: S19-23.
- Geijtenbeek, T. B. and Y. van Kooyk (2003). "DC-SIGN: a novel HIV receptor on DCs that mediates HIV-1 transmission." Curr Top Microbiol Immunol **276**: 31-54.
- Gellissen, G., Z. A. Janowicz, U. Weydemann, K. Melber, A. W. Strasser and C. P. Hollenberg (1992). "High-level expression of foreign genes in *Hansenula polymorpha*." Biotechnol Adv **10**(2): 179-89.
- Gellissen, G. and K. Melber (1996). "Methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* as production organism for recombinant pharmaceuticals." Arzneimittelforschung **46**(9): 943-8.
- Gellissen, G. (2000). "Heterologous protein production in methylotrophic yeasts." Appl Microbiol Biotechnol **54**(6): 741-50.
- Gentles, A. J. and S. Karlin (1999). "Why are human G-protein-coupled receptors predominantly intronless?" Trends Genet **15**(2): 47-9.

- Gether, U. and B. K. Kobilka (1998). "G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation." J Biol Chem **273**(29): 17979-82.
- Gether, U. (2000). "Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors." Endocr Rev **21**(1): 90-113.
- Gines, S., F. Ciruela, J. Burgueno, V. Casado, E. I. Canela, J. Mallol, C. Lluís and R. Franco (2001). "Involvement of caveolin in ligand-induced recruitment and internalization of A(1) adenosine receptor and adenosine deaminase in an epithelial cell line." Mol Pharmacol **59**(5): 1314-23.
- Gomez-Mouton, C., R. A. Lacalle, E. Mira, S. Jimenez-Baranda, D. F. Barber, A. C. Carrera, A. C. Martinez and S. Manes (2004). "Dynamic redistribution of raft domains as an organizing platform for signaling during cell chemotaxis." J Cell Biol **164**(5): 759-68.
- Goodman, O. B., Jr., J. G. Krupnick, F. Santini, V. V. Gurevich, R. B. Penn, A. W. Gagnon, J. H. Keen and J. L. Benovic (1996). "Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor." Nature **383**(6599): 447-50.
- Gosling, J., F. S. Monteclaro, R. E. Atchison, H. Arai, C. L. Tsou, M. A. Goldsmith and I. F. Charo (1997). "Molecular uncoupling of C-C chemokine receptor 5-induced chemotaxis and signal transduction from HIV-1 coreceptor activity." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(10): 5061-6.
- Govaerts, C., C. Blanpain, X. Deupi, S. Ballet, J. A. Ballesteros, S. J. Wodak, G. Vassart, L. Pardo and M. Parmentier (2001). "The TXP motif in the second transmembrane helix of CCR5. A structural determinant of chemokine-induced activation." J Biol Chem **276**(16): 13217-25.
- Govaerts, C., A. Bondue, J. Y. Springael, M. Olivella, X. Deupi, E. Le Poul, S. J. Wodak, M. Parmentier, L. Pardo and C. Blanpain (2003). "Activation of CCR5 by chemokines involves an aromatic cluster between transmembrane helices 2 and 3." J Biol Chem **278**(3): 1892-903.
- Gozansky, E. K., J. M. Louis, M. Caffrey and G. M. Clore (2005). "Mapping the binding of the N-terminal extracellular tail of the CXCR4 receptor to stromal cell-derived factor-1alpha." J Mol Biol **345**(4): 651-8.
- Gudermann, T., F. Kalkbrenner, E. Dippel, K. L. Laugwitz and G. Schultz (1997). "Specificity and complexity of receptor-G-protein interaction." Adv Second Messenger Phosphoprotein Res **31**: 253-62.
- Guillet-Deniau, I., A. F. Burnol and J. Girard (1997). "Identification and localization of a skeletal muscle serotonin 5-HT_{2A} receptor coupled to the Jak/STAT pathway." J Biol Chem **272**(23): 14825-9.
- Guo, Y., H. Feinberg, E. Conroy, D. A. Mitchell, R. Alvarez, O. Blixt, M. E. Taylor, W. I. Weis and K. Drickamer (2004). "Structural basis for distinct ligand-binding and targeting properties of the receptors DC-SIGN and DC-SIGNR." Nat Struct Mol Biol **11**(7): 591-8.
- Gupta, S. K. and K. Pillarisetti (1999). "Cutting edge: CXCR4-Lo: molecular cloning and functional expression of a novel human CXCR4 splice variant." J Immunol **163**(5): 2368-72.

- Gupta, S. K., K. Pillarisetti, R. A. Thomas and N. Aiyar (2001). "Pharmacological evidence for complex and multiple site interaction of CXCR4 with SDF-1alpha: implications for development of selective CXCR4 antagonists." Immunol Lett **78**(1): 29-34.
- 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.
- Haan, G. J., K. N. Faber, R. J. Baerends, A. Koek, A. Krikken, J. A. Kiel, I. J. van der Klei and M. Veenhuis (2002). "Hansenula polymorpha Pex3p is a peripheral component of the peroxisomal membrane." J Biol Chem **277**(29): 26609-17.
- Hanf, R., Y. Li, G. Szabo and R. Fischmeister (1993). "Agonist-independent effects of muscarinic antagonists on Ca²⁺ and K⁺ currents in frog and rat cardiac cells." J Physiol **461**: 743-65.
- Harvey, J. A., S. E. Welsh, H. Hood and A. G. Romano (1999). "Effect of 5-HT₂ receptor antagonists on a cranial nerve reflex in the rabbit: evidence for inverse agonism." Psychopharmacology (Berl) **141**(2): 162-8.
- Hassaine, G., R. Wagner, J. Kempf, N. Cherouati, N. Hassaine, C. Prual, N. Andre, C. Reinhart, F. Pattus and K. Lundstrom (2005). "Semliki Forest virus vectors for overexpression of 101 G protein-coupled receptors in mammalian host cells." Protein Expr Purif.
- Hatse, S., K. Princen, E. De Clercq, M. M. Rosenkilde, T. W. Schwartz, P. E. Hernandez-Abad, R. T. Skerlj, G. J. Bridger and D. Schols (2005). "AMD3465, a monomacrocyclic CXCR4 antagonist and potent HIV entry inhibitor." Biochem Pharmacol **70**(5): 752-61.
- Heesen, M., M. A. Berman, U. E. Hopken, N. P. Gerard and M. E. Dorf (1997). "Alternate splicing of mouse fusin/CXC chemokine receptor-4: stromal cell-derived factor-1alpha is a ligand for both CXC chemokine receptor-4 isoforms." J Immunol **158**(8): 3561-4.
- Hendrix, C. W., A. C. Collier, M. M. Lederman, D. Schols, R. B. Pollard, S. Brown, J. B. Jackson, R. W. Coombs, M. J. Glesby, C. W. Flexner, G. J. Bridger, K. Badel, R. T. Macfarland, G. W. Henson and G. Calandra (2004). "Safety, Pharmacokinetics, and Antiviral Activity of AMD3100, a Selective CXCR4 Receptor Inhibitor, in HIV-1 Infection." J Acquir Immune Defic Syndr **37**(2): 1253-1262.
- Hermans, E. (2003). "Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors." Pharmacol Ther **99**(1): 25-44.
- Hernanz-Falcon, P., J. M. Rodriguez-Frade, A. Serrano, D. Juan, A. del Sol, S. F. Soriano, F. Roncal, L. Gomez, A. Valencia, A. C. Martinez and M. Mellado (2004). "Identification of amino acid residues crucial for chemokine receptor dimerization." Nat Immunol **5**(2): 216-23.
- Herzog, H., Y. J. Hort, J. Shine and L. A. Selbie (1993). "Molecular cloning, characterization, and localization of the human homolog to the reported bovine NPY Y3 receptor: lack of NPY binding and activation." DNA Cell Biol **12**(6): 465-71.
- Hettema, E. H., W. Girzalsky, M. van Den Berg, R. Erdmann and B. Distel (2000). "Saccharomyces cerevisiae pex3p and pex19p are required for proper

- localization and stability of peroxisomal membrane proteins." Embo J **19**(2): 223-33.
- Heveker, N., M. Montes, L. Germeroth, A. Amara, A. Trautmann, M. Alizon and J. Schneider-Mergener (1998). "Dissociation of the signalling and antiviral properties of SDF-1-derived small peptides." Curr Biol **8**(7): 369-76.
- Hoffman, T. L., G. Canziani, L. Jia, J. Rucker and R. W. Doms (2000). "A biosensor assay for studying ligand-membrane receptor interactions: binding of antibodies and HIV-1 env to chemokine receptors [In Process Citation]." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(21): 11215-20.
- Hoffmann, M., D. Verzijl, K. Lundstrom, U. Simmen, A. E. Alewijnse, H. Timmerman and R. Leurs (2001). "Recombinant Semliki Forest virus for over-expression and pharmacological characterisation of the histamine H(2) receptor in mammalian cells." Eur J Pharmacol **427**(2): 105-14.
- Hollenberg, C. P. and G. Gellissen (1997). "Production of recombinant proteins by methylotrophic yeasts." Curr Opin Biotechnol **8**(5): 554-60.
- Hong, H., N. Neamati, S. Wang, M. C. Nicklaus, A. Mazumder, H. Zhao, T. R. Burke, Y. Pommier and G. W. Milne (1997). "Discovery of HIV-1 integrase inhibitors by pharmacophore searching." J Med Chem **40**(6): 930-6.
- Horuk, R. (1998). "Chemokines beyond inflammation." Nature **393**(6685): 524-5.
- Hou, Y., I. Azpiazu, A. Smrcka and N. Gautam (2000). "Selective role of G protein gamma subunits in receptor interaction." J Biol Chem **275**(50): 38961-4.
- Houshmand, P. and A. Zlotnik (2003). "Therapeutic applications in the chemokine superfamily." Curr Opin Chem Biol **7**(4): 457-60.
- Huang, Y., W. A. Paxton, S. M. Wolinsky, A. U. Neumann, L. Zhang, T. He, S. Kang, D. Ceradini, Z. Jin, K. Yazdanbakhsh, K. Kunstman, D. Erickson, E. Dragon, N. R. Landau, J. Phair, D. D. Ho and R. A. Koup (1996). "The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression." Nat Med **2**(11): 1240-3.
- Huang, Y., M. S. Williamson, A. L. Devonshire, J. D. Windass, S. J. Lansdell and N. S. Millar (2000). "Cloning, heterologous expression and co-assembly of Mpbeta1, a nicotinic acetylcholine receptor subunit from the aphid *Myzus persicae*." Neurosci Lett **284**(1-2): 116-20.
- Huttenrauch, F., A. Nitzki, F. T. Lin, S. Honing and M. Oppermann (2002). "Beta-arrestin binding to CC chemokine receptor 5 requires multiple C-terminal receptor phosphorylation sites and involves a conserved Asp-Arg-Tyr sequence motif." J Biol Chem **277**(34): 30769-77.
- Ichihama, K., S. Yokoyama-Kumakura, Y. Tanaka, R. Tanaka, K. Hirose, K. Bannai, T. Edamatsu, M. Yanaka, Y. Niitani, N. Miyano-Kurosaki, H. Takaku, Y. Koyanagi and N. Yamamoto (2003). "A duodenally absorbable CXC chemokine receptor 4 antagonist, KRH-1636, exhibits a potent and selective anti-HIV-1 activity." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(7): 4185-90.
- Ikeda, S. R. (1996). "Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein beta gamma subunits." Nature **380**(6571): 255-8.
- Ikonen, E. (2001). "Roles of lipid rafts in membrane transport." Curr Opin Cell Biol **13**(4): 470-7.

