

**Université de Montréal**

**Impact de différentes modalités de recrutement de la  
 $\beta$ -arrestine au récepteur de chimiokine CXCR4.**

Par  
Julien Bonneterre

Département de biochimie et médecine moléculaire

Mémoire présenté à la Faculté de  
Médecine en vue de l'obtention du grade  
de maîtrise en biochimie et médecine  
moléculaire

Juin 2017

© Julien Bonneterre, 2017







# I. RÉSUMÉ

Les chimiokines sont de petites protéines impliquées dans la migration cellulaire. La chimiokine CXCL12 (aussi appelée SDF-1) signale via le récepteur CXCR4. CXCR4 est surexprimé dans plus de 20 types de cancer et est associé à une augmentation du taux de métastases, de la croissance de cellules cancéreuses ainsi qu'à leur survie. La diversité et la complexité de la signalisation de CXCR4 font l'objet de nombreuses recherches, mais CXCR4 signale par deux voies principales:  $G_{\alpha i}$  et  $\beta$ -arrestine. Les mécanismes de régulation du recrutement de la  $\beta$ -arrestine demeurent à préciser, mais le récent cadre d'interprétation décrit un mécanisme de recrutement en deux étapes permettant deux niveaux d'interaction. La première étape permettrait la liaison de l'extrémité C-terminale du récepteur à la  $\beta$ -arrestine, formant une interaction partielle, tandis que la seconde permettrait une liaison subséquente de la  $\beta$ -arrestine au cœur du récepteur, formant une interaction complète.

Ce projet étudie ces différentes modalités de recrutement à l'aide des mutants constitutivement actifs de CXCR4 ; N119S et R134A, et ce en utilisant des systèmes de transfert d'énergie de résonance de bioluminescence (BRET). Nous avons confirmé que CXCR4 N119S est un mutant constitutivement actif (CAM) à la fois sur le  $G_{\alpha i}$  et la voie arrestine. En revanche, R134A est un mutant constitutivement inactif (CIM), soit dépourvu de signalisation par la protéine G, mais recrute cependant spontanément la  $\beta$ -arrestine 2.

Nous suggérons que les différences de recrutement de la  $\beta$ -arrestine observés en BRET entre ces deux mutants représentent des modalités de recrutement différentes. Ainsi, le mutant N119S représentait l'interaction complète tandis que le mutant R134A représentait l'interaction partielle. De façon similaire, nous observons des différences d'activation de ERK par immunoblot entre ces mutants. Finalement, l'utilisation de la PTX, inhibant l'activation de la  $G_{\alpha i}$ , démontre que le mutant R134A recrute la  $\beta$ -arrestine à travers une modalité différente. Nous suggérons que ce mutant permet la formation d'un megaplex entre la protéine G hétérotrimérique et la  $\beta$ -arrestine.

Mot clés : CXCR4,  $\beta$ -arrestine, GRK, BRET, WHIM

## II. SUMMARY

Chemokines are small proteins involved in cell migration. The chemokine CXCL12 (SDF-1) signals via the receptor CXCR4. CXCR4 is overexpressed in more than 20 types of cancer, and associated with metastasis and increased cancer cell growth and survival. The diversity and complexity of CXCR4 signaling are subject to research, but CXCR4 signals through two major pathways: *Gai* and  $\beta$ -arrestin 2. Regulatory mechanisms for  $\beta$ -arrestin recruitment remain to be defined, but the recent interpretive framework describes a two-stage recruitment mechanism allowing for two levels of interaction. The first step would allow binding of the C-terminal end of the receptor to  $\beta$ -arrestin, forming a partial interaction, while the second would allow subsequent binding of  $\beta$ -arrestin to the core of the receptor, forming a complete interaction.

This project studies these different recruitment modalities using the constitutively active mutants of CXCR4; N119S and R134A, using bioluminescence resonance energy transfer (BRET) systems. We confirmed that CXCR4 N119S is a constitutively active mutant (CAM) on both *Gai* and the arrestin pathway. On the other hand, R134A is a constitutively inactive mutant (CIM), thus lacking signaling by the G protein, but spontaneously recruits  $\beta$ -arrestin.

We suggest that the differences in recruitment of  $\beta$ -arrestin observed in BRET between these two mutants represent these different recruitment modalities. Thus, the mutant N119S represents the complete interaction while the mutant R134A represents the partial interaction. Similarly, we observe differences between these mutants in activation of ERK by Immunoblot. Finally, the use of PTX, inhibiting the activation of *Gai*, demonstrates that the mutant R134A recruits  $\beta$ -arrestin through a different modality. We suggest that this mutant allows the formation of a megaplex between  $\beta$ -arrestin and the heterotrimeric G-protein.

Keywords: CXCR4,  $\beta$ -arrestin, GRK, BRET, WHIM

### III. ABRÉVIATIONS

ANOVA	Analysis Of Variance
U.B.N.	Unités de BRET Net
U.B.	Unités de BRET
BRET	Bioluminescence Resonance Energy Transfer
C-terminal	Carboxy-Terminal
CAM	Constitutively Active Mutant
CIM	Constitutively Inactive Mutant
DMEM	Dubelco Modified Eagle's Medium
EC50	Half maximal effective concentration
ERK	Extracellular Signal Regulated Kinases
GAP	GTPase Activating Protein
GDP	Guanosine Diphosphate
GEF	Guanine Exchange Factor
GFP <sup>10</sup>	Green Fluorescent Protein 10
GPCR	G-Protein Coupled Receptor
GRK	GPCR Kinase
GTP	Guanosine Triphosphate
HEK	Human Embryonic Kidney
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
N-terminal	Amino-Terminal
PBS	Phosphate saline buffer
PEI	Polyethylenimine
PKC	Protein Kinase C
PLC	Phospholipase C
PTX	Pertussis Toxin
R	Arginine
Rluc3	<i>Renilla</i> Luciferase 3
SDF-1 $\alpha$	CXCL12, Stromal Cell Derived Factor-
1 $\alpha$ TM	Transmembrane Helix
WT	Wildtype
YFP	Yellow Fluorescent Protein

## **IV. TABLE DES MATIÈRES**

<b>I.</b>	<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>I</b>
<b>II.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>II</b>
<b>III.</b>	<b>ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>III</b>
<b>IV.</b>	<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>IV</b>
<b>V.</b>	<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>VI</b>
<b>VI.</b>	<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>VIII</b>
<b>1.</b>	<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
1.1	GPCR .....	1
1.2	Les protéines G hétérotrimériques .....	2
1.3	Arrestine .....	4
1.4	Diversité signalétique de la $\beta$ -arrestine .....	5
1.5	Interactions récepteur - $\beta$ -arrestine.....	8
1.6	Motif DRY .....	10
1.7	N3.35.....	11
1.8	Récepteurs de Chimioquinas.....	11
1.9	CXCR4.....	12
1.9	AMD3100 et T140 .....	12
1.9	Principes du BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer) .....	13
<b>2.</b>	<b>Objectifs .....</b>	<b>16</b>
<b>3.</b>	<b>Matériel et méthodes.....</b>	<b>17</b>
3.1	Plasmides.....	17
3.2	Culture Cellulaire et Transfections .....	17
3.3	Mesures BRET .....	17
3.4	Immunobuvardage.....	18
3.5	Analyse des données .....	19

<b>4.</b>	<b>RÉSULTATS</b> .....	<b>20</b>
4.1	Établissement du système BRET2 entre CXCR4 et la $\beta$ -arrestine .....	20
4.2	Conception des mutants de CXCR4.....	22
4.3	Recrutement de la $\beta$ -arrestine par les mutants N/DRY de CXCR4 .....	23
4.4	Recrutement et différence conformationnelle de recrutement basal de la $\beta$ -arrestine auprès des mutants N119S et R134A de CXCR4 .....	26
4.5	Recrutement de la $\beta$ -arrestine par des mutants C-terminaux de CXCR4.....	28
4.6	Effet de la toxine de Pertussis sur le recrutement de la $\beta$ -arrestine.....	31
4.7	Effet de T140 et AMD3100 sur le recrutement de la $\beta$ -arrestine aux mutants N119S R134A de CXCR4. ....	32
4.8	Activation constitutive de la voie ERK par les mutants N119S et R134A .....	35
4.9	Activation constitutive de la voie ERK par les mutants de l'extrémité C terminale .....	36
<b>5.</b>	<b>DISCUSSION</b> .....	<b>40</b>
5.1	Aperçu .....	40
5.2	Nouveaux concepts d'interaction arrestine - récepteur .....	41
5.2.1	Interaction complète.....	42
5.2.2	Le mutant CXCR4 N119S comme modèle de l'interaction complète.....	43
5.2.3	Interaction partielle – Le mégaplex .....	45
5.2.4	Le mutant CXCR4 R134A comme modèle de l'interaction partielle.....	46
5.3	Rôle de R3.50 pour l'activation .....	49
5.4	Rôle de R3.50 dans d'autres GPCR de pertinence clinique.....	50
5.5	Modalités d'interaction CXCR4-arrestine dans le syndrome WHIM.....	51
<b>6.</b>	<b>CONCLUSION</b> .....	<b>52</b>
<b>7.</b>	<b>PERSPECTIVES</b> .....	<b>53</b>
<b>8.</b>	<b>RÉFÉRENCES</b> .....	<b>54</b>
<b>9.</b>	<b>Annexe</b> .....	<b>59</b>

## V. LISTE DES FIGURES

Figure 1. Schéma du mécanisme d'action des protéines G (10) .....	3
Figure 2. Représentation de la structure de la $\beta$ -arrestine (22).....	5
Figure 3 Schéma des voies de signalisation des GPCR.....	7
Figure 4 Schéma du modèle de liaison biphasique de la $\beta$ -arrestine .....	9
Figure 5 Représentation schématique du système BRET.....	14
Figure 6. Graphique théorique d'une courbe de titration BRET. ....	15
Figure 7. BRET des différentes constructions CXCR4 – arrestine .....	21
Figure 8. Représentation schématique de CXCR4 incluant les différentes mutations en position N119, R134 et les mutants C-terminal.....	23
Figure 9. Deux des six mutants de CXCR4 démontrent un recrutement constitutif de la $\beta$ -arrestine.....	25
Figure 10. Recrutement constitutif de la $\beta$ -arrestine par les mutants de CXCR4 R134A et N119S. ....	27
Figure 11. La $\beta$ -arrestine affiche différentes modalités de recrutement sur les mutants CXCR4.....	29
Figure 12. Le recrutement de la $\beta$ -arrestine par des mutants CXCR4 inhibée par la toxine de Pertussis.....	32
Figure 13. L'analyse par Western blot des niveaux d'activation de ERK sur des cellules exprimant des mutants CXCR4 démontre une activité constitutive de la voie de signalisation. ....	35
Figure 14. Immunoblot de l'activation ERK sur des cellules exprimant les mutants CXCR4 après traitement par la toxine de Pertussis.....	37
Figure 15. Immunoblot de l'activation ERK sur des cellules exprimant les mutants CXCR4-R134A après traitement par la toxine de Pertussis. ....	38
Figure 16. Immunoblot de l'activation ERK sur des cellules exprimant les mutants CXCR4-N119S après traitement par la toxine de Pertussis.....	39
Figure 17. L'activation G-dépendante n'est pas responsable du recrutement de la $\beta$ -arrestine observée en BRET.....	34

Figure 18. Représentation des complexes $\beta$ 2V2R-arrestine par microscopie électronique à simple particule (Single-particle cryo-EM). .....	41
Figure 19. Représentation des complexes $\beta$ 2V2R-arrestine-proteine G par microscopie électronique à simple particule. ....	42
Figure 20. Interaction BRET entre la $\beta$ -arrestine et $G_\gamma$ .....	49

## **VI. REMERCIEMENTS**

J'aimerais remercier mon directeur de recherche, Dr. Nikolaus Heveker pour avoir partagé sa passion et son expérience ainsi que pour son support et sa disponibilité tout au long de ma maîtrise.

J'aimerais remercier l'ensemble des membres du laboratoire, Nassr Nama, Francois Guité-Vinet, Stéphanie Gravel et Geneviève St-Onge. Un grand merci à Mathias Plourde et David Rhains pour leur support, leur complicité ainsi que leur constante source de motivation. Un remerciement spécial à Nicolas Montpas pour son aide inestimable tout au long de ma maîtrise, sa disponibilité ainsi que sa complicité.

J'aimerais surtout remercier ma conjointe Camille Tessier pour son support infaillible.

Finalement, je tiens à remercier le Dr. Mallette ainsi que le Dr Sapieha pour leur participation à la révision de ce mémoire.

# 1. INTRODUCTION

## 1.1 GPCR

La famille des GPCR (*G protein-coupled receptors*) ou 7TMR (récepteurs à 7 domaines transmembranaires) forme une des plus grandes familles de récepteurs exprimés à la surface de la membrane plasmique des cellules de mammifères (1). Cette famille de récepteurs, exprimée uniquement chez les eucaryotes, est responsable de la régulation de nombreuses fonctions cellulaires chez les mammifères telles que l'odorat, la vue, le goût, les fonctions immunes, nerveuses, rénales et cardiovasculaires ainsi que la signalisation hormonale (2). La place centrale qu'occupent ces récepteurs au sein de la régulation de ces systèmes en fait une cible pharmacologique de premier choix. En effet, près de 50% des médicaments sur le marché et en développement ciblent des GPCR et leur mécanisme de régulation (3). Les ligands de ces récepteurs sont diversifiés et comprennent acides aminés, hormones, peptides, protéines, et même des ions (1).

Leur nom provient de leur structure caractéristique qui est constituée de sept hélices transmembranaires, d'une extrémité N-terminale extracellulaire, agissant en concert avec les 3 ECL (*extra-cellular loops*) afin de lier les différents ligands. L'extrémité C-terminale intracellulaire interagit avec les différents effecteurs à l'aide des 3 ICL (*intra-cellular loops*). Cette extrémité C-terminale permet l'interaction d'une majorité de GPCR avec une protéine G hétérotrimérique, responsable du recrutement d'effecteurs activant les différentes voies de signalisation cellulaire spécifiques (4).

La famille des GPCR comprend 6 classes de récepteurs, classés de A à F et regroupés en fonction de leur homologie de séquences et leurs similarités fonctionnelles. Les classes A à F regroupent respectivement les *Rhodopsin-like*, *Secretin receptor family*, *Metabotropic glutamate/pheromone*, *Fungal mating pheromone receptors*, *Cyclic AMP receptors* et *Frizzled/Smoothed* (5).

Le champ d'intérêt de l'étude se concentre sur le récepteur CXCR4, membre de la classe A des récepteurs *Rhodopsin-like*. Les GPCR de classe A feront donc ici l'objet d'informations plus détaillées que les autres classes. Cette classe représente la plus grande des classes de GPCR avec plus de 700 récepteurs. Elle rassemble notamment les récepteurs

de rhodopsine, les  $\beta$ -2-adrénergiques, des opioïdes, hormonaux, visuels ainsi que les récepteurs de chimiokines (5). L'implication de ces récepteurs dans ces fonctions biologiques en fait une cible d'intérêt. De plus, il existe une forte homologie de séquence entre les différents récepteurs de la classe A, notamment une séquence E/DRY dont il sera l'objet plus loin. Ces homologies de séquences permettent d'identifier les mécanismes applicables à de nombreux récepteurs à l'aide d'un récepteur modèle (6). Par exemple, les récepteurs  $\beta$ -2-adrénergiques ainsi que CXCR4 sont fréquemment utilisés comme récepteurs modèle afin de fournir des informations sur les mécanismes des GPCR de classe A (5).

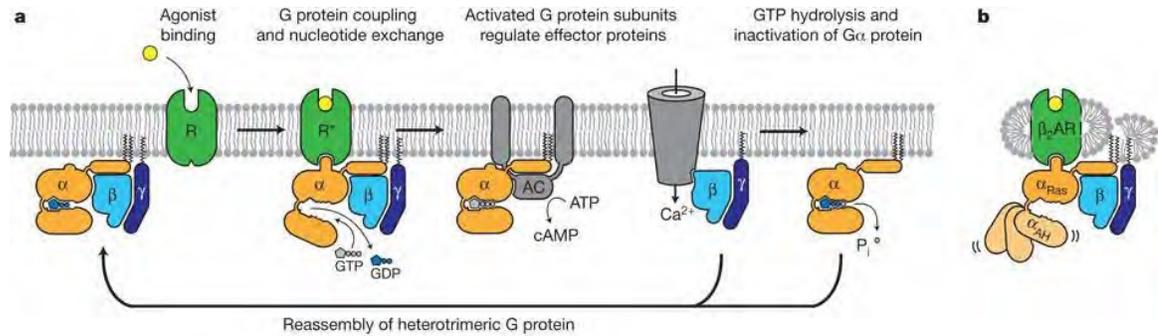
## 1.2 Les protéines G hétérotrimériques

Les GPCR signalisent principalement grâce à l'association de protéines G hétérotrimériques. Cependant, il a été démontré récemment que les GPCR ont la capacité de signaler grâce à des mécanismes indépendants des protéines G, notamment à l'aide des  $\beta$ -arrestines (7).

Les protéines G, aussi connus sous le nom de *guanine nucleotide-binding proteins*, regroupent une famille de d'effecteurs intracellulaires responsables de la transmission du signal provenant des GPCR, après leur stimulation respective par un stimulus extérieur, vers leurs protéines effectrices (7). Membres de la famille des GTPases, les protéines G sont des protéines hétérotrimériques composées de sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$ , et  $\gamma$  (7, 8). L'activité des protéines G est régulée par des facteurs contrôlant leur capacité à hydrolyser le guanosine triphosphate (GTP) en guanosine diphosphate (GDP). Lors de la liaison du GTP, la protéine G est activée, la sous-unité  $G\alpha$  se dissocie des sous-unités  $G\beta\gamma$  et lorsque le GTP est hydrolysé, la protéine G retourne à son état inactivé, ce qui permet l'association des sous-unités  $G\alpha$  et  $G\beta\gamma$  (9).

La liaison d'un ligand sur un récepteur de type GPCR induit un changement de conformation au sein du récepteur. Ce changement de conformation est responsable de l'activation des protéines G. Une fois activé, le récepteur agit comme facteur d'échange de guanine (GEF), induisant l'échange du GDP lié à la sous-unité  $G\alpha$  pour un GTP, activant ainsi l'activation de la protéine G hétérotrimérique (7). Une fois activée, la protéine G induit l'activation subséquente de protéines effectrices situées en aval de sa

cascade de signalisation. Lorsqu'activée, la sous-unité  $G\alpha$  a une activité GTPase, responsable de l'hydrolyse du GTP en GDP et la terminaison de la signalisation (7).



**Figure 1. Schéma du mécanisme d'action des protéines G (10).** La sous-unité  $\alpha$  dispose d'un site catalytique interne permettant l'interaction avec le GDP/GTP. La structure de la sous-unité  $\alpha$  active est similaire à celle inactive.

La toxine de Pertussis PTX est une endotoxine produite par la bactérie *Bordetella Pertussis*, responsable de la coqueluche. Elle est utilisée en laboratoire afin de bloquer l'action des protéines G. La PTX catalyse l'ADP-ribosylation de la sous-unité  $\alpha$ , empêchant l'interaction de cette dernière avec le récepteur. L'effet de la PTX sur la structure de la sous-unité  $\alpha$  n'est pas entièrement compris, mais la toxine induirait un changement de structure de la sous-unité  $\alpha$ , provoquant une conservation dans son état lié au GDP, soit son état inactif (11).

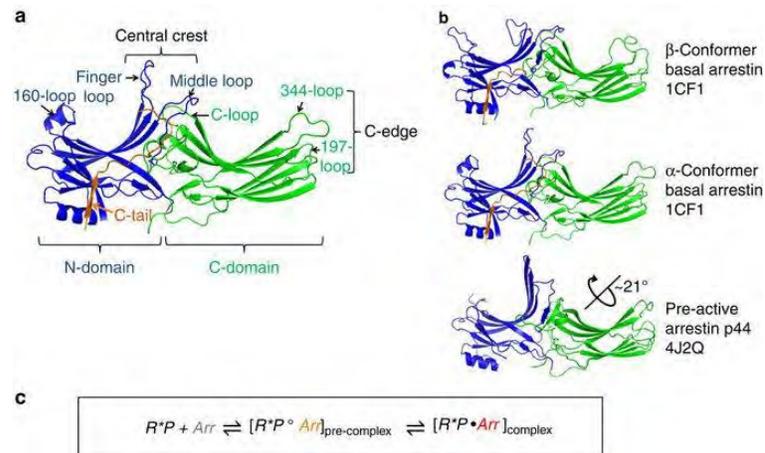
### 1.3 Arrestine

Les arrestines sont une famille de protéines impliquées dans la transduction du signal des GPCR. Ces protéines de taille moyenne (44-48 kDa) font preuve d'une impressionnante versatilité en interagissant avec plusieurs centaines de GPCR, de protéines de signalisation et d'internalisation (12). La famille des arrestines comprend quatre arrestines ; l'arrestine 1 et 4, aussi nommées arrestines visuelles, dont l'expression est restreinte aux photorécepteurs situés dans les cônes et bâtonnets de la rétine, l'arrestine 2, ou  $\beta$ -arrestine 1, ainsi que l'arrestine 3, aussi nommée  $\beta$ -arrestine 2 (13). Notre champ d'intérêt se portant sur l'arrestine non visuelle  $\beta$ -arrestine 2, les arrestines 1 et 4 ne seront pas plus détaillées.

Les arrestines sont des protéines d'échafaudage permettant la désensibilisation, l'internalisation ainsi que la transduction du signal auprès des GPCR en réponse à un stimulus. En se liant au récepteur sur sa face intracellulaire, la  $\beta$ -arrestine obture le site de liaison de la protéine G, mettant fin à son activation; ce processus est appelé désensibilisation (14). Subséquemment, la  $\beta$ -arrestine, liée au récepteur, interagit comme une protéine d'échafaudage afin de permettre la liaison, et l'activation, des différents facteurs, tel que ERK (15).

Structurellement, afin qu'un complexe arrestine-récepteur se forme, il est nécessaire que le récepteur soit dans une conformation active et qu'il soit phosphorylé (16, 17). Une fois activé, la conformation du récepteur se modifie, les hélices 5 et 6 du récepteur se déplacent vers l'extérieur, formant une cavité du côté cytoplasmique du récepteur. Cette cavité permet la dissociation de la sous-unité  $G\alpha$ , liée au récepteur, des sous-unités  $G\beta\gamma$ . Il a récemment été suggéré que cette cavité serait responsable de la liaison de la  $\beta$ -arrestine en permettant l'insertion du "finger-loop" de la  $\beta$ -arrestine (18). La liaison d'arrestine avec l'extrémité C-terminale du récepteur n'est, quant à elle, que partiellement établie, mais il a été suggéré que certaines des régions de phospho-senseurs de la  $\beta$ -arrestine seraient responsables de la liaison de la  $\beta$ -arrestine, tandis que d'autres contrôleraient l'activation différentielle de celle-ci. Les informations disponibles sur la formation du complexe récepteur-arrestine supportent l'hypothèse d'un modèle séquentiel de liaison dépendant de sites multiples. Ce mécanisme séquentiel a récemment été décrit en 2 étapes ; une première étape avec une interaction avec l'extrémité C-terminale phosphorylée du récepteur, et la deuxième étape serait l'insertion du "*finger loop*" de la  $\beta$ -arrestine au centre du récepteur (18, 19). Le

mécanisme d'interaction entre le récepteur et l'arrestine sera abordé plus en détail à la section 1.5.



**Figure 2. Représentation de la structure de la β-arrestine (20).** La structure de la β-arrestine est composée de deux domaines, C-terminal et le N-terminal. La structure *finger loop* se situe dans le domaine N-terminal.

Le rôle différentiel des deux β-arrestines n'est à ce jour pas encore bien défini, mais les deux protéines jouent plusieurs rôles lors de la signalisation des GPCR. Leur rôle principal est d'induire l'arrêt de la transduction du signal, ou la désensibilisation, par les protéines G hétérotrimérique ainsi que l'endocytose du récepteur (21). Cependant, à la lumière des récentes observations, la β-arrestine s'est imposé comme une nouvelle voie de signalisation indépendante (22, 23).

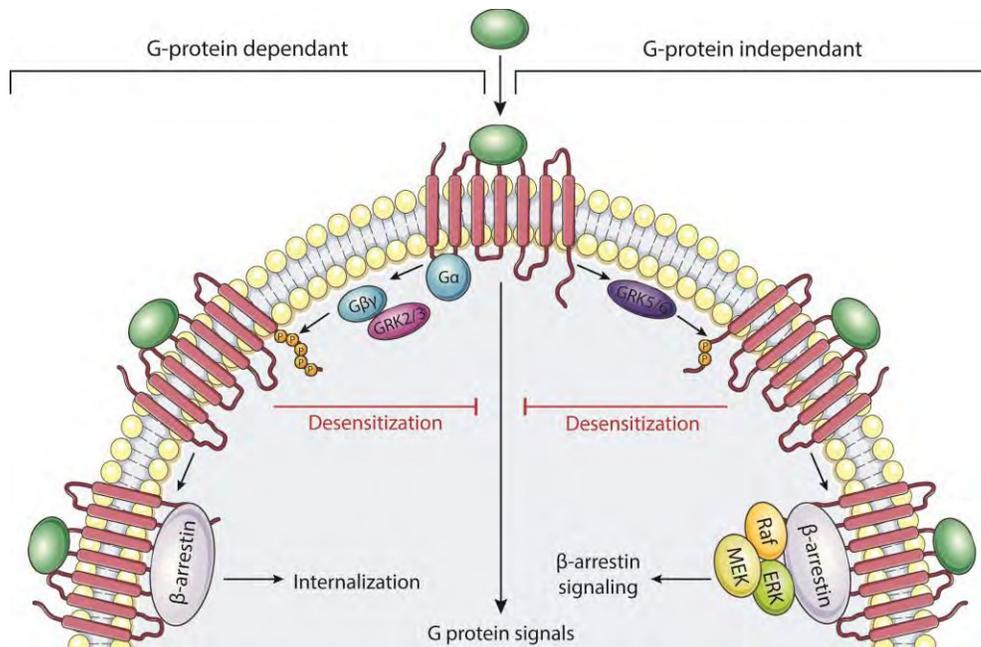
#### 1.4 Diversité signalétique de la β-arrestine

Les arrestines ont tout d'abord été identifiées comme interagissant avec les clathrines (24). Depuis, le nombre de leurs partenaires d'interaction a été très largement étendu.

Cependant, même si les interactions récepteur-arrestines restent à mieux comprendre, nous ne disposons que de très peu d'informations sur les interactions arrestines-protéines effectrices, sinon que le recrutement de ces protéines est fortement dépendant de la conformation qu'adopte celle-ci (25). En effet, la conformation qu'adopte la  $\beta$ -arrestine est hautement variable, notamment lorsqu'elle est liée au récepteur. Ainsi, on observe que les interactions avec Raf et ERK, des voies de signalisations liés a la migration et à la prolifération cellulaire, sont favorisées lorsque la  $\beta$ -arrestine est liée au récepteur tandis que Mdm2 (internalisation) et JNK3 (activation des MAPK) interagissent de préférence avec la  $\beta$ -arrestine lorsqu'elle est dissociée (26).

