

Université de Montréal

Nouvelles stratégies d'imageries afin de faciliter l'étude des interactions entre les  
récepteurs couplés aux protéines G

par

Isabelle Héroux

Département de Biochimie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences  
en Biochimie

Août 2008

© Isabelle Héroux, 2008

Université de Montréal  
Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé :  
Nouvelles stratégies d'imagerie afin de faciliter l'étude des interactions entre les  
récepteurs couplés aux protéines G

présenté par :  
Isabelle Héroux

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Nikolaus Heveker  
président-rapporteur

Dr Terry Hébert  
directeur de recherche

Dr Bruce G. Allen  
membre du jury

## Résumé

L'étude de l'assemblage et de l'acheminement à la membrane plasmique des complexes de signalisation des RCPGs va jouer un rôle crucial dans le développement de nouveaux médicaments ayant moins d'effets secondaires. Des outils permettant l'étude de ces phénomènes existent déjà, mais un outil polyvalent qui permettrait d'étudier plusieurs aspects pourrait grandement faciliter et accélérer ces études. L'étiquette SNAP est un candidat intéressant puisqu'avec cette étiquette il est possible de marquer une seule construction avec une variété de différents substrats. Une construction encodant pour le récepteur  $\beta_2$ AR avec une étiquette SNAP à son extrémité C-terminale a été ingérée. Cette construction est apte à lier son ligand, à être acheminée à la membrane plasmique et à homodimériser. La protéine exprimée a été marquée avec le fluorophore BG-430. De la fluorescence non spécifique a été détectée dans la cellule (même en absence de l'étiquette SNAP sur le récepteur). Un essai BRET a été développé, utilisant la construction HA- $\beta_2$ AR-SNAP en tant qu'accepteur et est fonctionnel. L'étiquette SNAP, comme utilisée ici, ne présente pas un aussi bon candidat qu'attendu, puisque le substrat n'ayant pas réagi demeure coincé dans la cellule. Le facteur activateur de plaquette (PAF) et son récepteur (PAFR) jouent un rôle critique dans plusieurs réponses inflammatoires et le récepteur FP est impliqué dans l'accouchement prématuré. Une meilleure compréhension des complexes de signalisation associés à ces récepteurs pourrait être la première étape dans la compréhension de leur signalisation dans des situations normales ou de maladies. Des expériences de BRET étudiant des interactions de bases entre les récepteurs et leurs partenaires d'interactions connus ont été réalisées. Elles ont permis de déterminer que : les récepteurs PAF et FP homodimérisent, que les récepteurs PAF et FP hétérodimérisent, que les protéines  $G\beta\gamma$  interagissent de manière constitutive avec ces récepteurs et qu'aucun signal de BRET n'a été détecté avec la protéine  $G\alpha$  et ce, en présence ou en absence de stimulation par un agoniste (suggérant qu'il est nécessaire d'optimiser le système présentement utilisé).

**Mots clés :** RCPG,  $\beta_2$ AR, PAFR, FPR, étiquette SNAP, BRET

## Abstract

Studies of the assembly and plasma membrane trafficking of G protein-coupled receptor (GPCR) signalling complexes will play an important role in the development of new drugs with fewer side effects. Tools for this purpose have already been developed, but a more versatile tool which would allow assessment of multiple aspects of GPCR trafficking and protein/protein interaction could greatly facilitate and expedite these studies. The SNAP tag is without doubt an interesting candidate for this task. Using this tag, it is possible to label one receptor construct, with a variety of different substrates. A construct encoding the  $\beta_2$ AR receptor was engineered with a C-terminal SNAP tag. This construct, when expressed in HEK 293 cells, was able to bind ligand, to traffic to the plasma membrane and to form homodimers. The expressed protein was then labelled with the BG-430 fluorophore. Non-specific fluorescence was detected in the cell, even in the absence of the SNAP tag. A BRET assay was developed using the HA- $\beta_2$ AR-SNAP as a BRET acceptor. The SNAP tag as used in this initial study was not as good as thought previously because unreacted substrate remains trapped in cells (i.e. the background was too high). Platelet-activating factor (PAF) and its receptor (PAF-R) play a critical role in many inflammatory responses and the receptor for prostaglandin F (FP) plays a role in pre-term labour. A better understanding of signalling complexes associated with these receptors might be the first step in a better understanding of their signalling in health and disease. As an initial step in this direction, we used BRET to study basic interactions between these receptors and known signalling partners. PAF-R and FP receptors homodimerize. A heterodimer between the FP and PAF receptors was also detected.  $G\beta\gamma$  subunits interact with these receptors in a constitutive way. In the case of the  $G\alpha$ , no BRET signal was detected with or without agonist stimulation suggesting more work is required to optimize the system.

**Key words:** GPCR,  $\beta_2$ AR, PAFR, FPR, SNAP tag, BRET

# Table des matières

<b>Résumé .....</b>	<b>iii</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>iv</b>
<b>Table des matières .....</b>	<b>v</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>ix</b>
<b>Liste des tables .....</b>	<b>xi</b>
<b>Liste des abréviations .....</b>	<b>xii</b>
<b>Remerciements.....</b>	<b>xv</b>
<b>1 Introduction : .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Généralités .....	1
1.1.1.1 <i>Fonction</i> .....	1
1.1.1.2 <i>Pertinence pharmacologique</i> .....	2
1.1.2 Doctrines d’hier et d’aujourd’hui.....	4
1.1.2.1 <i>Formation du complexe de signalisation</i> .....	4
1.1.2.2 <i>Liaison du ligand</i> .....	6
1.1.2.3 <i>Acheminement à la membrane plasmique</i> .....	6
1.1.2.4 <i>Signalisation</i> .....	7
1.1.2.5 <i>Oligomérisation des récepteurs</i> .....	11
1.1.2.6 <i>Internalisation des récepteurs</i> .....	14
<b>1.2 Récepteurs .....</b>	<b>17</b>
1.2.1 $\beta_2$ -adrénergique .....	17
1.2.1.1 <i>Pertinence biologique</i> .....	17
1.2.1.2 <i>Signalisation</i> .....	18
1.2.1.3 <i>Structure</i> .....	19

1.2.2	Facteur activateur de plaquettes.....	20
1.2.2.1	<i>Pertinence biologique</i> .....	20
1.2.2.2	<i>Signalisation</i> .....	21
1.2.3	Prostaglandines F.....	22
1.2.3.1	<i>Pertinence biologique</i> .....	22
1.2.3.2	<i>Signalisation</i> .....	23
<b>1.3</b>	<b>Outils utilisés pour l'étude des interactions protéines/protéines</b>	<b>26</b>
1.3.1	Méthodes générales.....	26
1.3.2	Transfert d'énergie par résonance.....	27
1.3.2.1	<i>FRET</i> .....	27
1.3.2.2	<i>BRET</i> .....	29
1.3.3	L'étiquette SNAP.....	32
<b>1.4</b>	<b>Hypothèse et objectifs</b> .....	<b>35</b>
1.4.1	Développement d'un outil multi-stratégique pour les études des interactions protéines-protéines.....	35
1.4.2	Optimisation des outils pour le criblage des nouveaux ligands pour les récepteurs PAF et FP .....	36
<b>2</b>	<b>Matériel et Méthodes</b> :.....	<b>37</b>
<b>2.1</b>	<b>Anticorps et réactifs</b> .....	<b>37</b>
2.1.1	Construction d'ADN complémentaire .....	37
2.1.2	Réactifs de culture cellulaire, transfection et préparation des cellules.....	37
2.1.3	Anticorps primaires.....	38
2.1.4	Anticorps secondaires .....	38
2.1.5	Substrat 6-benzylguanine.....	38
2.1.6	BRET .....	39
2.1.7	Autres réactifs .....	39
<b>2.2</b>	<b>Sous-clonage moléculaire</b> .....	<b>40</b>
<b>2.3</b>	<b>Culture cellulaire et transfection</b> .....	<b>41</b>
<b>2.4</b>	<b>Immunobuvardage de type western</b> .....	<b>42</b>
2.4.1	Préparation membranaire .....	42

2.4.2	Solubilisation des préparations membranaires.....	42
2.4.3	Dosage de protéines .....	43
2.4.4	Immunobuvardage de type Western .....	43
2.4.5	Décapage (Stripping) des anticorps .....	44
<b>2.5</b>	<b>Immunoprécipitation.....</b>	<b>44</b>
<b>2.6</b>	<b>Essai de liaison de ligand radiomarqué .....</b>	<b>45</b>
<b>2.7</b>	<b>Marquage avec le substrat 6-benzylguanine .....</b>	<b>45</b>
<b>2.8</b>	<b>BRET.....</b>	<b>46</b>
2.8.1	Considération préliminaire.....	47
2.8.2	BRET <sup>1</sup> .....	48
2.8.3	BRET <sup>2</sup> .....	48
2.8.4	SNAP-BRET.....	49
2.8.5	Essai de stimulation avec un agoniste.....	50
<b>2.9</b>	<b>Microscopie confocale .....</b>	<b>51</b>
<b>2.10</b>	<b>Stimulation des protéines MAPKs .....</b>	<b>53</b>
<b>3</b>	<b>Résultats :.....</b>	<b>54</b>
<b>3.1</b>	<b>Clonage : .....</b>	<b>54</b>
<b>3.2</b>	<b>Caractérisation du récepteur <math>\beta_2</math>AR marqué avec l'étiquette SNAP et développement d'un nouvel essai BRET .....</b>	<b>55</b>
3.2.1	Expression et fonctionnalité des protéines de fusion dans des cellules HEK 293 .....	55
3.2.1.1	<i>Expression des protéines de fusion dans des cellules HEK 293</i> .....	55
3.2.1.2	<i>Acheminement de protéines de fusion à la membrane plasmique.....</i>	56
3.2.1.3	<i>Capacité des protéines de fusion à lier un ligand.....</i>	58
3.2.1.4	<i>Homodimérisation du récepteur .....</i>	60
3.2.2	Développement d'un essai BRET utilisant la technologie SNAP .....	62
3.2.2.1	<i>Marquage avec un substrat BG .....</i>	62
3.2.2.2	<i>Essai BRET .....</i>	63