- Ilien, B., C. Franchet, P. Bernard, S. Morisset, C. O. Weill, J. J. Bourguignon, M. Hibert and J. L. Galzi (2003). "Fluorescence resonance energy transfer to probe human M1 muscarinic receptor structure and drug binding properties." J Neurochem **85**(3): 768-78.
- Im, D. S. (2002). "Orphan G protein-coupled receptors and beyond." Jpn J Pharmacol **90**(2): 101-6.
- Isegawa, Y., Z. Ping, K. Nakano, N. Sugimoto and K. Yamanishi (1998). "Human herpesvirus 6 open reading frame U12 encodes a functional beta-chemokine receptor." J Virol **72**(7): 6104-12.
- Ishihara, G., M. Goto, M. Saeki, K. Ito, T. Hori, T. Kigawa, M. Shirouzu and S. Yokoyama (2005). "Expression of G protein coupled receptors in a cell-free translational system using detergents and thioredoxin-fusion vectors." Protein Expr Purif **41**(1): 27-37.
- Issafras, H., S. Angers, S. Bulenger, C. Blanpain, M. Parmentier, C. Labbe-Jullie, M. Bouvier and S. Marullo (2002). "Constitutive agonist-independent CCR5 oligomerization and antibody-mediated clustering occurring at physiological levels of receptors." J Biol Chem **277**(38): 34666-73.
- Ji, T. H., M. Grossmann and I. Ji (1998). "G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions." J Biol Chem **273**(28): 17299-302.
- Ji, X., H. Gewurz and G. T. Spear (2005). "Mannose binding lectin (MBL) and HIV." Mol Immunol **42**(2): 145-52.
- Jin, H., Z. Xie, S. R. George and B. F. O'Dowd (1999). "Palmitoylation occurs at cysteine 347 and cysteine 351 of the dopamine D(1) receptor." Eur J Pharmacol **386**(2-3): 305-12.
- Jingami, H., S. Nakanishi and K. Morikawa (2003). "Structure of the metabotropic glutamate receptor." Curr Opin Neurobiol **13**(3): 271-8.
- Jordan, B. A. and L. A. Devi (1999). "G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function." Nature **399**(6737): 697-700.
- Kajumo, F., D. A. Thompson, Y. Guo and T. Dragic (2000). "Entry of R5X4 and X4 human immunodeficiency virus type 1 strains is mediated by negatively charged and tyrosine residues in the amino-terminal domain and the second extracellular loop of CXCR4." Virology **271**(2): 240-7.
- Katugampola, S. and A. Davenport (2003). "Emerging roles for orphan G-protein-coupled receptors in the cardiovascular system." Trends Pharmacol Sci **24**(1): 30-5.
- Katz, A., D. Wu and M. I. Simon (1992). "Subunits beta gamma of heterotrimeric G protein activate beta 2 isoform of phospholipase C." Nature **360**(6405): 686-9.
- Kempf, J., L. A. Snook, J. L. Vonesch, T. E. Dahms, F. Pattus and D. Massotte (2002). "Expression of the human mu opioid receptor in a stable Sf9 cell line." J Biotechnol **95**(2): 181-7.
- Kenakin, T. (2004). "Principles: receptor theory in pharmacology." Trends Pharmacol Sci **25**(4): 186-92.
- Kiefer, H., J. Krieger, J. D. Olszewski, G. Von Heijne, G. D. Prestwich and H. Breer (1996). "Expression of an olfactory receptor in Escherichia coli: purification, reconstitution, and ligand binding." Biochemistry **35**(50): 16077-84.

- Kilby, J. M., S. Hopkins, T. M. Venetta, B. DiMassimo, G. A. Cloud, J. Y. Lee, L. Alldredge, E. Hunter, D. Lambert, D. Bolognesi, T. Matthews, M. R. Johnson, M. A. Nowak, G. M. Shaw and M. S. Saag (1998). "Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry." Nat Med **4**(11): 1302-7.
- Kim, D., D. L. Lewis, L. Graziadei, E. J. Neer, D. Bar-Sagi and D. E. Clapham (1989). "G-protein beta gamma-subunits activate the cardiac muscarinic K⁺-channel via phospholipase A2." Nature **337**(6207): 557-60.
- King, K., H. G. Dohlman, J. Thorner, M. G. Caron and R. J. Lefkowitz (1990). "Control of yeast mating signal transduction by a mammalian beta 2-adrenergic receptor and Gs alpha subunit." Science **250**(4977): 121-3.
- Kirkham, M. and R. G. Parton (2005). "Clathrin-independent endocytosis: New insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers." Biochim Biophys Acta.
- Kirkpatrick, R. B., S. Ganguly, M. Angelichio, S. Griego, A. Shatzman, C. Silverman and M. Rosenberg (1995). "Heavy chain dimers as well as complete antibodies are efficiently formed and secreted from Drosophila via a BiP-mediated pathway." J Biol Chem **270**(34): 19800-5.
- Kledal, T. N., M. M. Rosenkilde, F. Coulin, G. Simmons, A. H. Johnsen, S. Alouani, C. A. Power, H. R. Lutichau, J. Gerstoft, P. R. Clapham, I. Clark-Lewis, T. N. Wells and T. W. Schwartz (1997). "A broad-spectrum chemokine antagonist encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus." Science **277**(5332): 1656-9.
- Klein, P. S., T. J. Sun, C. L. Saxe, 3rd, A. R. Kimmel, R. L. Johnson and P. N. Devreotes (1988). "A chemoattractant receptor controls development in Dictyostelium discoideum." Science **241**(4872): 1467-72.
- Kohno, T., A. Wada and Y. Igarashi (2002). "N-glycans of sphingosine 1-phosphate receptor Edg-1 regulate ligand-induced receptor internalization." Faseb J **16**(9): 983-92.
- Kovacs, B., M. V. Maus, J. L. Riley, G. S. Derimanov, G. A. Koretzky, C. H. June and T. H. Finkel (2002). "Human CD8⁺ T cells do not require the polarization of lipid rafts for activation and proliferation." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(23): 15006-11.
- Kraft, K., H. Olbrich, I. Majoul, M. Mack, A. Proudfoot and M. Oppermann (2001). "Characterization of sequence determinants within the carboxyl-terminal domain of chemokine receptor CCR5 that regulate signaling and receptor internalization." J Biol Chem **276**(37): 34408-18.
- Krasel, C., M. Bunemann, K. Lorenz and M. J. Lohse (2005). "Beta-arrestin binding to the beta2-adrenergic receptor requires both receptor phosphorylation and receptor activation." J Biol Chem **280**(10): 9528-35.
- Kremer, K. N., T. D. Humphreys, A. Kumar, N. X. Qian and K. E. Hedin (2003). "Distinct role of ZAP-70 and Src homology 2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa in the prolonged activation of extracellular signal-regulated protein kinase by the stromal cell-derived factor-1 alpha/CXCL12 chemokine." J Immunol **171**(1): 360-7.
- Kucia, M., K. Jankowski, R. Reza, M. Wysoczynski, L. Bandura, D. J. Allendorf, J. Zhang, J. Ratajczak and M. Z. Ratajczak (2004). "CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion." J Mol Histol **35**(3): 233-45.

- Kunishima, N., Y. Shimada, Y. Tsuji, T. Sato, M. Yamamoto, T. Kumasaka, S. Nakanishi, H. Jingami and K. Morikawa (2000). "Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor." Nature **407**(6807): 971-7.
- Kunkel, S. L. and N. Godessart (2002). "Chemokines in autoimmunity: from pathology to therapeutics." Autoimmun Rev **1**(6): 313-20.
- Kutzleb, C., A. Busmann, M. Wendland and E. Maronde (2005). "Discovery of novel regulatory peptides by reverse pharmacology: spotlight on chemerin and the RF-amide peptides metastatin and QRFP." Curr Protein Pept Sci **6**(3): 265-78.
- LaBranche, C. C., G. Galasso, J. P. Moore, D. P. Bolognesi, M. S. Hirsch and S. M. Hammer (2001). "HIV fusion and its inhibition." Antiviral Res **50**(2): 95-115.
- Lagane, B., G. Gaibelet, E. Meilhoc, J. M. Masson, L. Cezanne and A. Lopez (2000). "Role of sterols in modulating the human mu-opioid receptor function in *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem **275**(43): 33197-200.
- Lagane, B., S. Ballet, T. Planchenault, K. Balabanian, E. Le Poul, C. Blanpain, Y. Percherancier, I. Staropoli, G. Vassart, M. Oppermann, M. Parmentier and F. Bachelierie (2005). "Mutation of the DRY motif reveals different structural requirements for the CC chemokine receptor 5-mediated signaling and receptor endocytosis." Mol Pharmacol **67**(6): 1966-76.
- Laing, K. J. and C. J. Secombes (2004). "Chemokines." Dev Comp Immunol **28**(5): 443-60.
- Lambright, D. G., J. Sondek, A. Bohm, N. P. Skiba, H. E. Hamm and P. B. Sigler (1996). "The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein." Nature **379**(6563): 311-9.
- Lapham, C. K., M. B. Zaitseva, S. Lee, T. Romanstseva and H. Golding (1999). "Fusion of monocytes and macrophages with HIV-1 correlates with biochemical properties of CXCR4 and CCR5." Nat Med **5**(3): 303-8.
- Laporte, S. A., R. H. Oakley, J. A. Holt, L. S. Barak and M. G. Caron (2000). "The interaction of beta-arrestin with the AP-2 adaptor is required for the clustering of beta 2-adrenergic receptor into clathrin-coated pits." J Biol Chem **275**(30): 23120-6.
- Laporte, S. A., W. E. Miller, K. M. Kim and M. G. Caron (2002). "beta-Arrestin/AP-2 interaction in G protein-coupled receptor internalization: identification of a beta-arrestin binding site in beta 2-adaptin." J Biol Chem **277**(11): 9247-54.
- Laurence, J. S., C. Blanpain, A. De Leener, M. Parmentier and P. J. LiWang (2001). "Importance of basic residues and quaternary structure in the function of MIP-1 beta: CCR5 binding and cell surface sugar interactions." Biochemistry **40**(16): 4990-9.
- Le, Y., M. Honczarenko, A. M. Glodek, D. K. Ho and L. E. Silberstein (2005). "CXC chemokine ligand 12-induced focal adhesion kinase activation and segregation into membrane domains is modulated by regulator of G protein signaling 1 in pro-B cells." J Immunol **174**(5): 2582-90.
- Leao, A. N. and J. A. Kiel (2003). "Peroxisome homeostasis in *Hansenula polymorpha*." FEMS Yeast Res **4**(2): 131-9.
- Lee, B., M. Sharron, C. Blanpain, B. J. Doranz, J. Vakili, P. Setoh, E. Berg, G. Liu, H. R. Guy, S. R. Durell, M. Parmentier, C. N. Chang, K. Price, M. Tsang and R. W. Doms (1999). "Epitope mapping of CCR5 reveals multiple conformational states and

- distinct but overlapping structures involved in chemokine and coreceptor function." J Biol Chem **274**(14): 9617-26.
- Lee, C., Q. H. Liu, B. Tomkowicz, Y. Yi, B. D. Freedman and R. G. Collman (2003a). "Macrophage activation through CCR5- and CXCR4-mediated gp120-elicited signaling pathways." J Leukoc Biol **74**(5): 676-82.
- Lee, S. P., B. F. O'Dowd and S. R. George (2003b). "Homo- and hetero-oligomerization of G protein-coupled receptors." Life Sci **74**(2-3): 173-80.
- Leff, P. (1995). "The two-state model of receptor activation." Trends Pharmacol Sci **16**(3): 89-97.
- Lefkowitz, R. J. (1998). "G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization." J Biol Chem **273**(30): 18677-80.
- Lefkowitz, R. J. and S. K. Shenoy (2005). "Transduction of receptor signals by beta-arrestins." Science **308**(5721): 512-7.
- Lemay, J., S. Marullo, R. Jockers, M. Alizon and A. Brelot (2005). "On the dimerization of CCR5." Nat Immunol **6**(6): 535; author reply 535-6.
- Lepetic A, S. M., Arduino RC, Lazovski J, Nacinovich F, Sturba E, Stambou-Iian D (1996). "Novel recombinant HB vaccine produced by a high-level expression *Hansenula polymorphayeast* system." Clin Infect Dis **23**: 276.
- Li, Z., H. Jiang, W. Xie, Z. Zhang, A. V. Smrcka and D. Wu (2000). "Roles of PLC-beta2 and -beta3 and PI3Kgamma in chemoattractant-mediated signal transduction." Science **287**(5455): 1046-9.
- Liu, R., W. A. Paxton, S. Choe, D. Ceradini, S. R. Martin, R. Horuk, M. E. MacDonald, H. Stuhlmann, R. A. Koup and N. R. Landau (1996). "Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection." Cell **86**(3): 367-77.
- Lodi, P. J., D. S. Garrett, J. Kuszewski, M. L. Tsang, J. A. Weatherbee, W. J. Leonard, A. M. Gronenborn and G. M. Clore (1994). "High-resolution solution structure of the beta chemokine hMIP-1 beta by multidimensional NMR." Science **263**(5154): 1762-7.
- Loetscher, M., T. Geiser, T. O'Reilly, R. Zwahlen, M. Baggiolini and B. Moser (1994). "Cloning of a human seven-transmembrane domain receptor, LESTR, that is highly expressed in leukocytes." J Biol Chem **269**(1): 232-7.
- Lortat-Jacob, H., A. Grosdidier and A. Imberty (2002). "Structural diversity of heparan sulfate binding domains in chemokines." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(3): 1229-34.
- Lowes, V. L., N. Y. Ip and Y. H. Wong (2002). "Integration of signals from receptor tyrosine kinases and g protein-coupled receptors." Neurosignals **11**(1): 5-19.
- Lu, Z., J. F. Berson, Y. Chen, J. D. Turner, T. Zhang, M. Sharron, M. H. Jenks, Z. Wang, J. Kim, J. Rucker, J. A. Hoxie, S. C. Peiper and R. W. Doms (1997). "Evolution of HIV-1 coreceptor usage through interactions with distinct CCR5 and CXCR4 domains." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(12): 6426-31.
- Lucotte, G. and F. Dieterlen (2003). "More about the Viking hypothesis of origin of the delta32 mutation in the CCR5 gene conferring resistance to HIV-1 infection." Infect Genet Evol **3**(4): 293-5.