Les GPCR signalisent à travers différentes voies. Les deux voies principales sont : la voie dépendante des protéines G et l'autre la voie indépendante des protéines G (16). La signalisation à travers les protéines G constitue le mécanisme de signalisation classique des GPCR. Suite à la liaison du ligand, la conformation du récepteur est altérée et active la dissociation de la sous-unité  $G\alpha$  des sous-unités  $G\beta\gamma$ . Une fois les sous-unités dissociées, le récepteur est alors actif, il peut alors permettre la signalisation à travers ses différentes voies de signalisation, notamment ERK, la phospholipase C, PI3K (chimiotaxie et adhésion cellulaire) ou être internalisé. La liaison subséquente de la  $\beta$ -arrestine entraîne la terminaison de la signalisation via les protéines G, possiblement à travers un mécanisme de compétition pour la cavité interne du récepteur, ainsi que l'internalisation du récepteur et donc une désensibilisation (27).

Cependant il existe une voie de signalisation alternative, indépendante des protéines G. Découverte plus récemment, cette voie permet l'activation du récepteur par la phosphorylation du récepteur par des GRK (GPCR Kinases) et la liaison de la  $\beta$ -arrestine directement au récepteur. Cette interaction directe a été identifiée comme permettant la signalisation vers des voies effectrices tel que ERK (28, 29). Il est à noter que les deux voies de signalisations activent ERK. Une conformation favorable est nécessaire afin de permettre le recrutement du complexe.



**Figure 3. Schéma des voies de signalisation des GPCR.** La voie G-dépendante permet la signalisation à travers l'activation de la  $G\alpha$  puis le recrutement de la  $\beta$ -arrestine menant à l'internalisation. La voie G-indépendante permet une liaison directe de la  $\beta$ -arrestine au récepteur menant à une signalisation.

La voie ERK est impliquée dans le processus de mitose, mais est directement reliée à la signalisation de migration et de prolifération cellulaire. Elle est activée par divers stimuli tels que les facteurs de croissance, des infections virales ou, comme dans le cas de CXCR4, des cytokines. Suite à l'activation de certains GPCRs, l'activation de ERK se fait notamment à travers la  $\beta$ -arrestine. ERK est aussi directement activé par la voie de signalisation G-dépendante (30, 31). L'activation de la voie MAPK-ERK se fait à travers le recrutement subséquent du complexe Raf-MEK-ERK. La  $\beta$ -arrestine agit comme protéine d'échafaudage pour le recrutement du complexe protéique. La  $\beta$ -arrestine adopte différentes conformations en fonction de ces interactions.

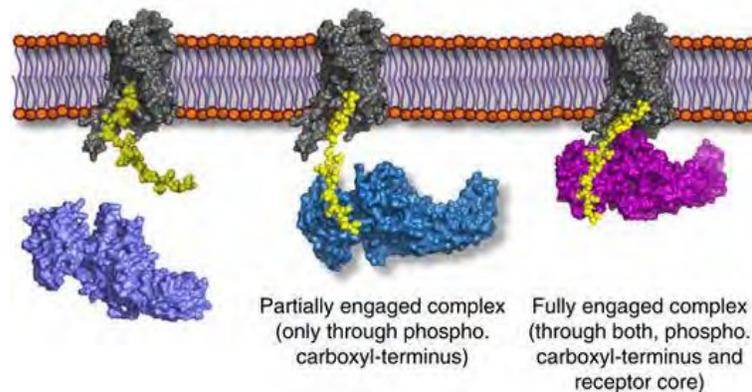
Les déterminants moléculaires de cette signalisation alternative ne sont pas encore bien définis. Des études récentes ont permis d'identifier les GRK 2 et 3 comme impliqués dans la signalisation G-dépendante et les 5 et 6 de l'indépendante, mais les différences de réponses suite à la liaison de la  $\beta$ -arrestine sont encore inconnus (23, 32).

Les GRK sont une famille de petites protéines responsables de la régulation de l'activité des GPCR. Les *GPCR Kinases* (GRK) phosphorylent l'extrémité Carboxy-terminale du récepteur permettant le recrutement des arrestines. Plus spécifiquement, l'extrémité C-terminale du récepteur est constituée d'une série de serines et thréonines, celles-ci phosphorylables par les GRK. Lorsque les GRK se lient au récepteur, suite à l'altération de sa conformation, ils phosphorylent ces serines, ces phosphorylations permettent la liaison de la  $\beta$ -arrestine (33, 34). Cependant, la diversité des rôles d'échafaudage de la  $\beta$ -arrestine s'explique notamment par la modulation de ces sites de phosphorylations et donc par les GRK. En effet, il existe sept GRK, les GRK 1 et 7 sont spécifiques à la signalisation visuelle tandis que la 4 a été associée à des fonctions rénales (35). Nous nous concentrerons ici sur les GRK 2/3 et 5/6. Ces GRK phosphorylent respectivement des séries de serines différentes, correspondant à des « codes-barres », reconnus par la  $\beta$ -arrestine, résultant en une variation de recrutement et de réponse de la  $\beta$ -arrestine, orientée vers l'arrêt de la signalisation et de la désensibilisation ou même l'internalisation du récepteur (32, 34). Ces activations des voies de signalisation entraînent des réponses physiologies au niveau de la prolifération et de la migration cellulaire. Par exemple, pour CXCR4 les GRK 2/3 seraient responsables de la phosphorylation des serines à l'extrémité de la queue C-terminale (serines 346-348 et 351-352) tandis que les GRK 5/6 phosphoryleraient des serines situées plus en amont (serines 324, 325, 330, 338, 339 et 341) (32). Ces différents motifs de phosphorylation entraîneraient un recrutement variable de la  $\beta$ -arrestine au niveau de sa conformation et des effecteurs recrutés (32). Le mécanisme de régulation est inconnu.

## **1.5 Interactions récepteur - $\beta$ -arrestine**

La signalisation et la régulation des GPCR sont contrôlées majoritairement par les  $\beta$ -arrestines, soit en induisant la terminaison du signal par la voie de la protéine G, soit en induisant une cascade signalétique indépendante des protéines G hétérotrimérique (16). Les

interactions entre la  $\beta$ -arrestine et le récepteur n'ont été que partiellement caractérisés. Jusqu'à récemment, les différentes techniques de visualisation structurales ne permettaient pas d'obtenir de données concluantes sur les interactions avec des récepteurs transmembranaires. L'utilisation récente de nouvelles méthodes de stabilisation protéiques, de cristallographie et de microscopie électronique à simple particule (Single-particle cryo-EM) permettent la stabilisation de ces complexes et l'observation des conformations qu'adopte ce complexe  $\beta$ -arrestine – récepteur en cristal (18, 36). Bien que l'utilisation de ces nouvelles techniques soit encore limitée, les données recueillies ont permis d'observer des interactions entre différentes boucles de la  $\beta$ -arrestine avec la portion centrale du récepteur. Ces interactions apparaissent comme une seconde phase d'interaction donnant suite à la liaison du domaine N-terminal des arrestines à l'extrémité C-terminale phosphorylée du récepteur (18, 25).



**Figure 4. Schéma du modèle de liaison biphasique de la  $\beta$ -arrestine.** (19) La  $\beta$ -arrestine se lie par son domaine N-terminal à l'extrémité C-terminale du récepteur, formant ainsi une interaction partielle. Dans une interaction complète, la  $\beta$ -arrestine se lie aussi au cœur du récepteur à l'aide de son *finger loop*.

Le modèle illustré dans la Figure 4 montre l'interaction biphasique entre le récepteur et la  $\beta$ -arrestine. Dans un premier temps la partie N-terminale de la  $\beta$ -arrestine se lie à l'extrémité C-terminale phosphorylée du récepteur, ici indiquée en jaune dans la Figure 4. La seconde phase consisterait en un remodelage conformationnel permettant la liaison de boucles de la  $\beta$ -arrestine avec la partie intracellulaire du GPCR. Le remodelage conformationnel peut être fait au sein du récepteur, favorisant l'insertion et la liaison de la  $\beta$ -arrestine. Il peut aussi être fait au niveau de la  $\beta$ -arrestine, une fois liée au récepteur,

et en fonction du motif de phosphorylation, elle adopterait une conformation favorisant sa liaison au cœur du récepteur. Les conséquences au niveau signalétique de ces différents modes d'interaction ne sont pas connues et font l'objet de notre recherche.

L'établissement de ce modèle structurel ouvre la porte à de nombreuses implications au niveau de la signalisation. L'effet de cette liaison partielle de la  $\beta$ -arrestine au niveau de la réponse signalétique n'est que peu documenté dans la littérature. Cependant, cette réaction semble avoir des caractéristiques fonctionnelles et signalétiques différentes de celle provoquée par l'interaction dite « complète » avec le récepteur (31, 37). La liaison complète ne semble donc pas requise pour obtenir une réponse signalétique.

## 1.6 Motif DRY

Le motif DRY est une séquence hautement conservée parmi les GPCR de classe A, il est situé dans l'hélice transmembranaire III, en position 3.49-51 selon la nomenclature Ballesteros-Weinstein (6). Cette nomenclature permet d'identifier des résidus sur les GPCR en fonction de leur position relative sur les domaines transmembranaires, et ce de manière générique afin de comparer les positions équivalentes entre les récepteurs (38). Il a été démontré que ce motif interagit directement avec les protéines  $G\alpha$ . L'importance structurelle et fonctionnelle de ces résidus a été identifiée en utilisant des mutants du motif DRY (6). Les conclusions de ces études ont permis d'établir le caractère essentiel de ces résidus dans l'activation de la voie G-dépendante de plusieurs GPCR tel que le récepteur de Vasopressine 1a (V1aR) ou le récepteur Muscarinique d'acétylcholine M1 (M1 AChR) (6).

L'introduction de mutations au sein du motif DRY peut avoir pour conséquence de modifier l'activité constitutive de ces récepteurs. En effet, ces mutations peuvent conférer une activité constitutivement active (CAM) ou constitutivement inactive (CIM). Les mutants CAM activent spontanément les protéines G tandis que les CIM recrutent constitutivement la  $\beta$ -arrestine et sont dépourvus de signalisation G-dépendante (39).

Dans le cas spécifique de CXCR4, Zhang et al. ainsi que Berchiche et al. ont précédemment étudié différents mutants DRY du récepteur CXCR4 (40, 41). Les mutations du D3.49 en asparagine (D133N) ou du Y3.51 en alanine (Y135A) ne semblent pas affecter la signalisation du récepteur (40). Cependant, une mutation du R3.50 en arginine (R134A)

empêche l'activation G-dépendante du récepteur (40). La voie  $\beta$ -arrestine G-indépendante n'a cependant pas été évalué au cours de ces études.

### **1.7 N3.35**

Les récepteurs de chimiokines, tels que les récepteurs d'opiacés ou de l'angiotensine, possèdent un autre résidu hautement conservé ; l'asparagine N3.35. Ce résidu s'avère être essentiel dans les changements conformationnels induits lors de l'activation du récepteur. Zhang et al. ont étudié cet acide aminé spécifique sur le récepteur de chimiokine CXCR4. La mutation de l'asparagine N119 en alanine ou serine a produit des récepteurs constitutivement actifs dans la voie G-dépendante. De plus, cette activité constitutive était sensible à la toxine de Pertussis (PTX), indiquant une dépendance de l'activation des  $G_{\alpha i}$  (41). Tout comme le motif DRY, l'effet de ces mutations sur le recrutement de la  $\beta$ -arrestine n'as pas été évalué.

### **1.8 Récepteurs de Chimiokines**

Les récepteurs de chimiokines sont des récepteurs de cytokines, eux-mêmes membres de la grande famille des GPCRs. Exprimés à la surface de certaines cellules, ils interagissent avec leur(s) ligands respectifs pour induire une cascade signalétique. Il existe une vingtaine de récepteurs de chimiokines actuellement répertoriés. Leurs fonctions sont variées, mais interviennent dans la réponse immunitaire, notamment dans la prolifération et migration cellulaire, ou chimiotaxie. Les récepteurs de chimiokines appartenant à la classe A des GPCR, ils conservent une homologie de séquence élevée. En effet, ces récepteurs possèdent le motif DRY ainsi que l'asparagine 3.35 (41). Les récepteurs de chimiokines sont exprimés principalement dans les cellules immunitaires, mais aussi les cellules endothéliales, épithéliales ainsi que les neurones.

## 1.9 CXCR4

Le récepteur de chimiokine CXCR4 (initialement décrit comme « fusin ») est un récepteur couplé aux protéines G de classe A. CXCR4 est l'un des récepteurs de chimiokines utilisés par le VIH afin d'infecter les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (42). Son ligand spécifique est CXCL12, ou SDF1 $\alpha$ , une molécule responsable, entre autres, de la chimiotaxie des lymphocytes.

SDF1 $\alpha$  est aussi connu pour jouer un rôle important dans la domiciliation (*homing*) et la quiescence des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse. CXCR4 permet la migration de ces cellules souches vers les niches de la moelle osseuse à l'aide de son ligand SDF-1 présent en concentration plus élevée au sein de la moelle en suivant ce gradient de chimiokines. Jusqu'à récemment, SDF1 $\alpha$  était considéré comme l'unique ligand de CXCR4. Des données récentes démontrent que l'ubiquitine agirait également comme un ligand naturel de CXCR4 (43).

CXCR4 a été associé à une surexpression dans près de 23 types de cancer, incluant le cancer de la prostate, des ovaires et du sein. L'expression du récepteur a été liée au développement de métastases dans les tissus exprimant une concentration élevée de SDF1 $\alpha$ , tel que les poumons, le foie et la moelle osseuse. Sa surreprésentation dans ces nombreux types de cancers s'explique notamment par son implication au niveau des voies de signalisation de croissance et de migration cellulaire.

CXCR4 a aussi été associé au syndrome WHIM, un trouble d'immunodéficience caractérisé par une neutropénie chronique. Le syndrome est causé par des mutations autosomiques dominantes dans le gène de CXCR4 engendrant une extrémité C-Terminale tronquée de 10 à 19 résidus (44, 45). Ces mutations conduisent à l'expression d'un récepteur possédant une capacité de régulation modifiée. Après l'activation, il y a une perte de désensibilisation, une capacité chimiotaxique supérieure, une mobilisation accrue du calcium ainsi qu'une diminution de l'internalisation médiée par SDF1.

La signalisation de CXCR4 s'effectue suite à la liaison avec son ligand SDF1 $\alpha$ . Suite à cette liaison, le changement conformationnel du récepteur peut activer différentes voies de signalisation. Une majorité d'entre elles sont identifiées comme G-dépendantes. Parmi celles-ci, l'activation de la G $\alpha$ i est capable d'inhiber l'adénylate cyclase ainsi que

d'activer la famille Src de tyrosine kinases tandis que la G $\beta\gamma$  libéré active la phospholipase C- $\beta$  (PLC- $\beta$ ) ainsi que la phosphoinositide-3 kinase (PI3K) menant à la régulation de processus tels que la transcription génique, la migration cellulaire et l'adhésion cellulaire. Au niveau G-indépendant, l'activation de la voie JAK/STAT par CXCR4 a été identifiée comme indépendant des protéines G. SDF induit l'association transitoire de JAK2 et 3 avec CXCR4, conduisant à l'activation et à la translocation nucléaire de plusieurs protéines STAT. En plus de la terminaison du signal, les arrestines sont capables d'agir comme protéines d'échafaudage pour un certain nombre de molécules de signalisation. La  $\beta$ -arrestine-1 et 2 ont été liées à l'activation de ERK médiée par CXCR4 tandis que la  $\beta$ -arrestine 2 est impliqué dans l'activation et la migration de p38 suite à la stimulation de CXCR4 par SDF1.

De nombreuses GPCR subissent également un processus appelé désensibilisation. CE processus est médié par l'activation de protéines kinases dépendantes du second messenger telles que la PKA et la PKC. L'analyse de séquence de CXCR4 montre que plusieurs sérines dans la queue C-terminale sont des sites potentiels de phosphorylation de PKC. En accord avec cela, l'activation directe de la PKC entraîne la phosphorylation et l'internalisation de CXCR4. Après internalisation, les GPCR peuvent être recyclés vers la membrane plasmique ou triés vers le lysosome pour dégradation. CXCR4 peut recycler vers la membrane plasmique suite à l'internalisation médiée par PKC. Pour être dégradé, CXCR4 est ubiquitiné, puis trié par le lysosome, puis dégradé. Ce processus est médié par l'ubiquitine ligase E3 AIP4.

Considérant le rôle primordial et multiple que joue CXCR4 dans les divers processus allant du développement cellulaire à la migration métastatique, CXCR4 est une cible thérapeutique de grand potentiel. Beaucoup d'études ont permis d'identifier les conséquences physiologiques liées à CXCR4, cependant, une compréhension détaillée de la régulation de ces récepteurs fait encore défaut. Comprendre les mécanismes précis permettant la régulation des fonctions de CXCR4 au niveau du récepteur permettrait de fournir un aperçu de potentielles cibles thérapeutiques. De plus, cela ouvrira des possibilités de recherche translationnelle afin de définir les spécificités et les façons dont la régulation des récepteurs est modifiée dans la maladie.

## **1.9 AMD3100 et T140**

L'AMD 3100, ou Plerixafor, est une petite molécule synthétique initialement développée comme inhibiteur de CXCR4 afin d'être utilisée pour empêcher la liaison du VIH par Gp120 sur le récepteur. Abandonnée pour cette utilisation dû à des effets secondaires au niveau cardiaque, cette molécule synthétique s'est avérée utile dans un autre contexte thérapeutique. En effet, l'AMD 3100 en inhibant l'activité de CXCR4, permettait la mobilisation des cellules souches dans la circulation sanguine périphérique, la migration de ces cellules étant contrôlée en partie par CXCR4. L'AMD 3100 est donc utilisée comme un médicament immunostimulant. Ici, l'AMD 3100 est utilisée pour ses propriétés antagonistes sur CXCR4 (46).

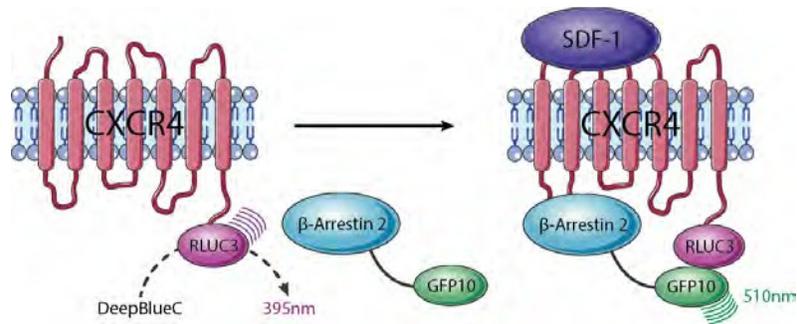
T140 est un peptide synthétique développé comme inhibiteur de l'activité rétrovirale du VIH. Il agit sur CXCR4 comme un agoniste inverse. Son action est dirigée sur la voie dépendante des protéines G (47).

## 1.9 Principes du BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer)

Les récepteurs de chimiokines recrutent la  $\beta$ -arrestine en réponse à leur activation par la liaison d'un ligand. Ce recrutement peut être médié par un mécanisme dépendant ou indépendant des protéines G. En utilisant une méthode de BRET, cela nous permet de mesurer l'activation d'un récepteur à travers les voies distinctes, soit protéine G-dépendant, mais aussi indépendant des protéines G. Le BRET (*Bioluminescence Resonance Energy Transfer*) permet d'obtenir de l'information concernant l'interaction des protéines marquées, mais aussi sur leurs conformations (48). Pour CXCR4- $\beta$ -arrestine, nous utilisons un système BRET2, offrant un meilleur ratio de signal sur niveau de fond que le BRET1.

Le principe du BRET repose sur la proximité entre deux protéines d'intérêt. Cette proximité permet un transfert d'énergie lumineuse observable. Afin d'obtenir cette énergie lumineuse, les protéines d'intérêt sont altérées afin d'obtenir des protéines de fusion intégrant un accepteur ainsi qu'un donneur d'énergie. Ici le récepteur de chimiokine CXCR4 ainsi que la  $\beta$ -arrestine, sont utilisés respectivement comme donneur et accepteur. Le donneur BRET, Rluc3 (*Renilla Luciferase*) est intégré en aval du récepteur et l'accepteur, GFP10 (*Green Fluorescent Protein*), est intégré en amont de la  $\beta$ -arrestine. Ces plasmides contenant les protéines de fusion sont alors cotransfectés dans des cellules HEK293.

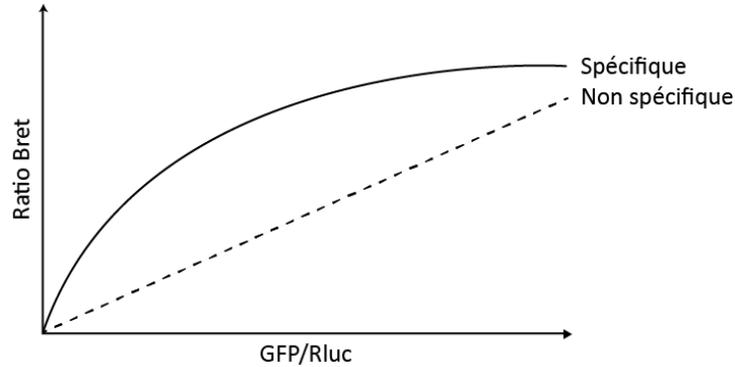
L'activation du donneur Rluc3 se fait à l'aide de son substrat, la Coelenterazine 400a, aussi appelée DeepBlueC. L'oxydation du substrat permet la libération d'énergie sous forme de photons à une longueur d'onde de pic de 395nm. Lorsque la seconde protéine d'intérêt comportant l'accepteur, ici la  $\beta$ -arrestine intégrant la GFP10, est à une distance supérieure à 50Å, le transfert d'énergie ne s'opère pas et aucune émission secondaire n'est observée (49). À l'inverse, si l'accepteur se trouve à proximité du donneur, le transfert d'énergie a lieu et la GFP10 réémet le signal lumineux reçu à un pic 395nm à une longueur d'onde supérieur dont le pic est de 510nm (48).



**Figure 5. Représentation schématique du système BRET.** La luciférase (RLuc3), liée au récepteur, transfère son énergie à la GFP10, elle-même liée à la  $\beta$ -arrestine, lorsque les deux protéines de fusion sont à proximité.

Cette méthode biophysique permet d'établir un lien fiable d'extrême proximité entre ces deux protéines (50). Cependant, ce lien de proximité ne peut être interprété comme un lien d'interaction qu'avec prudence puisque dans certaines conditions, ces collisions entre le donneur et l'accepteur peuvent être aléatoires. Afin de pallier à ce problème, une titration peut être réalisée (48).

Une titration permet de démontrer l'interaction physique entre deux protéines en BRET. Pour faire la distinction entre l'interaction spécifique et non spécifique, le signal BRET est mesuré en utilisant une quantité fixe de donneurs et une quantité variable d'accepteurs marqués. Les valeurs de signal BRET sont ensuite tracées en fonction du ratio accepteur/donneur. Dans le cas d'une interaction spécifique, on observe une courbe de saturation, tandis que dans le cas d'interactions non spécifiques, la courbe est linéaire. En effet, une courbe linéaire signifie que les interactions de proximité sont aléatoires et dues à la présence accrue de protéines. À l'inverse, l'interaction spécifique montre une courbe de saturation puisque les tous donneurs BRET, en présence d'excès d'accepteur, sont physiquement en interaction, limitant ainsi la réaction (48).



**Figure 6. Graphique théorique d'une courbe de titration BRET.** Le ratio BRET est représenté en fonction du ration GFP/RLuc. Lors d'une interaction non spécifique, le ratio BRET augmente de façon linéaire. Lors d'une interaction spécifique, l'augmentation du ratio BRET sature.

Le BRET 1 repose sur les mêmes bases expérimentales. Comparativement au BRET 2, il utilise différents couples d'accepteurs et donneurs d'énergie. Plutôt que d'utiliser la Rluc3 comme donneur, la Rluc est utilisée avec son substrat : la coelenterazine H. L'accepteur pour le BRET 2, la GFP10, est substitué par la YFP en BRET 1. Les filtres utilisés sont aussi changés pour correspondre aux gammes de longueurs d'ondes des accepteurs/donneurs. L'utilisation d'un différent couple pour le BRET 2 permet d'obtenir une meilleure séparation des longueurs d'ondes respectives des accepteurs/donneurs, diminuant ainsi le chevauchement des longueurs d'ondes d'émission dans la gamme de longueurs d'ondes de l'accepteur. Cependant, la perte de luminescence de la coelenterazine 400A étant nettement plus rapide que la H, rends le BRET2 un choix moins approprié pour les expériences cinétiques long terme.

## 2. Objectifs

Les objectifs principaux de ce projet consistent à établir les différentes modalités de recrutement de la  $\beta$ -arrestine ainsi que définir les paramètres de ces modalités. Afin de réaliser cela, nous avons utilisé une série de mutants de CXCR4 comprenant des substitutions dans le motif DRY ainsi que l'asparagine 119, celles-ci affectant l'état conformationnel du récepteur, lui conférant une activité constitutive. Par la suite des mutants de ces constructions de CXCR4 incluant des substitutions sélectives des sérines en C-terminal nous ont permis d'évaluer le rôle de ces substitutions dans le recrutement de la  $\beta$ -arrestine et ainsi identifier des différences de modalité de recrutement.

Plus spécifiquement, nous avons cherché à apporter des réponses aux points suivants :

1. Les techniques de BRET ayant des limites de sensibilité au niveau conformationnel, notamment les systèmes de BRET1 (51), nous voulions tenter de réaliser différentes constructions BRET2 du couple CXCR4- $\beta$ -arrestine afin d'observer ces différences conformationnelles et d'optimiser la détection du recrutement  $\beta$ -arrestine par CXCR4 .
2. Les mutants N/DRY de CXCR4 ont précédemment été évalués comme constitutif uniquement pour la voie  $G_{\alpha i}$ . Ici, nous voulions évaluer leur capacité de recrutement de la  $\beta$ -arrestine par une méthode de BRET. Nous voulions identifier des mutants affectant des voies de signalisation sélectives différentes, soit G-dépendante et indépendante, et confirmer l'activation constitutive.
3. La phosphorylation des sérines en C terminal du récepteur ayant un rôle crucial dans le recrutement de la  $\beta$ -arrestine, nous voulions abolir sélectivement la capacité de phosphorylation de GRK spécifiques afin d'observer l'effet sur les voies sélectives en utilisant les mutants N/DRY préalablement identifiés.
4. Le recrutement des arrestines peut se traduire par une diversité de réponses intracellulaires. Nous voulions observer l'effet de ces mutations, et donc de différentes modalités de recrutement de la  $\beta$ -arrestine, sur l'activation de voies effectrices, tel que ERK.

### **3. Matériel et méthodes**

#### **3.1 Plasmides**

Les mutations CXCR4 C-terminal, N119 et R134 ont été introduits dans le plasmide de CXCR4-RLuc3 en utilisant le *Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit* de New England Biolabs. Les plasmides hArrb2- GFP10, hArrb2-RLuc3 et RLuc3-hArrb2 ont été générés par amplification PCR à partir de CXCR4-RLuc3 et de GFP10-hArrb2, la ligation a été réalisée en utilisant le *Gibson assembly kit* de New England Biolabs.