3.2.2.3	<i>Localisation cellulaire</i> .....	66
<b>3.3</b>	<b>Caractérisation initiale des complexes formés par les récepteurs</b>	
	<b>PAF et FP : Identification de leurs partenaires d'interaction</b> .....	71
3.3.1	Homodimérisation des récepteur .....	71
3.3.2	Hétérodimérisation de récepteurs .....	76
3.3.3	Interaction avec les protéines G .....	77
<b>4</b>	<b>Discussion :</b> .....	<b>86</b>
4.1	Les protéines de fusion sont exprimées dans les cellules HEK 293 .....	86
4.2	Les récepteurs $\beta$ 2AR, PAFR et FP sont aptes à lier un ligand ...	87
4.3	Les récepteurs $\beta$ 2AR, PAFR et FP dimérisent .....	89
4.4	L'étiquette SNAP comme nouvel outil d'étude, un mauvais candidat.....	91
4.5	Les récepteurs PAFR et FP interagissent avec les protéines G $\beta$ et G $\gamma$ de manière constitutive.....	93
4.6	Les récepteurs PAFR et FP ne semblent pas interagir avec la protéine G $\alpha$ en absence de stimulation par l'agoniste .....	94
4.7	Ce que vous ne lirez pas.....	95
<b>5</b>	<b>Conclusions et Perspectives :</b> .....	<b>97</b>
<b>6</b>	<b>Références :</b> .....	<b>99</b>
<b>7</b>	<b>Annexes :</b> .....	<b>XV</b>
7.1	Annexe 1 : Résultats décrivant la fonctionnalité des constructions utilisées pour les récepteurs PAF et FP.....	xv
7.2	Accord des coauteurs .....	xviii

## Liste des figures

<b>Figure 1.1 : Modèle général des voies de signalisation des RCPGs.....</b>	<b>2</b>
<b>Figure 1.2 : Les rôles présumés jouer par la dimérisation des RCPGs.....</b>	<b>14</b>
<b>Figure 1.3 : Voies de signalisations du récepteur <math>\beta_2</math>AR.....</b>	<b>18</b>
<b>Figure 1.4 : Voies de signalisation du récepteur PAF.....</b>	<b>22</b>
<b>Figure 1.5 : Voies de signalisation suivant la stimulation par un agoniste des récepteurs FP(A) et FP(B).....</b>	<b>24</b>
<b>Figure 1. 6 : Schéma représentant les réactions de FRET et de BRET.....</b>	<b>29</b>
<b>Figure 1. 7 : Différence entre les techniques de BRET<sup>1</sup> et de BRET<sup>2</sup>.....</b>	<b>31</b>
<b>Figure 1.8 : Réaction chimique entre l'étiquette SNAP et son substrat BG..</b>	<b>33</b>
<b>Figure 3.1 : Expression de la construction HA-<math>\beta_2</math>AR-SNAP.....</b>	<b>56</b>
<b>Figure 3.2 : Essai de stimulation des protéines MAPKs.....</b>	<b>57</b>
<b>Figure 3.3 : Capacité d'un récepteur à lier un ligand.....</b>	<b>59</b>
<b>Figure 3.4 : Co-immunoprécipitation.....</b>	<b>61</b>
<b>Figure 3.5 : Marquage du clone HA-<math>\beta_2</math>AR-SNAP avec 5 <math>\mu</math>M de BG-430.....</b>	<b>63</b>
<b>Figure 3.6 : Essai SNAP-BRET.....</b>	<b>65</b>
<b>Figure 3.7 : Essai de microscopie confocale.....</b>	<b>68</b>
<b>Figure 3.8 : Homodimérisation des récepteurs PAF et FP (essai BRET).....</b>	<b>73</b>
<b>Figure 3.9 : Hétérodimérisation entre les récepteurs PAF et FP.....</b>	<b>76</b>
<b>Figure 3.10 : Interaction de la protéine G<math>\alpha</math>q avec les récepteurs PAF et FP.....</b>	<b>79</b>
<b>Figure 3.11 : Interaction de la protéine G<math>\gamma</math>2 avec ou sans G<math>\beta</math>1 pour les récepteurs PAF et FP.....</b>	<b>83</b>

**Figure 7.1 : Essai de microscopie confocale ..... xv**

**Figure 7.2 : Essai de stimulation des protéines MAPKs..... xvi**

## Liste des tables

<b>Table I.I : Effecteurs activés par les différentes isoformes de la protéine</b>	
<b><i>Gα</i>.....</b>	<b>9</b>
<b>Table I.II : Effecteurs activés par les protéine <math>G\beta\gamma</math>.....</b>	<b>10</b>

## Liste des abréviations

AC	Adénylate cyclase
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AGT	Acylguanine-ADN-acyltransférase
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ARN	Acide ribonucléique
$\beta_2$ AR	Récepteur $\beta_2$ -adrénergique
BG	6-Benzylguanine
BRET	Transfert d'énergie par résonance provenant d'une source bioluminescente ( <i>Bioluminescence Resonance Energy Transfer</i> )
BSA	Albumine de sérum bovin ( <i>Bovine serum albumin</i> )
CPM	Compte par minute
CYP	$^{125}$ I-Cyanopindolol
DAG	Diacylglycérol
DMEM	Milieu Eagle modifié de Dulbecco ( <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> )
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
DTT	Dithiotheritol
ECL	Chemiluminescence augmentée ( <i>enhanced chemiluminescence</i> )
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétraacétique
eGFP	Protéine fluorecente verte augmentée ( <i>enhanced green fluorescent protein</i> )
EGTA	Acide éthylène-glycol-tétraacétique
ERK	Kinase régulée par un signal extracellulaire ( <i>extracellular-regulated kinase</i> )
FBS	Sérum foetal bovin ( <i>fetal bovine serum</i> )
FRET	Transfert d'énergie par résonance provenant d'une source fluorescente ( <i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i> )
FPR	Récepteur des prostaglandines F ( <i>F prostaglandins receptor</i> )

<i>g</i>	Force de centrifugation <i>g</i>
GFP	Protéine fluorescente verte ( <i>green fluorescent protein</i> )
GRK	Protéine kinase de RCPG
HA	Hémagglutinine
HEK 293	Cellules embryonnaire de rein humain 293 ( <i>human embryonic kidney 293 cells</i> )
HRP	Peroxydase de raifort ( <i>horseradish peroxydase</i> )
IB	Immunobuvardage de type Western
IgG	Immunoglobuline
IP	Immunoprécipitation
IP <sub>3</sub>	Inositol-3-phosphate
LHR	Récepteur de l'hormone lutéinisante
MAPK	Protéine kinase activée par des agents mitogéniques ( <i>mitogen activated protein kinase</i> )
NGS	Sérum normal de chèvre ( <i>normal goat serum</i> )
nm	Nanomètre
NP-40	Tergitol de type NP-40 (nonyl phenoxy polyethoxy ethanol)
PAFR	Récepteur du facteur activateur de plaquettes ( <i>platelet activating factor receptor</i> )
PBS	Tampon salin à base de phosphate ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PBST	Tampon salin à base de phosphate contenant du Tween-20
PCR	Réaction en chaîne de la polymérase ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PEI	Polyethelenimine
PGF2 $\alpha$	Prostaglandine F-2 $\alpha$
pH	Potentiel hydrogène
PI	Inhibiteur de protéase ( <i>protease inhibitor</i> )
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-3-phosphate
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phénylméthanesulfonyl fluorure
PM	Poids moléculaire
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G

RE	Réticulum endoplasmique
RET	Transfert d'énergie par résonance
RLU	Unité relative de luminescence ( <i>relative luminescence unit</i> )
RLuc	<i>Renilla</i> Luciférase
RPM	Révolution par minute
SDS	Sodium dodécylsulfate
SDS-PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS ( <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
S.E.	Erreur standard ( <i>Standard Error</i> )
TBS	Tampon salin à base de Tris
TBST	Tampon salin à base de Tris contenant du Tween-20
TP	Température pièce
Tris	Trishydroxyméthylaminométhane
Tris-HCl	Tris ayant un pH ajuster avec du HCl
U/mL	Unité par millilitre

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche le Dr Terry Hébert pour son aide, ses encouragements et ses connaissances. Malgré le fait que j'aie découvert des problèmes auxquels il n'avait pas encore songé au cours de mes deux années de travail, il n'a jamais mis en doute mes qualités techniques. Cette maîtrise fut toute une aventure, un exercice de persévérance et de détermination qui a su mettre mon caractère au défi! Merci tout particulièrement pour sa compréhension et son support dans les moments de découragements et de doutes. Je suis certaine que je n'aurais pu trouver un meilleur directeur de recherche et je lui en suis très reconnaissante.

Je veux aussi remercier les membres présents et passés de mon laboratoire pour toutes les discussions animées que nous avons échangées qui m'ont permis de m'améliorer et de pousser mes connaissances techniques et intellectuelles à un niveau supérieur. Leur soutien fut tout aussi précieux. Je salue tout particulièrement Mélanie Robitaille, Phan Trieu et Darlaine Pétrin pour leur support constant, leur réponse à mes innombrables questions et la patience dont elles ont fait preuve dans l'enseignement de nouvelles techniques. Elles sont bien plus que de simples collègues de travail, elles sont aussi devenues des amies.

Je tiens à remercier tout spécialement Nathalie Éthier pour son aide constante, son expertise technique et intellectuelle incroyable, ainsi que son intérêt concernant mon projet de recherche. Sans elle, plusieurs des résultats présentés ici n'auraient pu être réalisés.

Il ne faut pas oublier la contribution de Dominic Devost (un dictionnaire scientifique ambulant, qui est toujours intéressé par tout ce qui touche de près ou de loin à la science) avec qui j'ai eu d'innombrables conversations, toutes plus

enrichissantes les unes que les autres et qui m'ont permis d'avancer et de pousser mes réflexions toujours plus loin.

Un merci tout spécial à la compagnie Covalys qui m'a fourni une grande quantité de réactif et un soutien technique remarquable.

Il est important pour moi de souligner la contribution de mes parents Diane Bégin et Denis Héroux et de mon frère Patrick Héroux ainsi que leurs encouragements, tout au cours de mes études. Ils ont su être présents pour moi, pour m'encourager et m'aider dans tous les projets que j'ai voulu entreprendre. Je ne pourrai jamais les remercier assez, sans eux je n'aurais pas été bien loin! En terminant, je tiens à remercier mes amies Edith Lepage-Simard, Valérie Roger, Marie-Eve Pelletier et Sandrine Vautrin pour leur écoute, leur amitié, leur sourire, leur fou rire et leur folie; une combinaison nécessaire à la réussite et à la survie d'une maîtrise (surtout dans les moments plus difficiles).