- Lundstrom, K. (2003). "Semliki Forest virus vectors for rapid and high-level expression of integral membrane proteins." Biochim Biophys Acta **1610**(1): 90-6.
- Luttrell, L. M., Y. Daaka, G. J. Della Rocca and R. J. Lefkowitz (1997). "G protein-coupled receptors mediate two functionally distinct pathways of tyrosine phosphorylation in rat 1a fibroblasts. Shc phosphorylation and receptor endocytosis correlate with activation of Erk kinases." J Biol Chem **272**(50): 31648-56.
- Ma, Q., D. Jones, P. R. Borghesani, R. A. Segal, T. Nagasawa, T. Kishimoto, R. T. Bronson and T. A. Springer (1998). "Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(16): 9448-53.
- Macauley-Patrick, S., M. L. Fazenda, B. McNeil and L. M. Harvey (2005). "Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system." Yeast **22**(4): 249-70.
- Mack, M., B. Luckow, P. J. Nelson, J. Cihak, G. Simmons, P. R. Clapham, N. Signoret, M. Marsh, M. Stangassinger, F. Borlat, T. N. Wells, D. Schlondorff and A. E. Proudfoot (1998). "Aminooxypentane-RANTES induces CCR5 internalization but inhibits recycling: a novel inhibitory mechanism of HIV infectivity." J Exp Med **187**(8): 1215-24.
- Mack, M., J. Cihak, C. Simonis, B. Luckow, A. E. Proudfoot, J. Plachy, H. Bruhl, M. Frink, H. J. Anders, V. Vielhauer, J. Pfirstinger, M. Stangassinger and D. Schlondorff (2001). "Expression and characterization of the chemokine receptors CCR2 and CCR5 in mice." J Immunol **166**(7): 4697-704.
- Mackay, C. R. (2001). "Chemokines: immunology's high impact factors." Nat Immunol **2**(2): 95-101.
- Maeda, Y., K. Yusa and S. Harada (2003). "Enhanced infectivity of HIV-1 by X4 HIV-1 coinfection." Biochem Biophys Res Commun **308**(4): 906-13.
- Maghazachi, A. A. and A. Al-Aoukaty (1998). "Chemokines activate natural killer cells through heterotrimeric G-proteins: implications for the treatment of AIDS and cancer." Faseb J **12**(11): 913-24.
- Mandrika, I., R. Petrovska and J. Wikberg (2005). "Melanocortin receptors form constitutive homo- and heterodimers." Biochem Biophys Res Commun **326**(2): 349-54.
- Manes, S., E. Mira, C. Gomez-Mouton, R. A. Lacalle, P. Keller, J. P. Labrador and A. C. Martinez (1999). "Membrane raft microdomains mediate front-rear polarity in migrating cells." Embo J **18**(22): 6211-20.
- Manes, S., G. del Real, R. A. Lacalle, P. Lucas, C. Gomez-Mouton, S. Sanchez-Palomino, R. Delgado, J. Alcamí, E. Mira and A. C. Martinez (2000). "Membrane raft microdomains mediate lateral assemblies required for HIV-1 infection." EMBO Rep **1**(2): 190-6.
- Marchese, A. and J. L. Benovic (2001). "Agonist-promoted Ubiquitination of the G Protein-coupled Receptor CXCR4 Mediates Lysosomal Sorting." J Biol Chem **276**(49): 45509-12.

- Marechal, V., F. Arenzana-Seisdedos, J. M. Heard and O. Schwartz (1999). "Opposite effects of SDF-1 on human immunodeficiency virus type 1 replication." J Virol **73**(5): 3608-15.
- Martin, L., C. Blanpain, P. Garnier, V. Wittamer, M. Parmentier and C. Vita (2001). "Structural and functional analysis of the RANTES-glycosaminoglycans interactions." Biochemistry **40**(21): 6303-18.
- Massotte, D., L. Baroche, F. Simonin, L. Yu, B. Kieffer and F. Pattus (1997). "Characterization of delta, kappa, and mu human opioid receptors overexpressed in baculovirus-infected insect cells." J Biol Chem **272**(32): 19987-92.
- Massotte, D. (2003). "G protein-coupled receptor overexpression with the baculovirus-insect cell system: a tool for structural and functional studies." Biochim Biophys Acta **1610**(1): 77-89.
- Matarazzo, V., O. Clot-Faybesse, B. Marcet, G. Guiraudie-Capraz, B. Atanasova, G. Devauchelle, M. Cerutti, P. Etievant and C. Ronin (2005). "Functional characterization of two human olfactory receptors expressed in the baculovirus Sf9 insect cell system." Chem Senses **30**(3): 195-207.
- Matthews, T., M. Salgo, M. Greenberg, J. Chung, R. DeMasi and D. Bolognesi (2004). "Enfuvirtide: the first therapy to inhibit the entry of HIV-1 into host CD4 lymphocytes." Nat Rev Drug Discov **3**(3): 215-25.
- Maurer, M. and E. von Stebut (2004). "Macrophage inflammatory protein-1." Int J Biochem Cell Biol **36**(10): 1882-6.
- Mbemba, E., A. Benjouad, L. Saffar and L. Gattegno (1999). "Glycans and proteoglycans are involved in the interactions of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein and of SDF-1alpha with membrane ligands of CD4(+) CXCR4(+) cells." Virology **265**(2): 354-64.
- McCudden, C. R., M. D. Hains, R. J. Kimple, D. P. Siderovski and F. S. Willard (2005). "G-protein signaling: back to the future." Cell Mol Life Sci **62**(5): 551-77.
- Medina, I., G. Krapivinsky, S. Arnold, P. Kooor, L. Krapivinsky and D. E. Clapham (2000). "A switch mechanism for G beta gamma activation of I(KACh)." J Biol Chem **275**(38): 29709-16.
- Mellado, M., J. M. Rodriguez-Frade, A. J. Vila-Coro, S. Fernandez, A. Martin De Ana, D. R. Jones, J. L. Toran and A. C. Martinez (2001). "Chemokine receptor homo- or heterodimerization activates distinct signaling pathways." Embo J **20**(10): 2497-507.
- Meng, E. C. and H. R. Bourne (2001). "Receptor activation: what does the rhodopsin structure tell us?" Trends Pharmacol Sci **22**(11): 587-93.
- Mercier, J. F., A. Salahpour, S. Angers, A. Breit and M. Bouvier (2002). "Quantitative assessment of beta 1- and beta 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer." J Biol Chem **277**(47): 44925-31.
- Millar, N. S., H. A. Baylis, C. Reaper, R. Bunting, W. T. Mason and D. B. Sattelle (1995). "Functional expression of a cloned Drosophila muscarinic acetylcholine receptor in a stable Drosophila cell line." J Exp Biol **198**(Pt 9): 1843-50.
- Milligan, G. and J. H. White (2001). "Protein-protein interactions at G-protein-coupled receptors." Trends Pharmacol Sci **22**(10): 513-8.

- Milligan, G., D. Ramsay, G. Pascal and J. J. Carrillo (2003). "GPCR dimerisation." Life Sci **74**(2-3): 181-8.
- Miltenyi, S., W. Muller, W. Weichel and A. Radbruch (1990). "High gradient magnetic cell separation with MACS." Cytometry **11**(2): 231-8.
- Minic, J., M. A. Persuy, E. Godel, J. Aioun, I. Connerton, R. Salessse and E. Pajot-Augy (2005). "Functional expression of olfactory receptors in yeast and development of a bioassay for odorant screening." Febs J **272**(2): 524-37.
- Mirzabekov, T., N. Bannert, M. Farzan, W. Hofmann, P. Kolchinsky, L. Wu, R. Wyatt and J. Sodroski (1999). "Enhanced expression, native purification, and characterization of CCR5, a principal HIV-1 coreceptor." J Biol Chem **274**(40): 28745-50.
- Mirzabekov, T., H. Kontos, M. Farzan, W. Marasco and J. Sodroski (2000). "Paramagnetic proteoliposomes containing a pure, native, and oriented seven-transmembrane segment protein, CCR5." Nat Biotechnol **18**(6): 649-54.
- Mirzadegan, T., F. Diehl, B. Ebi, S. Bhakta, I. Polsky, D. McCarley, M. Mulkins, G. S. Weatherhead, J. M. Lapierre, J. Dankwardt, D. Morgans, Jr., R. Wilhelm and K. Jarnagin (2000). "Identification of the binding site for a novel class of CCR2b chemokine receptor antagonists: binding to a common chemokine receptor motif within the helical bundle." J Biol Chem **275**(33): 25562-71.
- Misse, D., P. O. Esteve, B. Renneboog, M. Vidal, M. Cerutti, Y. St Pierre, H. Yssel, M. Parmentier and F. Veas (2001). "HIV-1 glycoprotein 120 induces the MMP-9 cytopathogenic factor production that is abolished by inhibition of the p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway." Blood **98**(3): 541-7.
- Morisset, S., A. Rouleau, X. Ligneau, F. Gbahou, J. Tardivel-Lacombe, H. Stark, W. Schunack, C. R. Ganellin, J. C. Schwartz and J. M. Arrang (2000). "High constitutive activity of native H3 receptors regulates histamine neurons in brain." Nature **408**(6814): 860-4.
- Mouillac, B., T. Sen, T. Durroux, G. Gaibelet and C. Barberis (2002). "Expression of human vasopressin and oxytocin receptors in Escherichia coli." Prog Brain Res **139**: 163-77.
- Mueller, A., E. Kelly and P. G. Strange (2002). "Pathways for internalization and recycling of the chemokine receptor CCR5." Blood **99**(3): 785-91.
- Murakami, T., T. Nakajima, Y. Koyanagi, K. Tachibana, N. Fujii, H. Tamamura, N. Yoshida, M. Waki, A. Matsumoto, O. Yoshie, T. Kishimoto, N. Yamamoto and T. Nagasawa (1997). "A small molecule CXCR4 inhibitor that blocks T cell line-tropic HIV-1 infection." J Exp Med **186**(8): 1389-93.
- Murphy, P. M., M. Baggiolini, I. F. Charo, C. A. Hebert, R. Horuk, K. Matsushima, L. H. Miller, J. J. Oppenheim and C. A. Power (2000). "International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors." Pharmacol Rev **52**(1): 145-76.
- Nagasawa, T., T. Nakajima, K. Tachibana, H. Iizasa, C. C. Bleul, O. Yoshie, K. Matsushima, N. Yoshida, T. A. Springer and T. Kishimoto (1996). "Molecular cloning and characterization of a murine pre-B-cell growth-stimulating factor/stromal cell-derived factor 1 receptor, a murine homolog of the human immunodeficiency virus 1 entry coreceptor fusin." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(25): 14726-9.