#### **3.2 Culture Cellulaire et Transfections**

Des cellules embryonnaires de reins humains (HEK) 293E ont été cultivées dans du milieu *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) supplémenté avec 10% de sérum fœtal bovin (Wisent, Rocklin, CA), 100 unités/ml de pénicilline/streptomycine et 2 mM L-glutamine (Invitrogen). Les transfections transitoires ont été réalisées dans des plaques 6 puis en utilisant la méthode du polyéthylèneimine (PEI) (Polysciences, Warrington, PA).

#### **3.3 Mesures BRET**

Le recrutement de la  $\beta$ -arrestine 2 a été mesuré par BRET2. Des cellules HEK293E ont été cotransfectées avec 0.05  $\mu$ g de la construction récepteur-RLuc3 avec 1 $\mu$ g de GFP-  $\beta$ -arrestine 2. Pour les titrations [accepteur]/[donneur], 1 $\mu$ g de GFP- $\beta$ -arrestine 2 a été cotransfectés avec des concentrations croissantes de construction récepteur-RLuc3 (0.05, 0.075, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.75, 1, 2 $\mu$ g). Toutes les transfections ont été complétées avec 2  $\mu$ g/puits avec du vecteur vide. Après une nuit de culture, les cellules HEK293E transfectées transitoirement ont été transférées dans des microplaques 96-puits blanches à fond clair (ViewPlate; PerkinElmer Life Sciences) traitées avec de la poly(D-lysine) et laissés en culture pour 24 h, le milieu de culture DMEM a été remplacé par du tampon BRET (PBS, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% glucose). La toxine de Pertussis (PTX) (Sigma) a été ajoutée à des puits spécifiques à raison d'une concentration de 100ng/mL. Les cellules ont été stimulées par 200nM de SDF-1 (Peprotech) pour 5 min à 37°C. Le substrat de RLuc3, la Deep Blue C (Coelenterazine 400A) (Biotinum, Hayward, CA), a été ajouté à une

concentration finale de 50  $\mu$ M au tampon BRET. Les lectures BRET ont été collectées en utilisant un lecteur de plaques Mithras LB940 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) ainsi que le programme MicroWin2000. Les mesures BRET entre Rluc3 et la GFP ont été obtenues par intégration séquentielle des signaux dans les fenêtres à  $390 \pm 22$  nm (Rluc3) et  $510 \pm 10$  nm (GFP). Le signal BRET a été calculé comme le ratio de lumière émise par l'accepteur (GFP) sur la lumière émise par le donneur (Rluc3). Les valeurs ont été corrigées en BRET net en soustrayant le signal de fond BRET obtenu par les cellules transfectées uniquement par les cellules comportant uniquement la construction Rluc3.

### 3.4 Immunobuvardage

Des cellules HEK293E ont été étendues dans des plaques 6 puits dans du DMEM. Après 24h, les cellules HEK293E ont été cotransfectées avec 1  $\mu$ g de construction récepteur-RLuc3. Toutes les transfections ont été complétées avec 2  $\mu$ g/puits de vecteur vide. Après 24h d'incubation, le milieu des cellules a été remplacé par du milieu DMEM privé de sérum pour la nuit, en présence de toxine de Pertussis (100ng/mL) lorsque indiqué. Les cellules confluentes ont été lavées sur glace deux fois à l'aide de PBS et grattées délicatement dans 1ml de PBS avant d'être centrifugées à 500g puis resuspendues dans du tampon de lyse (0,8% SDS, 1% triton X-100, 0.5% deoxycholate de sodium, 150mM NaCl, 20mM HEPES, 5mM EDTA, orthovanadate 200mM, PMSF 100mM, NaF 1M et inhibiteurs de protéases de Roche). Du tampon Laemmli 4X (0,25 M Tris-HCl / 8,2% SDS, 40% glycérol, 0,4 mM DTT + bleu de bromophenol, pH6,8) a été ajouté à une concentration de 1X. Les lysats ont été bouillis pour 5mins 3 fois avant d'être chargés sur gel. Les échantillons ont été séparés par gel SDS-PAGE 10%, transférés sur membrane de PVDF, bloqués avec une solution de TBST lait écrémé 5%, puis incubés durant la nuit avec l'anticorps phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (9101) (Cell Signaling Technologies, Boston, MA). Le jour suivant, les membranes ont été lavées plusieurs fois avec du TBS-T (0.1% Tween) avant d'être incubées avec l'anticorps secondaire chevre anti-lapin IgG-HRP (Santa Cruz) pour 1 h à température ambiante. Les membranes ont été lavées à plusieurs reprises dans du TBS-T puis visualisées en utilisant une *G:BOX Chemi XRQ* (Syngene) et du *Clarity Western ECL* (Biorad).

### **3.5 Analyse des données**

Les différences entre les mutants ont été analysées par ANOVA unidirectionnelle suivie d'un post test de Dunnett.

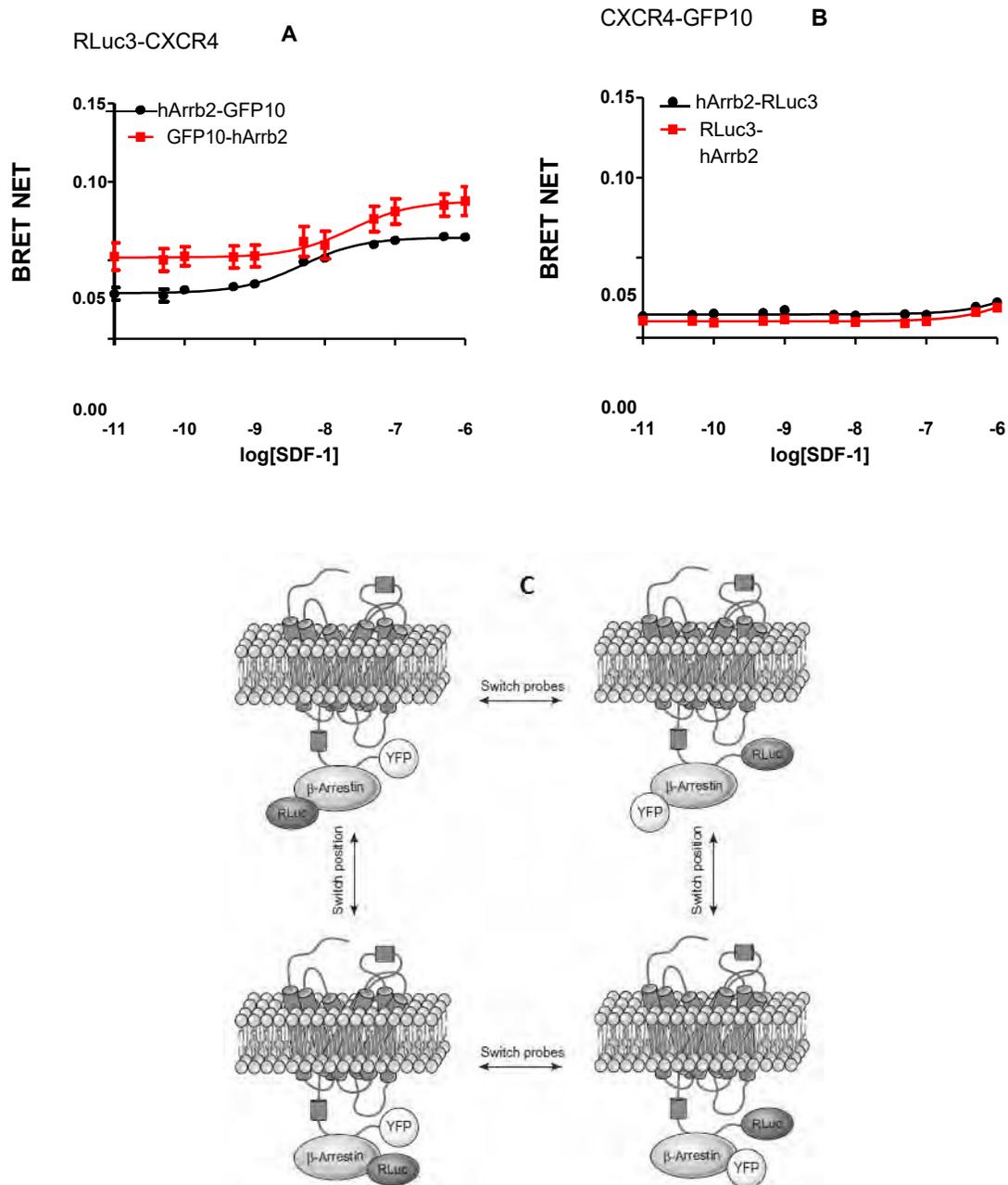
Les données des essais BRET représentent la moyenne des trois expériences indépendantes, chacune d'entre elles répétée en triplicata. L'ajustement des courbes par régression non linéaire et l'analyse statistique ont été réalisés en utilisant le logiciel *GraphPad Prism 5* (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

## 4. RÉSULTATS

### 4.1 Établissement du système BRET2 entre CXCR4 et la $\beta$ -arrestine

Les techniques de BRET1 ne permettent qu'une sensibilité réduite pour les complexes GPCR-  $\beta$ -arrestine, notamment pour CXCR4. En utilisant le BRET2, les pics d'émissions étant plus éloignés, le niveau de bruit de fond est nettement diminué, augmentant ainsi la spécificité du signal (51). Afin de maximiser le potentiel de cette méthode, nous avons réalisé les 4 constructions BRET2 possibles pour le couple CXCR4- $\beta$ -arrestine2 en interchangeant le donneur et l'accepteur en amont et en aval des protéines ainsi qu'entre le récepteur et la  $\beta$ -arrestine. Cette expérience nous permet de mettre au point un système BRET avec les constructions nous offrant un signal optimal.

Nous observons que la construction CXCR4-GFP10 ne nous permet pas d'observer de transfert d'énergie avec l'arrestine couplée à la Luciférase (figure 7). Cela est probablement dû au fait que la GFP10 se trouve trop à l'extrémité du récepteur et ne permet pas la proximité conformationnelle nécessaire au transfert d'énergie. Quant aux constructions GFP10- $\beta$ -arrestine2 et  $\beta$ -arrestine2-GFP10 associées à CXCR4-RLuc3, le déplacement de la GFP10 en aval de la  $\beta$ -arrestine ne semble pas nous permettre d'obtenir d'information supplémentaire, simplement une variation de ratio. Les variations de ratio BRET peuvent s'expliquer par une différence de proximité ou d'orientation, affectant le transfert d'énergie entre le donneur et le receveur BRET. Elles peuvent aussi s'expliquer par une simple absence d'interaction entre les deux protéines. Nous utiliserons donc la construction GFP10- hArrb2 avec CXCR4-RLuc3.



**Figure 7. BRET des différentes constructions CXCR4 – arrestine.** Des cellules HEK293E coexprimant transitoirement CXCR4-RLuc3 ou RLuc3-CXCR4 et GFP10-β-arrestine2 ou β-arrestine2-GFP10 ont été incubées avec les concentrations indiquées de SDF-1, pour 5 minutes et le BRET résultant a été mesuré immédiatement après à température ambiante. Les niveaux d'expression des protéines de fusion GFP10 et RLuc3 ont été contrôlés par mesure de fluorescence et de luminescence totale. Les données représentent la moyenne de trois expériences indépendantes réalisées en triplicata ± S.E.M. *Figure C. tirée de Bonneterre et al. 2016 (48) (voir ANNEXE 1).*

## 4.2 Conception des mutants de CXCR4

Dans un premier temps, nous avons développé une série de mutants de CXCR4 afin d'évaluer leurs capacités de recrutement de la  $\beta$ -arrestine, et d'activation des voies de signalisation, tel que ERK, les protéines kinases B et C et la phospholipase C. Les mutants de CXCR4 réalisés comprennent des substitutions situées dans le motif N/DRY ainsi que des sérines situées à l'extrémité C terminale. Les mutations en N/DRY ont été réalisées afin de conférer aux mutants de CXCR4 des propriétés d'activation constitutive.

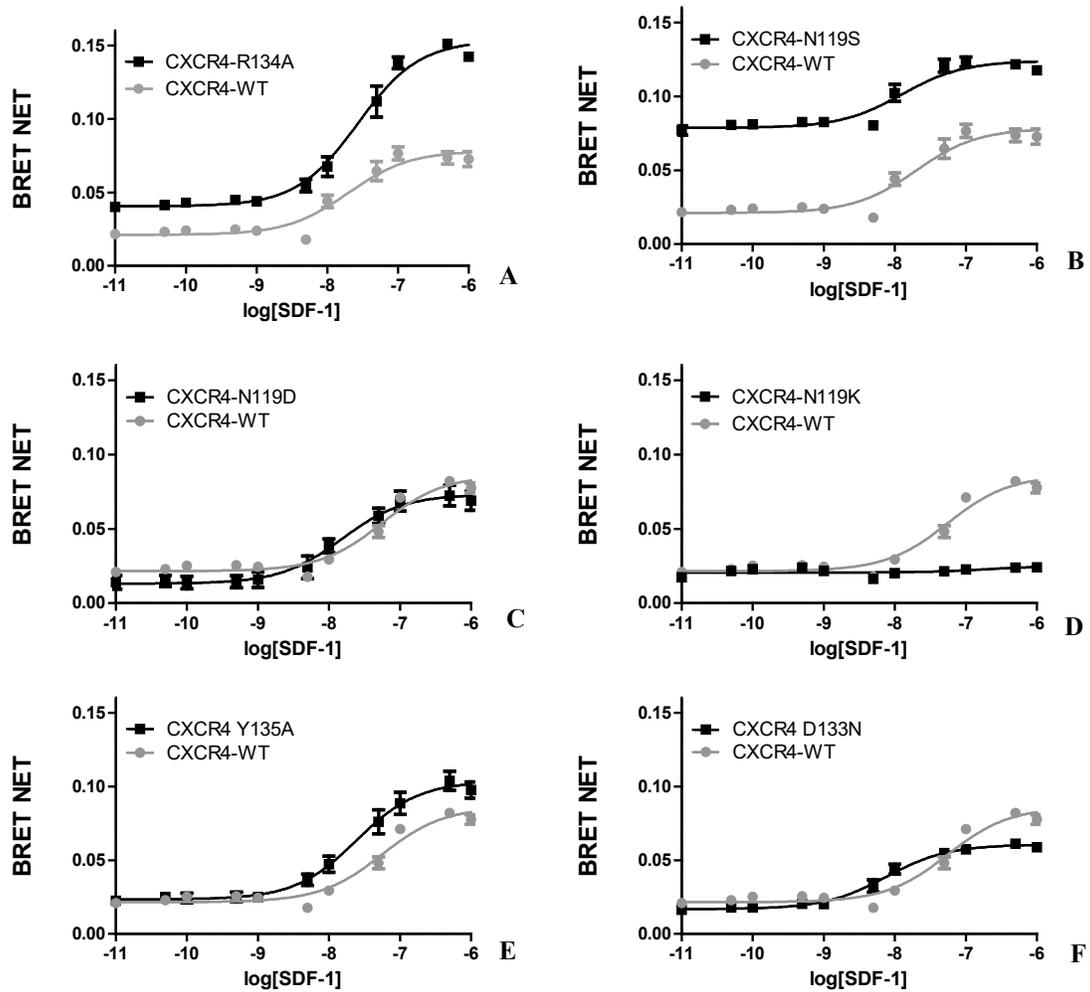
Afin d'évaluer le rôle des sites de phosphorylation des GRK dans le recrutement de la  $\beta$ -arrestine, nous avons substitué plusieurs sérines situées en C-terminal en alanines pour simuler la perte de phosphorylations par des GRK spécifiques. Nous avons combiné ces substitutions avec deux mutants de CXCR4; R134A et N119S, mutations ayant précédemment été démontrées comme modulant l'activation constitutive de CXCR4. Le fait de posséder cette série de mutants nous permet d'évaluer l'effet de la perte de phosphorylation du récepteur sur le recrutement de la  $\beta$ -arrestine, et cela sur des récepteurs signalisant à travers les différentes voies; soit  $G_{\alpha i}$  et  $\beta$ -arrestine.



L'analyse du niveau basal du signal des expériences dose-réponse a révélé une activité constitutive des mutants R134A (doublée) et N119S (triplée), mais pas sur les autres mutants. La réponse à SDF-1 a démontré une efficacité supérieure avec les mutants R134A et N119S, mais inférieure avec D133N, N119D et N119K. Le mutant N119K n'a montré aucune activité. N119S et R134A ont donc été choisis comme mutants de CXCR4 constitutifs en recrutement de la  $\beta$ -arrestine, tandis que les autres mutants ont été écartés du reste de l'étude.

La Figure 10 représente les données non normalisées obtenues avec les différents mutants de CXCR4 après stimulation du récepteur par SDF-1. Le premier point sur la courbe à l'extrême gauche représente le niveau de BRET2 sans aucune stimulation par le ligand. Il est déterminé par ajustement de la courbe sigmoïdale dose-réponse à 0,020 U.B (Unités BRET) pour le WT, mais augmente à 0.045 U.B. pour R134A et même 0.08 U.B. pour le mutant N119S, suggérant un recrutement constitutif de la  $\beta$ -arrestine. Lorsque stimulé par SDF-1, le récepteur WT atteint 0.08 U.B, le mutant R134A atteint les 0.15 U.B. et le N119S 0.12 U.B. Sur une échelle logarithmique, les doses-réponse de l'effet de la chimiokine SDF-1 sur les niveaux de recrutement de la  $\beta$ -arrestine suivent des courbes sigmoïdales.

Il est important de considérer dans cette expérience les courbes selon deux objectifs distincts ; d'une part l'activation constitutive du récepteur, soit son niveau basal sans stimulation par SDF-1 et d'autre part l'état activé du récepteur une fois stimulé.



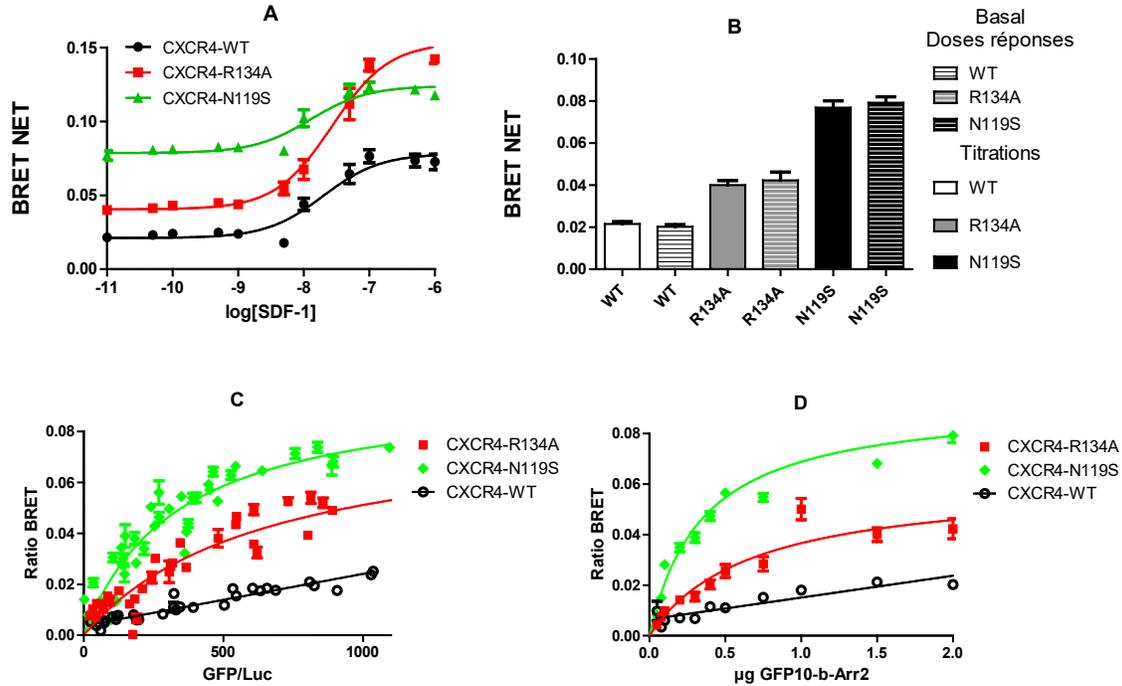
**Figure 9. Deux des six mutants de CXCR4 démontrent un recrutement constitutif de la  $\beta$ -arrestine.** Le recrutement de chaque mutant est mesuré par transfert d'énergie BRET. Des cellules HEK293E ont été transfectées pour coexprimer transitoirement GFP10- $\beta$ -arrestine 2 et soit CXCR4-RLuc3 WT (en gris) ou un des 6 mutants : R134A (A), N119S (B), N119D (C), N119K (D), Y135A (E) et D133N (F). Les cellules ont par la suite été incubées 5 minutes avec les concentrations indiquées (variant entre  $10^{-5}$  et  $10^{-12}$  M) de ligand SDF-1 et les niveaux BRET résultants mesurés immédiatement après, et ce, à température ambiante. La courbe dose-réponse de type WT est représentée en arrière-plan de chaque graphique en gris. Les données représentent la moyenne de trois (R134A et N119S) ou cinq (WT, N119D, N119K, et Y135A D133N) expériences indépendantes réalisées en triplicata  $\pm$  S.E.M.

#### **4.4 Recrutement et différence conformationnelle de recrutement basal de la $\beta$ -arrestine auprès des mutants N119S et R134A de CXCR4**

Les deux mutants R134A et N119S montrent tous deux un recrutement de la  $\beta$ -arrestine constitutif, mais à des niveaux beaucoup plus élevés pour le N119S. Lorsqu'ils sont stimulés avec SDF-1, N119S affiche une plage dynamique similaire à celle du WT tandis que R134A affiche un plage dynamique accrue (doublée) du recrutement de la  $\beta$ -arrestine.

Cependant, une des limites de l'utilisation d'une technique d'essai BRET est la difficulté d'établir une relation d'interaction directe entre les deux protéines marquées. En effet, le signal BRET observé peut parfois être causé par des collisions ou des rapprochements spontanés et aléatoires entre ces protéines, provoquant un transfert d'énergie. Ces transferts d'énergies sont parfois reflétés à travers le signal BRET, mais ne correspondent pas à la variation d'interaction protéines. Une différence conformationnelle d'une de ces protéines, ici du récepteur, peut entraîner une variation de ce BRET. Afin de confirmer que la différence observée par BRET entre CXCR4 N119S et R134A, n'est pas un artefact, nous avons réalisé des expériences de type titrations, où l'accepteur BRET a été transfecté à différentes concentrations tandis que la concentration des donneurs demeurait constante. La courbe WT montre une augmentation linéaire, suggérant un BRET non spécifique, tandis que les courbes des mutants N119S et R134A forment des courbes hyperboliques, où on observe une saturation des donneurs par les accepteurs en excès. Les BRETmax obtenus par titration sont conformes aux données de référence obtenues en doses-réponses comme observé dans la Figure 10.

Le développement de ces mutants constitutivement actifs nous permet de les utiliser comme outils afin d'évaluer d'autres facteurs de signalisation, tel que le rôle des phosphorylations C-terminales, en utilisant deux mutants ayant des propriétés de recrutement constitutives distinctes, soit indépendantes des protéines G, pour R134A, et utilisant les deux voies, pour N119S.

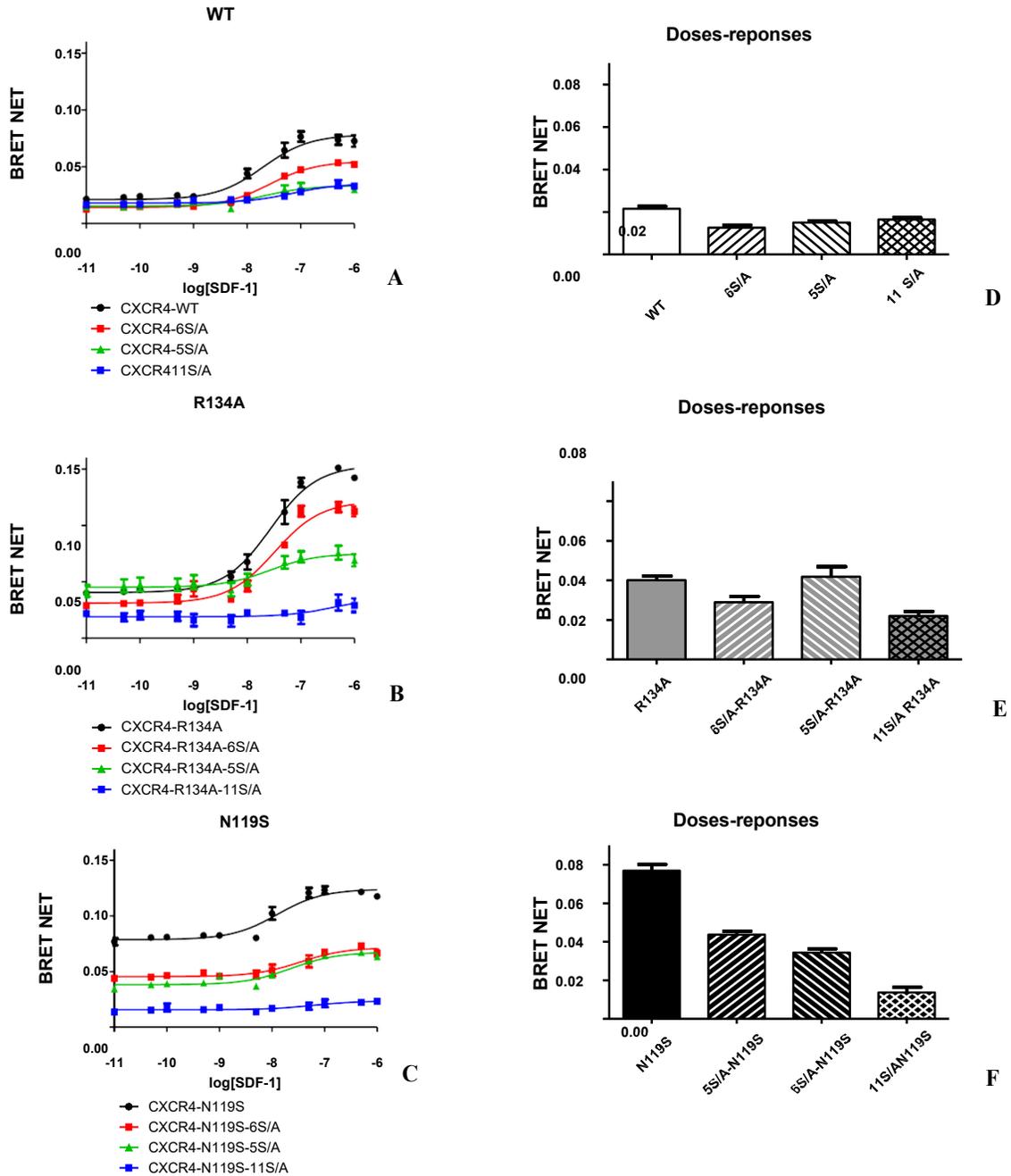


**Figure 10. Recrutement constitutif de la  $\beta$ -arrestine par les mutants de CXCR4**

**R134A et N119S.** La figure A illustre le recrutement BRET de la  $\beta$ -arrestine des deux mutants constitutivement actifs. Des cellules HEK293E coexprimant transitoirement CXCR4 mutants-RLuc3 et GFP10- $\beta$ -arrestine 2 ont été incubées avec les concentrations indiquées de ligand SDF-1 et les niveaux BRET résultant ont été mesurés immédiatement après à température ambiante. Les données représentent la moyenne de trois expériences indépendantes réalisées en triplicata  $\pm$  S.E.M. La figure B illustre les niveaux basaux de recrutement BRET des deux mutants lors des expériences de doses-réponses et de titration. Les niveaux basaux ont été obtenus par des valeurs de BRETnet de dose-réponse et titrations sans stimulation par SDF-1. Les données représentent la moyenne de trois expériences indépendantes réalisées en triplicata  $\pm$  S.E.M. La figure C représente la titration BRET du recrutement de la  $\beta$ -arrestine par les mutants de CXCR4. Les cellules HEK293E coexprimant transitoirement une quantité stable de CXCR4 mutants-RLuc3 et une quantité croissante GFP10- $\beta$ -arrestine 2 ont été incubées avec les concentrations indiquées de ligand SDF-1 et le BRET résultant a été mesuré immédiatement après à température ambiante. Les valeurs sont représentées graphiquement en fonction du rapport de GFP10 total sur l'expression Rluc3 obtenue en mesurant la fluorescence et la luminescence totale de chaque condition. Les données représentent la moyenne de trois expériences indépendantes réalisées en triplicata  $\pm$  S.E.M. La figure D offre une visualisation du ratio BRET en fonction de la concentration de plasmide GFP10- $\beta$ -arrestine 2 transfectée.