# 1 Introduction :

## 1.1 Récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs)

### 1.1.1 Généralités

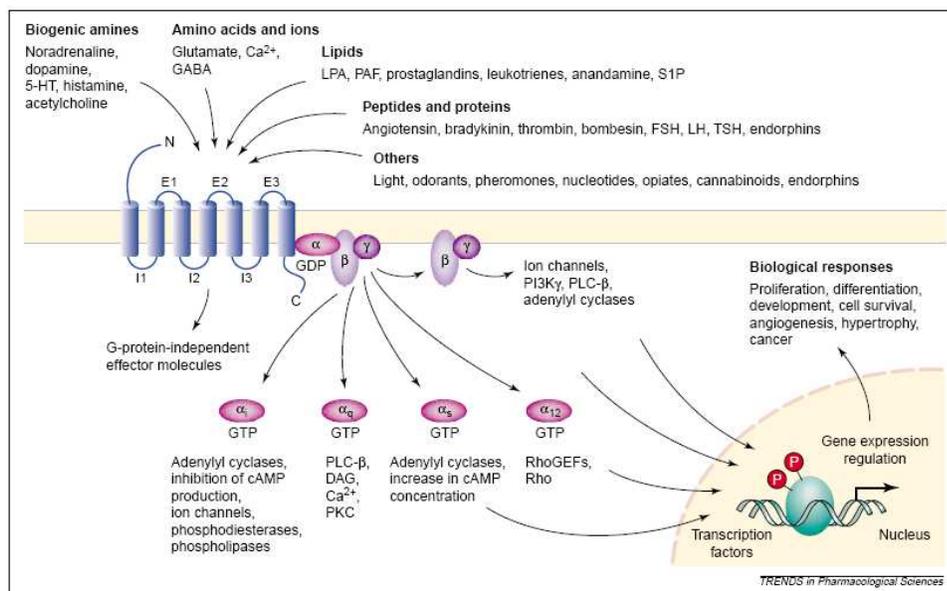
#### 1.1.1.1 *Fonction*

Les récepteurs à sept domaines transmembranaires, aussi connus sous le nom de récepteur couplé aux protéines G (RCPG), forment la plus grande famille connue de récepteurs présents à la surface cellulaire. Environ 1 % du génome humain encode pour leurs gènes (162). Leur fonction principale consiste à traduire les signaux extracellulaires en événements intracellulaires, de façon à pouvoir répondre aux changements environnants constants (23). Ils répondent à plusieurs modulateurs cellulaires tels les hormones, les peptides, les photons, les nucléotides et les ions (56).

Suite à leur activation par ces modulateurs, les récepteurs enclencheront diverses cascades de signalisations, via l'activation d'effecteurs spécifiques tels que des enzymes ou encore des canaux ioniques. Les RCPGs contrôlent plusieurs processus biologiques comme par exemple : la fonction cardiaque, l'olfaction, la vision, la perception de la douleur, le métabolisme et l'inflammation (105). Les différentes étapes d'activation et de signalisation des RCPGs sont résumées à la **figure 1.1**.

Les RCPGs signalent principalement via les protéines G hétérotrimériques qui leur sont associées. Il existe une grande variété de ces protéines G, soit 16 différentes sous-unités  $\alpha$ , 5 sous-unités  $G\beta$  distinctes et 12 protéines  $G\gamma$  (66). La communauté scientifique a tout d'abord cru que les RCPGs ne pouvaient que signaler via les protéines G. Maintenant, des évidences indiquent qu'il est possible d'activer des voies de signalisation fonctionnellement indépendante de

celles-ci. C'est le cas, entre autres, de la voie de signalisation JAK/STAT, qui est activée par le récepteur de la sérotonine 5-HT<sub>2A</sub>, sans l'aide des protéines G hétérotrimériques (61).



**Figure 1.1 : Modèle général des voies de signalisation des RCPGs** Suite à son activation par un ligand le RCPG subi un changement de conformation qui entraîne une activation de la protéine G $\alpha$  ce qui engendrera, dans certains cas, une dissociation des protéines G hétérotrimériques. Celles-ci vont à leur tour réguler des effecteurs et engendrer une cascade de signalisation ce qui provoquera l'apparition de seconds messagers à l'intérieur de la cellule. Ces seconds messagers vont à leur tour engendrer des phénomènes de signalisation ou modifier l'expression de gènes spécifiques (référence : (105))

### 1.1.1.2 Pertinence pharmacologique

Environ 50 % de médicaments qui se retrouvent actuellement sur le marché sont dirigés contre cette famille de récepteurs, ce qui en fait la plus importante cible pharmacologique (132). Il est à noter que le potentiel de développement de nouvelles stratégies thérapeutiques visant ces récepteurs est très élevé puisque seulement 10 % des 400 RCPGs non olfactifs ainsi que leur

voie de signalisation sont ciblés par les médicaments présentement en vente (48, 95).

Plusieurs maladies sont causées par un mauvais repliement, une altération dans la maturation ou encore dans l'acheminement de certains RCPG à la membrane plasmique (43). C'est le cas par exemple du diabète insipide néphrogénique. Cette maladie est causée par une séquestration des récepteurs de la vasopressine V2, qui sont mutés, dans le réticulum endoplasmique (RE) ce qui entraîne, à un certain point, leur dégradation. Des protéines chaperones ou encore de petits ligands sont capables de favoriser un repliement et une maturation adéquate des récepteurs de la vasopressine mutés et permettent leur expression à la membrane plasmique (11, 113). Les RCPGs jouent un rôle central dans les processus d'inflammation via des récepteurs comme celui du facteur activateur de plaquettes (PAFR). Le récepteur PAF, à lui seul, est impliqué dans plus d'une dizaine de pathologies. Il joue un rôle crucial dans la signalisation provoquée par la présence d'allergènes, pouvant entraîner des situations pathologiques telles que des crises d'asthme ou, dans le pire des cas, mener au choc anaphylactique (69). L'implication de ce récepteur dans les différents processus d'inflammation et aussi importante. Des études ont démontré qu'il pourrait jouer un rôle dans l'inflammation chronique causée par l'activation des macrophages (91) ou encore dans le cas du choc endotoxique (69).

Le besoin de mieux comprendre l'implication des RCPGs dans des processus biologiques centraux nécessaires au bon fonctionnement du corps humain en plus du rôle prépondérant qu'ils jouent chez plusieurs situations pathologiques explique le grand intérêt que leur porte la communauté scientifique.

## 1.1.2 Doctrines d'hier et d'aujourd'hui

### 1.1.2.1 *Formation du complexe de signalisation*

Les chercheurs ont longtemps pensé que le complexe de signalisation des RCPGs formé du récepteur, des protéines G hétérotrimériques ainsi que de l'effecteur, se formait de façon purement aléatoire (ce qui est vrai chez le système visuel des mammifères (5)). De plus en plus d'études tendent à démontrer que ce modèle ne s'applique pas à tous les RCPGs et qu'en fait, dans certains cas, ces complexes sont formés de manière coordonnée, et ce, bien avant d'atteindre la membrane plasmique. Un article publié par notre équipe en 2006, utilisant des mutants dominants négatifs des petites protéines G Rab et Sar1, montre que la dimérisation du récepteur ainsi que son association avec les protéines G $\beta\gamma$  prend place dans le RE. L'interaction de la protéine G $\alpha$  avec ce complexe a lieu lors du transit entre le RE et l'appareil de Golgi (44). Il est à noter que cette étude s'applique pour la synthèse *de novo* récepteurs. En ce qui concerne la reformation du complexe de signalisation formé des récepteurs, des protéines G et des effecteurs, suite à son recyclage, très peu d'informations sont disponibles.

Les interactions entre les protéines G et les RCPGs ne sont pas encore très bien caractérisées. Plusieurs études se contredisent sur ce sujet et la communauté scientifique n'est pas arrivée à un consensus en la matière. De nouvelles techniques ont été développées au cours des dernières années, afin de faciliter et d'accélérer la compréhension de ce phénomène. Ces techniques sont principalement des techniques de transfert d'énergie par résonance par exemple le BRET, le FRET et le BiFC. Ces techniques sont précises et permettent d'étudier les interactions protéines-protéines dans des cellules vivantes (pour plus d'information voir section 1.3.1) (64) (101) et ce, même en temps réel (52). Le modèle de base en ce qui a trait à l'activation des protéines G par les RCPGs, implique un changement de conformation transmis du récepteur (lors de sa stimulation par un agoniste) aux protéines G. Mais la nature exacte de ces

changements de conformation demeure encore inconnue. Un modèle où la liaison d'un agoniste au récepteur  $\alpha_2$ -adrenergique engendre un changement de conformation qui provoque une ouverture de l'interface entre  $G\alpha$  et  $G\beta\gamma$  sans provoquer leur dissociation a été développé par le groupe du Dr Bouvier (53). D'autres études suggèrent que les protéines hétérotrimériques se dissocient suite à la stimulation du RCPG, mais qu'il est aussi possible que certaines protéines G signalent sans dissociation physique (38). La signalisation par les protéines G est isoforme spécifique, ce qui signifie que certains effecteurs ne sont activés que par une famille particulière de protéines G hétérotrimériques. Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que la rapidité et la facilité avec laquelle la dissociation des protéines G hétérotrimériques est exécutée dépendent de l'isoforme de la protéine  $G\alpha$  présente (39).

Les sites de liaison des protéines G hétérotrimériques sur les RCPGs ne sont identifiés que chez quelques récepteurs. Par exemple, le site de liaison de la protéine  $G\alpha$  a été identifié chez le récepteur de la thromboxane  $A_2$  et se situe dans la troisième boucle intracellulaire (29). En ce qui a trait au site de liaison des protéines  $G\beta\gamma$ , il a été identifié chez le récepteur de la rhodopsine à la fin des années quatre-vingts (76, 126). Celui du récepteur muscarinique  $M_3$  se trouve dans la troisième boucle intracellulaire et correspond à la séquence FXXXXF. Cette séquence est située à proximité du site de phosphorylation de la kinase des RCPGs (GRK) : GRK2 (170). Il semble avoir une interrelation entre la liaison de protéines  $G\beta\gamma$  au récepteur et la phosphorylation de celui-ci par GRK2. Ce phénomène a été observé chez le récepteur muscarinique  $M_3$  (170), chez la rhodopsine (62) et chez le récepteur  $\beta_2$ -adénergique (80). Cependant, le rôle exact de cette interrelation n'a pas encore été déterminé.