- Nakata, H., K. Maeda, T. Miyakawa, S. Shibayama, M. Matsuo, Y. Takaoka, M. Ito, Y. Koyanagi and H. Mitsuya (2005). "Potent anti-R5 human immunodeficiency virus type 1 effects of a CCR5 antagonist, AK602/ONO4128/GW873140, in a novel human peripheral blood mononuclear cell nonobese diabetic-SCID, interleukin-2 receptor gamma-chain-knocked-out AIDS mouse model." J Virol **79**(4): 2087-96.
- Nathans, J. and D. S. Hogness (1983). "Isolation, sequence analysis, and intron-exon arrangement of the gene encoding bovine rhodopsin." Cell **34**(3): 807-14.
- Navenot, J. M., Z. X. Wang, J. O. Trent, J. L. Murray, Q. X. Hu, L. DeLeeuw, P. S. Moore, Y. Chang and S. C. Peiper (2001). "Molecular anatomy of CCR5 engagement by physiologic and viral chemokines and HIV-1 envelope glycoproteins: differences in primary structural requirements for RANTES, MIP-1 alpha, and vMIP-II Binding." J Mol Biol **313**(5): 1181-93.
- Navratilova, I., J. Sodroski and D. G. Myszka (2005). "Solubilization, stabilization, and purification of chemokine receptors using biosensor technology." Anal Biochem **339**(2): 271-81.
- Nelson, G., M. A. Hoon, J. Chandrashekar, Y. Zhang, N. J. Ryba and C. S. Zuker (2001). "Mammalian sweet taste receptors." Cell **106**(3): 381-90.
- Nelson, G., J. Chandrashekar, M. A. Hoon, L. Feng, G. Zhao, N. J. Ryba and C. S. Zuker (2002). "An amino-acid taste receptor." Nature **416**(6877): 199-202.
- Neote, K., D. DiGregorio, J. Y. Mak, R. Horuk and T. J. Schall (1993). "Molecular cloning, functional expression, and signaling characteristics of a C-C chemokine receptor." Cell **72**(3): 415-25.
- Neptune, E. R. and H. R. Bourne (1997). "Receptors induce chemotaxis by releasing the betagamma subunit of Gi, not by activating Gq or Gs." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(26): 14489-94.
- Nguyen, D. H. and D. Taub (2002a). "Cholesterol is essential for macrophage inflammatory protein 1 beta binding and conformational integrity of CC chemokine receptor 5." Blood **99**(12): 4298-306.
- Nguyen, D. H. and D. Taub (2002b). "CXCR4 function requires membrane cholesterol: implications for HIV infection." J Immunol **168**(8): 4121-6.
- Nguyen, D. H. and D. D. Taub (2003). "Inhibition of chemokine receptor function by membrane cholesterol oxidation." Exp Cell Res **291**(1): 36-45.
- Nguyen, D. H., B. Giri, G. Collins and D. D. Taub (2005). "Dynamic reorganization of chemokine receptors, cholesterol, lipid rafts, and adhesion molecules to sites of CD4 engagement." Exp Cell Res **304**(2): 559-69.
- Nilsen, S. L. and F. J. Castellino (1999). "Expression of human plasminogen in Drosophila Schneider S2 cells." Protein Expr Purif **16**(1): 136-43.
- Noel, J. P., H. E. Hamm and P. B. Sigler (1993). "The 2.2 Å crystal structure of transducin-alpha complexed with GTP gamma S." Nature **366**(6456): 654-63.
- Noguera, M. A., M. D. Ivorra and P. D'Ocon (1996). "Functional evidence of inverse agonism in vascular smooth muscle." Br J Pharmacol **119**(1): 158-64.
- Oakley, R. H., S. A. Laporte, J. A. Holt, M. G. Caron and L. S. Barak (2000). "Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors." J Biol Chem **275**(22): 17201-10.

- Oberlin, E., A. Amara, F. Bachelierie, C. Bessia, J. L. Virelizier, F. Arenzana-Seisdedos, O. Schwartz, J. M. Heard, I. Clark-Lewis, D. F. Legler, M. Loetscher, M. Baggiolini and B. Moser (1996). "The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1." Nature **382**(6594): 833-5.
- Oh, P., D. P. McIntosh and J. E. Schnitzer (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.
- Okada, T., O. P. Ernst, K. Palczewski and K. P. Hofmann (2001). "Activation of rhodopsin: new insights from structural and biochemical studies." Trends Biochem Sci **26**(5): 318-24.
- Okamoto, Y., H. Ninomiya, S. Miwa and T. Masaki (2000). "Cholesterol oxidation switches the internalization pathway of endothelin receptor type A from caveolae to clathrin-coated pits in Chinese hamster ovary cells." J Biol Chem **275**(9): 6439-46.
- Olbrich, H., A. E. Proudfoot and M. Oppermann (1999). "Chemokine-induced phosphorylation of CC chemokine receptor 5 (CCR5)." J Leukoc Biol **65**(3): 281-5.
- Olson, J. M., S. J. Kennedy and G. A. Cabral (2003). "Expression of the murine CB2 cannabinoid receptor using a recombinant Semliki Forest virus." Biochem Pharmacol **65**(12): 1931-42.
- Onuffer, J. J. and R. Horuk (2002). "Chemokines, chemokine receptors and small-molecule antagonists: recent developments." Trends Pharmacol Sci **23**(10): 459-67.
- Opekarova, M. and W. Tanner (2003). "Specific lipid requirements of membrane proteins--a putative bottleneck in heterologous expression." Biochim Biophys Acta **1610**(1): 11-22.
- Oppermann, M., M. Mack, A. E. Proudfoot and H. Olbrich (1999). "Differential effects of CC chemokines on CC chemokine receptor 5 (CCR5) phosphorylation and identification of phosphorylation sites on the CCR5 carboxyl terminus." J Biol Chem **274**(13): 8875-85.
- Oppermann, M. (2004). "Chemokine receptor CCR5: insights into structure, function, and regulation." Cell Signal **16**(11): 1201-10.
- Orsini, M. J., J. L. Parent, S. J. Mundell, J. L. Benovic and A. Marchese (1999). "Trafficking of the HIV coreceptor CXCR4. Role of arrestins and identification of residues in the c-terminal tail that mediate receptor internalization." J Biol Chem **274**(43): 31076-86.
- Overton, M. and K. Blumer (2002). "Use of fluorescence resonance energy transfer to analyze oligomerization of G-protein-coupled receptors expressed in yeast." Methods **27**(4): 324.
- Overton, M. C. and K. J. Blumer (2000). "G-protein-coupled receptors function as oligomers in vivo." Curr Biol **10**(6): 341-4.
- Palanche, T., B. Ilien, S. Zoffmann, M. P. Reck, B. Bucher, S. J. Edelstein and J. L. Galzi (2001). "The neurokinin A receptor activates calcium and cAMP responses through distinct conformational states." J Biol Chem **276**(37): 34853-61.

- Palczewski, K., T. Kumasaka, T. Hori, C. A. Behnke, H. Motoshima, B. A. Fox, I. Le Trong, D. C. Teller, T. Okada, R. E. Stenkamp, M. Yamamoto and M. Miyano (2000). "Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor." Science **289**(5480): 739-45.
- Parmentier, M. L., L. Prezeau, J. Bockaert and J. P. Pin (2002). "A model for the functioning of family 3 GPCRs." Trends Pharmacol Sci **23**(6): 268-74.
- Parnot, C., S. Miserey-Lenkei, S. Bardin, P. Corvol and E. Clauser (2002). "Lessons from constitutively active mutants of G protein-coupled receptors." Trends Endocrinol Metab **13**(8): 336.
- Parnot, C. and B. Kobilka (2004). "Toward understanding GPCR dimers." Nat Struct Mol Biol **11**(8): 691-2.
- Pascal, G. and G. Milligan (2005). "Functional complementation and the analysis of opioid receptor homodimerization." Mol Pharmacol **68**(3): 905-15.
- Pausch, M. H., M. Lai, E. Tseng, J. Paulsen, B. Bates and S. Kwak (2004). "Functional expression of human and mouse P2Y12 receptors in *Saccharomyces cerevisiae*." Biochem Biophys Res Commun **324**(1): 171-7.
- Pauwels, P. J. and T. Wurch (1998). "Review: amino acid domains involved in constitutive activation of G-protein-coupled receptors." Mol Neurobiol **17**(1-3): 109-35.
- Penela, P., C. Ribas and F. Mayor, Jr. (2003). "Mechanisms of regulation of the expression and function of G protein-coupled receptor kinases." Cell Signal **15**(11): 973-81.
- Percherancier, Y., T. Planchenault, A. Valenzuela-Fernandez, J. L. Virelizier, F. Arenzana-Seisdedos and F. Bachelerie (2001). "Palmitoylation-dependent control of degradation, life span, and membrane expression of the CCR5 receptor." J Biol Chem **276**(34): 31936-44.
- Percherancier, Y., B. Lagane, T. Planchenault, I. Staropoli, R. Altmeyer, J. L. Virelizier, F. Arenzana-Seisdedos, D. C. Hoessli and F. Bachelerie (2003). "HIV-1 Entry into T-cells Is Not Dependent on CD4 and CCR5 Localization to Sphingolipid-enriched, Detergent-resistant, Raft Membrane Domains." J Biol Chem **278**(5): 3153-61.
- Percherancier, Y., Y. A. Berchiche, I. Slight, R. Volkmer-Engert, H. Tamamura, N. Fujii, M. Bouvier and N. Heveker (2005). "Bioluminescence resonance energy transfer reveals ligand-induced conformational changes in CXCR4 homo- and heterodimers." J Biol Chem **280**(11): 9895-903.
- Perez, D. M. and S. S. Karnik (2005). "Multiple signaling states of G-protein-coupled receptors." Pharmacol Rev **57**(2): 147-61.
- Perret, B. G., R. Wagner, S. Lecat, K. Brillet, G. Rabut, B. Bucher and F. Pattus (2003). "Expression of EGFP-amino-tagged human mu opioid receptor in *Drosophila* Schneider 2 cells: a potential expression system for large-scale production of G-protein coupled receptors." Protein Expr Purif **31**(1): 123-32.
- Pierson, T. C. and R. W. Doms (2003). "HIV-1 entry and its inhibition." Curr Top Microbiol Immunol **281**: 1-27.
- Piiper, A. and S. Zeuzem (2004). "Receptor tyrosine kinases are signaling intermediates of G protein-coupled receptors." Curr Pharm Des **10**(28): 3539-45.