## **4.5 Recrutement de la $\beta$ -arrestine par des mutants C-terminaux de CXCR4**

Nous avons par la suite testé si le recrutement constitutif observé sur les deux mutants correspond à différentes modalités de recrutement de la  $\beta$ -arrestine. Afin d'évaluer cela, nous avons réalisé une série de mutations des deux mutants de CXCR4 constitutivement actifs. Ces mutations, situées dans la région C-terminale, comprennent les substitutions d'un certain nombre de sérines qui sont phosphorylées par les GRK, en alanines. Celles-ci sont responsables du recrutement de la  $\beta$ -arrestine, empêchant la phosphorylation de ces sites spécifiques. Les mutants comprennent une série où tous les sites de GRK 5/6 sont substitués et un autre où c'est le cas pour les sites GRK 2/3. Enfin, nous avons réalisé une série où toutes les sérines en C-terminal sont substituées en alanines, empêchant toute phosphorylation de CXCR4 en C-terminal.



**Figure 11. La  $\beta$ -arrestine affiche différentes modalités de recrutement sur les mutants CXCR4.** A, B, C, Des cellules HEK293E coexprimant transitoirement CXCR4-mutants RLuc3 et GFP10- $\beta$ -arrestine 2 ont été incubées avec les concentrations indiquées de ligand SDF-1 et le BRET résultant a été mesuré immédiatement après à température ambiante. Les niveaux d'expression des protéines de fusion GFP10 et RLuc3 ont été contrôlés par mesure de fluorescence et de luminescence totale. Les données représentent la moyenne de trois expériences indépendantes réalisées en triplicata  $\pm$  S.E.M. D, E, F. Les niveaux basaux ont été obtenus par des valeurs BRET sans stimulation par SDF- 1. Les données représentent la moyenne de trois expériences indépendantes réalisées en triplicata  $\pm$  S.E.M.

Afin d'évaluer les différences fonctionnelles entre les mutants, nous avons réalisé des essais BRET de recrutement de la  $\beta$ -arrestine avec les mutants CXCR4 R134A et N119S avec leurs mutants C-terminal correspondants. Les résultats des niveaux de BRET basal ne montrent aucune variation du signal de BRET entre les différentes mutations C-terminales de CXCR4 WT. Le mutant R134A semble ne pas être affecté par la perte des sites de GRK2/3 ou GRK 5/6, tandis que la perte de tous les sites semble quant à elle abolir l'activité constitutive. Le mutant N119S semble être également touché par la perte des sites de GRK2/3 ou de GRK 5/6, alors que la perte de tous les sites abolit aussi toute activité constitutive.

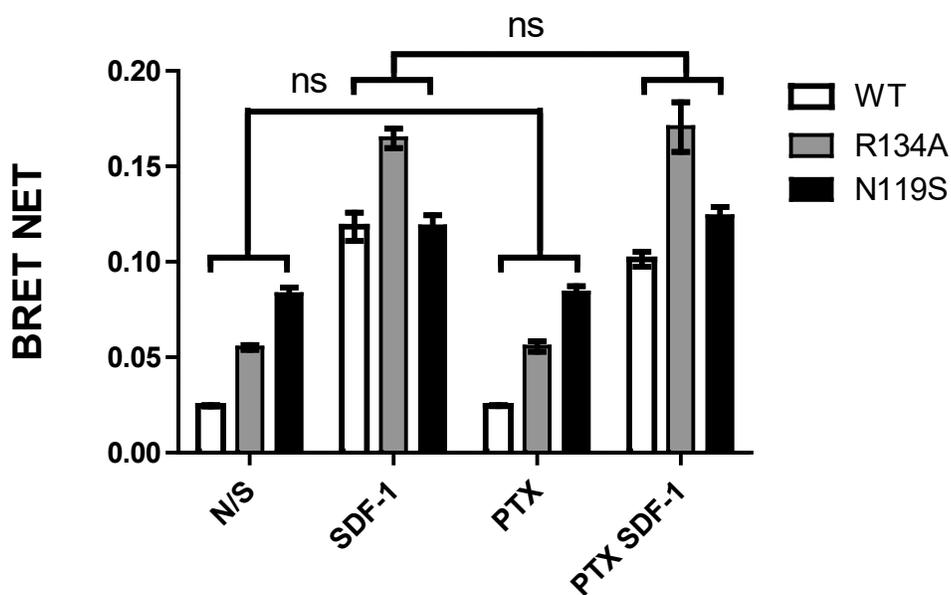
Nous avons pu observer des variations en terme d'efficacité des signaux BRET après stimulation avec SDF-1 sur les différents mutants. Sur CXCR4 WT, la perte de 5S/A abolit tout recrutement, tout comme la perte de l'ensemble des sites de GRK, tandis que la perte des sites de 6S/A ne diminue que partiellement l'efficacité.

Pour le mutant R134A, la perte de tous les sites de phosphorylation abolit également tout recrutement. Les mutants 5S/A montrent une très faible efficacité, mais maintiennent un signal relativement élevé de BRET en raison de son activité de base constitutive. Le mutant 6S/A ne montre qu'une partie de sa capacité comparativement au recrutement stimulé. Enfin, le mutant N119S montre un effet similaire sur les recrutements induits en présence de SDF-1. La perte de 6S/A ou 5S/A font nettement diminuer leur efficacité tandis que leur signal BRET demeure relativement élevé en raison de leur activité de base constitutive. La perte de toute activité pour le mutant R134A 11S/A (6S/A-5S/A) demeure chez le mutant N119S 11S/A.

Des variations d'efficacité de BRET peuvent refléter des différences quantitatives de recrutement de la  $\beta$ -arrestine, comme la variation de l'affinité de l'arrestine pour la conformation du récepteur. D'autre part, ces différences pourraient également être dues à des conformations différentes adoptées par les protéines résultant en une variation de distance entre l'accepteur et le donneur dans le complexe arrestine-récepteur qui peut se traduire par une variation du signal BRET.

#### **4.6 Effet de la toxine de Pertussis sur le recrutement de la $\beta$ -arrestine.**

L'analyse par BRET du recrutement de la  $\beta$ -arrestine nous permet de visualiser le recrutement constitutif des mutants. Cependant, la  $\beta$ -arrestine pouvant être recrutée à travers la voie G-dépendante et la voie indépendante aux GPCR (52), il n'est pas possible de savoir quelle voie est responsable du recrutement observé, et dans quelle proportion. Afin d'obtenir une réponse à cette question, nous avons réalisé l'analyse par BRET du recrutement de la  $\beta$ -arrestine constitutif des mutants en présence de toxine de Pertussis (PTX). La PTX agit en inhibant la voie de signalisation protéine G-dépendante, nous permettant ainsi d'isoler la voie G-indépendante dans nos résultats BRET. Le BRET observé dans la figure 12 représente le recrutement de la  $\beta$ -arrestine des mutants en présence de PTX correspondant donc au recrutement G-indépendant. Les résultats sans PTX correspondent quant à eux au recrutement combiné de la signalisation protéine G-dépendante et indépendante. L'expérience a été répétée en stimulant les récepteurs par leur ligand SDF-1. L'absence de variation significative entre les cellules traitées et non traitées suggère que la signalisation constitutive et stimulée des mutants serait entièrement protéine G-indépendante.



**Figure 12. Le recrutement de la  $\beta$ -arrestine par des mutants CXCR4 inhibée par la toxine de Pertussis.** Le signal BRET a été mesuré après un traitement d’une nuit avec la toxine de Pertussis dans un milieu privé de sérum. Les données sont la moyenne de trois expériences indépendantes réalisées en triplicata  $\pm$  S.E.M.. L’ANOVA avec post-test Bonferroni n’a révélé aucune différence statistiquement significative entre les cellules PTX traitées et non traitées.

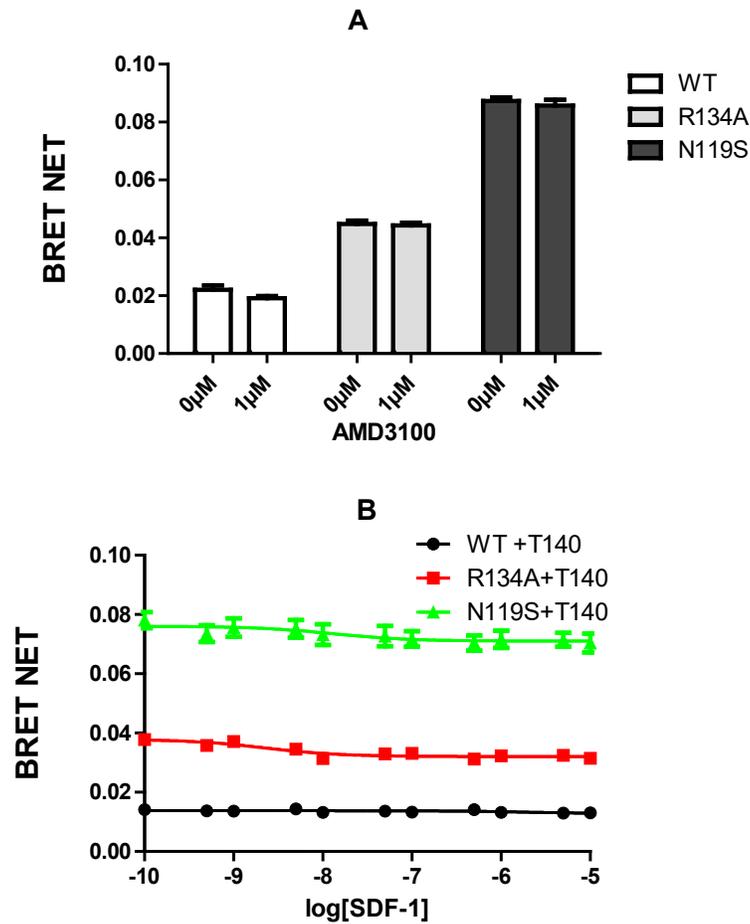
#### **4.7 Effet de T140 et AMD3100 sur le recrutement de la $\beta$ -arrestine aux mutants N119S R134A de CXCR4.**

Dans le but de confirmer les résultats de recrutement de la  $\beta$ -arrestine en BRET obtenus avec la toxine de Pertussis, nous avons utilisé T140 ainsi que l’AMD3100, des agonistes inverses de la signalisation G-dépendante de CXCR4, sur les mutants R134A et N119S. La Figure 13 montre que le recrutement constitutif observé précédemment est en effet dû à l’activité arrestine G-indépendante puisque l’activité constitutive n’est pas affectée par les agonistes inverses. Les niveaux basaux sont similaires à ceux observés lors des essais doses-réponses.

T140 étant un agoniste inverse de CXCR4 sur la voie de signalisation des protéines G, il n'affecte pas le recrutement du mutant R134A puisque ce mutant est constitutif dans sa voie G-indépendante. Étonnamment, le mutant N119S, signalisant pourtant constitutivement à travers la voie G-dépendante, n'est pas non plus affecté par l'agoniste inverse T140, comme le montre la figure 13 B.

Zhang et al. démontre l'activité constitutive de CXCR4 N119S dans la voie de signalisation dépendante des protéines G ainsi que son caractère désensibilisant. Nous constatons cette activité constitutive au niveau du recrutement de la  $\beta$ -arrestine, mais aussi au niveau de l'activation de ERK. En ce qui concerne le caractère désensibilisant de N119S, cette observation correspondrait avec l'hypothèse que ce mutant interagirait avec une interaction complète avec la  $\beta$ -arrestine.

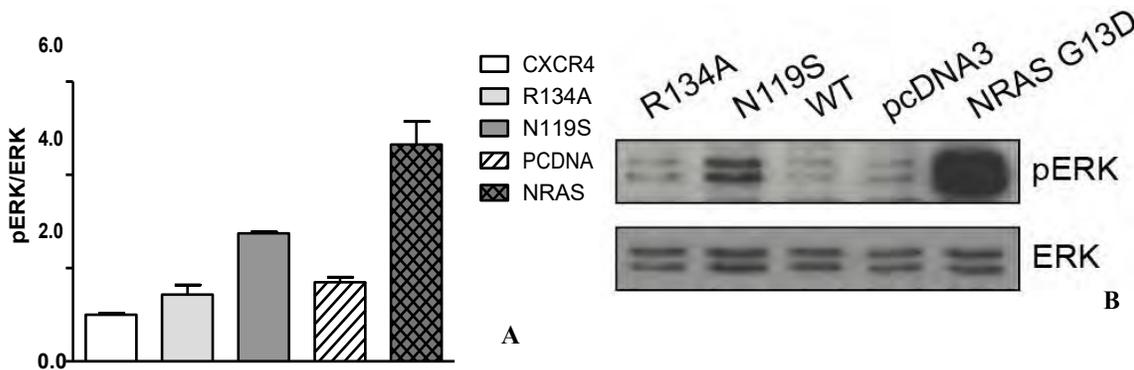
Comme nous le démontrons dans la Figure 17, ERK n'est pas affecté par la mutation N119S en présence de PTX. De plus, la Figure 9 démontre que le mutant N119 recrute la  $\beta$ -arrestine de façon constitutive. Cela signifie que le mutant N119S signale à travers la  $\beta$ -arrestine, et ce, de façon indépendante des protéines G puisque même en l'absence de signalisation G (PTX), ERK demeure activé. Ici, le T140, agoniste inverse de CXCR4 sur la voie G dépendante, n'affecte pas le recrutement de la  $\beta$ -arrestine, confirmant l'activation G-indépendante de la  $\beta$ -arrestine. L'AMD3100 n'est pas un agoniste inverse pour CXCR4 au niveau de la voie G-dépendante; il aurait cependant été possible d'observer une activité agoniste sur la voie arrestine, ce qui n'est pas le cas.



**Figure 13. L'activation G-dépendante n'est pas responsable du recrutement de la  $\beta$ -arrestine observé en BRET.** Des cellules HEK293E coéxprimant transitoirement CXCR4-WT/R134A/N119S RLuc3 et GFP10- $\beta$ -arrestine 2 ont été incubées avec les concentrations indiquées d'AMD3100 et de T140, tous deux des agonistes inverses de  $G\alpha$ , pour 5 minutes et le BRET résultant a été mesuré immédiatement après à température ambiante. Les niveaux d'expression des protéines de fusion GFP10 et RLuc3 ont été contrôlés par mesure de fluorescence et de luminescence totale. Les données représentent la moyenne de trois expériences indépendantes réalisées en triplicata  $\pm$  S.E.M.

## 4.8 Activation constitutive de la voie ERK par les mutants N119S et R134A

Les résultats des immunoblots en présence des mutants R134A et N119S de CXCR4, illustrés la figure 14.B, sont représentatifs des expériences réalisées en triplicatas. Les résultats compilés et analysés représentés par la Figure 14.A montrent l'activation de ERK par rapport au récepteur WT ainsi qu'un contrôle négatif, ici le vecteur vide, et un contrôle positif, ici un mutant constitutivement actif de NRAS. On observe une augmentation de l'activation constitutive pour le mutant R134A de près de 150% tandis que le mutant N119S triple l'activation constitutive de ERK. Cela démontre que l'activité constitutive observée en BRET se traduit aussi par une activation fonctionnelle du récepteur sur la voie effectrice ERK. Nous observons aussi des différences fonctionnelles entre les mutants au niveau de l'activation basale, suggérant différentes modalités de recrutement.



**Figure 14. L'analyse par Western blot des niveaux d'activation de ERK sur des cellules exprimant des mutants CXCR4 démontre une activité constitutive de la voie de signalisation. A.** Activation ERK des différents mutants de CXCR4 à l'état basal. Des cellules HEK293E exprimant transitoirement les mutants de CXCR4 ont été lysées sans stimulation après une incubation privée de sérum durant la nuit. Le plasmide NRAS a été utilisé comme contrôle positif et le vecteur vide comme contrôle négatif. Les concentrations en protéines des lysats ont été normalisées en fonction des concentrations de ERK-total. Les données représentent la moyenne de trois expériences indépendantes réalisées en triplicata  $\pm$  S.E.M. **B.** Immunoblot représentatif de la Fig. 14.A. Des résultats similaires ont été obtenus lors de trois expériences indépendantes.

## 4.9 Activation constitutive de la voie ERK par les mutants de l'extrémité C terminale

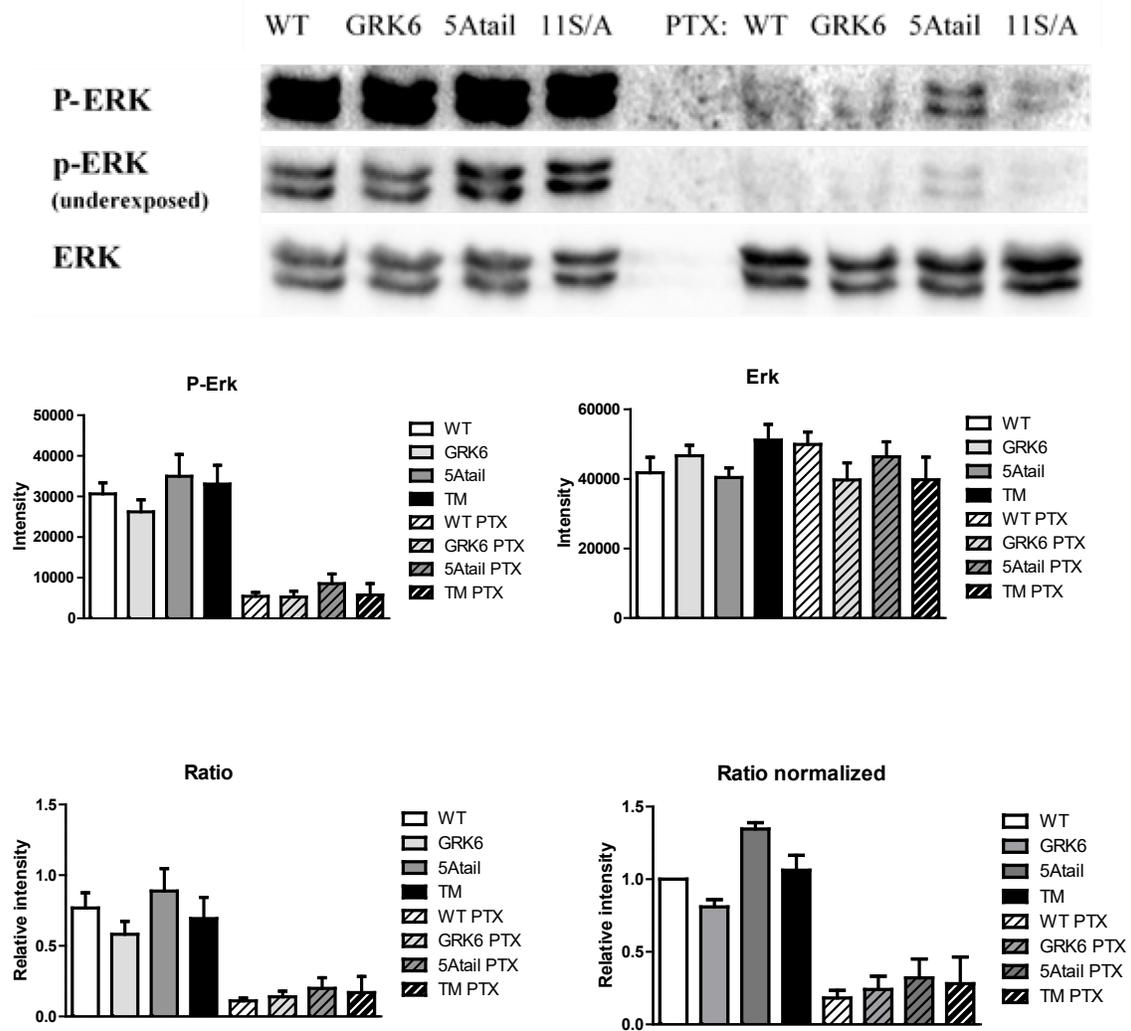
Les deux voies de signalisation, dépendante des protéines G et l'autre via le recrutement direct de la  $\beta$ -arrestine, activent la phosphorylation de ERK. Afin d'observer l'effet des mutations sur la signalisation dépendante de la  $\beta$ -arrestine, nous avons utilisé des traitements de toxine de Pertussis pour inhiber l'activité G-dépendante, permettant ainsi la visualisation de l'activité ERK  $\beta$ -arrestine-dépendante. Comme le montre la Figure 15, les traitements PTX ont considérablement réduit l'activation des ERK sur tous les mutants.

Les pertes des sérines 5S/A ou 6S/A sur CXCR4 WT n'ont eu que peu d'effets sur le recrutement basal de la  $\beta$ -arrestine. Par contre, le traitement PTX a aboli la majeure partie du recrutement constitutif sur tous les mutants, bien que le mutant sans sérines phosphorylables a été complètement aboli.

La mutation R134A a eu un effet similaire avec la perte de l'une des séries de sérines ou la totalité de celles-ci, entraînant un niveau basal d'activation abaissé. Le traitement PTX abolit également la majeure partie de l'activation de ces mutants, et ce, de manière égale même en l'absence de recrutement de l'arrestine.

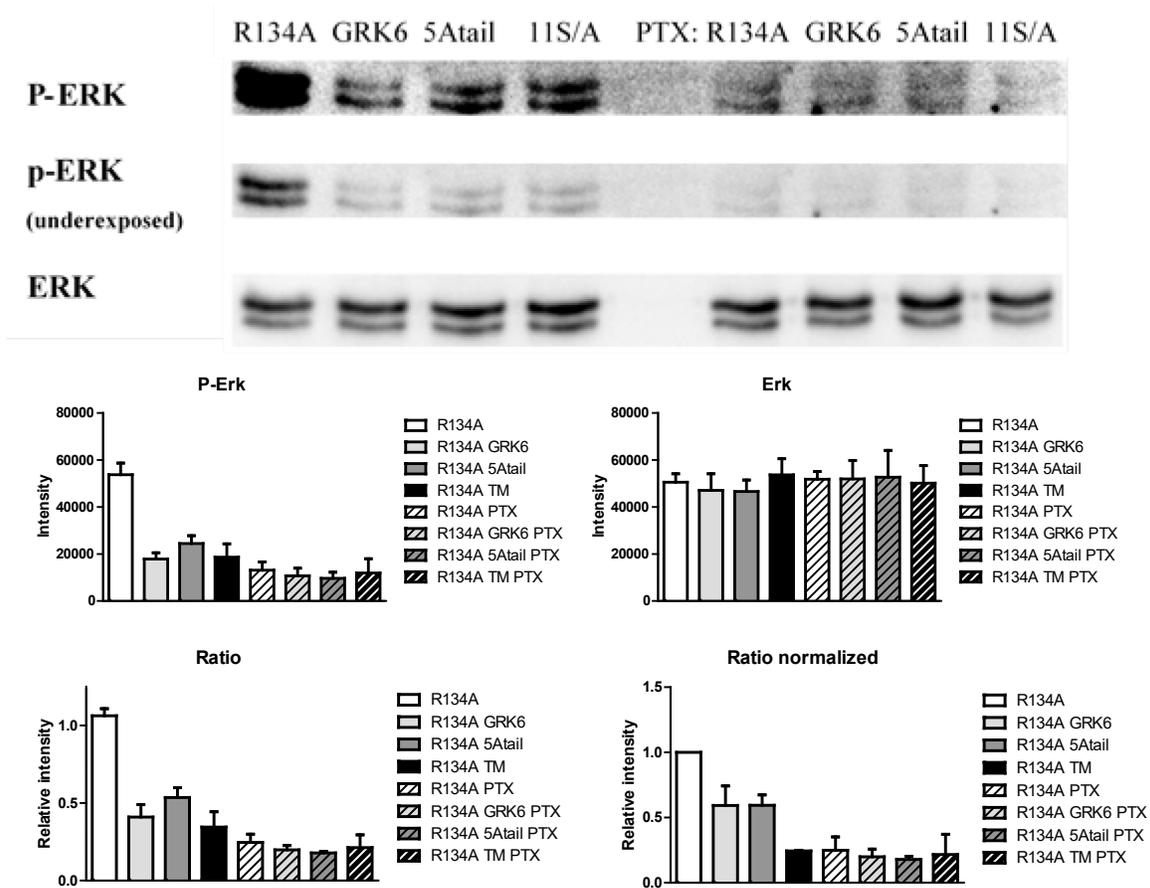
Le mutant N119S ne semble pas être affecté par la perte des sites GRK. Par contre, la perte de toutes les sérines en C-terminal sur le mutant N119S permet une importante augmentation dans le recrutement de la  $\beta$ -arrestine. Cette augmentation atteint jusqu'à quatre fois le niveau du mutant N119S.

Le traitement PTX diminue l'activation de ERK de façon similaire sur les différents mutants des sites GRK et WT, mais abolit toute activité de ERK sur le mutant privé de capacité de phosphorylation. Cela suggère que l'activation de ERK est G dépendante pour le mutant 11S/A. Il est possible que cette perte d'activité soit compensée par la voie  $\beta$ -arrestine-G indépendante pour les autres mutants 5S/A et 6S/A.