### 1.1.2.2 *Liaison du ligand*

La liaison du ligand sur le RCPG est une étape clé dans la signalisation. Dans le modèle classique, suite à sa stimulation, un RCPG subit des changements de conformation, qui lui permettent de se lier avec les protéines G hétérotrimériques, entraînant l'activation de la protéine  $G\alpha$  par l'échange du GDP qui lui est rattaché pour un GTP (14, 150). Cet échange de nucléotides va entraîner une diminution de l'affinité de  $G\alpha$  pour le dimère  $G\beta\gamma$  (88) menant à la dissociation du complexe formé par le récepteur, les protéines  $G\beta\gamma$  et la protéine  $G\alpha$  (96). Des effecteurs spécifiquement activés par ces protéines G seront régulés. Ils vont ensuite engendrer une cascade de signalisation qui provoquera l'apparition de seconds messagers à l'intérieur de la cellule, tels que : l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc), le diacylglycérol (DAG), le  $Ca^{2+}$  (voir **figure 1.1**). Cette étape est en fait la réponse biologique à court terme. Ces seconds messagers vont à leur tour engendrer des phénomènes de signalisation ou modifier l'expression de gènes spécifiques (réponse biologique à long terme).

### 1.1.2.3 *Acheminement à la membrane plasmique*

Plusieurs études ont concentré leurs efforts dans la compréhension des processus impliqués au cours de la désensibilisation et de l'internalisation des RCPGs. Pendant ce temps, très peu d'attention a été portée à l'acheminement à la membrane plasmique des récepteurs nouvellement synthétisés. Quelques groupes se sont penchés sur cette question et ont découvert que l'oligomérisation des récepteurs pouvait jouer un rôle crucial au cours de cette étape (134). Pour plus d'information sur le sujet, vous référez à la section 1.1.2.5 sur l'oligomérisation.

D'autres mécanismes favorisant l'acheminement des RCPGs à la membrane plasmique ont aussi été identifiés, comme par exemple, les protéines RAMP (protéines qui modifient l'activité des récepteurs). Ces protéines

permettent en fait de réguler la liaison du ligand, la sélectivité et l'acheminement à la membrane plasmique via une association physique (43). Dans le cas du récepteur de la calcitonine CRLR, la protéine RAMP est nécessaire à son transport à la membrane plasmique (110). L'expression des protéines RAMP est limitée aux compartiments intracellulaires sauf lorsqu'elles se retrouvent associées avec un RCPG. Dans ces cas-là, les RAMP sont aptes à être co-acheminées à la membrane plasmique. Cette liaison des RAMP avec les RCPGs est un mécanisme permettant de contrôler la distribution cellulaire des RCPGs qui leur sont associés (30). La protéine DRiP78 (protéine interagissant avec le récepteur de la dopamine 78) joue elle aussi un rôle important dans l'acheminement de certains récepteurs à la membrane plasmique comme dans le cas du récepteur de la dopamine D1 (10) ou encore du récepteur de l'angiotensine II AT1 (94).

Il est important de souligner que des études ont démontré que certains RCPGs ne sont pas envoyés à la membrane plasmique, mais bien vers d'autres compartiments intracellulaires (revue en (13)). Il y a le RCPG orphelin 30 qui se situe au RE et qui est activé par les oestrogènes (135). De plus, plusieurs récepteurs sont dirigés à la membrane nucléaire, comme par exemple le récepteur PAFR (106), le récepteur du glutamate métabotrope MGluR5 (115) et le récepteur des prostaglandines (57).

#### *1.1.2.4 Signalisation*

Il existe de nombreux effecteurs pouvant être activés par les protéines G hétérotrimériques. Chaque protéine  $G\alpha$  est liée avec un ou des effecteurs particuliers et il en est de même pour les protéines  $G\beta\gamma$ . La **table I.I** présente une vue générale des différents effecteurs régulés par chacune des familles de  $G\alpha$ . La **table I.II**, quant à elle, présente les différents effecteurs régulés par les sous-unités  $\beta\gamma$ . De plus en plus d'études démontrent que les protéines  $G\beta\gamma$  contribuent

elles aussi à la signalisation des RCPGs en activant des effecteurs qui leur sont spécifiques (voir **table I.II**) (36-38). Il est à noter que la protéine  $G\beta$  est instable en absence de la protéine  $G\gamma$  et que ces deux protéines sont en fait considérées comme étant une seule entité (144).

Les effecteurs activés par les sous unités de  $G\alpha$  les plus connus sont sans doute l'adénylate cyclase (AC) (12, 155) et la phospholipase C (PLC). L'adénylate cyclase est activée par la sous unité  $G_{\alpha s}$  et son activation induit une production d'AMPc à l'intérieur de la cellule (140). Quant à elle, la phospholipase C lorsqu'activée par la sous unité  $G_{\alpha q}$ , permet l'hydrolyse du phosphatidylinositol-3-phosphate ( $PIP_3$ ) en inositol-3-phosphate ( $IP_3$ ) et en DAG (136). Plusieurs revues de la littérature sont disponibles sur le sujet (81, 109, 157).

Family	Subtype	Effector
$G_s$	$G\alpha_s(S)^\alpha$	↑ AC
	$G\alpha_s(L)^\alpha$	↑ GTPase of tubulin ↑ Src
	$G\alpha_{olf}$	↑ AC
$G_i$	$G_{i1}$	↓ AC
	$G_{i2}$	Rap 1 GAP
	$G_{i3}$	GRIN 1 and 2
	$G\alpha_{oA}^\alpha$	↑ GTPase of tubulin
	$G\alpha_{oB}^\alpha$	↑ src
	$G\alpha_z$	Ca <sup>2+</sup> and K <sup>+</sup> channels
	$G\alpha_{t1}$	↑ cGMP-PDE
	$G\alpha_{t2}$	
	$G\alpha_g$	Unknown
$G_q$	$G\alpha_q$	PLC $\beta$ s
	$G\alpha_{11}$	Bruton's tyrosine Kinase ( $G\alpha_q$ )
	$G\alpha_{14}$	
	$G\alpha_{15 \text{ or } 16}$	
$G_{12}$	$G\alpha_{12}$	↑ NHE-1 ↑ PLD
	$G\alpha_{13}$	↑ p115RhoGEF ↑ iNOS

**Table I.I : Effecteurs activés par les différentes isoformes de la protéine  $G\alpha$**   
(Adapté de (23))

Effector	Regulation
PLC $\beta$ s	Stimulation
AC I	Inhibition
AC II, IV and VII	Stimulation
K <sup>+</sup> channels (GIRK1, 2, 4)	Stimulation
Ca <sup>2+</sup> channels	Inhibition
G protein receptor kinase	Recrutement to membrane
PI <sub>3</sub> kinase	Stimulation
Bruton's tyrosine kinase	Stimulation
Tsk tyrosine kinase	Stimulation
Protein kinase D	Stimulation
Calmodulin	Inhibition of calmodulin kinase
Tubulin	Increased GTPase activity
Dynamin I	Increased GTPase activity
Shc phosphorylation	Indirect activation of MAPK (?)
Raf-1 protein kinase	Sequestration of G $\beta$ $\lambda$
Ras exchange factor	Indirect activation of MAPK (?)
KSR-1	Sequestration of G $\beta$ $\lambda$

**Table I.II : Effecteurs activés par les protéines G $\beta$  $\gamma$**  (Adapté de (23))

La voie de signalisation des kinases activées par des agents mitogéniques (MAPK) joue un rôle important dans la signalisation cellulaire. L'activation de cette voie de signalisation permet, entre autres, de contrôler la croissance, la prolifération, la différenciation cellulaire ainsi que l'apoptose (87, 121). De cette façon, les RCPGs permettent de réguler des processus biologiques importants qui permettront à la cellule de répondre aux changements présents dans son environnement. Il est possible de stimuler la voie des MAPKs via les protéines G $\beta$  $\gamma$ . Les protéines G $\beta$  $\gamma$  activeront la protéine Src, qui a son tour induira la voie de signalisation des tyrosines kinases, ce qui provoquera l'activation de la voie de signalisation de la protéine Ras (34, 103, 160). Les protéines G $\alpha$  peuvent elles aussi activer la voie des MAPKs. Dans le cas de G $\alpha$ i/o, l'activation de la voie des MAPKs peut se faire via la protéine kinase C (161). Pour ce qui est de la protéine G $\alpha$ q/11, l'activation de la voie des MAPKs survient de manière dépendante ou encore indépendante de la petite GTPase Ras (84). La protéine G $\alpha$ s, quant à elle, est apte à stimuler la voie des MAPKs en passant par l'accumulation d'AMPc ce

qui permettra à la protéine kinase A d'activer la petite protéine G Rap1 et ainsi d'induire la voie de signalisation (165).

Maintenant, de nombreuses évidences suggèrent que la protéine  $\beta$ -arrestine servirait de protéine d'échafaudage à cette voie de signalisation. Il serait donc possible de provoquer une deuxième vague de signalisation suite à l'internalisation des RCPGs (37, 102).

#### *1.1.2.5 Oligomérisation des récepteurs*

Maintenant, la communauté scientifique s'entend pour dire que les RCPGs existent sous la forme d'homo- et d'hétérodimère. Depuis la première étude démontrant l'existence de cette unité de signalisation au milieu des années 1990, plusieurs groupes se sont penchés sur le sujet. En fait, les équipes de chercheurs ont prouvé que ces homo- et hétérodimères jouent des rôles prépondérants lors de l'export des récepteurs à la membrane plasmique, en régulant la signalisation induite par le ligand, en augmentant la diversité pharmacologique, en modifiant la transduction du signal en plus d'avoir un impact sur l'internalisation de ces récepteurs (158) (voir **figure 1.2**). Il est à noter qu'au cours de la dernière décennie les chercheurs ont aussi identifié un nombre croissant, d'homo- et d'hétérodimères formés par les différents RCPGs. Les revues suivantes sont intéressantes pour avoir une vue d'ensemble sur tout le travail qui a été accompli par les différentes équipes de recherche (21, 104, 120, 158).

La dimérisation des récepteurs semble jouer un rôle dans la maturation des récepteurs en plus de permettre un repliement efficace des nouveaux récepteurs formés et de favoriser leur export du RE à la membrane plasmique (voir **figure 1.2**, section 1). Le premier cas d'hétérodimère obligé a été observé pour les récepteurs GABA(B)1 et GABA(B)2 (73, 75). En l'absence de GABA(B)2, le récepteur GABA(B)1 est retenu dans le RE par un motif RXR(R) présent sur sa

queue C-terminale. La formation d'un dimère composé d'un récepteur GABA(B)1 et d'un récepteur GABA(B)2 masque le motif présent sur GABA(B)1 et permet au dimère de récepteurs de quitter le RE et d'atteindre la membrane plasmique (24, 118). Des études ont aussi démontré que le récepteur GABA(B)1 est responsable de la liaison de l'agoniste tandis que le récepteur GABA(B)2 est, quant à lui, responsable de l'activation des protéines G hétérotrimériques (46, 54, 55).