- Pin, J. P., T. Galvez and L. Prezeau (2003). "Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors." Pharmacol Ther **98**(3): 325-54.
- Pitcher, J. A., N. J. Freedman and R. J. Lefkowitz (1998). "G protein-coupled receptor kinases." Annu Rev Biochem **67**: 653-92.
- Poli, G. (2001). "PRO-140 (Progenics)." IDrugs **4**(9): 1068-71.
- Pollakis, G., S. Kang, A. Kliphuis, M. I. Chalaby, J. Goudsmit and W. A. Paxton (2001). "N-Linked Glycosylation of the HIV Type-1 gp120 Envelope Glycoprotein as a Major Determinant of CCR5 and CXCR4 Coreceptor Utilization." J Biol Chem **276**(16): 13433-41.
- Pollok-Kopp, B., K. Schwarze, V. K. Baradari and M. Oppermann (2003). "Analysis of ligand-stimulated CC chemokine receptor 5 (CCR5) phosphorylation in intact cells using phosphosite-specific antibodies." J Biol Chem **278**(4): 2190-8.
- Pomerantz, R. J. and D. L. Horn (2003). "Twenty years of therapy for HIV-1 infection." Nat Med **9**(7): 867-873.
- Popik, W., T. M. Alce and W. C. Au (2002). "Human immunodeficiency virus type 1 uses lipid raft-colocalized CD4 and chemokine receptors for productive entry into CD4(+) T cells." J Virol **76**(10): 4709-22.
- Princen, K., S. Hatse, K. Vermeire, S. Aquaro, E. De Clercq, L. O. Gerlach, M. Rosenkilde, T. W. Schwartz, R. Skerlj, G. Bridger and D. Schols (2004). "Inhibition of human immunodeficiency virus replication by a dual CCR5/CXCR4 antagonist." J Virol **78**(23): 12996-3006.
- Princen, K. and D. Schols (2005). "HIV chemokine receptor inhibitors as novel anti-HIV drugs." Cytokine Growth Factor Rev.
- Prinster, S. C., C. Hague and R. A. Hall (2005). "Heterodimerization of G protein-coupled receptors: specificity and functional significance." Pharmacol Rev **57**(3): 289-98.
- Probst, W. C., L. A. Snyder, D. I. Schuster, J. Brosius and S. C. Sealton (1992). "Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily." DNA Cell Biol **11**(1): 1-20.
- Prosise, W. W., T. Yarosh-Tomaine, Z. Lozewski, R. N. Ingram, J. Zou, J. J. Liu, F. Zhu, S. S. Taremi, H. V. Le and W. Wang (2004). "Protease domain of human ADAM33 produced by Drosophila S2 cells." Protein Expr Purif **38**(2): 292-301.
- Prossnitz, E. R. (2004). "Novel roles for arrestins in the post-endocytic trafficking of G protein-coupled receptors." Life Sci **75**(8): 893-9.
- Proudfoot, A. E., R. Buser, F. Borlat, S. Alouani, D. Soler, R. E. Offord, J. M. Schroder, C. A. Power and T. N. Wells (1999). "Amino-terminally modified RANTES analogues demonstrate differential effects on RANTES receptors." J Biol Chem **274**(45): 32478-85.
- Rabut, G. E., J. A. Konner, F. Kajumo, J. P. Moore and T. Dragic (1998). "Alanine substitutions of polar and nonpolar residues in the amino-terminal domain of CCR5 differently impair entry of macrophage- and dualtropic isolates of human immunodeficiency virus type 1." J Virol **72**(4): 3464-8.
- Raisley, B., M. Zhang, D. Hereld and J. A. Hadwiger (2004). "A cAMP receptor-like G protein-coupled receptor with roles in growth regulation and development." Dev Biol **265**(2): 433-45.

- Rana, S., G. Besson, D. G. Cook, J. Rucker, R. J. Smyth, Y. Yi, J. D. Turner, H. H. Guo, J. G. Du, S. C. Peiper, E. Lavi, M. Samson, F. Libert, C. Liesnard, G. Vassart, R. W. Doms, M. Parmentier and R. G. Collman (1997). "Role of CCR5 in infection of primary macrophages and lymphocytes by macrophage-tropic strains of human immunodeficiency virus: resistance to patient-derived and prototype isolates resulting from the delta ccr5 mutation." *J Virol* **71**(4): 3219-27.
- Raport, C. J., J. Gosling, V. L. Schweickart, P. W. Gray and I. F. Charo (1996). "Molecular cloning and functional characterization of a novel human CC chemokine receptor (CCR5) for RANTES, MIP-1beta, and MIP-1alpha." *J Biol Chem* **271**(29): 17161-6.
- Rasmussen, T. N., I. Novak and S. M. Nielsen (2004). "Internalization of the human CRF receptor 1 is independent of classical phosphorylation sites and of beta-arrestin 1 recruitment." *Eur J Biochem* **271**(22): 4366-74.
- Ribeiro, S. and R. Horuk (2005). "The clinical potential of chemokine receptor antagonists." *Pharmacol Ther*.
- Richardson, R. M., K. Tokunaga, R. Marjoram, T. Sata and R. Snyderman (2003). "Interleukin-8-mediated heterologous receptor internalization provides resistance to HIV-1 infectivity. Role of signal strength and receptor desensitization." *J Biol Chem* **278**(18): 15867-73.
- Robishaw, J. D. and C. H. Berlot (2004). "Translating G protein subunit diversity into functional specificity." *Curr Opin Cell Biol* **16**(2): 206-9.
- Rodriguez-Frade, J. M., A. J. Vila-Coro, A. M. de Ana, J. P. Albar, A. C. Martinez and M. Mellado (1999). "The chemokine monocyte chemoattractant protein-1 induces functional responses through dimerization of its receptor CCR2." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(7): 3628-33.
- Rodriguez-Frade, J. M., M. Mellado and A. C. Martinez (2001). "Chemokine receptor dimerization: two are better than one." *Trends Immunol* **22**(11): 612-7.
- Rodriguez-Frade, J. M., G. del Real, A. Serrano, P. Hernanz-Falcon, S. F. Soriano, A. J. Vila-Coro, A. M. de Ana, P. Lucas, I. Prieto, A. C. Martinez and M. Mellado (2004). "Blocking HIV-1 infection via CCR5 and CXCR4 receptors by acting in trans on the CCR2 chemokine receptor." *Embo J* **23**(1): 66-76.
- Roland, J., B. J. Murphy, B. Ahr, V. Robert-Hebmann, V. Delauzun, K. E. Nye, C. Devaux and M. Biard-Piechaczyk (2003). "Role of the intracellular domains of CXCR4 in SDF-1-mediated signaling." *Blood* **101**(2): 399-406.
- Root, M. J., M. S. Kay and P. S. Kim (2001). "Protein Design of an HIV-1 Entry Inhibitor." *Science* **11**: 11.
- Rosenkilde, M. M., M. Waldhoer, H. R. Luttichau and T. W. Schwartz (2001). "Virally encoded 7TM receptors." *Oncogene* **20**(13): 1582-93.
- Rucker, J., M. Samson, B. J. Doranz, F. Libert, J. F. Berson, Y. Yi, R. J. Smyth, R. G. Collman, C. C. Broder, G. Vassart, R. W. Doms and M. Parmentier (1996). "Regions in beta-chemokine receptors CCR5 and CCR2b that determine HIV-1 cofactor specificity." *Cell* **87**(3): 437-46.
- Sabourin, T., L. Bastien, D. R. Bachvarov and F. Marceau (2002). "Agonist-induced translocation of the kinin B(1) receptor to caveolae-related rafts." *Mol Pharmacol* **61**(3): 546-53.

- Saeki, T., A. M. Shimabuku, Y. Azuma, Y. Shibano, T. Komano and K. Ueda (1991). "Expression of human P-glycoprotein in yeast cells--effects of membrane component sterols on the activity of P-glycoprotein." *Agric Biol Chem* **55**(7): 1859-65.
- Sakmar, T. P. (2002). "Structure of rhodopsin and the superfamily of seven-helical receptors: the same and not the same." *Curr Opin Cell Biol* **14**(2): 189-95.
- Salahpour, A., S. Angers and M. Bouvier (2000). "Functional significance of oligomerization of G-protein-coupled receptors." *Trends Endocrinol Metab* **11**(5): 163-8.
- Samama, P., S. Cotecchia, T. Costa and R. J. Lefkowitz (1993). "A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model." *J Biol Chem* **268**(7): 4625-36.
- Samson, M., O. Labbe, C. Mollereau, G. Vassart and M. Parmentier (1996). "Molecular cloning and functional expression of a new human CC-chemokine receptor gene." *Biochemistry* **35**(11): 3362-7.
- Samson, M., G. LaRosa, F. Libert, P. Paindavoine, M. Detheux, G. Vassart and M. Parmentier (1997). "The second extracellular loop of CCR5 is the major determinant of ligand specificity." *J Biol Chem* **272**(40): 24934-41.
- Sander, P., S. Grunewald, H. Reilander and H. Michel (1994). "Expression of the human D2S dopamine receptor in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*: a comparative study." *FEBS Lett* **344**(1): 41-6.
- Sarramegna, V., F. Talmont, P. Demange and A. Milon (2003). "Heterologous expression of G-protein-coupled receptors: comparison of expression systems from the standpoint of large-scale production and purification." *Cell Mol Life Sci* **60**(8): 1529-46.
- Sato, N., W. A. Kuziel, P. C. Melby, R. L. Reddick, V. KostECKi, W. Zhao, N. Maeda, S. K. Ahuja and S. S. Ahuja (1999). "Defects in the generation of IFN-gamma are overcome to control infection with *Leishmania donovani* in CC chemokine receptor (CCR) 5-, macrophage inflammatory protein-1 alpha-, or CCR2-deficient mice." *J Immunol* **163**(10): 5519-25.
- Saunders, J. (2001). "Rhodopsin crystal structure: provides information on GPCR-ligand binding in general?" *Drug Discov Today* **6**(6): 288-289.
- Schamel, W. W., S. Kuppig, B. Becker, K. Gimborn, H. P. Hauri and M. Reth (2003). "A high-molecular-weight complex of membrane proteins BAP29/BAP31 is involved in the retention of membrane-bound IgD in the endoplasmic reticulum." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(17): 9861-6.
- Scheer, A., F. Fanelli, T. Costa, P. G. De Benedetti and S. Cotecchia (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.
- Scheer, A., K. Bjorklof, S. Cotecchia and K. Lundstrom (1999). "Expression of the alpha 1b-adrenergic receptor and G protein subunits in mammalian cell lines using the Semliki Forest virus expression system." *J Recept Signal Transduct Res* **19**(1-4): 369-78.

- Schertler, G. F., C. Villa and R. Henderson (1993). "Projection structure of rhodopsin." Nature **362**(6422): 770-2.
- Schetz, J. A., O. J. Kim and D. R. Sibley (2003). "Pharmacological characterization of mammalian D1 and D2 dopamine receptors expressed in *Drosophila* Schneider-2 cells." J Recept Signal Transduct Res **23**(1): 99-109.
- Schlegel, A. and M. P. Lisanti (2001). "Caveolae and their coat proteins, the caveolins: from electron microscopic novelty to biological launching pad." J Cell Physiol **186**(3): 329-37.
- Schneider, I. (1972). "Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*." J Embryol Exp Morphol **27**(2): 353-65.
- Schneider, S. E., B. L. Bray, C. J. Mader, P. E. Friedrich, M. W. Anderson, T. S. Taylor, N. Boshernitzan, T. E. Niemi, B. C. Fulcher, S. R. Whight, J. M. White, R. J. Greene, L. E. Stoltenberg and M. Lichty (2005). "Development of HIV fusion inhibitors." J Pept Sci.
- Schoneberg, T., A. Schulz, H. Biebermann, T. Hermsdorf, H. Rompler and K. Sangkuhl (2004). "Mutant G-protein-coupled receptors as a cause of human diseases." Pharmacol Ther **104**(3): 173-206.
- Sealfon, S. C., H. Weinstein and R. P. Millar (1997). "Molecular mechanisms of ligand interaction with the gonadotropin-releasing hormone receptor." Endocr Rev **18**(2): 180-205.
- Seibert, C. and T. P. Sakmar (2004). "Small-molecule antagonists of CCR5 and CXCR4: a promising new class of anti-HIV-1 drugs." Curr Pharm Des **10**(17): 2041-62.
- Seifert, R. and K. Wenzel-Seifert (2002). "Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors." Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol **366**(5): 381-416.
- Shaheen, F. and R. G. Collman (2004). "Co-receptor antagonists as HIV-1 entry inhibitors." Curr Opin Infect Dis **17**(1): 7-16.
- Shaw, J. P., Z. Johnson, F. Borlat, C. Zwahlen, A. Kungl, K. Roulin, A. Harrenga, T. N. Wells and A. E. Proudfoot (2004). "The X-ray structure of RANTES: heparin-derived disaccharides allows the rational design of chemokine inhibitors." Structure (Camb) **12**(11): 2081-93.
- Shen, W., B. Li, M. A. Wetzel, T. J. Rogers, E. E. Henderson, S. B. Su, W. Gong, Y. Le, R. Sargeant, D. S. Dimitrov, J. J. Oppenheim and J. M. Wang (2000). "Down-regulation of the chemokine receptor CCR5 by activation of chemotactic formyl peptide receptor in human monocytes." Blood **96**(8): 2887-94.
- Shirozu, M., T. Nakano, J. Inazawa, K. Tashiro, H. Tada, T. Shinohara and T. Honjo (1995). "Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene." Genomics **28**(3): 495-500.
- Signoret, N., J. Oldridge, A. Pelchen-Matthews, P. J. Klasse, T. Tran, L. F. Brass, M. M. Rosenkilde, T. W. Schwartz, W. Holmes, W. Dallas, M. A. Luther, T. N. Wells, J. A. Hoxie and M. Marsh (1997). "Phorbol esters and SDF-1 induce rapid endocytosis and down modulation of the chemokine receptor CXCR4." J Cell Biol **139**(3): 651-64.