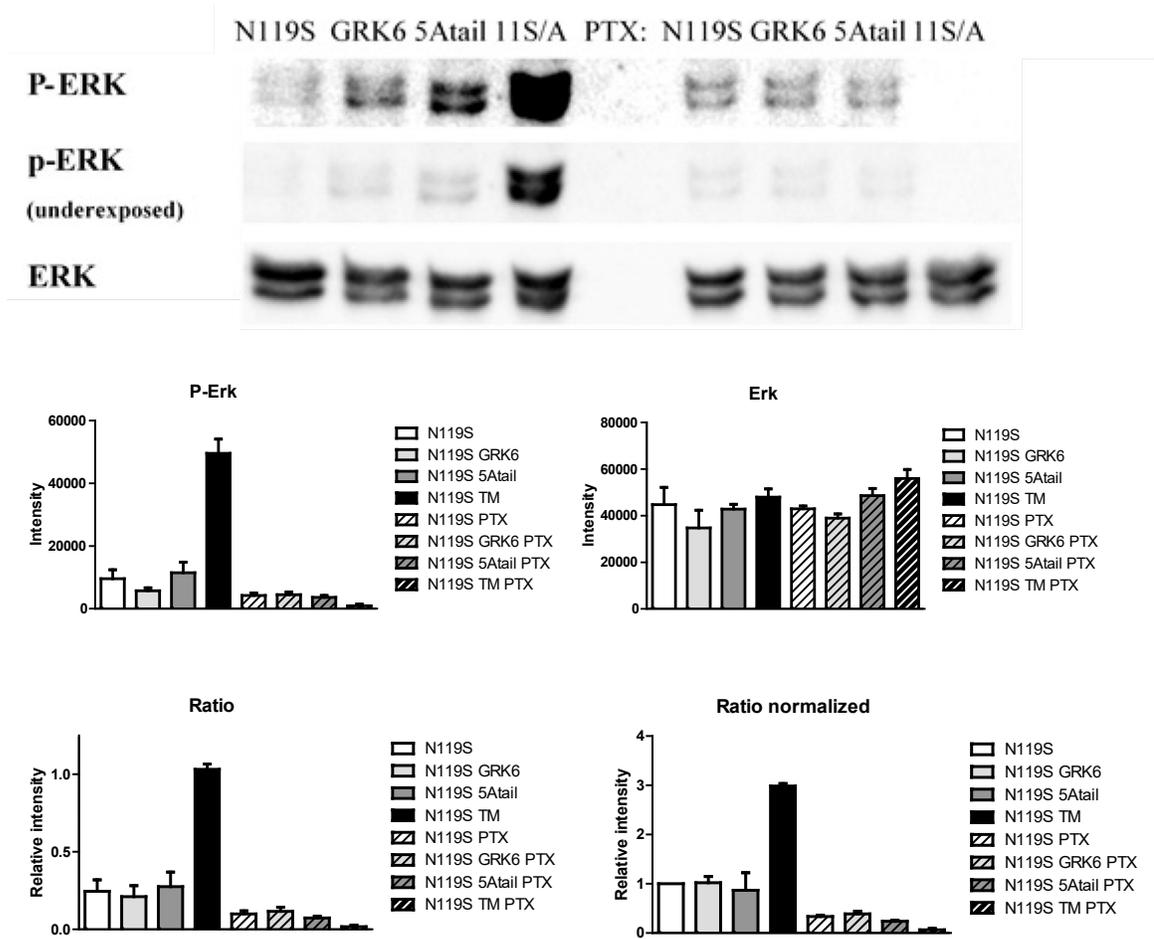


**Figure 15. Immunoblot de l'activation ERK sur des cellules exprimant les mutants**

**CXCR4 après traitement par la toxine de Pertussis.** Des cellules HEK293E exprimant transitoirement les mutants de CXCR4 ont été prétraitées avec toxine de Pertussis durant la nuit dans un milieu privé de sérum et lysées sans stimulation. Les figures P-Erk représentent le niveau de phosphorylation observé de ERK, et les figures intitulées ERK, le dosage total des protéines ERK. Le ratio est sous deux formes ; brut et normalisé. Le second correspond au ratio normalisé en fonction du ratio obtenu par le récepteur WT ne disposant d'aucune mutations en C-terminal. Les données représentent la moyenne de trois expériences indépendantes avec toxine de Pertussis durant la nuit dans un milieu privé de sérum et lysées sans stimulation. Les figures P-Erk représentent le niveau de phosphorylation observé de ERK, et réalisé en triplicata  $\pm$  S.E.M. Le chargement égal des protéines a été confirmé par la concentration de protéines ERK total.



**Figure 16. Immunoblot de l'activation ERK sur des cellules exprimant les mutants CXC4-R134A après traitement par la toxine de Pertussis.** Des cellules HEK293E exprimant transitoirement les mutants de CXC4 ont été prétraitées avec toxine de Pertussis durant la nuit dans un milieu privé de sérum et lysées sans stimulation. Les figures P-Erk représentent le niveau de phosphorylation observé de ERK, et les figures intitulées ERK, le dosage total des protéines ERK. Le ratio est sous deux formes ; brut et normalisé. Le second correspond au ratio normalisé en fonction du ratio obtenu par le récepteur R134A ne disposant d'aucunes mutations en C-terminal. Les données représentent la moyenne de trois expériences indépendantes avec toxine de Pertussis durant la nuit dans un milieu privé de sérum et lysées sans stimulation. Les figures P-Erk représentent le niveau de phosphorylation observé de ERK, et réalisé en triplicata  $\pm$  S.E.M. Le chargement égal des protéines a été confirmé par la concentration de protéines ERK total.



**Figure 17. Immunoblot de l'activation ERK sur des cellules exprimant les mutants**

**CXCR4-N119S après traitement par la toxine de Pertussis.** Des cellules HEK293E exprimant transitoirement les mutants de CXCR4 ont été prétraitées avec toxine de Pertussis durant la nuit dans un milieu privé de sérum et lysées sans stimulation. Les figures P-Erk représentent le niveau de phosphorylation observé de ERK, et les figures intitulées ERK, le dosage total des protéines ERK. Le ratio est sous deux formes ; brut et normalisé. Le second correspond au ratio normalisé en fonction du ratio obtenu par le récepteur N119S ne disposant d'aucune mutations en C-terminal. Les données représentent la moyenne de trois expériences indépendantes avec toxine de Pertussis durant la nuit dans un milieu privé de sérum et lysées sans stimulation. Les figures P-Erk représentent le niveau de phosphorylation observé de ERK, et réalisé en triplicata  $\pm$  S.E.M. Le chargement égal des protéines a été confirmé par la concentration de protéines ERK total.

## 5. DISCUSSION

### 5.1 Aperçu

L'analyse des récentes découvertes en matière de signalisation des GPCR suggère qu'il existe un mécanisme de liaison de la  $\beta$ -arrestine au récepteur en deux étapes. Dans certaines circonstances, un mécanisme alternatif impliquant la formation d'un mégaplex récepteur-protéine G-arrestine a été identifié (31, 53).

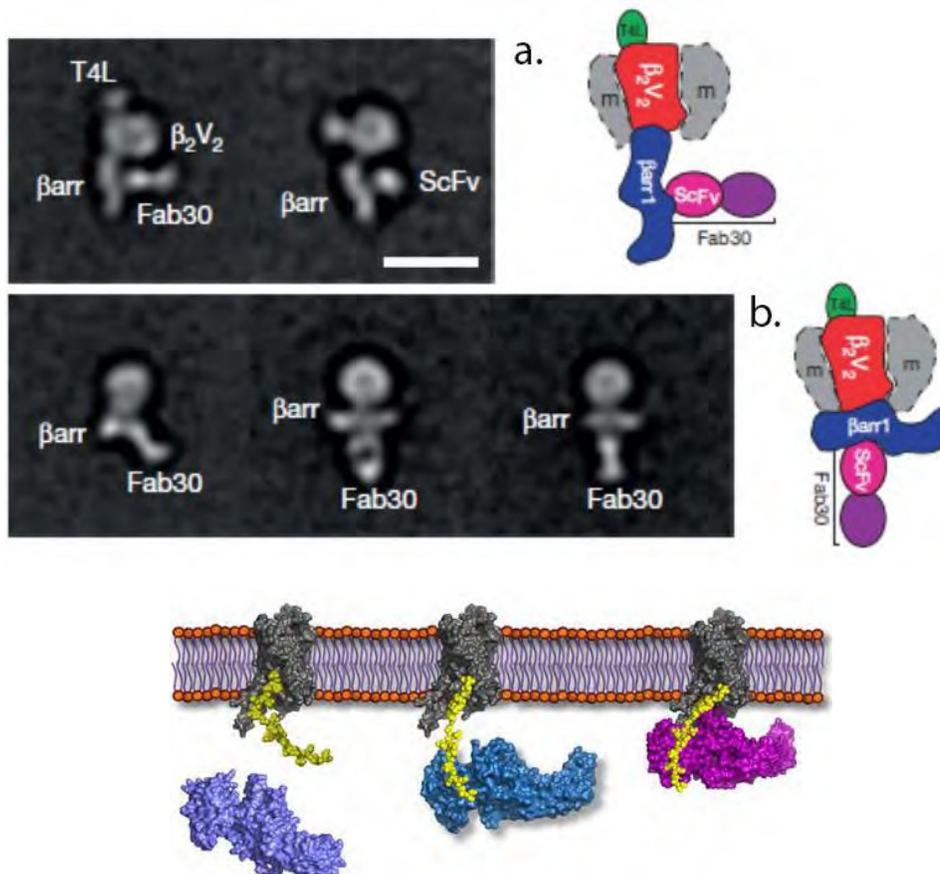
Le mécanisme en deux étapes permet dans un premier temps la liaison de la  $\beta$ -arrestine au récepteur par l'extrémité C-terminale de celui-ci puis dans un second, l'insertion du *finger loop* de la  $\beta$ -arrestine au cœur du récepteur pour fournir une interaction dite complète.

Nous estimons que nos résultats s'insèrent parfaitement dans ce nouveau cadre d'interprétation. Nous pensons que les mutants développés, R134A et N119S, représentent spécifiquement ce modèle en deux étapes. Le mutant R134A de CXCR4, simulant l'interaction partielle en interagissant avec la  $\beta$ -arrestine uniquement par l'extrémité C-terminale du récepteur, et le mutant N119S représentant l'interaction complète en interagissant avec le récepteur par cette extrémité C-terminale et directement avec le cœur du récepteur. Nous estimons que l'absence de l'arginine 134 sur le mutant R134A pourrait être une des causes de son incapacité à interagir avec le *finger loop* de la  $\beta$ -arrestine. Les causes possibles de cette absence d'interaction seront abordées plus en détail par la suite.

Afin de faciliter la compréhension de l'analyse et l'interprétation que nous faisons de nos résultats, nous allons ici rappeler le cadre d'interprétation révisé concernant les modalités d'interaction entre les récepteurs et la  $\beta$ -arrestine.

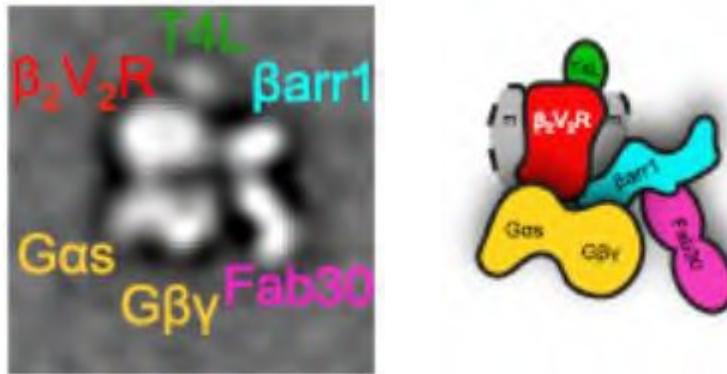
## 5.2 Nouveaux concepts d'interaction arrestine - récepteur

La compréhension actuelle est qu'il existe deux différentes modalités de recrutement de la  $\beta$ -arrestine ; une dont la liaison entre le récepteur et la  $\beta$ -arrestine est partielle ainsi qu'une où elle est complète. Illustrée dans la figure 18 ci-dessous, cette première modalité, dite complète, représente l'interaction où le cœur de la partie intracellulaire du récepteur transmembranaire interagit avec la  $\beta$ -arrestine. Cette cavité interne du récepteur serait responsable du mécanisme de désensibilisation (18).



**Figure 18. Représentation des complexes  $\beta_2V_2R$ -arrestine par microscopie électronique à simple particule (Single-particle cryo-EM).** a) Représentation du récepteur en complexe avec la  $\beta$ -arrestine dans une interaction partielle. La  $\beta$ -arrestine, suspendue au récepteur, interagit avec l'extrémité C-terminale mais pas avec le cœur du récepteur b). Représentation du récepteur en complexe avec la  $\beta$ -arrestine dans une interaction complète. La  $\beta$ -arrestine, liée au récepteur, interagit non seulement avec l'extrémité C-terminale, mais aussi avec le cœur du récepteur. Tiré de Thomsen et al. et Kumari et al. (18, 19, 53).

D'autre part, la modalité dite partielle implique exclusivement l'extrémité carboxyle-terminale du récepteur pour la liaison de la  $\beta$ -arrestine. Comme illustré ci-dessous, ce type de modalité peut permettre une interaction entre le récepteur, la  $\beta$ -arrestine et les sous-unités de la protéine G, menant à la formation d'un complexe nommé mégaplex. Cette modalité entraînerait ainsi une réponse signalétique différente, soit un recrutement partiel de la  $\beta$ -arrestine tout en possédant une capacité d'activation de la voie de signalisation ERK (53).



**Figure 19. Représentation des complexes  $\beta_2V_2R$ -arrestine-protéine G par microscopie électronique à simple particule.** Représentation du récepteur en complexe avec la  $\beta$ -arrestine ainsi que les  $G\alpha$  et  $G\beta\gamma$ . La  $\beta$ -arrestine est présente ici dans une interaction partielle, n'interagissant avec le récepteur qu'avec son extrémité C-terminale. La présence des sous-unités des protéines G et de la  $\beta$ -arrestine au récepteur supporte l'existence de la formation d'un mégaplex. *Tiré de Thomsen et al.(53).*

Nous allons ici discuter plus en détail les deux modes d'interaction, et leurs liens avec nos observations des mutants CXCR4 N119S et R134A.

### 5.2.1 Interaction complète

Au cours des dernières années, deux études (Kang et al. et Szczepek et al.) ont pu observer la structure de la rhodopsine dans un état de liaison complet avec la  $\beta$ -arrestine. Kang et al. établissent la première représentation structurale du cristal d'un GPCR, ici la rhodopsine, liée à une arrestine. Ce cristal permet d'observer le mécanisme de liaison de la  $\beta$ -arrestine au récepteur. Ils observent une modification conformationnelle du récepteur au niveau des hélices transmembranaires. Cette modification de la structure forme une poche

au cœur du récepteur. Cette poche permettrait la réception du *finger loop* de la  $\beta$ - arrestine. Ils observent aussi la liaison de l'extrémité N-terminale de la  $\beta$ -arrestine à l'extrémité C-terminale phosphorylée du récepteur, confirmant le mécanisme d'activation de la  $\beta$ -arrestine par ces sites de phosphorylation. La liaison de la  $\beta$ -arrestine à l'extrémité C-terminale du récepteur induit un réarrangement conformationnel de la  $\beta$ -arrestine. Ce repliement de la  $\beta$ -arrestine permettrait la formation du *finger loop* compatible avec l'insertion dans la poche interne de l'hélice intracellulaire de la rhodopsine. Ils mentionnent aussi que ce changement conformationnel de la  $\beta$ -arrestine peut permettre le recrutement de protéine de signalisation, tel que ERK.

Szczespek et al. confirment ces résultats avec un approche similaire, en observant la liaison de la  $\beta$ -arrestine à la rhodopsine par un cristal du récepteur activé lié à un analogue simulant le *finger loop* de la  $\beta$ -arrestine. Ils observent l'altération de la structure du récepteur, favorisant le placement de la  $\beta$ -arrestine sur la poche interne du récepteur, bloquant ainsi l'accès de la protéine G au récepteur.

### **5.2.2 Le mutant CXCR4 N119S comme modèle de l'interaction complète**

Selon nos observations, N119S correspondrait au mode d'interaction complète. En effet, ce mutant active la voie ERK. Il dispose d'une activité dépendante des protéines G ainsi qu'une activité indépendante de celles-ci. Nous observons aussi que cette activité ERK est soumise à la compétition entre la voie de signalisation protéine G-arrestine. Nous interprétons que cet effet sur la voie ERK est dû à une compétition pour la cavité centrale entre la protéine G et la  $\beta$ -arrestine. En effet, le mutant N119S semble recruter la  $\beta$ -arrestine sous sa forme desensibilisatrice, ce recrutement représenté dans la Figure 4 par le complexe complètement engagé. Cette observation s'appuie sur l'augmentation de la signalisation G-protéine-dépendante lors de l'abolition du recrutement de la  $\beta$ -arrestine par le mutant N119S 11S/A, dont tous les sites de phosphorylations sont mutés en alanines. Ce mutant, incapable de recruter la  $\beta$ -arrestine, démontre une augmentation de l'activation de la voie ERK G-dépendante, voie sensible à la toxine de Pertussis (voir Figure 18. Représentation des complexes  $\beta$ 2V2R-arrestine par microscopie électronique à simple particule (Single-

particule cryo-EM).). Nous concluons donc que la  $\beta$ -arrestine aurait un effet désensibilisateur sur l'activité de la protéine G et l'activité de Erk en découlant.

Comme mentionné précédemment, Szczepek et al. décrit l'interaction entre le récepteur et la  $\beta$ -arrestine, particulièrement avec le *finger loop*. En effet, Szczepek utilise un peptide dont la structure est similaire au *finger loop* de la  $\beta$ -arrestine et observe sa liaison avec le récepteur au sein de sa poche interne. Il identifie ainsi spécifiquement le lien d'interaction entre ces deux sites. Kang et al. établissent aussi cette liaison du *finger loop* de la  $\beta$ -arrestine au cœur du récepteur, mais l'observent en réaction à une liaison de la  $\beta$ -arrestine à l'extrémité C-terminale du récepteur. Puisque le mutant N119S active la voie ERK de façon G dépendante et recrute la  $\beta$ -arrestine de façon indépendante des protéines G, et que ces voies sont activées seulement par le modèle d'interaction complète de CXCR4, nous suggérons que ce mutant adopte, de façon constitutive, une interaction complète entre l'extrémité et le cœur du récepteur avec la  $\beta$ -arrestine

Au niveau fonctionnel, nous pensons qu'il est logique que l'interaction complète entre le récepteur et la  $\beta$ -arrestine soit responsable de la désensibilisation. En vue de ces résultats ainsi que ceux de Kumari et al., il apparaît possible d'émettre l'hypothèse que l'interaction avec le cœur du récepteur serait nécessaire pour le mécanisme de désensibilisation. En effet, Kumari et al. observent le caractère en deux étapes de l'interaction entre le récepteur et la  $\beta$ -arrestine. En combinant les données structurales des cristaux obtenus avec l'imagerie de microscopie électronique à simple particule (Single-particle cryo-EM), ils déterminent des sites de superposition entre la protéine  $G\alpha$  et la  $\beta$ -arrestine sur le récepteur. Ils identifient aussi, à l'aide du cristal, des sites de chevauchement de liaison entre le *finger loop* de la  $\beta$ -arrestine et la protéine G sur le récepteur rhodopsine.

Ces observations supportent l'existence d'un mécanisme de désensibilisation régulé par l'encombrement stérique et le mécanisme de concurrence pour une interface superposée sur la surface cytoplasmique du récepteur. Cette conclusion est supportée par les données de Shukla et al. stipulant que l'insertion du « *finger loop* » de la  $\beta$ -arrestine est nécessaire à l'interaction complète avec le récepteur (18).

Nos données correspondent à ces observations. En effet, comme observé dans la Figure 17,

l'activation ERK du mutant N119S n'est pas affectée par la présence de PTX. Cependant, lorsque la mutation N119S est combinée aux mutations 11 S/A, l'activation de ERK est fortement augmentée. À l'inverse, lorsque ce même mutant N119S 11S/A est en présence de PTX, aucune activation n'est détectée, contrairement au mutant N119S avec un C-terminal intact en présence de PTX. Ces observations confirment que l'activation ERK par le mutant N119S découle en partie de la  $\beta$ -arrestine. Nous estimons que cette modalité correspond à l'interaction complète précédemment décrite.

### 5.2.3 Interaction partielle – Le mégaplex

La modalité partielle de recrutement a été démontrée comme compatible avec une formation de « mégaplex », comprenant récepteur, arrestine, et protéines G de façon simultanée (53). Dans ce « mégaplex », la  $\beta$ -arrestine ne semble pas désensibiliser l'activité de  $G_{\alpha i}$  (53). Au contraire, ce mégaplex permettrait une activation soutenue, durable dans le temps, de  $G_{\alpha i}$  (53). De même, les sous-unités  $G_{\beta}$  et  $G_{\gamma}$  font également partie du mégaplex. Effectivement, une association arrestine- $G_{\gamma}$  avait été observée par d'autres auteurs tel que Audet et al. et une proximité avec le mégaplex a été constatée par Thomsen et al. (53, 54).

A l'aide d'analyse par microscopie électronique à simple particule (Single-particle cryo-EM), Kumari et al. déterminent que l'extrémité C-terminale du récepteur permet la liaison de la  $\beta$ -arrestine dans un premier temps avant l'interaction avec le cœur. L'isolation d'un complexe partiel stable entre le récepteur et la  $\beta$ -arrestine permet de confirmer le rôle de l'extrémité C-terminale phosphorylée dans la formation d'un complexe avec la  $\beta$ -arrestine et suggère une importance fonctionnelle de ce mode d'interaction. C'est ce que Kumari et al. confirment en observant le niveau d'activation de ERK et d'internalisation du récepteur. En réalisant un récepteur mutant incapable de fournir cette interaction avec le cœur du récepteur, ils observent une incapacité du récepteur à recruter de façon complète la  $\beta$ -arrestine. Cependant ils observent une capacité de stimulation de ERK et d'internalisation du récepteur. Ils suggèrent donc que le mode d'interaction partielle est suffisant pour permettre l'endocytose du récepteur et l'activation de ERK. Nous observons une activité similaire pour le mutant R134A au niveau du recrutement ERK.

## 5.2.4 Le mutant CXCR4 R134A comme modèle de l'interaction partielle

Le mutant R134A présente des caractéristiques différentes de N119S. En effet, le mutant R134A est décrit comme étant incapable d'activer la protéine  $G_{\alpha i}$  (40). En revanche, nous détectons un recrutement constitutif de la  $\beta$ -arrestine (Figure 10, Figure 11 et Figure 7) par R134A, ce qui entraîne une activation de ERK (Figure 14). L'abolissement complet de ce recrutement constitutif par le mutant R134A-11S/A (Figure 16), qui éteint également l'activation d'ERK, contrairement au mutant N119S-11S/A (Figure 17), démontre l'absence de contribution **d'activité de  $G_{\alpha i}$**  à cette activation d'ERK par R134A. De façon surprenante, toutefois, l'incubation avec PTX abolit également ce signal ERK, et ce malgré l'absence d'activité  $G_{\alpha i}$ . Ce résultat suggère alors une contribution non-enzymatique de  $G_{\alpha i}$  à l'activation de ERK par la  $\beta$ -arrestine recrutée au mutant R134A. Ces observations sont compatibles avec l'interprétation stipulant que le recrutement de la  $\beta$ -arrestine à R134A représente la modalité partielle.

L'analyse des résultats de R134A nous porte donc à croire qu'il adopte une interaction partielle avec la  $\beta$ -arrestine. Cette interaction, où la  $\beta$ -arrestine se lie au récepteur par l'extrémité C-terminale de ce dernier signifie que la cavité interne du récepteur n'accueille pas ici le *finger loop*. L'absence d'interaction avec le *finger loop* de la  $\beta$ -arrestine pourrait s'expliquer par différents mécanismes :

Le **premier** impliquerait que la cavité interne du récepteur n'est simplement pas ouverte. Ainsi, les hélices transmembranaires ne permettent pas un accès mécanique adéquat pour la liaison du *finger loop*. De la même manière, la  $G_{\alpha}$  ne peut y accéder non plus. Elle ne peut donc pas être activée, conformément à nos observations.

Le **second**, à l'inverse, disposerait d'une cavité ouverte et accessible, mais non-fonctionnelle. L'arginine 134 serait indispensable à la liaison de la  $\beta$ -arrestine. Étant mutée en alanine, la liaison devient impossible, soit par une incompatibilité

de charges ou conformationnelle. De la même façon, leurs sites de liaison étant chevauchants, la  $G\alpha$  ne pourrait s'y lier.

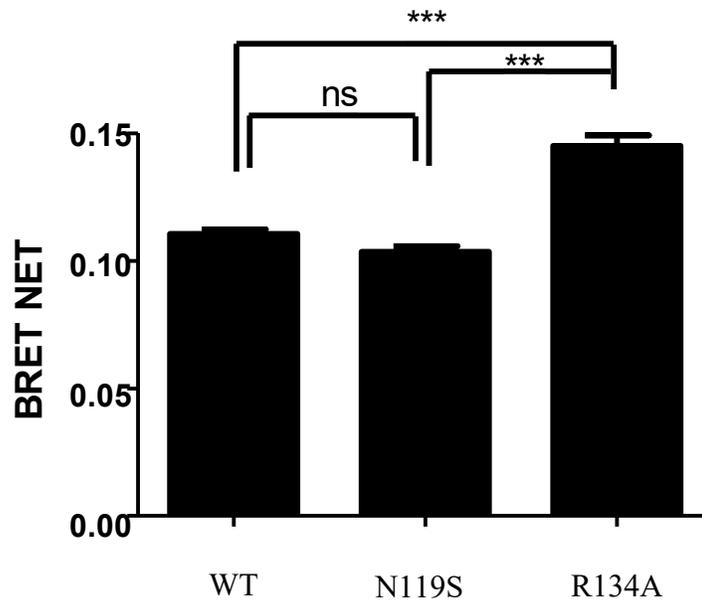
Le **troisième** mécanisme pourrait être une absence de la formation du *finger loop*. En effet, si la  $\beta$ -arrestine adopte une conformation différente, il est possible que le *finger loop* ne soit tout simplement pas présent. Cette différence conformationnelle pourrait être induite par différents facteurs notamment le motif de phosphorylation de l'extrémité C-terminale du récepteur. En effet, la liaison de la  $\beta$ -arrestine à l'extrémité C-terminale phosphorylée du récepteur est primordiale pour la formation du motif *finger loop*. Une variation dans le motif de phosphorylation de cette extrémité C-terminale pourrait entraîner une altération dans la formation du *finger loop*. Ainsi, si le patron de phosphorylation était différent pour le mutant R134A, il est possible que la  $\beta$ -arrestine ne forme simplement pas de *finger loop*.

Fait intéressant, les travaux de Thomsen et al. observent une protéine  $G\alpha$  active pour un récepteur ne disposant pas de la mutation R3.50A (équivalente au R134A), démontrant ainsi la présence d'une cavité ouverte et fonctionnelle pour la  $G\alpha$ , mais pas la  $\beta$ -arrestine. Ces observations supportent bien l'hypothèse d'un mécanisme où le récepteur est disponible, avec une cavité accessible et fonctionnelle, mais où la  $\beta$ -arrestine elle-même ne peut interagir avec, potentiellement dû à l'absence de *finger loop*. Ainsi, la première hypothèse semblerait donc moins probable que la seconde ou la dernière. L'absence d'interaction peut aussi bien être causée par la mutation de R134 ou l'absence de *finger loop*.