Dans le cas du récepteur de l'hormone lutéinisante (LHR), son gène encode pour plusieurs acides ribonucléiques (ARN) messagers différents, dont une version tronquée du récepteur complet à laquelle il manque une partie de la queue C-terminale. La co-expression de la version complète et de la version tronquée du LHR modifie le comportement de la version complète du récepteur en le retenant dans le RE par les mécanismes de contrôle de qualité. Ces mécanismes de régulation permettent de contrôler la quantité et la qualité des récepteurs nouvellement synthétisés qui seront acheminés à la surface cellulaire (4).

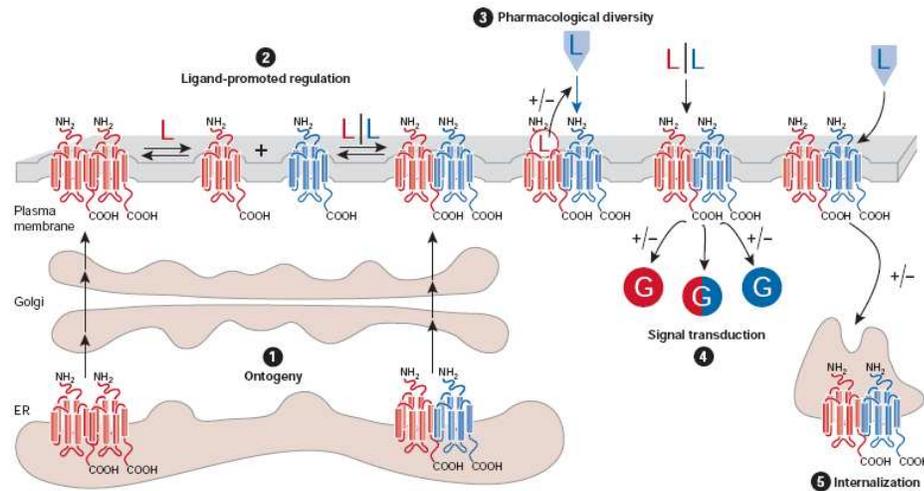
Les techniques de transfert d'énergie par résonance (RET) ont permis d'identifier un grand nombre d'homo- et d'hétérodimère. Une étude a répertorié la capacité des récepteurs CCR2 et CXCR4 à former des homodimères aussi bien que des hétérodimères. La liaison d'un ligand provoque un changement de conformation à l'intérieur même du dimère sans affecter pour autant la formation de nouveau dimère ou encore la dissociation de ceux existants. Ce phénomène semble donc être constitutif et ne requiert pas l'activation du récepteur pour prendre place (122), c'est le cas aussi de l'homodimère du récepteur  $\beta_2$ AR (3) (voir **figure 1.2**, section 2).

Dans certain cas d'hétérodimère, la liaison du ligand à un des récepteurs provoque un changement de conformation qui se propage d'un récepteur à l'autre et peut modifier la signalisation de ce second récepteur soit en augmentant,

diminuant la cascade de signalisation générée ou modifier la sélectivité des protéines G hétérotrimériques liées aux récepteurs (voir **figure 1.2**, section 3 et 4). C'est d'ailleurs ce qui est observé chez l'hétérodimère formé des récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergique et  $\mu$ -opioïde. La liaison de la morphine sur le récepteur  $\mu$ -opioïde provoque un changement de conformation qui inhibe la signalisation via la protéine  $G_{\alpha i}$  du récepteur  $\alpha_2$ -adrénergique (163). La dimérisation des RCPGs pourrait donc augmenter la diversité pharmacologique des récepteurs. De plus, ceci permet un contrôle plus précis dans la régulation de la réponse cellulaire déclenchée suite à un changement dans l'environnement cellulaire (104).

En fait, des études se basant sur les structures tridimensionnelles de la rhodopsine (119) et des protéines G hétérotrimériques (89), soulèvent l'hypothèse que le dimère de récepteurs pourrait en fait être l'unité de signalisation de base. Selon ces informations, deux RCPGs devraient être nécessaires à la liaison d'un seul trimère de protéines G. Il a été montré à l'aide de la méthode du BRET, que le récepteur muscarinique, l'unité de signalisation de base dans la cellule est composée d'homodimères de haute affinité pour les différentes isoformes M1, M2 ainsi que M3 MaChR (58).

La dimérisation des RCPGs peut aussi affecter la manière dont ils seront internalisés suite à leur stimulation par un agoniste (voir **figure 1.2**, section 5). En fait, des études ont démontré que chez plusieurs hétérodimères, la stimulation d'un seul récepteur était suffisante pour provoquer l'internalisation des deux récepteurs. C'est le cas, entre autres, du dimère formé des récepteurs  $\alpha_{2A}$ -AR et  $\beta_1$ AR. La stimulation de l'hétérodimère par un agoniste du récepteur  $\alpha_{2A}$ -AR entraîne l'internalisation du récepteur  $\beta_1$ AR (173).



**Figure 1.2 : Les rôles présumés jouer par la dimérisation des RCPGs** (1) Rôle dans la maturation des récepteurs en plus de permettre un repliement efficace des nouveaux récepteurs formés et de favoriser leur export du RE à la membrane plasmique (2) Régulation de la formation des homo- et hétérodimères par la présence du ligand (3) Une modification dans la signalisation des protéines G hétérotrimériques liées au dimère de RCPGs peut prendre place en modulant de manière positive ou négative la coopérativité de liaison du ligand (4) Soit en augmentant, en diminuant la cascade de signalisation générée ou en modifiant la sélectivité des protéines G hétérotrimériques liées aux récepteurs (5) Entraîner la co-internalisation des deux récepteurs impliqués dans le dimères même lors de la stimulation par un agoniste d'un seul des récepteurs (révisé dans l'article (158)).

#### 1.1.2.6 Internalisation des récepteurs

Suite à sa stimulation par un agoniste, le RCPG est phosphorylé par des GRKs (8) ou encore les protéines kinases A et C (176). La phosphorylation par les GRKs augmente l'affinité du RCPG pour la protéine  $\beta$ -arrestine. La liaison de la  $\beta$ -arrestine au récepteur empêche physiquement la liaison à celui-ci de protéines G additionnelles. Ceci entraîne la dissociation des protéines G liées au récepteur et atténue par conséquent toute signalisation subséquente par les protéines G (100). Ce phénomène, traduit par une diminution de la signalisation d'un RCPG via les protéines G suite à sa stimulation par un agoniste, se nomme

désensibilisation et permet d'empêcher une signalisation prolongée (pour revue sur le sujet voir : (168)).

Il existe plusieurs différentes isoformes de la  $\beta$ -arrestine, soit la  $\beta$ -arrestine 1, la  $\beta$ -arrestine 2, l'arrestine visuelle (de bâtonnets et de cônes) (114, 147). Les isoformes de la  $\beta$ -arrestine 1 (100) et 2 possèdent une très grande similarité de séquence et sont exprimées de façon ubiquitaire selon des proportions variables (6). Les isoformes de l'arrestine visuelle sont, quant à elles, principalement présentes dans la rétine (114, 147).

L'internalisation des RCPGs passe par l'interaction entre le récepteur phosphorylé et la protéine  $\beta$ -arrestine en permettant le recrutement de la clathrine, une protéine responsable de l'endocytose via les puits tapissés de clathrine (59). Par la suite, la protéine adaptatrice AP-2 est recrutée au complexe déjà formé entre le récepteur, la  $\beta$ -arrestine et la clathrine (90). Le mécanisme d'endocytose peut ensuite s'effectuer complètement grâce à la protéine GTPase ARF6 et à son facteur d'échange de guanine, ARNO (31). C'est l'interaction de toutes ces protéines qui permet l'internalisation du récepteur, qui se terminera soit par la dégradation de ce dernier ou son recyclage à la membrane plasmique, selon le cas (97).

Certains domaines intracellulaires (principalement reconnus pas des protéines kinases) présents sur le récepteur jouent aussi un rôle important dans sa désensibilisation. La séquestration de récepteurs à l'intérieur de la cellule ne dépend donc pas seulement des interactions entre le récepteur et la  $\beta$ -arrestine, mais aussi de domaines présents dans la région cytoplasmique et de l'orientation de ceux-ci (72).

Les RCPGs sont divisés en deux classes selon leur type d'interaction avec la  $\beta$ -arrestine. Pour ce qui est des récepteurs de classe A, dont fait partie le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique ( $\beta_2$ AR), c'est la  $\beta$ -arrestine 2 qui est principalement

responsable de la désensibilisation et par conséquent de l'internalisation du récepteur. L'interaction qui a lieu entre les récepteurs de classe A et la  $\beta$ -arrestine est temporaire. Par conséquent, l'endocytose via les puits tapissés de clathrine a lieu, puis le complexe formé entre la  $\beta$ -arrestine et la clathrine se dissocie. Ainsi, le récepteur se retrouve libre et est apte à être recyclé rapidement à la membrane plasmique. Le récepteur de l'angiotensine 1, quant à lui, fait partie de la classe B et possède une affinité équivalente pour la  $\beta$ -arrestine 1 et la  $\beta$ -arrestine 2. Aussi, cette affinité est plus importante que celle observée pour la classe A de récepteur. Ainsi, le récepteur est internalisé avec la protéine  $\beta$ -arrestine, ce qui ralentit la vitesse de retour de ce récepteur à la membrane plasmique (83, 116).

Beaucoup des informations répertoriées dans cette section de l'introduction semblent se contredire, mais elles sont à l'image des articles scientifiques de revues et de données qui sont disponibles. Il reste beaucoup à découvrir sur les RCPGs avant d'avoir complètement élucidé les mécanismes cellulaires impliqués.