- Signoret, N., A. Pelchen-Matthews, M. Mack, A. E. Proudfoot and M. Marsh (2000). "Endocytosis and recycling of the HIV coreceptor CCR5." J Cell Biol **151**(6): 1281-94.
- Signoret, N., T. Christophe, M. Oppermann and M. Marsh (2004). "pH-independent endocytic cycling of the chemokine receptor CCR5." Traffic **5**(7): 529-43.
- Simmons, G., P. R. Clapham, L. Picard, R. E. Offord, M. M. Rosenkilde, T. W. Schwartz, R. Buser, T. N. Wells and A. E. Proudfoot (1997). "Potent inhibition of HIV-1 infectivity in macrophages and lymphocytes by a novel CCR5 antagonist." Science **276**(5310): 276-9.
- Singer, II, S. Scott, D. W. Kawka, J. Chin, B. L. Daugherty, J. A. DeMartino, J. DiSalvo, S. L. Gould, J. E. Lineberger, L. Malkowitz, M. D. Miller, L. Mitnaul, S. J. Siciliano, M. J. Staruch, H. R. Williams, H. J. Zweerink and M. S. Springer (2001). "CCR5, CXCR4, and CD4 are clustered and closely apposed on microvilli of human macrophages and T cells." J Virol **75**(8): 3779-90.
- Singer, M. A. and S. Lindquist (1998). "Multiple effects of trehalose on protein folding in vitro and in vivo." Mol Cell **1**(5): 639-48.
- Sizmann, D., H. Kuusinen, S. Keranen, J. Lomasney, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz and K. Keinanen (1996). "Production of adrenergic receptors in yeast." Receptors Channels **4**(3): 197-203.
- Skelton, N. J., F. Aspiras, J. Ogez and T. J. Schall (1995). "Proton NMR assignments and solution conformation of RANTES, a chemokine of the C-C type." Biochemistry **34**(16): 5329-42.
- Sloane, A. J., V. Raso, D. S. Dimitrov, X. Xiao, S. Deo, N. Muljadi, D. Restuccia, S. Turville, C. Kearney, C. C. Broder, H. Zoellner, A. L. Cunningham, L. Bendall and G. W. Lynch (2005). "Marked structural and functional heterogeneity in CXCR4: separation of HIV-1 and SDF-1alpha responses." Immunol Cell Biol **83**(2): 129-43.
- Sondek, J., A. Bohm, D. G. Lambright, H. E. Hamm and P. B. Sigler (1996). "Crystal structure of a G-protein beta gamma dimer at 2.1A resolution." Nature **379**(6563): 369-74.
- Speck, R. F., U. Esser, M. L. Penn, D. A. Eckstein, L. Pulliam, S. Y. Chan and M. A. Goldsmith (1999). "A trans-receptor mechanism for infection of CD4-negative cells by human immunodeficiency virus type 1." Curr Biol **9**(10): 547-50.
- Springael, J. Y., E. Urizar and M. Parmentier (2005). "Dimerization of chemokine receptors and its functional consequences." Cytokine Growth Factor Rev.
- Stantchev, T. S. and C. C. Broder (2001). "Human immunodeficiency virus type-1 and chemokines: beyond competition for common cellular receptors." Cytokine Growth Factor Rev **12**(2-3): 219-43.
- Staudinger, R. and J. C. Bandres (2000). "Solubilization of the chemokine receptor CXCR4." Biochem Biophys Res Commun **274**(1): 153-6.
- Stenkamp, R. E., D. C. Teller and K. Palczewski (2002). "Crystal structure of rhodopsin: a G-protein-coupled receptor." ChemBiochem **3**(10): 963-7.
- Stenlund, P., G. J. Babcock, J. Sodroski and D. G. Myszka (2003). "Capture and reconstitution of G protein-coupled receptors on a biosensor surface." Anal Biochem **316**(2): 243-50.

- Strader, C. D., T. M. Fong, M. R. Tota, D. Underwood and R. A. Dixon (1994). "Structure and function of G protein-coupled receptors." Annu Rev Biochem **63**: 101-32.
- Strizki, J. M., S. Xu, N. E. Wagner, L. Wojcik, J. Liu, Y. Hou, M. Endres, A. Palani, S. Shapiro, J. W. Clader, W. J. Greenlee, J. R. Tagat, S. McCombie, K. Cox, A. B. Fawzi, C. C. Chou, C. Pugliese-Sivo, L. Davies, M. E. Moreno, D. D. Ho, A. Trkola, C. A. Stoddart, J. P. Moore, G. R. Reyes and B. M. Baroudy (2001). "SCH-C (SCH 351125), an orally bioavailable, small molecule antagonist of the chemokine receptor CCR5, is a potent inhibitor of HIV-1 infection in vitro and in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(22): 12718-23.
- Sudbery, P. E., M. A. Gleeson, R. A. Veale, A. M. Ledebor and M. C. Zoetmulder (1988). "Hansenula polymorpha as a novel yeast system for the expression of heterologous genes." Biochem Soc Trans **16**(6): 1081-3.
- Sun, Y., Z. Cheng, L. Ma and G. Pei (2002). "Beta-arrestin2 is critically involved in CXCR4-mediated chemotaxis, and this is mediated by its enhancement of p38 MAPK activation." J Biol Chem **277**(51): 49212-9.
- Sunahara, R. K., J. J. Tesmer, A. G. Gilman and S. R. Sprang (1997). "Crystal structure of the adenylyl cyclase activator G α ." Science **278**(5345): 1943-7.
- Szabo, I., M. A. Wetzel, N. Zhang, A. D. Steele, D. E. Kaminsky, C. Chen, L. Y. Liu-Chen, F. Bednar, E. E. Henderson, O. M. Howard, J. J. Oppenheim and T. J. Rogers (2003). "Selective inactivation of CCR5 and decreased infectivity of R5 HIV-1 strains mediated by opioid-induced heterologous desensitization." J Leukoc Biol **74**(6): 1074-82.
- Tabak, H. F., I. Braakman and B. Distel (1999). "Peroxisomes: simple in function but complex in maintenance." Trends Cell Biol **9**(11): 447-53.
- Tachibana, K., S. Hirota, H. Iizasa, H. Yoshida, K. Kawabata, Y. Kataoka, Y. Kitamura, K. Matsushima, N. Yoshida, S. Nishikawa, T. Kishimoto and T. Nagasawa (1998). "The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract." Nature **393**(6685): 591-4.
- Tagat, J. R., R. W. Steensma, S. W. McCombie, D. V. Nazareno, S. I. Lin, B. R. Neustadt, K. Cox, S. Xu, L. Wojcik, M. G. Murray, N. Vantuno, B. M. Baroudy and J. M. Strizki (2001). "Piperazine-based CCR5 antagonists as HIV-1 inhibitors. II. Discovery of 1-[(2,4-dimethyl-3-pyridinyl)carbonyl]-4-methyl-4-[3(S)-methyl-4-[1(S)-[4-(trifluoromethyl)phenyl]ethyl]-1-piperazinyl]-piperidine N1-oxide (Sch-350634), an orally bioavailable, potent CCR5 antagonist." J Med Chem **44**(21): 3343-6.
- Takashima, K., H. Miyake, N. Kanzaki, Y. Tagawa, X. Wang, Y. Sugihara, Y. Iizawa and M. Baba (2005). "Highly potent inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by TAK-220, an orally bioavailable small-molecule CCR5 antagonist." Antimicrob Agents Chemother **49**(8): 3474-82.
- Takeda, S., S. Kadowaki, T. Haga, H. Takaesu and S. Mitaku (2002). "Identification of G protein-coupled receptor genes from the human genome sequence." FEBS Lett **520**(1-3): 97-101.
- Tamamura, H., Y. Xu, T. Hattori, X. Zhang, R. Arakaki, K. Kanbara, A. Omagari, A. Otaka, T. Ibuka, N. Yamamoto, H. Nakashima and N. Fujii (1998). "A low-molecular-

- weight inhibitor against the chemokine receptor CXCR4: a strong anti-HIV peptide T140." Biochem Biophys Res Commun **253**(3): 877-82.
- Terrillon, S., T. Durroux, B. Mouillac, A. Breit, M. A. Ayoub, M. Taulan, R. Jockers, C. Barberis and M. Bouvier (2003). "Oxytocin and vasopressin V1a and V2 receptors form constitutive homo- and heterodimers during biosynthesis." Mol Endocrinol **17**(4): 677-91.
- Thelen, M. (2001). "Dancing to the tune of chemokines." Nat Immunol **2**(2): 129-34.
- Torfs, H., R. Shariatmadari, F. Guerrero, M. Parmentier, J. Poels, W. Van Poyer, E. Swinnen, A. De Loof, K. Akerman and J. Vanden Broeck (2000). "Characterization of a receptor for insect tachykinin-like peptide agonists by functional expression in a stable Drosophila Schneider 2 cell line." J Neurochem **74**(5): 2182-9.
- Tota, M. R., L. Xu, A. Sirotina, C. D. Strader and M. P. Graziano (1995). "Interaction of [fluorescein-Trp25]glucagon with the human glucagon receptor expressed in Drosophila Schneider 2 cells." J Biol Chem **270**(44): 26466-72.
- Toth, P. T., D. Ren and R. J. Miller (2004). "Regulation of CXCR4 receptor dimerization by the chemokine SDF-1alpha and the HIV-1 coat protein gp120: a fluorescence resonance energy transfer (FRET) study." J Pharmacol Exp Ther **310**(1): 8-17.
- Townson, J. R., G. J. Graham, N. R. Landau, B. Rasala and R. J. Nibbs (2000). "Aminooxypentane addition to the chemokine macrophage inflammatory protein-1alpha P increases receptor affinities and HIV inhibition." J Biol Chem **275**(50): 39254-61.
- Tsao, P., T. Cao and M. von Zastrow (2001). "Role of endocytosis in mediating downregulation of G-protein-coupled receptors." Trends Pharmacol Sci **22**(2): 91-6.
- Turner, L., S. G. Ward and J. Westwick (1995). "RANTES-activated human T lymphocytes. A role for phosphoinositide 3-kinase." J Immunol **155**(5): 2437-44.
- Turville, S. G., J. Arthos, K. Mac Donald, G. Lynch, H. Naif, G. Clark, D. Hart and A. L. Cunningham (2001). "HIV gp120 receptors on human dendritic cells." Blood **98**(8): 2482-8.
- Valenzuela-Fernandez, A., T. Palanche, A. Amara, A. Magerus, R. Altmeyer, T. Delaunay, J. L. Virelizier, F. Baleux, J. L. Galzi and F. Arenzana-Seisdedos (2001). "Optimal inhibition of X4 HIV isolates by the CXC chemokine stromal cell-derived factor 1 alpha requires interaction with cell surface heparan sulfate proteoglycans." J Biol Chem **276**(28): 26550-8.
- van der Klei, I. J. and M. Veenhuis (1997). "Yeast peroxisomes: function and biogenesis of a versatile cell organelle." Trends Microbiol **5**(12): 502-9.
- van Dijk, R., K. N. Faber, J. A. Kiel, M. Veenhuis and I. van der Klei (2000). "The methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*: a versatile cell factory." Enzyme Microb Technol **26**(9-10): 793-800.
- Varma, D. R., H. Shen, X. F. Deng, K. G. Peri, S. Chemtob and S. Mulay (1999). "Inverse agonist activities of beta-adrenoceptor antagonists in rat myocardium." Br J Pharmacol **127**(4): 895-902.
- Vassilatis, D. K., J. G. Hohmann, H. Zeng, F. Li, J. E. Ranchalis, M. T. Mortrud, A. Brown, S. S. Rodriguez, J. R. Weller, A. C. Wright, J. E. Bergmann and G. A. Gaitanaris