Cependant, il est pertinent de noter que nous observons tout de même une capacité signalétique de R134A. Le recrutement constitutif de la  $\beta$ -arrestine ainsi que l'activation de ERK signifie que cette forme partielle permet une activation fonctionnelle. En effet, le modèle représentant la forme d'interaction partielle recrute la  $\beta$ -arrestine, comme le montre la Figure 10. Le mutant R134A démontre aussi une capacité à activer ERK (Figure 16)

Une ligne d'évidence pointe vers la formation de « mégaplex » par R134A : l'inactivation de ERK (arrestine-dépendant) par l'incubation avec la PTX. La PTX mène à l'ADP ribosylation du site actif (bloquant ainsi la sous-unité  $\alpha$  dans un état inactif) de  $G_{\alpha i}$  (55). Il est raisonnable de penser que cette modification au site actif entraîne une distorsion conformationnelle importante de  $G_{\alpha i}$  (56). Effectivement, les conformations  $G_{\alpha i}$ -GDP (inactif) et  $G_{\alpha i}$ -GTP (actif) sont globalement similaires (57). Cependant, la conformation  $G_{\alpha i}$ -ADP-rib devrait ressembler davantage à la conformation  $G_{\alpha i}$ -APO (vide), qui elle est effectivement très distincte, les deux lobes de la  $G_{\alpha i}$  étant largement séparés (56). Dans le contexte d'un mégaplex, il est possible, voire probable, que la distorsion conformationnelle d'une composante, tel que  $G_{\alpha i}$  entraîne des effets globaux sur la conformation et l'activité du mégaplex. Il semble donc concevable que la conformation de la  $\beta$ -arrestine en mégaplex soit affectée par l'ADP-ribosylation de  $G_{\alpha i}$ , de la sorte, que l'activation de ERK (arrestine-dépendante) soit abolie, ce qui est observé. Toutefois, il est à rappeler que PTX n'abolit pas le recrutement de la  $\beta$ -arrestine sur R134A (Figure 12). Nos résultats suggèrent donc que la  $G_{\alpha}$  joue un rôle structural important dans la formation d'un mégaplex R134A-G $\alpha$ -arrestine et possiblement MEK-ERK. Ces informations complètent les recherches de Thomsen et al. qui démontrent que la  $G_{\alpha}$  nécessite la  $\beta$ -arrestine afin de signaler dans le mégaplex.

De plus, cette interprétation, soit que R134A mènerait à la formation d'un « mégaplex », est supportée par des données obtenues au laboratoire de la figure 18 ci-dessous. Effectivement, R134A provoque un BRET entre la  $\beta$ -arrestine et  $G_{\gamma}$ -GFP10 significativement supérieur à celui obtenu pour N119S, dont le niveau de BRET arrestine/ $G_{\gamma}$  est égale à celui du récepteur CXCR4 non muté. Ceci suggère une association arrestine/ $G_{\gamma}$  spécifique à R134A.



**Figure 20. Interaction BRET entre la  $\beta$ -arrestine et  $G_\gamma$ .** Le BRET est réalisé entre RLuc3-arrestine et  $G_\gamma$ -GFP10. Les cellules sont co-transfectées avec les récepteurs mutants R134A et N119S. Le ratio BRET du mutant R134A montre un BRET augmenté entre  $G_\gamma$  et la  $\beta$ -arrestine, suggérant une interaction différente, ou augmentée. *Expérience réalisée par D. Rhainds.*

Nos données apportent ici l'information nouvelle que la  $\beta$ -arrestine nécessite la  $G_\alpha$ , du moins structurellement, pour former un complexe protéique fonctionnel de signalisation vers ERK. Nous démontrons donc une dépendance réciproque entre les deux protéines dans le mécanisme de signalisation en « mégaplex ».

### 5.3 Rôle de R3.50 pour l'activation

Le rôle de l'arginine 3.50 est essentiel dans les interactions avec la cavité interne du récepteur. En effet, nos résultats suggèrent fortement que lorsque le R134A est muté sur le récepteur CXCR4, celui-ci est dans l'impossibilité d'atteindre une interaction complète avec la  $\beta$ -arrestine.

Le mécanisme d'ouverture de la poche interne du récepteur a été documenté dans le passé. En 2009, Tate et al. observent sur la rhodopsine l'interaction entre la sous-unité

G et le récepteur après un réarrangement des hélices transmembranaires libérant l'arginine 3.50. En 2014, Miao et al. observent sur le récepteur muscarinique M2 cette même ouverture libérant l'accès à l'arginine 3.50.

L'arginine 3.50 est un des résidus les plus hautement conservé au sein des GPCR. Un niveau de conservation élevé d'un acide aminé au sein d'un groupe de protéines, d'autant plus un récepteur, signifie souvent un rôle important au niveau d'une interaction ou conformationnel. Le cas de l'arginine 3.50 n'en fait pas exception.

En 2004, Montanelli et al. réalisent des mutants du récepteur de la FSH, un récepteur de classe A, et de la rhodopsine. La mutation d'acides aminés dans la région de l'arginine 3.50, résulte en une activité constitutive du récepteur. La mutation de résidus de la poche interne du récepteur par des résidus basiques tels que l'arginine ou la lysine causant une répulsion avec l'arginine 3.50, et donc libère sa chaîne latérale chargée pour l'interaction avec la protéine G, résultant en une activation constitutive.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, une mutation de l'arginine 134 peut entraîner une incapacité de la  $\beta$ -arrestine à interagir avec le récepteur à l'aide de son *finger loop*. En interprétant les résultats que nous observons dans le contexte des précédentes études sur l'arginine 134, il nous apparait probable que R134 soit directement responsable de l'interaction avec le *finger loop* de la  $\beta$ -arrestine, en accord avec notre seconde hypothèse sur l'interaction arrestine-R134A.

#### **5.4 Rôle de R3.50 dans d'autres GPCR de pertinence clinique**

Au niveau fonctionnel et clinique, le rôle de l'arginine R3.50 chez certains GPCR a déjà été documenté. Par exemple, des mutations de la rhodopsine ont été rapportées par Keen et al. comme une cause génétique des rétinites pigmentaires. Les rétinites pigmentaires interfèrent avec la sensibilité des bâtonnets : les récepteurs demeurent dans un état quiescent résultant en une perte de vision progressive. La rétinite pigmentaire est une maladie oculaire cliniquement et génétiquement hétérogène. Les mutations de l'arginine 135 (3.50) de la rhodopsine sont associées à une forme sévère de RP autosomique dominante.

Sur cette base, Chuang et al. observent des résultats similaires en 2004. En introduisant des mutations sur le résidu R135 (3.50) de la rhodopsine, ils observent une hyperphosphorylation et une internalisation constitutive dans des cellules HEK. Ces résultats sont compatibles avec un recrutement de la  $\beta$ -arrestine correspondant à un recrutement partiel. Ces observations sont semblables à nos résultats.

Similairement, Barak et al. rapportent que la mutation R137H du récepteur de la vasopressine ( $\beta_2V_2R$ ) cause une internalisation constitutive médiée par la  $\beta$ -arrestine ainsi qu'une phosphorylation du C-terminal. La mutation R137H a été associée au diabète insipide néphrogène familial. Encore une fois, la mutation de 3.50 entraîne une hyperphosphorylation du récepteur menant à un recrutement de la  $\beta$ -arrestine.

Ces maladies résultent d'une mutation de l'arginine 3.50 et provoquent des conséquences signalétiques similaires. Ces effets sur la signalisation correspondent aux observations réalisées sur le mutant 3.50 de CXCR4 notamment l'activation de ERK résultant d'un recrutement de la  $\beta$ -arrestine constitutif. En effet, la mutation du R3.50 abolit le recrutement dépendant de protéines G. Cette abolition du recrutement G-dépendant est tenu responsable du phénotype. Nous suggérons, selon notre cadre d'interprétation, que la rhodopsine mutée dispose une signalisation arrestine intacte, mais aberrante, correspondant à la modalité partielle.

## **5.5 Modalités d'interaction CXCR4-arrestine dans le syndrome WHIM**

Au niveau de la variabilité de l'extrémité C-terminale du récepteur, il existe une présentation clinique pertinente. En effet, le syndrome WHIM est spécifique à CXCR4. Le syndrome WHIM est une déficience immunitaire liée dans de nombreux cas à des mutations hétérozygotes provoquant une abrogation de l'extrémité C-terminale du récepteur de chimiokine CXCR4. Cette extrémité est responsable, par la phosphorylation de ses résidus, des modalités d'activation de la  $\beta$ -arrestine.

En 2008, Lagane et al. tentent de définir les spécificités fonctionnelles de CXCR4-WHIM. Leur attente est que l'abrogation de l'extrémité C-terminale devrait diminuer la liaison de la  $\beta$ -arrestine et donc l'internalisation et la désensibilisation, et donc prolonger l'activité du récepteur résultant en une réponse à CXCL12 augmentée. Ils observent que CXCR4-WHIM est incapable de désensibiliser et d'internaliser, mais **conserve son interaction fonctionnelle avec la  $\beta$ -arrestine constitutive** et sa signalisation CXCL12 dépendante, soit la migration. Ils déduisent que l'abrogation de l'extrémité C-terminale de CXCR4 augmente l'efficacité l'effet de CXCL12. Cette activité résultant de la mutation est donc décrite comme un gain de fonction. Chose intéressante, Lagane et al. suggèrent que la  $\beta$ -arrestine liée au C-terminal du récepteur interagit avec la protéine G afin d'activer des voies de signalisation distinctes liées au C-terminal. Cette conclusion concorde avec nos observations et conclusions. En effet, l'activité arrestine constitutive observée ne désensibilise pas le récepteur, de façon identique, le mutant R134A.

Les concepts observés par Lagane et al. sont en effet difficile à réconcilier avec l'ancien modèle d'interaction, selon lequel recrutement de la  $\beta$ -arrestine équivaut invariablement à la désensibilisation de la protéine G. À l'aide des concepts actuels, nous pouvons interpréter ces résultats en les intégrant au nouveau modèle.

## 6. CONCLUSION

Nous avons ici étudié les différentes formes de recrutement de la  $\beta$ -arrestine. Dans un premier temps, nous nous attendions à observer différentes modalités de recrutement de la  $\beta$ -arrestine. Nous avons en effet constaté la présence de ces différentes modalités de recrutement et d'activation. Certaines désensibilisant la réponse de la protéine G, tandis que d'autres non. Ces dernières forment possiblement un complexe coopératif entre la protéine G et la  $\beta$ -arrestine. Effectivement, suite aux récentes publications et concepts, nos données semblent bien s'accorder avec le nouveau cadre de référence. Nos données montrent que la protéine  $G\alpha$  et la  $\beta$ -arrestine sont engagées lors de l'interaction partielle, suggérant une action coopérative entre elles. La  $G\alpha$  jouerait donc un rôle structurel dans ce contexte, et donc fonctionnel (mais non-enzymatique) dans la formation d'un complexe récepteur-arrestine- $G\alpha$ . Nos données viennent donc compléter le nouveau modèle de recrutement et d'interaction de la  $\beta$ -arrestine.

## 7. PERSPECTIVES

Les résultats présentés démontrent différentes modalités de recrutement de la  $\beta$ -arrestine et que ces modalités mènent à des réponses signalétiques différentes. Le cadre d'interprétation actuel implique la formation d'un mégaplex. Nous avons observé les effets au niveau signalétique de la formation du mégaplex. Cependant, nous n'avons pas observé cette interaction au niveau structurel. Il serait pertinent de confirmer directement l'interaction entre la  $G\alpha$  et la  $\beta$ -arrestine. Cette interaction pourrait être confirmée par BRET.

Nous avons observé les effets du recrutement complet et partiel de la  $\beta$ -arrestine sur l'activation de ERK. Cependant, la  $\beta$ -arrestine permet l'activation de nombreuses autres protéines. Une de ces protéines est Mdm2, un régulateur de l'ubiquitination de la  $\beta$ -arrestine, lié à l'internalisation des récepteurs (43). Évaluer l'activation de ces différents effecteurs de la  $\beta$ -arrestine, tel que Mdm2 ou GSK3, nous permettrait d'obtenir un portrait plus complet des différences fonctionnelles des différentes modalités d'interaction (58, 59).

Au niveau structurel, les mutations du récepteur tel que R134A ou N119S nous ont permis de mieux définir les modalités d'interaction entre la  $\beta$ -arrestine et le récepteur, notamment au niveau de l'interaction entre le *finger loop* et le cœur du récepteur. Cette interaction pourrait être davantage caractérisée en utilisant des arrestines mutées dans la région du *finger loop*.

Finalement, les différences fonctionnelles des modalités présentées ici n'ont été étudié que sur un seul récepteur, CXCR4. L'utilisation de différents récepteurs modèles permettrait d'établir un portrait plus complet de ces interactions.

## 8. RÉFÉRENCES

1. Luttrell LM. Reviews in molecular biology and biotechnology: transmembrane signaling by G protein-coupled receptors. *Mol Biotechnol.* 2008;39(3):239-64.
2. de Mendoza A, Sebe-Pedros A, Ruiz-Trillo I. The evolution of the GPCR signaling system in eukaryotes: modularity, conservation, and the transition to metazoan multicellularity. *Genome Biol Evol.* 2014;6(3):606-19.
3. Tautermann CS. GPCR structures in drug design, emerging opportunities with new structures. *Bioorg Med Chem Lett.* 2014;24(17):4073-9.
4. Muller G. Towards 3D structures of G protein-coupled receptors: a multidisciplinary approach. *Current medicinal chemistry.* 2000;7(9):861-88.
5. Schioth HB, Fredriksson R. The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. *Gen Comp Endocrinol.* 2005;142(1-2):94-101.
6. Rovati GE, Capra V, Neubig RR. The highly conserved DRY motif of class A G protein-coupled receptors: beyond the ground state. *Mol Pharmacol.* 2007;71(4):959-64.
7. Neer EJ. Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell.* 1995;80(2):249-57.
8. Arshavsky VY, Lamb TD, Pugh EN, Jr. G proteins and phototransduction. *Annu Rev Physiol.* 2002;64:153-87.
9. Perry SJ, Baillie GS, Kohout TA, McPhee I, Magiera MM, Ang KL, et al. Targeting of cyclic AMP degradation to beta 2-adrenergic receptors by beta-arrestins. *Science.* 2002;298(5594):834-6.
10. Rasmussen SG, DeVree BT, Zou Y, Kruse AC, Chung KY, Kobilka TS, et al. Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature.* 2011;477(7366):549-55.
11. Ribeiro-Neto FA, Rodbell M. Pertussis toxin induces structural changes in G alpha proteins independently of ADP-ribosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1989;86(8):2577-81.
12. Gurevich VV, Gurevich EV. Structural determinants of arrestin functions. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2013;118:57-92.
13. Lefkowitz RJ, Rajagopal K, Whalen EJ. New roles for beta-arrestins in cell signaling: not just for seven-transmembrane receptors. *Molecular cell.* 2006;24(5):643-52.

14. Kang Y, Zhou XE, Gao X, He Y, Liu W, Ishchenko A, et al. Crystal structure of rhodopsin bound to arrestin by femtosecond X-ray laser. *Nature*. 2015;523(7562):561-7.
15. Noguez L, Salcedo A, Mayor F, Jr., Penela P. Multiple scaffolding functions of  $\beta$ -arrestins in the degradation of G protein-coupled receptor kinase 2. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(2):1165-73.
16. Gurevich VV, Gurevich EV. The structural basis of arrestin-mediated regulation of G-protein-coupled receptors. *Pharmacology & therapeutics*. 2006;110(3):465-502.
17. Gurevich VV, Gurevich EV. The molecular acrobatics of arrestin activation. *Trends in pharmacological sciences*. 2004;25(2):105-11.
18. Shukla AK, Westfield GH, Xiao K, Reis RI, Huang LY, Tripathi-Shukla P, et al. Visualization of arrestin recruitment by a G-protein-coupled receptor. *Nature*. 2014;512(7513):218-22.
19. Kumari P, Srivastava A, Banerjee R, Ghosh E, Gupta P, Ranjan R, et al. Functional competence of a partially engaged GPCR-beta-arrestin complex. *Nature communications*. 2016;7:13416.
20. Lally CC, Bauer B, Selent J, Sommer ME. C-edge loops of arrestin function as a membrane anchor. *Nat Commun*. 2017;8:14258.
21. Goodman OB, Jr., Krupnick JG, Santini F, Gurevich VV, Penn RB, Gagnon AW, et al. Role of arrestins in G-protein-coupled receptor endocytosis. *Adv Pharmacol*. 1998;42:429-33.
22. Gurevich VV, Gurevich EV, Cleghorn WM. Arrestins as multi-functional signaling adaptors. *Handb Exp Pharmacol*. 2008(186):15-37.
23. Gurevich VV, Gurevich EV. Analyzing the roles of multi-functional proteins in cells: The case of arrestins and GRK. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*. 2015;50(5):440-52.
24. Wilden U, Hall SW, Kuhn H. Phosphodiesterase activation by photoexcited rhodopsin is quenched when rhodopsin is phosphorylated and binds the intrinsic 48-kDa protein of rod outer segments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1986;83(5):1174-8.
25. Sommer ME, Hofmann KP, Heck M. Distinct loops in arrestin differentially regulate ligand binding within the GPCR opsin. *Nat Commun*. 2012;3:995.
26. Gurevich EV, Gurevich VV. Arrestins: ubiquitous regulators of cellular signaling

pathways. *Genome biology*. 2006;7(9):236.

27. Tuteja N. Signaling through G protein coupled receptors. *Plant Signal Behav*. 2009;4(10):942-7.

28. Luttrell LM, Gesty-Palmer D. Beyond desensitization: physiological relevance of arrestin- dependent signaling. *Pharmacol Rev*. 2010;62(2):305-30.

29. Smith NJ, Luttrell LM. Signal switching, crosstalk, and arrestin scaffolds: novel G protein- coupled receptor signaling in cardiovascular disease. *Hypertension*. 2006;48(2):173-9.

30. Strungs EG, Luttrell LM. Arrestin-dependent activation of ERK and Src family kinases. *Handb Exp Pharmacol*. 2014;219:225-57.

31. Kumari P, Srivastava A, Ghosh E, Ranjan R, Dogra S, Yadav PN, et al. Core engagement with beta-arrestin is dispensable for agonist induced vasopressin receptor endocytosis and ERK activation. *Molecular biology of the cell*. 2017.

32. Busillo JM, Armando S, Sengupta R, Meucci O, Bouvier M, Benovic JL. Site-specific phosphorylation of CXCR4 is dynamically regulated by multiple kinases and results in differential modulation of CXCR4 signaling. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(10):7805-17.

33. Cheng ZJ, Zhao J, Sun Y, Hu W, Wu YL, Cen B, et al. beta-arrestin differentially regulates the chemokine receptor CXCR4-mediated signaling and receptor internalization, and this implicates multiple interaction sites between beta-arrestin and CXCR4. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(4):2479-85.

34. Busillo JM, Benovic JL. Regulation of CXCR4 signaling. *Biochimica et biophysica acta*. 2007;1768(4):952-63.

35. Gurevich EV, Gainetdinov RR, Gurevich VV. G protein-coupled receptor kinases as regulators of dopamine receptor functions. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*. 2016;111:1-16.

36. Ghosh E, Kumari P, Jaiman D, Shukla AK. Methodological advances: the unsung heroes of the GPCR structural revolution. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2015;16(2):69-81.

37. Cahill TJ, 3rd, Thomsen AR, Tarrasch JT, Plouffe B, Nguyen AH, Yang F, et al. Distinct conformations of GPCR-beta-arrestin complexes mediate desensitization, signaling, and endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*

States of America. 2017;114(10):2562-7.

38. Visiers I, Ballesteros JA, Weinstein H. Three-dimensional representations of G protein-coupled receptor structures and mechanisms. *Methods in enzymology*. 2002;343:329-71.

39. Wilbanks AM, Laporte SA, Bohn LM, Barak LS, Caron MG. Apparent loss-of-function mutant GPCRs revealed as constitutively desensitized receptors. *Biochemistry*. 2002;41(40):11981-9.

40. Berchiche YA, Chow KY, Lagane B, Leduc M, Percherancier Y, Fujii N, et al. Direct assessment of CXCR4 mutant conformations reveals complex link between receptor structure and G(alpha)(i) activation. *J Biol Chem*. 2007;282(8):5111-5.

41. Zhang WB, Navenot JM, Haribabu B, Tamamura H, Hiramatsu K, Omagari A, et al. A point mutation that confers constitutive activity to CXCR4 reveals that T140 is an inverse agonist and that AMD3100 and ALX40-4C are weak partial agonists. *J Biol Chem*. 2002;277(27):24515-21.

42. Moriuchi M, Moriuchi H, Turner W, Fauci AS. Cloning and analysis of the promoter region of CXCR4, a coreceptor for HIV-1 entry. *Journal of immunology*. 1997;159(9):4322-9.

43. Marchese A, Raiborg C, Santini F, Keen JH, Stenmark H, Benovic JL. The E3 ubiquitin ligase AIP4 mediates ubiquitination and sorting of the G protein-coupled receptor CXCR4. *Developmental cell*. 2003;5(5):709-22.

44. McCormick PJ, Segarra M, Gasperini P, Gulino AV, Tosato G. Impaired recruitment of Grk6 and beta-Arrestin 2 causes delayed internalization and desensitization of a WHIM syndrome-associated CXCR4 mutant receptor. *PloS one*. 2009;4(12):e8102.

45. Balabanian K, Lagane B, Pablos JL, Laurent L, Planchenault T, Verola O, et al. WHIM syndromes with different genetic anomalies are accounted for by impaired CXCR4 desensitization to CXCL12. *Blood*. 2005;105(6):2449-57.

46. Donzella GA, Schols D, Lin SW, Este JA, Nagashima KA, Maddon PJ, et al. AMD3100, a small molecule inhibitor of HIV-1 entry via the CXCR4 co-receptor. *Nat Med*. 1998;4(1):72-7.

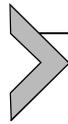
47. Tamamura H, Hori A, Kanzaki N, Hiramatsu K, Mizumoto M, Nakashima H, et al. T140 analogs as CXCR4 antagonists identified as anti-metastatic agents in the treatment of breast cancer. *FEBS letters*. 2003;550(1-3):79-83.

48. Bonnetterre J, Montpas N, Boularan C, Gales C, Heveker N. Analysis of Arrestin Recruitment to Chemokine Receptors by Bioluminescence Resonance Energy Transfer. *Methods in enzymology*. 2016;570:131-53.
49. Xu Y, Piston DW, Johnson CH. A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: application to interacting circadian clock proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(1):151-6.
50. Hamdan FF, Percherancier Y, Breton B, Bouvier M. Monitoring protein-protein interactions in living cells by bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Curr Protoc Neurosci*. 2006;Chapter 5:Unit 5 23.
51. Hamdan FF, Audet M, Garneau P, Pelletier J, Bouvier M. High-throughput screening of G protein-coupled receptor antagonists using a bioluminescence resonance energy transfer 1-based beta-arrestin2 recruitment assay. *Journal of biomolecular screening*. 2005;10(5):463-75.
52. Berchiche YA, Gravel S, Pelletier ME, St-Onge G, Heveker N. Different effects of the different natural CC chemokine receptor 2b ligands on beta-arrestin recruitment, Galphai signaling, and receptor internalization. *Molecular pharmacology*. 2011;79(3):488-98.
53. Thomsen AR, Plouffe B, Cahill TJ, 3rd, Shukla AK, Tarrasch JT, Dosey AM, et al. GPCR- G Protein-beta-Arrestin Super-Complex Mediates Sustained G Protein Signaling. *Cell*. 2016;166(4):907-19.
54. Audet N, Charfi I, Mnie-Filali O, Amraei M, Chabot-Dore AJ, Millecamps M, et al. Differential association of receptor-Gbetagamma complexes with beta-arrestin2 determines recycling bias and potential for tolerance of delta opioid receptor agonists. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2012;32(14):4827-40.
55. Mangmool S, Kurose H. G(i/o) protein-dependent and -independent actions of Pertussis Toxin (PTX). *Toxins (Basel)*. 2011;3(7):884-99.
56. Oldham WM, Hamm HE. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2008;9(1):60-71.
57. Lambright DG, Noel JP, Hamm HE, Sigler PB. Structural determinants for activation of the alpha-subunit of a heterotrimeric G protein. *Nature*. 1994;369(6482):621-8.

58. Del'guidice T, Lemasson M, Beaulieu JM. Role of Beta-arrestin 2 downstream of dopamine receptors in the Basal Ganglia. *Front Neuroanat.* 2011;5:58.
59. Jean-Charles PY, Freedman NJ, Shenoy SK. Chapter Nine - Cellular Roles of Beta-Arrestins as Substrates and Adaptors of Ubiquitination and Deubiquitination. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2016;141:339-69.

## **9. Annexe**

**Analysis of arrestin recruitment to chemokines receptors by Bioluminescence Resonance Energy Transfer.** Methods of Enzymology, Chemokines. Elsevier, 2015. J. Bonneterre, N. Montpas, C. Boularan, C. Gales and N. Heveker. Ouvrage de référence méthodologique sur l'analyse du recrutement des arrestines aux récepteurs de chimiokine par BRET. Participation à la rédaction et réalisation des figures de BRET contenant des données expérimentales originales.



# Analysis of Arrestin Recruitment to Chemokine Receptors by Bioluminescence Resonance Energy Transfer

J. Bonneterre\*, N. Montpas\*, C. Boularan<sup>†</sup>, C. Galés<sup>†</sup>, N. Heveker<sup>\*,†,1</sup>

\*Department of Biochemistry and Research Centre, Sainte-Justine Hospital, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

<sup>†</sup>Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1048, Université Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, France

<sup>1</sup>Corresponding author: e-mail address: nikolaus.heveker@recherche-ste-justine.qc.ca

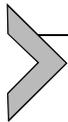
## Contents

1. Introduction	132
2. Methods	133
2.1 Materials Required	133
2.2 General Protocol	134
2.3 Optimizing the Experimental System	136
2.4 Use of Optimized Systems	140
2.5 Troubleshooting	142
3. Interpretation and Limitations of BRET Data	145
3.1 Interpreting BRET <sub>max</sub>	146
3.2 Interpreting BRET <sub>50</sub>	146
3.3 Comparing Arrestin Recruitment to Different Chemokine Receptors	147
3.4 Comparing Arrestin Recruitment by Different Ligands to the Same Chemokine Receptor	147
3.5 Comparing Receptor Mutants	149
4. Perspectives	149
Acknowledgments	150
References	150

## Abstract

Chemokine receptors recruit the multifunctional scaffolding protein beta arrestin in response to binding of their chemokine ligands. Given that arrestin recruitment represents a signaling axis that is in part independent from G-protein signaling, it has become a hallmark of G protein-coupled receptor functional selectivity. Therefore, quantification of arrestin recruitment has become a requirement for the delineation of chemokine and drug candidate activity along different signaling axes. Bioluminescence resonance

energy transfer (BRET) techniques provide methodology for such quantification that can reveal differences between nonredundant chemokines binding the same receptor, and that can be upscaled for high-throughput testing. We here provide protocols for the careful setup of BRET-based arrestin recruitment assays, and examples for the application of such systems in dose-response or time-course experiments. Suggestions are given for troubleshooting, optimizing test systems, and the interpretation of results obtained with BRET-based assays, which indeed yield an intricate blend of quantitative and qualitative information.



## 1. INTRODUCTION

The multifunctional adaptor protein beta arrestin is recruited from the cytosol to chemokine receptors, and many other seven-transmembrane domain receptors (7TMRs), following ligand binding. Initially found to be involved in the desensitization of G protein-mediated signaling (hence its name) and in receptor internalization, it then emerged that arrestin can also associate with a large number of downstream signaling proteins, and trigger a plethora of arrestin-dependent signaling pathways (Shukla, Xiao, & Lefkowitz, 2011). Arrestin-mediated signaling itself can be both G protein-dependent and -independent. In consequence, G protein-independent arrestin signaling often serves as a paradigm for the concept of functional selectivity. Functional selectivity, or “biased agonism,” denominates a concept that gained wide acceptance during the last decade and that describes how agonists of the same receptor may trigger different independent sets of signaling cascades (Urban et al., 2007). It was found that synthetic receptor agonists may be “biased,” and selectively activate one or another pathway. This selectivity may be gradual, yielding relative preferences in potency and efficacy of the responses (Galandrin & Bouvier, 2006; Galandrin, Oligny-Longpre, & Bouvier, 2007). It now emerges that functional selectivity may be much more intricate than simply opposing divergent G protein-dependent and -independent responses, but may take place between different G protein-dependent responses (Sauliere et al., 2012) as well as between different arrestin-dependent responses entailed by different arrestin recruitment modalities (Audet et al., 2012; Shukla et al., 2008; Zimmerman et al., 2012; see also below).