## 1.2 Récepteurs

### 1.2.1 $\beta_2$ -adrénergique

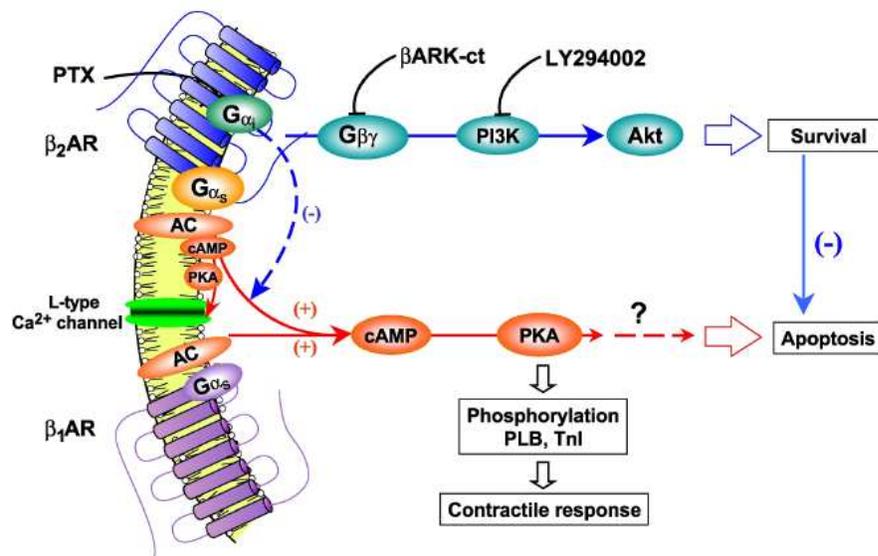
#### 1.2.1.1 *Pertinence biologique*

Les récepteurs adrénergiques sont stimulés par les catécholamines, soit l'adrénaline et la noradrénaline. Ils régulent plusieurs processus physiologiques comme la fréquence cardiaque, la force des contractions musculaires, le tonus des muscles lisses bronchiques et vasculaires, le métabolisme de l'énergie ainsi que l'activité du système nerveux central (172). Ils jouent aussi un rôle important dans plusieurs maladies telles que la défaillance cardiaque, qui peut être traitée en utilisant des bloqueurs de récepteurs  $\beta$ AR (revue en : (20, 47, 172)). L'asthme en est un autre exemple : les causes exactes de cette maladie sont inconnues dans la majorité des cas, mais des agonistes pour les récepteurs  $\beta_2$ AR sont utilisés pour traiter un patient qui en est atteint ou qui souffre d'obstruction chronique sévère. Les médicaments utilisés agissent en fait en stoppant la bronchoconstriction causée lors de la crise et en permettant ainsi à l'air d'atteindre les poumons (17). Les récepteurs adrénergiques sont divisés en deux familles principales, soit les récepteurs  $\alpha$  et  $\beta$ . Chacune de ces familles est ensuite divisée en sous-type correspondant à leur capacité relative d'activation par un ligand. Au total, la famille des récepteurs adrénergique compte neuf membres ( $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$ ,  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$ ,  $\alpha_{2C}$  et  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ) (22).

Le récepteur  $\beta_2$ AR est un RCPG prototypique : il est le deuxième récepteur étant le mieux caractérisé après la rhodopsine (149). C'est de ce récepteur qu'il sera discuté plus particulièrement au cours de cette section. Le gène encodant ce récepteur se trouve sur le chromosome 5 (82) et est largement exprimé dans le cœur et le tractus respiratoire (112).

### 1.2.1.2 Signalisation

L'activation du récepteur  $\beta_2$ AR par un agoniste va entraîner une signalisation via la sous-unité  $G_{\alpha_s}$ , qui couplée à l'adénylate cyclase, va permettre une augmentation importante de la quantité d'AMPc présente dans le cytosol. La protéine kinase A sera ainsi activée et pourra ensuite phosphoryler plusieurs protéines incluant le récepteur et permettre sa désensibilisation (137). Chez les cardiomyocytes, cette cascade de signalisation sera traduite par une réponse contractile de ces cellules (voir **figure 1.3**) (171). Dans le cas où le récepteur est stimulé par un agoniste inverse, c'est la sous-unité  $G_{\alpha_i}$  qui sera activée. Il s'en suivra une diminution du niveau basal de production d'AMPc et d'autres voies de signalisation, comme celles des MAPKs seront activées (voir **figure 1.3**) (35). Dans le cas des cardiomyocytes, cette cascade de signalisation sera traduite par une diminution de la réponse contractile (171). Une étude a démontré que la composition des sous-unités des protéines  $G\beta\gamma$  contribuerait directement à la spécificité de l'activation de la sous-unité  $G_{\alpha_s}$  engendrée par ce récepteur (85).



**Figure 1.3 : Voies de signalisations du récepteur  $\beta_2$ AR chez les cardiomyocytes** L'activation par un agoniste va engendrer une signalisation via la sous unité  $G_{\alpha s}$  ce qui activera l'AC et provoquera une augmentation de l'AMPc à l'intérieur de la cellule, puis une activation de la PKA et une contraction des cardiomyocytes. L'activation du récepteur  $\beta_2$ AR par un antagoniste inhibera l'AC ce qui diminuera la quantité d'AMPc et par conséquent la contraction des cardiomyocytes en plus d'activer la voie de signalisation de la PI3K via les protéines  $G\beta\gamma$  (171)

Le récepteur  $\beta_2$ AR contribue à divers aspects de la signalisation cellulaire. Dans certains cas, il a été trouvé qu'il peut jouer le rôle de protéine d'échafaudage qui permet de relier deux familles de canaux ioniques en un complexe de signalisation fonctionnel. Ceci permet de moduler le récepteur en plus de contrôler l'excitabilité de la membrane plasmique (99).

#### 1.2.1.3 Structure

Plusieurs études sur la dimérisation de ce récepteur ont été effectuées au cours de la dernière décennie. Un des premiers articles apportant des preuves substantielles de ce phénomène fut publié en 1996 par l'équipe du Dr Bouvier (65). Par la suite, plusieurs laboratoires publièrent sur le sujet. Certains soulignent le rôle que joue la dimérisation de  $\beta_2$ AR dans sa capacité à être exporté du RE et à atteindre la membrane plasmique (141). D'autres indiquent que des dimères et des oligomères sont détectés à la membrane plasmique et que la nature de ces complexes oligomériques diffère de celle des dimères. Les oligomères nécessitent la présence de ponts disulfides pour être stables dans la cellule, tandis que les dimères n'en ont pas besoin (142).

Le récepteur  $\beta_2$ AR a été cristallisé au cours de la dernière année par l'équipe du Dr Kobilka. Il est important de mentionner que la rhodopsine a été le premier RCGP cristallisé, (40) mais puisque ce récepteur fait classe à part dans plusieurs domaines, la cristallisation d'un autre RCPG, dit plus classique,

représente une étape importante dans l'étude et la compréhension de cette famille de récepteurs. Ces résultats reflètent une très grande avancée dans la recherche concernant les RCPGs et vont permettre d'élucider plusieurs des questions restées jusqu'ici sans réponses. L'équipe de Kobilka a réussi à cristalliser le récepteur lié à un agoniste inverse en utilisant un environnement lipidique. La structure des cristaux a pu être obtenue à une résolution variant entre 3.4 et 3.7 Å. La structure varie quelque peu de celle obtenue pour le récepteur de la rhodopsine principalement due à une plus faible force d'interaction entre la queue cytoplasmique et les domaines transmembranaires 3 et 6 (131). Le site de liaison du ligand est masqué par la deuxième boucle extracellulaire, qui est retenue dans cette cavité par deux ponts disulfure et un petit segment en hélice, ce qui en limite l'accessibilité (28). Les acides aminés régulant la fonction du récepteur sont reliés entre eux par un réseau de ponts hydrogènes et par un réseau de compactage. L'existence de ces réseaux pourrait suggérer une signalisation engendrée par un changement de conformation du récepteur, lors de liaison du ligand, qui serait transmis aux régions interagissant avec les protéines G hétérotrimériques (139).

### 1.2.2 Facteur activateur de plaquettes

#### 1.2.2.1 *Pertinence biologique*

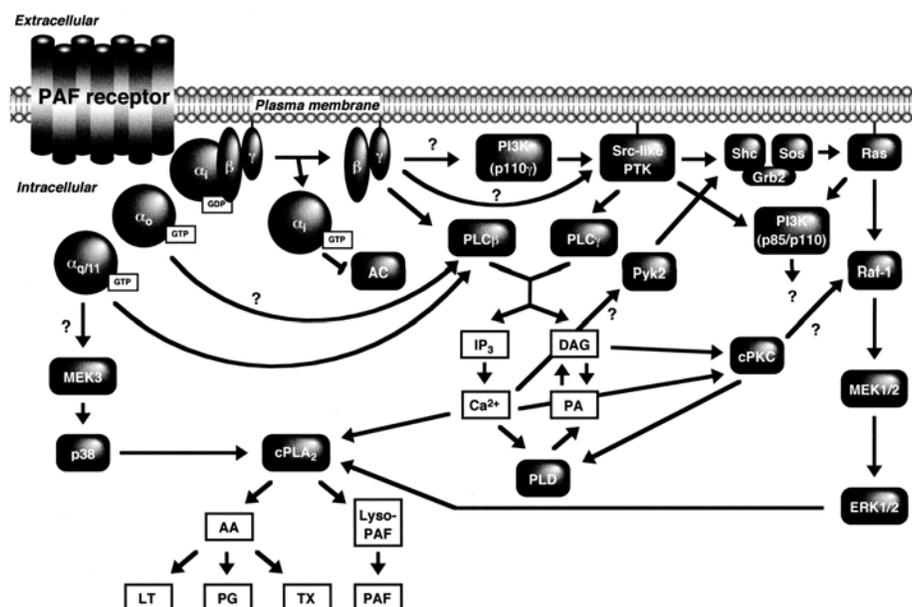
Le récepteur du facteur activateur de plaquettes communément appelé PAFR est activé par le facteur activateur de plaquettes (PAF), un phospholipide pro-inflammatoire, qui est produit par une grande variété de cellules tels les neutrophiles, les basophiles, les plaquettes, les macrophages et les cellules B (15, 19). Le récepteur PAF est exprimé dans les poumons, le placenta, les granulocytes différenciés HL-60 (175) ainsi que dans les cellules neuronales (177).