- (2003). "The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(8): 4903-8.
- Vazquez-Prado, J., P. Casas-Gonzalez and J. A. Garcia-Sainz (2003). "G protein-coupled receptor cross-talk: pivotal roles of protein phosphorylation and protein-protein interactions." Cell Signal **15**(6): 549-57.
- Venkatesan, S., J. J. Rose, R. Lodge, P. M. Murphy and J. F. Foley (2003). "Distinct mechanisms of agonist-induced endocytosis for human chemokine receptors CCR5 and CXCR4." Mol Biol Cell **14**(8): 3305-24.
- Venter, J. C., M. D. Adams, E. W. Myers, P. W. Li, R. J. Mural, G. G. Sutton, H. O. Smith, M. Yandell, C. A. Evans, R. A. Holt, J. D. Gocayne, P. Amanatides, R. M. Ballew, D. H. Huson, J. R. Wortman, Q. Zhang, C. D. Kodira, X. H. Zheng, L. Chen, M. Skupski, G. Subramanian, P. D. Thomas, J. Zhang, G. L. Gabor Miklos, C. Nelson, S. Broder, A. G. Clark, J. Nadeau, V. A. McKusick, N. Zinder, A. J. Levine, R. J. Roberts, M. Simon, C. Slayman, M. Hunkapiller, R. Bolanos, A. Delcher, I. Dew, D. Fasulo, M. Flanigan, L. Florea, A. Halpern, S. Hannenhalli, S. Kravitz, S. Levy, C. Mobarry, K. Reinert, K. Remington, J. Abu-Threideh, E. Beasley, K. Biddick, V. Bonazzi, R. Brandon, M. Cargill, I. Chandramouliswaran, R. Charlab, K. Chaturvedi, Z. Deng, V. Di Francesco, P. Dunn, K. Eilbeck, C. Evangelista, A. E. Gabrielian, W. Gan, W. Ge, F. Gong, Z. Gu, P. Guan, T. J. Heiman, M. E. Higgins, R. R. Ji, Z. Ke, K. A. Ketchum, Z. Lai, Y. Lei, Z. Li, J. Li, Y. Liang, X. Lin, F. Lu, G. V. Merkulov, N. Milshina, H. M. Moore, A. K. Naik, V. A. Narayan, B. Neelam, D. Nusskern, D. B. Rusch, S. Salzberg, W. Shao, B. Shue, J. Sun, Z. Wang, A. Wang, X. Wang, J. Wang, M. Wei, R. Wides, C. Xiao, C. Yan, A. Yao, J. Ye, M. Zhan, W. Zhang, H. Zhang, Q. Zhao, L. Zheng, F. Zhong, W. Zhong, S. Zhu, S. Zhao, D. Gilbert, S. Baumhueter, G. Spier, C. Carter, A. Cravchik, T. Woodage, F. Ali, H. An, A. Awe, D. Baldwin, H. Baden, M. Barnstead, I. Barrow, K. Beeson, D. Busam, A. Carver, A. Center, M. L. Cheng, L. Curry, S. Danaher, L. Davenport, R. Desilets, S. Dietz, K. Dodson, L. Doup, S. Ferriera, N. Garg, A. Gluecksmann, B. Hart, J. Haynes, C. Haynes, C. Heiner, S. Hladun, D. Hostin, J. Houck, T. Howland, C. Ibegwam, J. Johnson, F. Kalush, L. Kline, S. Koduru, A. Love, F. Mann, D. May, S. McCawley, T. McIntosh, I. McMullen, M. Moy, L. Moy, B. Murphy, K. Nelson, C. Pfannkoch, E. Pratts, V. Puri, H. Qureshi, M. Reardon, R. Rodriguez, Y. H. Rogers, D. Romblad, B. Ruhfel, R. Scott, C. Sitter, M. Smallwood, E. Stewart, R. Strong, E. Suh, R. Thomas, N. N. Tint, S. Tse, C. Vech, G. Wang, J. Wetter, S. Williams, M. Williams, S. Windsor, E. Winn-Deen, K. Wolfe, J. Zaveri, K. Zaveri, J. F. Abril, R. Guigo, M. J. Campbell, K. V. Sjolander, B. Karlak, A. Kejariwal, H. Mi, B. Lazareva, T. Hatton, A. Narechania, K. Diemer, A. Muruganujan, N. Guo, S. Sato, V. Bafna, S. Istrail, R. Lippert, R. Schwartz, B. Walenz, S. Yooseph, D. Allen, A. Basu, J. Baxendale, L. Blick, M. Caminha, J. Carnes-Stine, P. Caulk, Y. H. Chiang, M. Coyne, C. Dahlke, A. Mays, M. Dombroski, M. Donnelly, D. Ely, S. Esparham, C. Fosler, H. Gire, S. Glanowski, K. Glasser, A. Glodek, M. Gorokhov, K. Graham, B. Gropman, M. Harris, J. Heil, S. Henderson, J. Hoover, D. Jennings, C. Jordan, J. Jordan, J. Kasha, L. Kagan, C. Kraft, A. Levitsky, M. Lewis, X. Liu, J. Lopez, D. Ma, W. Majoros, J. McDaniel, S. Murphy, M. Newman, T. Nguyen, N. Nguyen, M. Nodell, S. Pan, J. Peck, M. Peterson, W. Rowe, R. Sanders, J. Scott, M. Simpson, T.

- Smith, A. Sprague, T. Stockwell, R. Turner, E. Venter, M. Wang, M. Wen, D. Wu, M. Wu, A. Xia, A. Zandieh and X. Zhu (2001). "The sequence of the human genome." Science **291**(5507): 1304-51.
- Vermeire, K., D. Schols and T. W. Bell (2004). "CD4 down-modulating compounds with potent anti-HIV activity." Curr Pharm Des **10**(15): 1795-803.
- Vila-Coro, A. J., J. M. Rodriguez-Frade, A. Martin De Ana, M. C. Moreno-Ortiz, A. C. Martinez and M. Mellado (1999). "The chemokine SDF-1alpha triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway." Faseb J **13**(13): 1699-710.
- Vila-Coro, A. J., M. Mellado, A. Martin de Ana, P. Lucas, G. del Real, A. C. Martinez and J. M. Rodriguez-Frade (2000). "HIV-1 infection through the CCR5 receptor is blocked by receptor dimerization." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(7): 3388-93.
- Vives, R. R., A. Imberty, Q. J. Sattentau and H. Lortat-Jacob (2005). "Heparan sulfate targets the HIV-1 envelope glycoprotein gp120 coreceptor binding site." J Biol Chem **280**(22): 21353-7.
- Vollmer, J. Y., P. Alix, A. Chollet, K. Takeda and J. L. Galzi (1999). "Subcellular compartmentalization of activation and desensitization of responses mediated by NK2 neurokinin receptors." J Biol Chem **274**(53): 37915-22.
- Wagner, L., O. O. Yang, E. A. Garcia-Zepeda, Y. Ge, S. A. Kalams, B. D. Walker, M. S. Pasternack and A. D. Luster (1998). "Beta-chemokines are released from HIV-1-specific cytolytic T-cell granules complexed to proteoglycans." Nature **391**(6670): 908-11.
- Walker, D. K., S. Abel, P. Comby, G. J. Muirhead, A. N. Nedderman and D. A. Smith (2005). "Species differences in the disposition of the CCR5 antagonist, UK-427,857, a new potential treatment for HIV." Drug Metab Dispos **33**(4): 587-95.
- Wang, D., X. Sun, L. M. Bohn and W. Sadee (2005). "Opioid receptor homo- and heterodimerization in living cells by quantitative bioluminescence resonance energy transfer." Mol Pharmacol **67**(6): 2173-84.
- Wang, J. F., I. W. Park and J. E. Groopman (2000). "Stromal cell-derived factor-1alpha stimulates tyrosine phosphorylation of multiple focal adhesion proteins and induces migration of hematopoietic progenitor cells: roles of phosphoinositide-3 kinase and protein kinase C." Blood **95**(8): 2505-13.
- Wang, J. M. and J. J. Oppenheim (1999). "Interference with the signaling capacity of CC chemokine receptor 5 can compromise its role as an HIV-1 entry coreceptor in primary T lymphocytes." J Exp Med **190**(5): 591-5.
- Wang, W. K., T. Dudek, Y. J. Zhao, H. G. Brumblay, M. Essex and T. H. Lee (1998). "CCR5 coreceptor utilization involves a highly conserved arginine residue of HIV type 1 gp120." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(10): 5740-5.
- Warne, T., J. Chirnside and G. F. Schertler (2003). "Expression and purification of truncated, non-glycosylated turkey beta-adrenergic receptors for crystallization." Biochim Biophys Acta **1610**(1): 133-40.
- Weill, C., J. L. Galzi, S. Chasserot-Golaz, M. Goeldner and B. Ilien (1999a). "Functional characterization and potential applications for enhanced green fluorescent protein- and epitope-fused human M1 muscarinic receptors." J Neurochem **73**(2): 791-801.

- Weill, C., B. Ilien, M. Goeldner and J. L. Galzi (1999b). "Fluorescent muscarinic EGFP-hM1 chimeric receptors: design, ligand binding and functional properties." J Recept Signal Transduct Res **19**(1-4): 423-36.
- Weiss, H. M., W. Haase, H. Michel and H. Reilander (1995). "Expression of functional mouse 5-HT_{5A} serotonin receptor in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: pharmacological characterization and localization." FEBS Lett **377**(3): 451-6.
- Weiss, H. M., W. Haase, H. Michel and H. Reilander (1998). "Comparative biochemical and pharmacological characterization of the mouse 5HT_{5A} 5-hydroxytryptamine receptor and the human beta₂-adrenergic receptor produced in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*." Biochem J **330** (Pt 3): 1137-47.
- Weissman, D., R. L. Rabin, J. Arthos, A. Rubbert, M. Dybul, R. Swofford, S. Venkatesan, J. M. Farber and A. S. Fauci (1997). "Macrophage-tropic HIV and SIV envelope proteins induce a signal through the CCR5 chemokine receptor." Nature **389**(6654): 981-5.
- Wells, T. N. and T. W. Schwartz (1997). "Plagiarism of the host immune system: lessons about chemokine immunology from viruses." Curr Opin Biotechnol **8**(6): 741-8.
- Wess, J. (1997). "G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition." Faseb J **11**(5): 346-54.
- White, J. F., L. B. Trinh, J. Shiloach and R. Grisshammer (2004). "Automated large-scale purification of a G protein-coupled receptor for neurotensin." FEBS Lett **564**(3): 289-93.
- Whitney, J. B. and R. M. Ruprecht (2004). "Live attenuated HIV vaccines: pitfalls and prospects." Curr Opin Infect Dis **17**(1): 17-26.
- Willets, J. M., R. A. Challiss and S. R. Nahorski (2003). "Non-visual GRKs: are we seeing the whole picture?" Trends Pharmacol Sci **24**(12): 626-33.
- Wong, M. M. and E. N. Fish (2003). "Chemokines: attractive mediators of the immune response." Semin Immunol **15**(1): 5-14.
- Wu, L., G. LaRosa, N. Kassam, C. J. Gordon, H. Heath, N. Ruffing, H. Chen, J. Humblis, M. Samson, M. Parmentier, J. P. Moore and C. R. Mackay (1997). "Interaction of chemokine receptor CCR5 with its ligands: multiple domains for HIV-1 gp120 binding and a single domain for chemokine binding." J Exp Med **186**(8): 1373-81.
- Wurch, T., A. Matsumoto and P. J. Pauwels (2001). "Agonist-independent and -dependent oligomerization of dopamine D(2) receptors by fusion to fluorescent proteins." FEBS Lett **507**(1): 109-13.
- Wyse, B. D., I. A. Prior, H. Qian, I. C. Morrow, S. Nixon, C. Muncke, T. V. Kurzchalia, W. G. Thomas, R. G. Parton and J. F. Hancock (2003). "Caveolin interacts with the angiotensin II type 1 receptor during exocytic transport but not at the plasma membrane." J Biol Chem **278**(26): 23738-46.
- Xu, Y., H. Tamamura, R. Arakaki, H. Nakashima, X. Zhang, N. Fujii, T. Uchiyama and T. Hattori (1999). "Marked increase in anti-HIV activity, as well as inhibitory activity against HIV entry mediated by CXCR4, linked to enhancement of the binding ability of tachyplesin analogs to CXCR4." AIDS Res Hum Retroviruses **15**(5): 419-27.