Chemokines and their receptors, with their widespread receptor and ligand promiscuity, were critical models to establish that functional selectivity indeed applies to endogenous receptors and ligands, and not only to synthetic drugs (Berchiche, Gravel, Pelletier, St-Onge, & Heveker, 2011;

Colvin, Campanella, Manice, & Luster, 2006; Colvin, Campanella, Sun, & Luster, 2004; Corbisier, Gales, Huszagh, Parmentier, & Springael, 2015; Kohout et al., 2004; Rajagopal et al., 2013). This also definitively dismissed the vision of different chemokine ligands to the same receptor as being “redundant.” All chemokine receptors, including the so-called atypical chemokine receptors (with the possible exception of ACKR1/DARC; Chakera, Seeber, John, Eidne, & Greaves, 2008), recruit arrestin. The intriguing case of CXCR7/ACKR3, which generally responds to chemokine stimulation with arrestin recruitment but not G protein-dependent responses (Kalatskaya et al., 2009), has been called a “biased receptor” (Rajagopal et al., 2010) (but see also Odemis et al., 2012).

Historically, arrestin recruitment was first observed by visualizing arrestin relocalization from the cytosol to the plasma membrane using fluorescence-based imaging (Barak, Ferguson, Zhang, & Caron, 1997; Ferguson & Caron, 2004). The advent of bioluminescence resonance energy transfer (BRET) techniques provided a sensitive and quantitative method to measure arrestin recruitment to receptors (Angers et al., 2000). The use of such relatively simple quantitative methodology is also amenable to high-throughput screening and thus facilitates testing of drug candidates on the arrestin pathway (Hamdan, Audet, Garneau, Pelletier, & Bouvier, 2005).

In this chapter, we describe protocols to set up BRET-based arrestin recruitment test systems. We provide suggestions for troubleshooting and identify experimental parameters that can be varied. We also discuss potential pitfalls and, importantly, some limitations of BRET as a quantitatively comparative method. Indeed, BRET is now widely used as a proximity-based assay to detect arrestin recruitment, but it is often overlooked that, besides proximity, the relative orientations of the probes crucially determines BRET efficiency. This somewhat complicates the accurate interpretation of BRET data, but careful setup and combination of different BRET systems hold promise for the study of yet underexplored questions in chemokine receptor signaling.



---

## 2. METHODS

### 2.1 Materials Required

Expression vectors coding for the receptor fused to either the energy donor (luciferase) or acceptor (fluorescent protein), and arrestin fusions to the complementary BRET partner, need to be constructed. Routinely, we give preference to fusing the C-terminal part of the receptor to the energy

acceptor, and arrestin (at the N- or C-terminus) to the donor, as the donor expression is kept lower than acceptor expression in BRET experiments. We showed that, when the RLuc-arrestin/receptor-YFP configuration is used, the total RLuc-arrestin levels required for BRET are clearly below endogenous arrestin levels in HEK293 cells (Leduc et al., 2009). This eliminates reservations that the detected receptor:arrestin interactions may depend on abnormally high arrestin levels generated by overexpression of the arrestin fusion construct. Along these lines, receptor levels required for BRET experiments can also be quantified by flow cytometry or cell ELISA, using specific antibodies. Comparison of the obtained values with levels of endogenous receptor in relevant cell types ensures that receptor expression remains in a physiologically relevant range (Percherancier et al., 2005). The energy donor (or acceptor) can be fused to either the C-terminal or N-terminal of arrestin, which may yield different results (Bellot et al., 2015). Depending on the tested receptor and chemokine, either the N-terminal or the C-terminal position of luciferase fused to arrestin may yield optimal results (see also Section 2.5).

## 2.2 General Protocol

The standard arrestin recruitment BRET<sup>1</sup> protocol is similar for all assay configurations, variations, and setup experiments. We thus give the standard protocol in this section and indicate the parameters that can or must be varied during setup or for specific questions. The standard protocol is also similar between BRET<sup>1</sup> and BRET<sup>2</sup>, which use different energy donor and acceptor variants—minor variations between BRET<sup>1</sup> and BRET<sup>2</sup> protocols are directly indicated in the protocol below, while specifics of BRET<sup>2</sup> are dealt with in a separate paragraph below (Section 2.5.2).

In general, BRET arrestin recruitment assays can be performed both on attached cells as well as cells in suspension (Hamdan et al., 2005). We routinely perform and thus describe here the assays on attached cells. Using attached cells facilitates assays in a HTS setting, and cell attachment is required for specific questions such as the determination of the receptor:arrestin dissociation rate, as it most likely better preserves the cellular cytoskeleton organization.

The general protocol for receptor/arrestin BRET experiments is as follows:

*Day 1:* Plate HEK293 cells in complete DMEM in 6-well plates at a density to reach optimal density for transfection (60–75% confluence) on the next day; let adhere overnight.

*Day 2:* Transfect the cells. Using the polyethylenimine method, we use a total of 2  $\mu\text{g}$  of DNA per well. Optimal donor and acceptor plasmids quantities should be determined independently (Sections 2.3.1 and 2.3.2). They must always be complemented with empty vector as a DNA carrier to reach 2  $\mu\text{g}$ /well, to equalize transfection efficiency. Always run also a donor-only control transfection, where the energy donor construct is transfected alone, to measure spectral spillover of the donor emission into the acceptor emission channel. Incubate overnight.

*Day 3:* Trypsin and resuspend the transfected cells in fresh complete medium and seed them into 96-flat-clear-bottom white microplates. Cell adherence to the plate can be increased with precoating with 0.1% poly-D-lysine. Optimal results are achieved with plates with individual clear bottoms surrounded by opaque matrix to increase well-to-well resolution and limit photon spillover, although this is not mandatory. Make sure cells are not clumping, and that equal amounts per well are seeded. Let adhere overnight. Cells should be near confluent, but not overconfluent, the next day.

*Day 4:*

- (i) Change medium to 30  $\mu\text{l}$ /well of BRET buffer (PBS, 0.1% BSA, 0.5 mM  $\text{MgCl}_2$ ); note that the phenol red in the media interferes with BRET readings. Alternatively, DMEM without phenol red, containing 0.1% BSA but no serum, may be used. With chemokine ligands, we avoid serum in the BRET buffer and prefer the use of bovine serum albumin. Read total fluorescence of all wells using direct acceptor stimulation with a laser and the appropriate filter. This permits to control for the quality of the transfection and the homogenous cell distribution per well, and is required to calculate the [acceptor]/[donor] ratio needed for BRET titration experiments described in Section 2.3.2.
- (ii) Then cover the clear microplate bottom with a white sticker. Add 10  $\mu\text{l}$  of chemokine or vehicle to stimulate arrestin recruitment; replace the plate in the incubator for 5 min (or keep in the heated chamber of the plate reader, if available). Different concentrations of chemokines (e.g., in dose-response experiments) are best prepared in a separate 96-well plate and then transferred to the BRET plate with a multichannel pipette. We avoid using injectors for chemokine addition due to the relatively large void volume. After 5 min, add 10  $\mu\text{l}$  of coelenterazine H (5  $\mu\text{M}$  final concentration) for BRET<sup>1</sup>. Preincubate in the incubator for 10 min. Substrate

preincubation allows the luciferase reaction to equilibrate and avoids readings during the initial unstable flash phase of photon emission. For BRET<sup>2</sup>, coelenterazine 400 A (DeepBlue C) is used as a substrate—note that no substrate preincubation is required for BRET<sup>2</sup>, and should actually be avoided, which somewhat alters the protocol for real-time kinetics readings. The optimal time of addition of the chemokine agonist may vary and can be determined in time-course experiments (the standard protocol given here uses 15 min, a time point where arrestin recruitment—if it occurs—will be clearly visible). For time-course experiments, the chemokine should be added only after the substrate preincubation, followed by immediate plate reading.

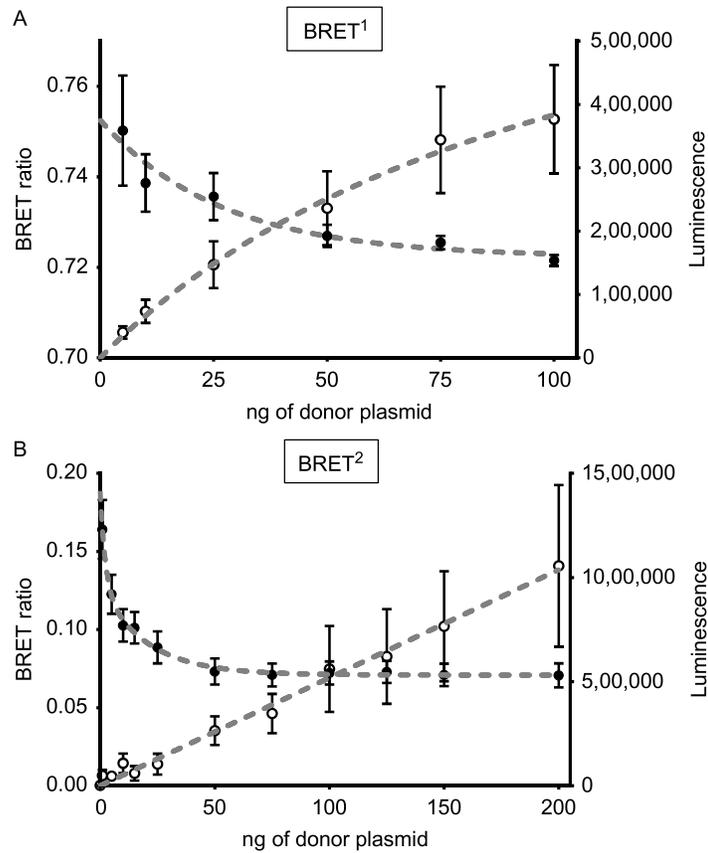
- (iii) Proceed to BRET readings in the appropriate wavelength channels (in the 460–500 nm (RLuc) and 510–550 nm (YFP) windows for BRET<sup>1</sup>). We use filters at  $485 \pm 14$  nm (RLuc) and  $530 \pm 10$  nm (eYFP) for BRET<sup>1</sup>. For BRET<sup>2</sup>, different filter sets are used (see below). Note that—for BRET<sup>1</sup>—the use of different filters and bandpasses affects the amplitude of the spillover of the RLuc signal into the YFP emission channel and thus the background signal. The BRET signal (correctly: “BRET ratio”) is the ratio of the photon emission in the acceptor channel to the emission in the donor channel. This is converted to BRET<sub>net</sub> by subtracting the background BRET ratio measured in the absence of cotransfected energy acceptor (energy donor alone). Background BRET derives from detection of photons from the luciferase signal by the acceptor channel and should be a stable, instrument-dependent constant. This constant is also identified during determination of the required donor quantity (Section 2.3.1 and Fig. 1); nevertheless, background (donor-only) controls should also be run as controls within every experiment. BRET<sub>net</sub> is calculated using the formula:

$$\text{BRET}_{\text{net}} = \left( \frac{\text{acceptor}}{\text{donor}} \right)_{\text{sample wells}} - \left( \frac{\text{acceptor}}{\text{donor}} \right)_{\text{“RLuc only” wells}}$$

## 2.3 Optimizing the Experimental System

### 2.3.1 Determination of the Optimal Quantity of BRET Donor

The optimal quantity of BRET donor-encoding vector is determined by transfecting increasing amounts of the energy donor plasmid alone. We



**Figure 1** Determination of optimal luciferase quantity and background BRET. Luciferase titrations are plotted as a function of the amount of transfected energy donor DNA, in the absence of energy acceptor (fluorescent protein). The resulting BRET ratio (black circles) is plotted on the left Y axis, and the luminescence counts (white circles) are plotted on the right Y axis. The detected BRET ratio decreases to reach a background value that is stable over increasing luminescence, and that must be deduced from experimental BRET ratios to obtain BRET<sub>net</sub>. This instrument-dependent stable background BRET is due to bleeding of the donor emission into the acceptor emission channel (note the scale difference between the BRET<sup>1</sup> and BRET<sup>2</sup> systems). The higher BRET ratios at too low luminescence counts are due to noise detection in the acceptor emission channel.

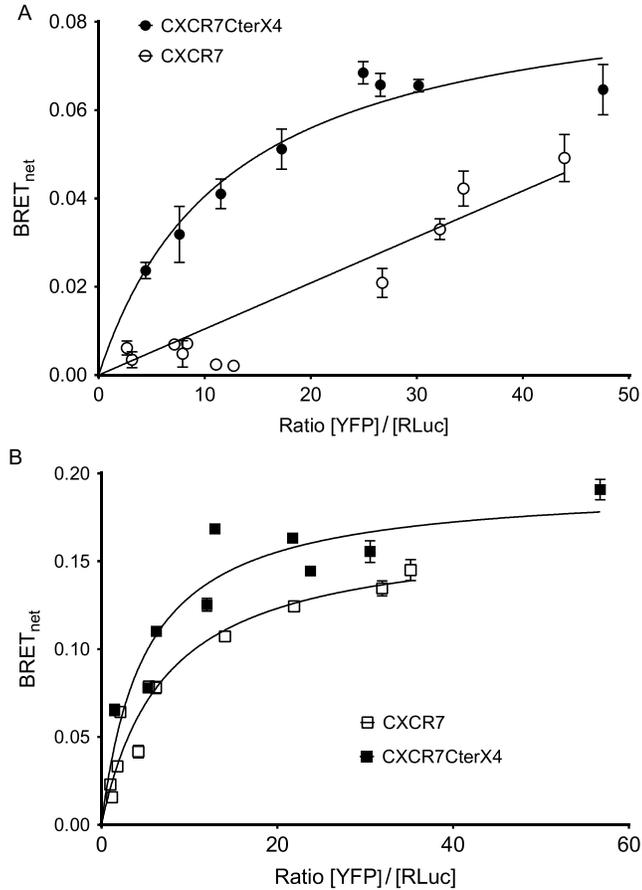
typically use 5–200 ng of energy donor plasmid. Read luciferase and BRET values (Fig. 1). The optimal amount of luciferase plasmid is the one that yields constant background BRET, but that is small enough to permit BRET saturation upon donor:acceptor cotransfection (next section). In our hands, this quantity is typically around 50 ng/well, but this depends

on transfection efficiency. Note that upon donor:acceptor cotransfection, the luciferase expression levels tend to further decrease (up to 50%) due to expression competition between cotransfected expression vectors. It is thus better not to choose the smallest luciferase quantity that generates stable background values if transfected alone. Comparison of the luminescence values in BRET experiments with the donor-only curve will establish if luciferase levels upon donor:acceptor cotransfection remain indeed in the valid range.

### **2.3.2 BRET Saturation (Also Called BRET Titration Experiments)**

BRET saturation experiments determine—among others—the optimal energy acceptor plasmid quantity for specific experiments, which are then executed at a single [acceptor]/[donor] ratio (such as dose-response curves, time-course experiments; see below). BRET donor plasmid is cotransfected at the fixed, optimal concentration with varying amounts of acceptor-encoding vector. Use a wide range of acceptor plasmid concentrations, for example, from 50 to 1900 ng/well. Perform BRET readings, in the absence and presence of saturating agonist concentrations. Plot the calculated  $BRET_{net}$  to the measured [acceptor]/[donor] ratios. Note that [acceptor]/[donor] ratios are not represented as respective plasmid concentrations, but derive from actually measured luminescence and fluorescence readings. They are thus strictly instrument-dependent arbitrary units (we also observed slight reproducible differences between identical instrument types from the same manufacturer—these derive from interinstrument variations of the photomultiplier unit). They can thus not be compared between different instruments, or laboratories.

Upon fitting of the results, if the receptor does not constitutively interact with arrestin,  $BRET_{net}$  should take the form of a slightly increasing straight line (typically at rather low  $BRET_{net}$  values) (Fig. 2A). This so-called bystander BRET derives from donor:acceptor random collisions, and not from specific interactions. Note that even bystander BRET can saturate at high [acceptor]/[donor] ratios—therefore, judgement rather than simply curve fitting alone should be used for interpretation. Ligand-induced arrestin recruitment should yield  $BRET_{net}$  values in a nonambiguous hyperbolic function, and most often considerably increased  $BRET_{net}$  values compared to bystander BRET (Fig. 2B). Maximal BRET ( $BRET_{max}$ ), and [acceptor]/[donor] ratios that yield half-maximal BRET ( $BRET_{50}$ ) are important comparative values that can be determined by curve fitting.



**Figure 2** Detection of spontaneous arrestin recruitment by BRET titration experiments. (A) CXCR7-YFP (white circles) and the chimeric receptor CXCR7CterX4-YFP (black circles) were cotransfected at increasing amounts with fixed amounts of beta arrestin 2-RLuc, and BRET<sub>net</sub> determined *in the absence of agonist*. While CXCR7:arrestin yields a straight line, CXCR7CterX4 yields a clear hyperbola. (B) In presence of agonist, both receptors recruit arrestin and yield hyperbolae, with increased BRET<sub>net</sub>. Modified from data originally published as supplementary data in Gravel *et al.* (2010), © the American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

BRET saturation curves permit to identify the optimal acceptor concentration: the acceptor concentration that—in combination with the optimal donor concentration—yields near saturation of BRET<sub>net</sub> (BRET<sub>max</sub>). This acceptor concentration results in optimal sensitivity and interexperiment reproducibility, and is thus to be chosen for experiments that are performed

at a single [acceptor]/[donor] ratio. Too low [acceptor]/[donor] ratios yield suboptimal BRET and consequently less sensitivity as well as high interexperiment variation. Too high [acceptor]/[donor] ratios in turn will result in higher bystander BRET and thus will reduce signal-to-noise ratios.

## 2.4 Use of Optimized Systems

### 2.4.1 Constitutive Arrestin Recruitment

For the detection of constitutive arrestin recruitment to chemokine receptors, BRET saturation experiments are recommended. In general, arrestin recruitment to chemokine receptors is expected to be ligand dependent, and thus, no specific BRET is anticipated in the absence of chemokine. However, as a special case, some receptors may constitutively associate with arrestin in preassembled complexes. Constitutive recruitment has been reported for the atypical chemokine receptor ACKR2/D6 (McCulloch et al., 2008; Weber et al., 2004). We have shown constitutive arrestin recruitment by a chimeric receptor consisting in CXCR7/ACKR3 with its C-terminal swapped for that of CXCR4 (Gravel et al., 2010; Fig. 2). However, no such constitutive interaction was detected with the reciprocal chimera, or with wild-type CXCR7/ACK3, which both nevertheless recruit arrestin in response to the chemokine CXCL12.

### 2.4.2 Dose-Response Experiments

The differential activation of signaling pathways along the G protein- or arrestin-dependent signaling axes by different ligands is a hallmark of functional selectivity. Chemokine receptor:arrestin BRET, at the determined optimal donor and acceptor plasmid concentrations, permits the determination of the respective  $EC_{50}$ s and maximal BRET responses to different chemokines in dose-response experiments. Relative ligand rank orders of potency can be established that can then be compared to potency rank orders in different readouts such as G-protein activation, informing about potential signaling bias of the respective chemokines. This type of analyses has been reported with a series of chemokine receptors and their multiple chemokine ligands (for example in Berchiche et al., 2011; Corbisier et al., 2015).

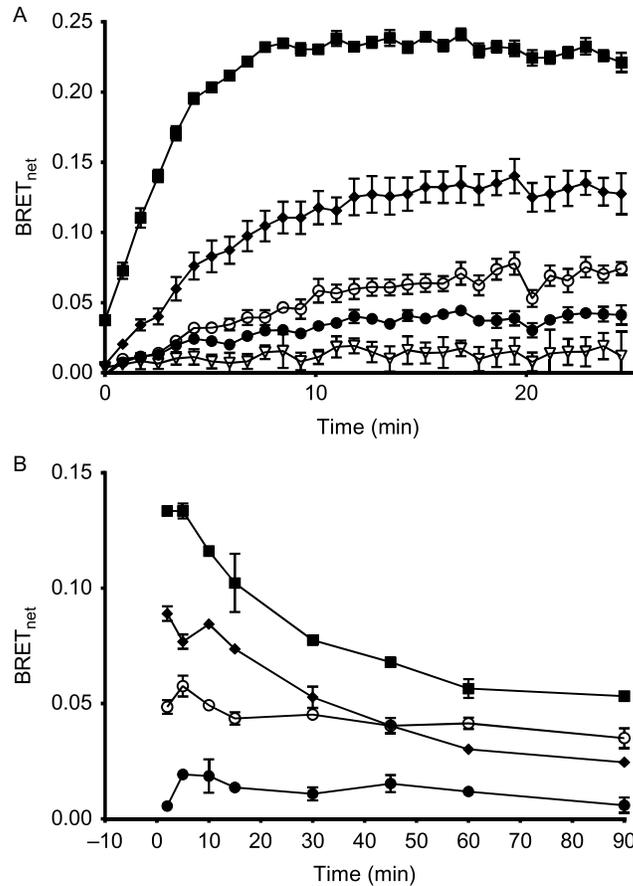
Another parameter that may differ significantly between different chemokine ligands at saturating chemokine concentrations is the efficacy of the BRET response,  $BRET_{max}$ , which is also determined by BRET saturation experiments at saturating ligand concentration. The interpretation of different BRET efficiencies will be dealt with below in detail, but it must be mentioned here that this parameter does describe the efficacy of the

BRET response, but—somewhat counter-intuitively—not necessarily the efficacy of arrestin recruitment.

### **2.4.3 Time-Course Experiments**

The dynamics of the receptor:arrestin association and dissociation can be measured by BRET. While the functional correlates of arrestin recruitment dynamics (such as potential shortening of the duration of G-protein signaling) will require further study, the longevity of the receptor:arrestin complex has been implicated in intracellular receptor trafficking and arrestin-dependent downstream signaling (Oakley, Laporte, Holt, Caron, & Barak, 2000; Zimmerman et al., 2012). Initially, the observation of differences in the stability of arrestin-receptor complexes has led to the postulation of “type A” and “type B” receptors, where “type A” receptors engage in stable association with arrestin, and “type B” receptors only transiently recruit the protein (Oakley et al., 2000). However, it turned out that these properties are ligand dependent, rather than receptor dependent (Shukla et al., 2008; Zimmerman et al., 2012). For example, significant differences in CCR2:arrestin dissociation were identified after challenge with the CCR2 ligands CCL2, CCL7, CCL8, and CCL13 (Berchiche et al., 2011; Fig. 3). The dissociation kinetics of receptor:arrestin complexes potentially represents another layer of functional selectivity, and differences in kinetics suggest different modalities of arrestin engagement by the same receptor bound to different ligands.

For arrestin association kinetics, the chemokine ligand is added to the cells after the preincubation with the luciferase substrate, followed immediately by sequential BRET<sup>1</sup> readings. For BRET<sup>2</sup>, substrate addition must be matched with each reading, which is best achieved using an automated injector. Therefore, in BRET<sup>2</sup>, kinetics readings require the use of multiple wells, each representing one single time point. As arrestin association can be very rapid ( $t_{1/2}$  of few seconds), it can be useful to decelerate the kinetics in order to increase the resolution, by shifting the cells from 37 °C to room temperature. The determination of the receptor:arrestin dissociation kinetics, however, is temperature dependent and requires the cells to be incubated at 37 °C. This can be achieved either by using a heated chamber during the readings or, perhaps more conveniently, by adding the ligand at different time points to cells continuously kept at 37 °C and then recording BRET simultaneously. Moreover, arrestin dissociation kinetics require intact organization of the cytoskeleton and should thus be performed using cells attached to the plate, and not in suspension.



**Figure 3** Time-course of arrestin recruitment and dissociation. (A) Association kinetics of arrestin-RLuc to CCR2-YFP after exposure to several of its chemokine ligands (CCL2: black squares; CCL7: black diamonds; CCL8: black circles; CCL13: white circles). (B) Decrease of the arrestin-RLuc:CCR2-YFP association over time after stimulation with the same ligands. *Reprinted with permission from Berchiche et al. (2011).*

## 2.5 Troubleshooting

It happens that receptor:arrestin BRET<sup>1</sup> systems do not yield sufficiently strong signals for meaningful analysis. This may occur, for example, if a given system does not bring BRET donor and acceptor in sufficient proximity, or in unfavorable relative orientation to generate adequate BRET signals. Rearrangement of the energy probes or choice of BRET<sup>2</sup> as an alternative detection system may help solve such problems.