Ce facteur permet de réguler plusieurs processus biologiques reliés à l'inflammation et à la réponse immunitaire. De plus, il est impliqué dans certaines conditions pathologiques comme l'asthme, l'anaphylaxie, le psoriasis, le choc

endotoxique et l'inflammation causée par des allergènes (15, 69). Il a été démontré qu'il joue aussi un rôle au niveau des effets neuropathogéniques causés par le VIH (123)

#### 1.2.2.2 *Signalisation*

Le récepteur PAFR est couplé à *Gai* ainsi qu'à *Gaq*. Lorsque le récepteur signale via *Gai*, des signaux chimioattracteurs et régulateurs sont produits. Tandis que, lorsque le récepteur signale via la protéine *Gaq* (ou via la protéine *Gai*), il provoque l'hydrolyse du  $PIP_3$  (19). Ces mécanismes jouent un rôle important dans les processus de défense du corps humain. Ils permettent, entre autre, d'activer une cascade de signalisation qui permettra le recrutement des leucocytes aux sites de blessures. En fait, lorsque le facteur activateur de plaquette agit en tant que molécule pro-inflammatoire et qu'il est relâché dans le corps, il entraîne la migration des neutrophiles des vaisseaux sanguins vers le site infecté (en combinaison avec l'aide de l'interleukine-8 et des leukotriènes  $B_4$ ) (67, 111). La signalisation via PAFR passe par une grande variété de systèmes d'activation de seconds messagers tels que les phospholipases C et D (86, 98), menant au relâchement des stocks de calcium présents dans le réticulum endoplasmique. Suite à cette stimulation, la  $\beta$ -arrestine est recrutée très rapidement au récepteur (42), ce qui entraîne une désensibilisation de PAFR et permet l'activation du signalosome des p38 MAPK engendrant une réorganisation du cytosquelette d'actine (26, 111). L'activation de la voie de ERK1/2 MAPK par le récepteur PAF est indépendante de l'internalisation du récepteur, de sa trans-activation par le récepteur de la tyrosine kinase ou de l'activation des protéines G (27). La **figure 1.4** résume les différentes voies de signalisation énumérées ci-haut.



**Figure 1.4 : Voies de signalisation du récepteur PAF** Le récepteur PAF signale via les protéines G $\alpha_i$ , G $\alpha_o$  et G $\alpha_q$ . Sa stimulation provoque l'activation de la voie de MAPK, de la PI3K ainsi que la production de facteurs pro-inflammatoire et provoque ainsi une réponse inflammatoire ou immunitaire. Les points d'interrogation représentent les étapes de signalisation non caractérisées (Référence : (69))

Une revue très complète sur le sujet a été publiée en 2000 par le groupe de Shimizu (69). Il est à noter que plusieurs points d'interrogation demeurent au sein du schéma présenté à la **figure 1.4**. Des études plus poussées sur ce récepteur devront être conduites afin de mieux comprendre le récepteur PAF et par le fait même de mieux traiter les maladies engendrées par son mal fonctionnement.

### 1.2.3 Prostaglandines F

#### 1.2.3.1 Pertinence biologique

Le récepteur des prostaglandines F est aussi connu sous le nom de FP. Il fait partie de la famille des RCPGs, son ligand naturel est la prostaglandine F $2\alpha$

(PGF2 $\alpha$ ). Les prostanoïdes sont des dérivés de lipides générés par le métabolisme de l'acide arachidonique par la cyclooxygénase (COX). Le récepteur FP est couplé à la protéine G $\alpha$ q et permet donc d'augmenter la quantité de calcium intracellulaire (63).

Le récepteur FP joue des rôles particulièrement importants dans la normalisation de la pression intraoculaire, dans la fonction rénale, dans la régulation des menstruations ainsi que lors de l'accouchement (63). Il est exprimé en très grande quantité dans le tubule distal rénal où il joue un rôle dans le transport du sel (16). Des analogues de la prostaglandine F sont utilisés dans le traitement du glaucome pour diminuer la pression intraoculaire (68, 154).

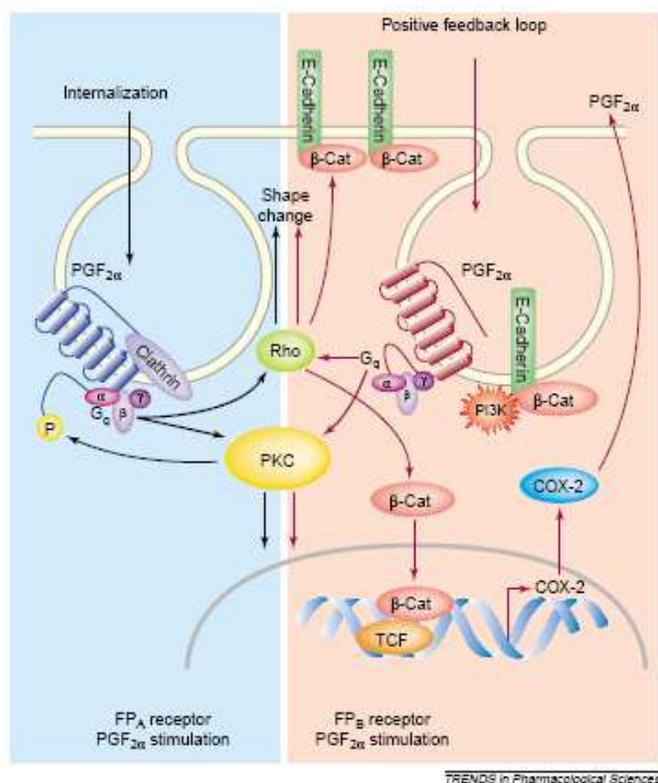
Le PGF2 $\alpha$  est sécrété au cours du cycle menstruel par l'endomètre et joue un rôle critique dans la reproduction des mammifères (1). Leur implication dans le travail au cours de l'accouchement est aussi très importante. En fait, au cours de la grossesse la quantité de récepteurs FP diminue d'environ 45 %, ce qui permet une relaxation du muscle myométrial (107). La quantité de récepteurs augmente quand le temps du travail est venu, ce qui induit une contraction de l'utérus (18). En absence de récepteur FP, l'accouchement n'a pas lieu (153). Plusieurs évidences suggèrent que le récepteur FP pourrait jouer un rôle au cours de l'accouchement prématuré et des chercheurs tentent de savoir s'il est possible de retarder l'accouchement en bloquant la signalisation de ce récepteur à l'aide d'inhibiteurs (117).

#### *1.2.3.2 Signalisation*

Certaines études suggèrent l'existence de voies de signalisation régulées par la petite protéine G Rho de façon dépendante ou parfois indépendante de la protéine kinase C. Dans le cas de la stimulation indépendante de la protéine kinase C, un réarrangement du cytosquelette d'actine en plus de la formation des

fibres de stress est observé (129). Chez les bovins, il existe deux isoformes d'épissage du récepteur, le FP(A) possède une queue C-terminale plus longue de 46 acides aminés que le FP(B). Ce dernier possède une queue C-terminale plus petite et ayant les 9 derniers acides aminés différents de ceux du FP(A) (128).

Ces deux récepteurs semblent signaler de manière semblable, mais c'est au niveau de la désensibilisation que des différences sont observées (voir **figure 1.5**) (51). Le récepteur FP(B) subit une internalisation constitutive complètement indépendante de sa stimulation par un agoniste; tandis que FP(A) est internalisé via les vésicules de clathrines suite à sa stimulation par  $\text{PGF}_{2\alpha}$  et à sa phosphorylation par la protéine kinase C (148). Le récepteur FP(B) active la voie de signalisation du facteur des cellules T (TCF) et de la  $\beta$ -caténine. Le rôle exact de cette dernière molécule n'est pas encore déterminé, mais il pourrait y avoir des implications dans le développement du cancer du côlon (49).



**Figure 1.5 : Voies de signalisation suivant la stimulation par un agoniste des récepteurs FP(A) et FP(B) chez le bovin** Dans la section de gauche : L'activation du récepteur FP(A) via PGF2 $\alpha$ . Suite à son activation, FP(A) est phosphorylé par la PKC et est internalisé via des vésicules de clathrine. Puis il active la petite protéine Rho et cause un réarrangement du cytosquelette d'actine. Dans la section de droite : L'activation du récepteur FP(B) via PGF2 $\alpha$ . Suite à son activation FP(B) active la voie de signalisation du facteur des cellules T (TCF) et de la  $\beta$ -caténine ce qui entraîne l'expression du gène de la COX-2 (50)

### 1.3 Outils utilisés pour l'étude des interactions protéines/protéines

#### 1.3.1 Méthodes générales

Plusieurs types d'essais ont été développés par la communauté scientifique afin de pouvoir mieux étudier les complexes protéiques et de déterminer quels sont les différents partenaires qui sont impliqués dans les voies de signalisation. La méthode de co-immunoprécipitation en fait partie. C'est un essai *in vitro* qui est en fait très sélectif et permet de séparer des complexes de protéines des autres protéines environnantes. L'avantage principal de cette technique est qu'elle peut être effectuée sur des cellules non transfectées, donc sur des protéines endogènes. De plus, l'interaction entre les deux protéines prend place dans un contexte cellulaire et non *in vitro*. Par contre, l'interaction détectée n'est pas nécessairement directe entre les deux protéines étudiées, elles peuvent faire partie d'un plus grand complexe protéique. Aussi, les techniques de solubilisation ou d'isolation des membranes plasmiques utilisées lors de l'expérience peuvent détruire des interactions protéiques plus faibles, qui ne seront par conséquent pas détectées. Il est aussi possible que de nouvelles interactions soient créées lors de cette étape engendrant ainsi des artefacts (pour des revues de la littérature à ce sujet voir les références : (9, 64, 127)).

La technique de microscopie confocale est elle aussi très utilisée et permet d'étudier les protéines dans leur environnement naturel, c'est-à-dire à l'intérieur même de la cellule. De nos jours, les microscopes sont très performants et peuvent servir à imager les protéines en temps réel. Elle permet en fait de voir si deux protéines co-localisent l'une avec l'autre (ce qui pourrait suggérer que les deux protéines interagissent ensemble). Par contre, rien ne peut affirmer avec certitude que les protéines interagissent bel et bien ensemble. Il est donc important d'effectuer les bons contrôles pour chacune des expériences réalisées.

Des techniques de transfert d'énergie par résonance, comme par exemple le BRET et le FRET, ont été développées et sont utilisées depuis plusieurs années dans le but d'étudier les interactions entre deux protéines dans des cellules vivantes. Ces techniques permettent entre autres de caractériser de façon dynamique des voies de signalisation, et ce, dans des conditions physiologiques. Une description détaillée de ces techniques est présentée aux sections 1.3.2 et 1.3.3. Ce qui permet donc de résoudre certains des problèmes rencontrés avec les méthodes de co-immunoprécipitation et de microscopie confocale. Par contre, ces techniques possèdent elles aussi leur inconvénient, c'est pourquoi il est important de prouver à l'aide d'au moins deux méthodes différentes que l'interaction observée est bel et bien réelle.