- Yang, A. G., X. Bai, X. F. Huang, C. Yao and S. Chen (1997). "Phenotypic knockout of HIV type 1 chemokine coreceptor CCR-5 by intrakines as potential therapeutic approach for HIV-1 infection." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(21): 11567-72.
- Yang, O. O., S. L. Swanberg, Z. Lu, M. Dziejman, J. McCoy, A. D. Luster, B. D. Walker and S. H. Herrmann (1999). "Enhanced inhibition of human immunodeficiency virus type 1 by Met-stromal-derived factor 1beta correlates with down-modulation of CXCR4." J Virol **73**(6): 4582-9.
- Yang, T. Y., S. C. Chen, M. W. Leach, D. Manfra, B. Homey, M. Wiekowski, L. Sullivan, C. H. Jenh, S. K. Narula, S. W. Chensue and S. A. Lira (2000). "Transgenic expression of the chemokine receptor encoded by human herpesvirus 8 induces an angioproliferative disease resembling Kaposi's sarcoma." J Exp Med **191**(3): 445-54.
- Yeagle, P. L., C. Danis, G. Choi, J. L. Alderfer and A. D. Albert (2000). "Three dimensional structure of the seventh transmembrane helical domain of the G-protein receptor, rhodopsin." Mol Vis **6**: 125-31.
- Yu, P., Z. Yang, J. E. Jones, Z. Wang, S. A. Owens, S. C. Mueller, R. A. Felder and P. A. Jose (2004). "D1 dopamine receptor signaling involves caveolin-2 in HEK-293 cells." Kidney Int **66**(6): 2167-80.
- Zaitseva, M., K. Peden and H. Golding (2003). "HIV coreceptors: role of structure, posttranslational modifications, and internalization in viral-cell fusion and as targets for entry inhibitors." Biochim Biophys Acta **1614**(1): 51-61.
- Zhang, W. B., J. M. Navenot, B. Haribabu, H. Tamamura, K. Hiramatu, A. Omagari, G. Pei, J. P. Manfredi, N. Fujii, J. R. Broach and S. C. Peiper (2002). "A point mutation that confers constitutive activity to CXCR4 reveals that T140 is an inverse agonist and that AMD3100 and ALX40-4C are weak partial agonists." J Biol Chem **277**(27): 24515-21.
- Zhang, X. F., J. F. Wang, E. Matczak, J. A. Proper and J. E. Gropman (2001). "Janus kinase 2 is involved in stromal cell-derived factor-1alpha-induced tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins and migration of hematopoietic progenitor cells." Blood **97**(11): 3342-8.
- Zhao, J., L. Ma, Y. L. Wu, P. Wang, W. Hu and G. Pei (1998). "Chemokine receptor CCR5 functionally couples to inhibitory G proteins and undergoes desensitization." J Cell Biochem **71**(1): 36-45.
- Zhou, N., Z. Luo, J. W. Hall, J. Luo, X. Han and Z. Huang (2000). "Molecular modeling and site-directed mutagenesis of CCR5 reveal residues critical for chemokine binding and signal transduction." Eur J Immunol **30**(1): 164-73.
- Zhou, N., Z. Luo, J. Luo, D. Liu, J. W. Hall, R. J. Pomerantz and Z. Huang (2001). "Structural and functional characterization of human CXCR4 as a chemokine receptor and HIV-1 co-receptor by mutagenesis and molecular modeling studies." J Biol Chem **276**(46): 42826-33.
- Zhou, Y., T. Kurihara, R. P. Ryseck, Y. Yang, C. Ryan, J. Loy, G. Warr and R. Bravo (1998). "Impaired macrophage function and enhanced T cell-dependent immune response in mice lacking CCR5, the mouse homologue of the major HIV-1 coreceptor." J Immunol **160**(8): 4018-25.

- Zimmerman, P. A., A. Buckler-White, G. Alkhatib, T. Spalding, J. Kubofcik, C. Combadiere, D. Weissman, O. Cohen, A. Rubbert, G. Lam, M. Vaccarezza, P. E. Kennedy, V. Kumaraswami, J. V. Giorgi, R. Detels, J. Hunter, M. Chopek, E. A. Berger, A. S. Fauci, T. B. Nutman and P. M. Murphy (1997). "Inherited resistance to HIV-1 conferred by an inactivating mutation in CC chemokine receptor 5: studies in populations with contrasting clinical phenotypes, defined racial background, and quantified risk." Mol Med **3**(1): 23-36.
- Zou, Y. R., A. H. Kottmann, M. Kuroda, I. Taniuchi and D. R. Littman (1998). "Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development." Nature **393**(6685): 595-9.

GLOSSAIRE

1. Les maladies impliquant les récepteurs de chimiokines

Arthrite : inflammation d'une articulation.

Asthme : forme de dyspnée (difficulté respiratoire) caractérisée par une difficulté de l'expiration accompagnée d'un bruit sifflant due à une sténose des bronchioles avec œdème et augmentation des sécrétions.

Athérosclérose : dépôt jaunâtre et grumeleux formé sur la paroi interne des artères.

Cancer : tumeur maligne c'est-à-dire constituée par la prolifération anarchique de cellules anormales, qui envahit les structures voisines et qui a tendance à produire des tumeurs secondaires à distance (métastases). Par extension, prolifération anarchique de cellules anormales sans formation de masse tumorale.

Colite : inflammation du côlon.

Dermatite : inflammation de la peau.

Glomérulonéphrite : nom d'ensemble des néphrites caractérisée par une inflammation des glomérules rénaux.

Goutte : affection souvent héréditaire due à un trouble du métabolisme de l'acide urique, survenant presque exclusivement chez l'homme. Elle se manifeste par des crises d'arthrite aiguë localisée surtout à l'articulation du gros orteil, et par des dépôts d'urate sous-cutanés périarticulaires.

Myocardite : toute atteinte inflammatoire ou dégénérative, aiguë ou chronique, du myocarde (muscle strié réticulé épais, qui constitue la quasi totalité de la paroi du cœur).

Polyarthrite rhumatoïde : rhumatisme polyarticulaire chronique, inflammatoire, d'origine non élucidée à tendance extensive, déformante et ankylosante se rencontrant surtout chez l'adulte, et particulièrement chez la femme. L'affection atteint le plus souvent les articulations des doigts et des poignets, entraînant des déformations caractéristiques « en coup de vent » accompagnées de nodosités sous-cutanées.

Psoriasis : dermatose d'origine inconnue à évolution chronique caractérisée par des taches rouges plus ou moins étendues, bien circonscrites, recouvertes de squames sèches, abondantes et friables. Les lésions siègent surtout aux coudes, aux genoux, au

cuir chevelu, mais peuvent aussi envahir tout le corps. Rebelle au traitement, le psoriasis ne peut être que blanchi, récidivant à intervalles plus ou moins longs.

Rejet de greffe : élimination d'un greffon (fragment de tissu ou d'organe transplanté) par les tissus receveurs, due à une incompatibilité des tissus.

Sarcoïdose : formation pulmonaire tumorale d'aspect nodulaire caractéristique (maladie de Besnier-Boeck-Schaumann).

Sclérose en plaques : affection du système nerveux central de l'adulte jeune, d'étiologie inconnue, due à la formation de plaques de démyélinisation disséminées en n'importe quel point du système nerveux central. La symptomatologie revêt différents aspects : troubles moteurs, cérébelleux, sensitifs, oculaires par atteinte des nerfs optiques, incontinence des sphincters, troubles psychiques. Elle évolue lentement par poussées entrecoupées de rémissions qui, au début, peuvent être complètes.

2. Les cellules du système immunitaire

Cellules dendritiques : cellules trouvées dans les zones T et les tissus lymphoïdes. Elles apparaissent branchées et sont les plus importants stimulateurs de la réponse T.

Cellules NK (Natural Killer) : cellules de grande dimension, larges, d'aspect granuleux le plus souvent, appelées aussi lymphocytes non-T/non-B. Ces cellules jouent un rôle fondamental dans la défense de l'organisme contre les pathogènes, dans l'immunité innée, dans certains processus cytotoxiques. Elles ont la faculté de tuer certaines cellules tumorales.

Granulocytes : globules blancs du sang (leucocytes) dont le cytoplasme contient des granulations et qui possèdent un noyau à plusieurs lobes (d'où leur ancien nom inapproprié de polynucléaire). D'après l'affinité des divers types de colorants pour les granulations, on distingue trois variétés : granulocytes éosinophiles, basophiles ou neutrophiles.

- Basophiles : globules blancs dont les granules sont colorés par les colorants basiques. On suppose que leur fonction est identique à celle des mastocytes.

- Eosinophiles : globules blancs dont les granules sont colorés par les colorants acides. Ils sont activés par les lymphocytes de la réponse immune adaptative et semblent jouer un rôle fondamental dans la défense contre les parasites.

- Neutrophiles : globules blancs dont les granules sont colorés par les colorants neutres. Ils représentent la classe de principale de globules blancs du sang circulant. Ils jouent un rôle clé dans la phagocytose des pathogènes extracellulaires.

Leucocytes : (terme général pour qualifier les globules blancs) cellule sanguine nucléée, d'aspect blanchâtre, de forme généralement arrondie. On distingue les granulocytes (neutrophiles, basophiles et éosinophiles), les lymphocytes et les monocytes. Ils

remplissent des fonctions très importantes aussi bien dans la défense de l'organisme contre divers agents infectieux que dans les processus immunitaires. Ils prennent naissance dans les organes hématopoïétiques (rate, moelle osseuse et ganglions lymphatiques).

Lymphocytes : petits leucocytes mononucléés, présents dans le sang, la moelle et les tissus lymphoïdes et caractérisés par un noyau à structure grossière, de teinte foncée, et un cytoplasme hyalin plus ou moins basophile :

- Lymphocytes B : classe de lymphocytes dont la fonction essentielle est la production d'anticorps. Ils représentent 10 % des lymphocytes du sang circulant.

- Lymphocytes T : classe de lymphocytes qui jouent un rôle dans la régulation de la réponse immunitaire et le rejet des greffes et dont la maturation se fait dans le thymus. Ils représentent 70 % des lymphocytes du sang circulant.

Macrophages : phagocytes de grande dimension qui dérivent des monocytes du sang, des cellules conjonctives ou endothéliales. Ils interviennent dans la défense de l'organisme contre les infections.

Monocytes : globules blancs du sang, de grande taille, à noyau non segmenté, provenant du monoblaste de la moelle osseuse. Ils constituent 2 à 6 % des leucocytes du sang circulant, et sont les précurseurs des macrophages.

3. Quelques définitions supplémentaires ...

Chimiotactisme : réaction de mouvement orienté et obligatoire d'organismes mobiles, déclenchée et entretenue par une substance chimique.

Diapédèse : passage des globules blancs sanguins, notamment des leucocytes, dans les tissus à travers les parois intactes des capillaires.

Intégrine : protéine de surface impliquée dans les interactions cellule-cellule et cellule-matrice qui joue un rôle clé dans les interactions entre les lymphocytes et les cellules présentatrices d'antigène lors de la migration des lymphocytes dans les tissus.

Sélectine : famille de molécules d'adhésion de surface des leucocytes et des cellules endothéliales qui se lient aux entités sucrées de certaines glycoprotéines.

Définitions tirées :

- Dictionnaire Médical, Manuila A., Manuila L., Nicoulin M., 5^e édition, 1992.
- Immunobiology, The immune system in health and disease, Janeway C.A., Travers P., Walport M., Capra D.J., 4^e édition, 1999.