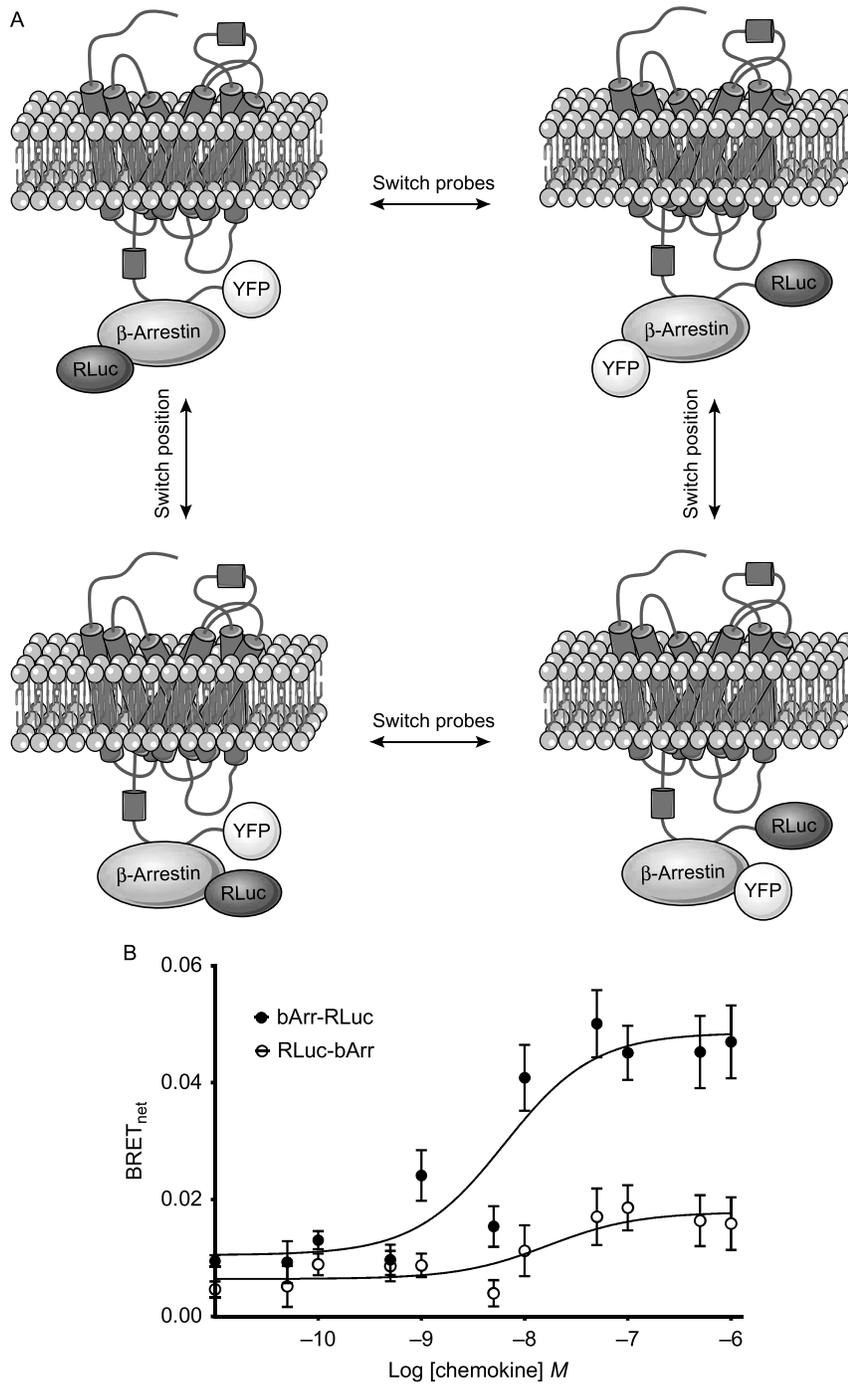
### 2.5.1 Switching the Probe Position

To palliate unfavorable acceptor–donor distance and especially orientation, the fused fluorophores may be switched: either from the arrestin C-terminal to its N-terminal, or between receptor and arrestin (Fig. 4A). Indeed, fusions to either the arrestin N-terminal or C-terminal have been used with success, but not necessarily with identical results (Bellot et al., 2015). We routinely obtained good results using the C-terminally fused arrestin-RLuc constructs with a number of chemokine receptors including CCR2, CXCR3, and CXCR7. While not systematically analyzed, we have found that, at least for CXCR4, the N-terminal arrestin fusion construct RLuc-arrestin does not yield satisfactory results, while the inverse fusion arrestin-RLuc does (Fig. 4B). Alternatively, switching BRET acceptor and donor between receptor and arrestin will also alter the relative donor–acceptor orientation. Probe switching applied to chemokine receptor heterodimers revealed its conformational impact: CXCR4:CCR2 heterodimers responded to CCL2 challenge with BRET increase or decrease, depending on the probe configuration; however, both probe configurations yielded BRET increase in response to CXCL12 (Percherancier et al., 2005). It is also likely that the composition and especially the rigidity of the linker sequence in the fusion proteins affect their ability to yield defined BRET signals, although this issue has not been studied systematically.

### 2.5.2 Use of BRET<sup>2</sup> to Improve the Signal:Noise Ratio

Alternatively, switching from BRET<sup>1</sup> to BRET<sup>2</sup> (or another generation of donor:acceptor pairs) may increase the intelligibility of the BRET signal (see also Kocan, Dalrymple, Seeber, Feldman, & Pflieger, 2010; Lohse, Nuber, & Hoffmann, 2012). Historically, BRET<sup>1</sup> systems have been developed first and are thus still prevalent in use. However, there is no general reason to favor BRET<sup>1</sup> over BRET<sup>2</sup>, if corresponding filter sets are available.

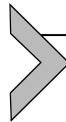
The main difference between BRET<sup>1</sup> and BRET<sup>2</sup> is the use of a different substrate, coelenterazine 400A (DeepBlue C) in combination with a wavelength-shifted fluorescent energy acceptor proteins (GFP2 or GFP10) (Leduc et al., 2009). This leads to much better separation of the respective donor and acceptor emission wavelengths (Denis, Sauliere, Galandrin, Senard, & Gales, 2012) and thus, unlike BRET<sup>1</sup>, in little donor emission spillover into the acceptor emission channel. However, this comes at the price of generally lower luminescence signals. This problem can be bypassed by the use of enhanced RLuc variants (RLuc3 and RLuc8)



**Figure 4** Alternative BRET configurations may yield higher signal resolution. (A) Schematic representation of the different BRET configurations achieved through probe switching or position switching. (B) Increase of resolution to detect arrestin: CXCR4 interaction, through switching from the N-terminally fused RLuc-arrestin (white circles) to the C-terminally fused arrestin-RLuc donor construct (black circles).

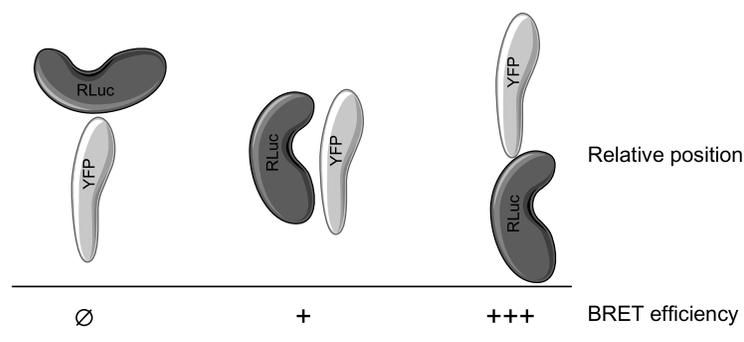
(Loening, Fenn, Wu, & Gambhir, 2006). The improved signal-to-noise ratio of BRET<sup>2</sup> may yield more intelligible signals than BRET<sup>1</sup>.

The practical impact of the use of BRET<sup>2</sup> derives from the different emission spectra (365–435 nm (RLuc3) and 505–525 nm (GFP10) windows) that require the use of different filter sets, and from the rather rapid fading of the substrate coelenterazine 400A. For BRET<sup>2</sup>, we use filters  $390 \pm 22$  nm (RLuc3) and  $510 \pm 10$  nm (GFP10). Obviously, due to the near absence of energy donor/acceptor spectral overlap, larger bandpasses are possible in BRET<sup>2</sup>, and actually recommended to increase signal strength. The rapid fading of the substrate coelenterazine 400A entails that no substrate preincubation is recommended, and that BRET<sup>2</sup> is less suitable for long-term real-time kinetic measurements (unless a separate well is used for each time point, in combination with the use of a substrate injector).



### 3. INTERPRETATION AND LIMITATIONS OF BRET DATA

To facilitate interpretation of all generated results, it seems useful to recall here that the Förster radius ( $R_0$ ), which is the distance in which resonance energy transfer occurs between a given donor and acceptor, crucially depends on their relative orientation. Indeed, the orientation factor ( $k^2$ ) is integral part of the Förster radius and can take values between 0 and 4. Unlike in freely rotating probes, where  $k^2$  can be averaged (Patterson, Piston, & Barisas, 2000), there is no rotational freedom of the probes in experiments with fusion proteins. In fusion proteins, the relative orientation and thus the efficacy of energy transfer between the probes are strongly



**Figure 5** Relative orientation affects energy transfer efficiency. Schematic representation of three different possible relative orientations between donor (RLuc) and acceptor (YFP). Relative orientations may be nonpermissive (left), suboptimal (middle), or optimal (right) for energy transfer.

determined by the conformation of the fused proteins, and of the complex of which they are part (Fig. 5; see also Muller, Galliardt, Schneider, Barisas, & Seidel, 2013). Before dealing with the interpretation of BRET arrestin recruitment data in different settings, we will therefore briefly clarify the meaning of two often used experimentally determined comparative parameters, namely  $BRET_{max}$  and  $BRET_{50}$ .

### 3.1 Interpreting $BRET_{max}$

Receptor:arrestin  $BRET_{max}$  is determined using saturating [acceptor]/[donor] ratios and saturating ligand concentrations. Given that the BRET signal and arrestin recruitment progressively rise with increasing agonist concentrations in dose-response experiments, the amplitude of  $BRET_{max}$  is sometimes mistaken as reflecting the efficacy of arrestin recruitment (i.e., high  $BRET_{max}$  indicating strong arrestin recruitment and low  $BRET_{max}$  representing weak recruitment). This interpretation is not accurate, given the major impact of the BRET partner complex conformation on the orientation factor, and thus Förster radius and BRET efficiency. Rather, different signal intensities at  $BRET_{max}$  brought about by different ligands of the same receptor may as well (and probably more often) represent different receptor:arrestin complex conformations. Conformational differences may of course, in addition, also affect the distance between the donor and the acceptor. The conformational aspect of the  $BRET_{max}$  amplitude is substantiated by recent experiments where two distinct ligands of the same receptor yielded equal  $BRET_{max}$  with RLuc-arrestin, but different  $BRET_{max}$  with arrestin-RLuc (Bellot et al., 2015). These differences correlated with distinct intracellular routing of the complex, further suggesting different arrestin recruitment modalities in response to both ligands.

### 3.2 Interpreting $BRET_{50}$

$BRET_{50}$  depends on the steepness of the BRET saturation curve in [acceptor]/[donor] titration experiments, and thus on the acceptor concentration required to saturate all donor molecules. It is interpreted as reflecting the affinity of the BRET acceptor for the donor (Mercier, Salahpour, Angers, Breit, & Bouvier, 2002). Therefore,  $BRET_{50}$  represents a much better parameter than  $BRET_{max}$  to address the relative efficacy between arrestin responses generated by different ligands within the same experimental BRET system. Lower  $BRET_{50}$  values would result from rapid donor saturation at increasing concentrations of the acceptor, reflecting high

propensity of the BRET partners to interact. Relatively higher BRET<sub>50</sub> in turn would indicate a requirement for higher acceptor concentrations to saturate all donors, and thus lower efficacy of arrestin recruitment. This being said, such differences in arrestin efficacy may or may not also correlate with differences in arrestin recruitment modalities.

### 3.3 Comparing Arrestin Recruitment to Different Chemokine Receptors

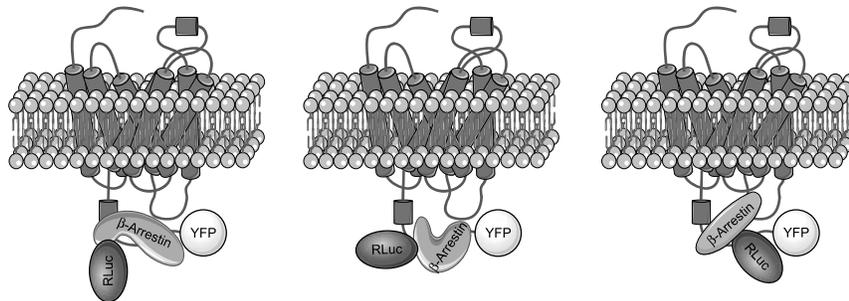
The dependence of the sensitivity of BRET systems on complex conformation implies that different receptors (for example, two chemokine receptors binding the same chemokine) should be compared with caution. Direct BRET<sub>max</sub> comparisons are rendered meaningless by conformational differences between different BRET systems. BRET<sub>50</sub> comparisons, however, are in principle possible. They are best combined with complementary experimental approaches.

### 3.4 Comparing Arrestin Recruitment by Different Ligands to the Same Chemokine Receptor

Comparison of the effects of different ligands binding to the same receptor is the hallmark of functional selectivity. This concerns both the potency (EC<sub>50</sub>) and the efficacy (maximal response) of the different signaling axes. Clearly, the EC<sub>50</sub>s and thus the potency of arrestin responses of different ligands at the same receptor determined by dose-response experiments can be compared (Berchiche et al., 2011; Corbisier et al., 2015), and may reveal signaling bias. Disparate BRET<sub>50</sub> values may suggest actual differences in the affinity of ligand-bound receptor for arrestin, and thus the efficacy of arrestin recruitment.

As outlined above, the efficacy of the BRET responses (BRET<sub>max</sub>) cannot be equated with the efficacy of arrestin recruitment. If quantitative measures of arrestin recruitment efficacy are sought, this may be better served with the use of reporter complementation assays. These have successfully been used with chemokine receptors (Ikeda, Kumagai, Skach, Sato, & Yanagisawa, 2013; Rajagopal et al., 2013). Note that these assays, while being quantitative, do not permit arrestin dissociation experiments, and that conformational information is lost.

Different BRET<sub>max</sub>, however, is indicative of conformational differences in the receptor:arrestin complex (Fig. 6), which may be of functional importance. Arrestin is a multifunctional protein that can scaffold the assembly (and activation) of a plethora of interacting proteins such as different



**Figure 6** Arrestin recruitment modalities affect BRET efficiency. Schematic representation of three different possible recruitment modalities, which would yield different energy transfer efficiency.

protein kinases, phosphatases, ubiquitin ligases, and deubiquitinases (Shukla et al., 2011), which differently affect arrestin conformation. Moreover, arrestin can be recruited to receptors as monomeric or oligomeric species, with different functional outcome (Bougaran et al., 2007). Such differences in arrestin conformation or “recruitment modalities” (Audet et al., 2012) can be relevant for functional differences between ligands (Audet et al., 2012; Nobles et al., 2011; Shukla et al., 2008; Zimmerman et al., 2012). Therefore, arrestin recruitment modalities may represent an additional layer of functional selectivity that takes also place *within* the arrestin pathway, rather than only between G protein- and arrestin-mediated signaling pathways. For example, this may be the case for CCR2 ligands (Berchiche et al., 2011), where different  $BRET_{max}$  induced by different ligands was reported. To conclude on potential differences in arrestin recruitment modalities by ligands, it is recommended to rely on cumulative evidence (such as time-course experiments) or complementary experiments addressing downstream signaling or intracellular receptor transport, rather than on differences in  $BRET_{max}$  alone. Arrestin conformation may be also directly assessed using conformational BRET reporters such as dual-brilliance arrestin BRET reporters (RLuc-arrestin-YFP or YFP-arrestin-RLuc) (Charest, Terrillon, & Bouvier, 2005; Nobles et al., 2011; Shukla et al., 2008) that monitor conformational changes within arrestin. While the double-brilliance arrestin probe provides a tool with great potential to evaluate arrestin recruitment by endogenous 7TMRs in primary cells and tissues, for the time being, its practicality is, however, rather limited due to a rather narrow dynamic range.

### 3.5 Comparing Receptor Mutants

Arrestin recruitment can also be compared between different substitution point mutants of the same receptor. Such comparisons may yield information about key residues for arrestin recruitment, for example, the respective roles of specific phosphorylation sites in the receptor C-terminal (Busillo et al., 2010; de Munnik et al., 2015). Substitution of some of these potential phosphorylation sites, but not others, may result in the absence of detectable arrestin recruitment. One conundrum of such analyses is that amino acid substitutions in the receptor may alter the sensitivity of the BRET system via conformational effects. This is illustrated by an example in which Busillo et al. found that alanine substitutions of phosphorylation sites in the CXCR4 C-terminal could lead to *increased* BRET efficiency—the authors concluded a conformational effect (Busillo et al., 2010). Because these effects may also decrease (or abolish) BRET efficiency for purely technical reasons (and not as an intrinsic property of the mutant receptors), we recommend to gather complementary evidence before concluding on the efficacy of arrestin recruitment. Alternative interpretations such as the occurrence of different arrestin recruitment modalities to different receptor mutants should also be considered. This applies in particular to mutations of phosphorylation sites, as the intricate receptor phosphorylation patterns (bar-codes) by multiple kinases are known to determine the recruited arrestin species (Nobles et al., 2011).



## 4. PERSPECTIVES

Arrestin recruitment as a main chemokine receptor signaling axis is of significant interest in the light of functional selectivity. The measurement of arrestin recruitment by BRET yields quantitative parameters such as agonist (or antagonist) potency that were challenging to obtain using microscopy. Therefore, BRET has become a standard method for arrestin recruitment. However, it is often underappreciated that results derived from receptor:arrestin BRET systems are not purely quantitative, but also contain conformational information. The inherent blend of quantitative and qualitative information gathered by BRET can be both curse and blessing: while it clearly complicates the interpretation of BRET efficiency, it may also provide first indications for the occurrence of different arrestin recruitment modalities. Besides divergent BRET efficiency between chemokine ligands of the same receptor or receptor mutants, differences in arrestin association

and dissociation kinetics suggest different recruitment modalities. To further complicate matters, it cannot be assumed that any given receptor:ligand pair allows only one single recruitment modality: rather, combinations of different recruitment modalities at variable proportions may coexist. For example, the observed biphasic arrestin:receptor dissociation kinetics for the combination CCR2:CCL2, but not CCR2:CCL7 (see also Fig. 3B; Berchiche et al., 2011), may point in this direction. The investigation of mechanisms determining arrestin recruitment modalities—and of the resulting downstream signaling and trafficking effects—is ongoing, and actually just beginning. Application and development of complementary methods will be required for their in-depth investigation.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Mathias Plourde for help with the drawings. N.M. was supported by fellowships from the “Fonds de Recherche du Québec–Santé”(FRQS) and the Cole Foundation. N.H. was supported by Canadian Institutes of Health Research grant MOP-123421.

## REFERENCES

- Angers, S., Salahpour, A., Joly, E., Hilairiet, S., Chelsky, D., Dennis, M., et al. (2000). Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(7), 3684–3689.
- Audet, N., Charfi, I., Mnie-Filali, O., Amraei, M., Chabot-Dore, A. J., Millecamps, M., et al. (2012). Differential association of receptor-Gbetagamma complexes with beta-arrestin2 determines recycling bias and potential for tolerance of delta opioid receptor agonists. *The Journal of Neuroscience*, 32(14), 4827–4840.
- Barak, L. S., Ferguson, S. S., Zhang, J., & Caron, M. G. (1997). A beta-arrestin/green fluorescent protein biosensor for detecting G protein-coupled receptor activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(44), 27497–27500.
- Bellot, M., Galandrin, S., Boullaran, C., Matthies, H. J., Despas, F., Denis, C., et al. (2015). Dual agonist occupancy of AT1-R-alpha2C-AR heterodimers results in atypical Gs-PKA signaling. *Nature Chemical Biology*, 11(4), 271–279.
- Berchiche, Y. A., Gravel, S., Pelletier, M. E., St-Onge, G., & Heveker, N. (2011). Different effects of the different natural CC chemokine receptor 2b ligands on {beta}-arrestin recruitment, G&alpha;i signaling, and receptor internalization. *Molecular Pharmacology*, 79(3), 488–498.
- Boullaran, C., Scott, M. G., Bourougaa, K., Bellal, M., Esteve, E., Thuret, A., et al. (2007). Beta-arrestin 2 oligomerization controls the Mdm2-dependent inhibition of p53. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(46), 18061–18066.
- Busillo, J. M., Armando, S., Sengupta, R., Meucci, O., Bouvier, M., & Benovic, J. L. (2010). Site-specific phosphorylation of CXCR4 is dynamically regulated by multiple kinases

- and results in differential modulation of CXCR4 signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(10), 7805–7817.
- Chakera, A., Seeber, R. M., John, A. E., Eidne, K. A., & Greaves, D. R. (2008). The duffy antigen/receptor for chemokines exists in an oligomeric form in living cells and functionally antagonizes CCR5 signaling through hetero-oligomerization. *Molecular Pharmacology*, 73(5), 1362–1370.
- Charest, P. G., Terrillon, S., & Bouvier, M. (2005). Monitoring agonist-promoted conformational changes of beta-arrestin in living cells by intramolecular BRET. *EMBO Reports*, 6(4), 334–340.
- Colvin, R. A., Campanella, G. S., Manice, L. A., & Luster, A. D. (2006). CXCR3 requires tyrosine sulfation for ligand binding and a second extracellular loop arginine residue for ligand-induced chemotaxis. *Molecular and Cellular Biology*, 26(15), 5838–5849.
- Colvin, R. A., Campanella, G. S., Sun, J., & Luster, A. D. (2004). Intracellular domains of CXCR3 that mediate CXCL9, CXCL10, and CXCL11 function. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(29), 30219–30227.
- Corbisier, J., Gales, C., Huszagh, A., Parmentier, M., & Springael, J. Y. (2015). Biased signaling at chemokine receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(15), 9542–9554.
- de Munnik, S. M., Kooistra, A. J., van Offenbeek, J., Nijmeijer, S., de Graaf, C., Smit, M. J., et al. (2015). The viral G protein-coupled receptor ORF74 hijacks beta-arrestins for endocytic trafficking in response to human chemokines. *PLoS One*, 10(4), e0124486.
- Denis, C., Sauliere, A., Galandrin, S., Senard, J. M., & Gales, C. (2012). Probing heterotrimeric G protein activation: Applications to biased ligands. *Current Pharmaceutical Design*, 18(2), 128–144.
- Ferguson, S. S., & Caron, M. G. (2004). Green fluorescent protein-tagged beta-arrestin translocation as a measure of G protein-coupled receptor activation. *Methods in Molecular Biology*, 237, 121–126.
- Galandrin, S., & Bouvier, M. (2006). Distinct signaling profiles of beta1 and beta2 adrenergic receptor ligands toward adenylyl cyclase and mitogen-activated protein kinase reveals the pluridimensionality of efficacy. *Molecular Pharmacology*, 70(5), 1575–1584.
- Galandrin, S., Oligny-Longpre, G., & Bouvier, M. (2007). The evasive nature of drug efficacy: Implications for drug discovery. *Trends in Pharmacological Sciences*, 28(8), 423–430.
- Gravel, S., Malouf, C., Boulais, P. E., Berchiche, Y. A., Oishi, S., Fujii, N., et al. (2010). The peptidomimetic CXCR4 antagonist TC14012 recruits beta-arrestin to CXCR7: Roles of receptor domains. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(49), 37939–37943.
- Hamdan, F. F., Audet, M., Garneau, P., Pelletier, J., & Bouvier, M. (2005). High-throughput screening of G protein-coupled receptor antagonists using a bioluminescence resonance energy transfer 1-based beta-arrestin2 recruitment assay. *Journal of Biomolecular Screening*, 10(5), 463–475.
- Ikeda, Y., Kumagai, H., Skach, A., Sato, M., & Yanagisawa, M. (2013). Modulation of circadian glucocorticoid oscillation via adrenal opioid-CXCR7 signaling alters emotional behavior. *Cell*, 155(6), 1323–1336.
- Kalatskaya, I., Berchiche, Y. A., Gravel, S., Limberg, B. J., Rosenbaum, J. S., & Heveker, N. (2009). AMD3100 is a CXCR7 ligand with allosteric agonist properties. *Molecular Pharmacology*, 75(5), 1240–1247.
- Kocan, M., Dalrymple, M. B., Seeber, R. M., Feldman, B. J., & Pflieger, K. D. (2010). Enhanced BRET technology for the monitoring of agonist-induced and agonist-independent interactions between GPCRs and beta-arrestins. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*, 1, 12.
- Kohout, T. A., Nicholas, S. L., Perry, S. J., Reinhart, G., Junger, S., & Struthers, R. S. (2004). Differential desensitization, receptor phosphorylation, beta-arrestin recruitment,

- and ERK1/2 activation by the two endogenous ligands for the CC chemokine receptor 7. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(22), 23214–23222.
- Leduc, M., Breton, B., Gales, C., Le Guill, C., Bouvier, M., Chemtob, S., et al. (2009). Functional selectivity of natural and synthetic prostaglandin EP(4) receptor ligands. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 331(1), 297–307.
- Loening, A. M., Fenn, T. D., Wu, A. M., & Gambhir, S. S. (2006). Consensus guided mutagenesis of Renilla luciferase yields enhanced stability and light output. *Protein Engineering, Design & Selection*, 19(9), 391–400.
- Lohse, M. J., Nuber, S., & Hoffmann, C. (2012). Fluorescence/bioluminescence resonance energy transfer techniques to study G-protein-coupled receptor activation and signaling. *Pharmacological Reviews*, 64(2), 299–336.
- McCulloch, C. V., Morrow, V., Milasta, S., Comerford, I., Milligan, G., Graham, G. J., et al. (2008). Multiple roles for the C-terminal tail of the chemokine scavenger D6. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(12), 7972–7982.
- Mercier, J. F., Salahpour, A., Angers, S., Breit, A., & Bouvier, M. (2002). Quantitative assessment of beta 1- and beta 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(47), 44925–44931.
- Muller, S. M., Galliardt, H., Schneider, J., Barisas, B. G., & Seidel, T. (2013). Quantification of Forster resonance energy transfer by monitoring sensitized emission in living plant cells. *Frontiers in Plant Science*, 4, 413.
- Nobles, K. N., Xiao, K., Ahn, S., Shukla, A. K., Lam, C. M., Rajagopal, S., et al. (2011). Distinct phosphorylation sites on the {beta}2-adrenergic receptor establish a barcode that encodes differential functions of {beta}-arrestin. *Science Signaling*, 4(185), ra51.
- Oakley, R. H., Laporte, S. A., Holt, J. A., Caron, M. G., & Barak, L. S. (2000). Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(22), 17201–17210.
- Odemis, V., Lipfert, J., Kraft, R., Hajek, P., Abraham, G., Hattermann, K., et al. (2012). The presumed atypical chemokine receptor CXCR7 signals through G(i/o) proteins in primary rodent astrocytes and human glioma cells. *Glia*, 60(3), 372–381.
- Patterson, G. H., Piston, D. W., & Barisas, B. G. (2000). Forster distances between green fluorescent protein pairs. *Analytical Biochemistry*, 284(2), 438–440.
- Percherancier, Y., Berchiche, Y. A., Slight, I., Volkmer-Engert, R., Tamamura, H., Fujii, N., et al. (2005). Bioluminescence resonance energy transfer reveals ligand-induced conformational changes in CXCR4 homo- and heterodimers. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(11), 9895–9903.
- Rajagopal, S., Bassoni, D. L., Campbell, J. J., Gerard, N. P., Gerard, C., & Wehrman, T. S. (2013). Biased agonism as a mechanism for differential signaling by chemokine receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(49), 35039–35048.
- Rajagopal, S., Kim, J., Ahn, S., Craig, S., Lam, C. M., Gerard, N. P., et al. (2010). Beta-arrestin- but not G protein-mediated signaling by the “decoy” receptor CXCR7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(2), 628–632.
- Sauliere, A., Bellot, M., Paris, H., Denis, C., Finana, F., Hansen, J. T., et al. (2012). Deciphering biased-agonism complexity reveals a new active AT1 receptor entity. *Nature Chemical Biology*, 8(7), 622–630.
- Shukla, A. K., Violin, J. D., Whalen, E. J., Gesty-Palmer, D., Shenoy, S. K., & Lefkowitz, R. J. (2008). Distinct conformational changes in beta-arrestin report biased agonism at seven-transmembrane receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(29), 9988–9993.

- Shukla, A. K., Xiao, K., & Lefkowitz, R. J. (2011). Emerging paradigms of beta-arrestin-dependent seven transmembrane receptor signaling. *Trends in Biochemical Sciences*, 36(9), 457–469.
- Urban, J. D., Clarke, W. P., von Zastrow, M., Nichols, D. E., Kobilka, B., Weinstein, H., et al. (2007). Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 320(1), 1–13.
- Weber, M., Blair, E., Simpson, C. V., O'Hara, M., Blackburn, P. E., Rot, A., et al. (2004). The chemokine receptor D6 constitutively traffics to and from the cell surface to internalize and degrade chemokines. *Molecular Biology of the Cell*, 15(5), 2492–2508.
- Zimmerman, B., Beutrait, A., Aguila, B., Charles, R., Escher, E., Claing, A., et al. (2012). Differential beta-arrestin-dependent conformational signaling and cellular responses revealed by angiotensin analogs. *Science Signaling*, 5(221), ra33.