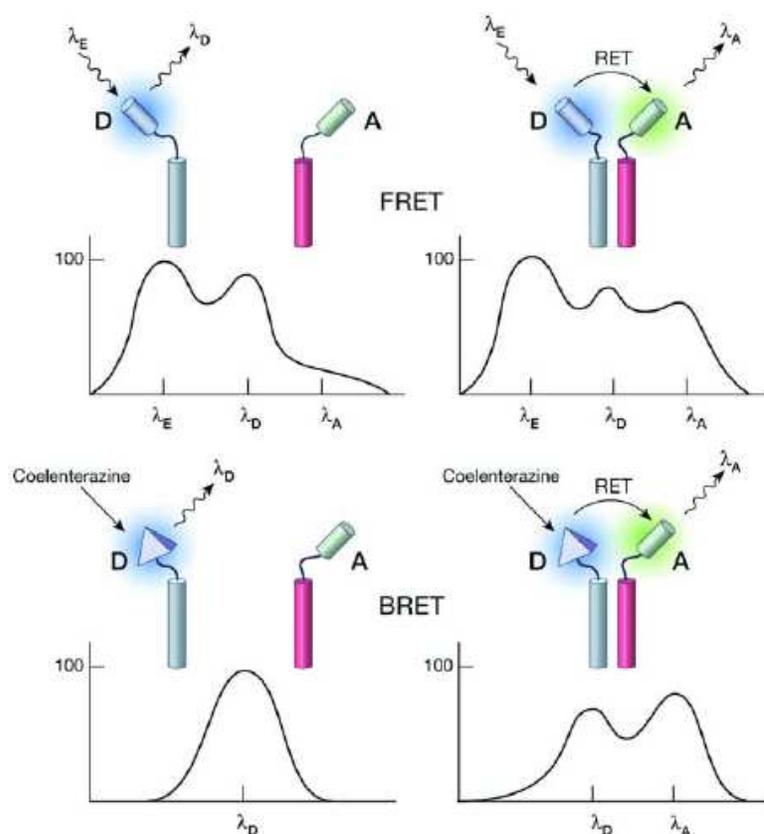
### 1.3.2 Transfert d'énergie par résonance

#### 1.3.2.1 *FRET*

La première technique de transfert d'énergie par résonance qui fut utilisée est celle du FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) qui se base sur le transfert d'énergie entre deux fluorophores, un donneur et l'autre accepteur d'énergie (71). Les études d'interaction protéine-protéine utilisant la technique de FRET peuvent être réalisées de deux manières différentes, soit en utilisant des anticorps dirigés contre les protéines à étudier qui sont couplés à des fluorophores ou encore en utilisant des protéines de fusion (124). Le spectre d'émission du donneur doit se superposer au spectre d'excitation de l'accepteur. Si les deux fluorophores se retrouvent à une distance inférieure à 100 Å l'un de l'autre, un transfert d'énergie non radiative via une interaction dipôle-dipôle aura lieu entre le donneur et l'accepteur. Ce transfert d'énergie, engendré par l'excitation du donneur, permettra d'exciter l'accepteur, qui à son tour sera capable d'émettre à une longueur d'onde qui lui est propre (revue en (70, 145)). Si les deux protéines se retrouvent à une distance supérieure à 100 Å, le transfert d'énergie entre le donneur et l'accepteur n'a pas lieu, ainsi aucune émission provenant de

l'accepteur n'est détectée (voir **figure 1.6**). L'efficacité du transfert d'énergie est proportionnelle à l'inverse de la puissance six de la distance moléculaire entre le donneur et l'accepteur (151, 152). L'orientation du donneur et de l'accepteur l'un par rapport à l'autre va aussi affecter le transfert d'énergie. Il est donc possible de détecter des changements de conformation entre les deux protéines par des modifications dans les ratios obtenus (64). Comme l'orientation du donneur et de l'accepteur joue un rôle crucial lors du transfert d'énergie, il est possible que deux protéines interagissent ensemble, mais que les fluorophores ne soient pas orientés de façon à favoriser ce transfert d'énergie. Cette situation entraîne une mauvaise analyse des résultats et nous nous trouvons en présence d'un faux négatif.

Le choix des couples de fluorophores qui seront utilisés au cours de l'expérience est primordial. En fait, ceci est l'étape clé dans la réussite de l'expérience. Plusieurs critères de sélection doivent être pris en considération comme par exemple : l'expression, la luminosité, la photostabilité et l'oligomérisation (à éviter) de la protéine fluorescente utilisée. L'environnement ne devrait pas non plus affecter le comportement de cette protéine. De plus, la combinaison des deux protéines utilisées pour l'expérience devrait être choisie en fonction d'un « crosstalk » minimal entre leurs canaux d'émission et d'excitation (146).



**Figure 1. 6 : Schéma représentant les réactions de FRET et de BRET** Dans le cas du FRET, une excitation par une source lumineuse (de longueur d'onde appropriée) est nécessaire à l'excitation du donneur (D). Si D est à une distance inférieure à 100 Å de l'accepteur (A) un transfert d'énergie non radiative aura lieu entre D et A. Si la distance qui sépare les deux protéines est supérieure à 100 Å aucun transfert d'énergie n'aura lieu. Dans le cas du BRET le D est une protéine bioluminescente, la luciférase et c'est l'oxydation de son substrat qui permettra de produire l'énergie qui sera transférée entre le donneur et l'accepteur (64)

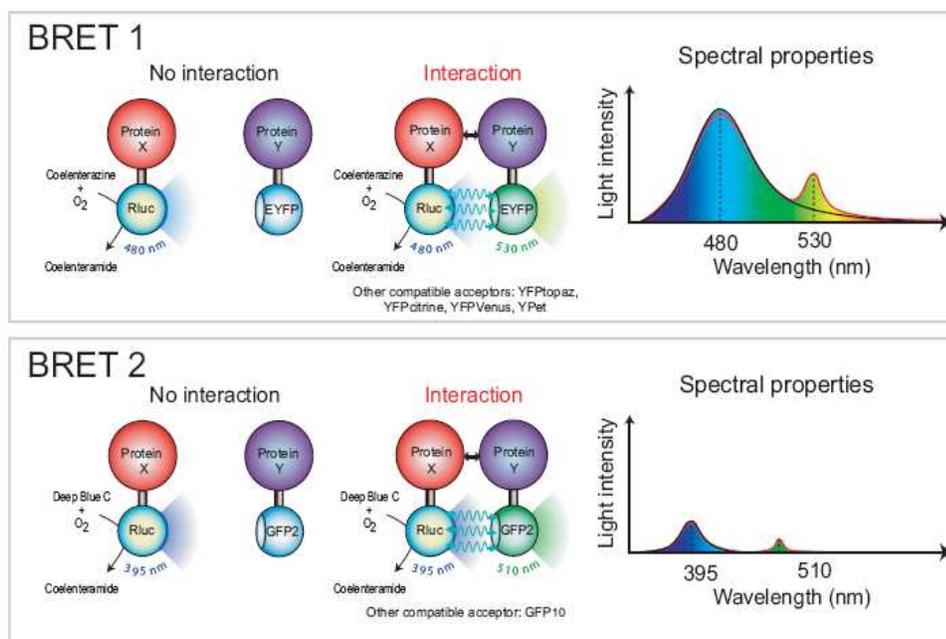
### 1.3.2.2 BRET

C'est en 1999 que le BRET (*Bioluminescence resonance energy transfer*) fut pour la première fois utilisé pour l'étude d'interaction protéine-protéine chez les bactéries (174). Ce fut un an plus tard que le laboratoire du Dr Michel Bouvier

reprit cette technique et l'appliqua à l'étude des RCPGs, en étudiant la formation d'homodimère du récepteur  $\beta_2$ AR (3).

La technique du BRET est basée sur les mêmes principes que le FRET, mais le donneur (le fluorophore) est remplacé par une protéine bioluminescente, comme par exemple la luciférase. La luciférase catalyse l'oxydation d'un substrat ce qui engendre la production de bioluminescence (revue en : (60, 167)). C'est cette lumière qui produit l'énergie transférée entre le donneur et l'accepteur via l'interaction dipôle-dipôle. Il existe deux substrats différents de la *Rénilla* luciférase (*RLuc*) couramment utilisés pour les expériences de BRET : la Coelenterazine H, qui a un maximum d'excitation situé à 475 nm et qui est employée dans les expériences de BRET<sup>1</sup> et le DeepBlue C (ou la Coelenterazine 400 A) qui a un maximum d'excitation de 400 nm et qui est utilisée pour les expériences de BRET<sup>2</sup> (consulter **figure 1.7** et revues de la littérature en : (7, 64)). Dans ce cas-ci, le donneur est donc une protéine de fusion couplée à la luciférase tandis que l'accepteur peut être soit une protéine de fusion, ou encore un anticorps dirigé contre la protéine à étudier couplé à un fluorophore, comme dans le cas du FRET.

Chacun des types de BRET décrits précédemment possède ses avantages. Par exemple, le BRET<sup>2</sup> présente une meilleure séparation entre les pics d'émission du donneur et de l'accepteur ce qui permet de diminuer le bruit de fond. Cependant, le substrat utilisé lors des essais de BRET<sup>2</sup> s'oxyde très rapidement, il est donc difficile d'effectuer plusieurs échantillons à la fois et le signal obtenu est de plus faible intensité. Tandis que pour les expériences de BRET<sup>1</sup>, le substrat employé ne s'oxyde pas très rapidement et les ratios produits sont stables sur une plus longue période (jusqu'à une heure) (7, 64, 125).



**Figure 1. 7 : Différence entre les techniques de BRET<sup>1</sup> et de BRET<sup>2</sup>** Dans le cas du BRET<sup>1</sup> c'est la Coelenterazine H, qui possède un maximum d'excitation de 475 nm, qui est utilisée. Suite à l'oxydation du substrat par la RLuc, il y aura production de bioluminescence. Cette lumière produira l'énergie qui sera transférée via une interaction dipôle-dipôle du donneur à l'accepteur. L'accepteur est en général la protéine GFP ou encore la protéine Venus le signal d'émission captée se situe autour de 530 nm. Dans le cas du BRET<sup>2</sup> c'est la Deep Blue C (ou la Coelenterazine 400A), qui possède un maximum d'excitation de 400 nm, qui est utilisée. Suite à l'oxydation du substrat par la RLuc, il y aura production de bioluminescence. Cette lumière produira l'énergie qui sera transférée via une interaction dipôle-dipôle du donneur à l'accepteur. L'accepteur est en général la protéine GFP10 qui émet à une longueur d'onde située autour de 510 nm. Il est à noter que si les deux protéines d'intérêts ne se retrouvent pas à une distance inférieure à 100 Å l'une de l'autre, le transfert d'énergie n'aura pas lieu et aucun signal de BRET ne sera détecté. Ceci s'applique tant au BRET<sup>1</sup> qu'au BRET<sup>2</sup> (Référence : (7)).

Les techniques de BRET et de FRET ont chacune leurs avantages. L'avantage majeur du FRET est qu'il permet d'étudier les interactions protéine-protéine au niveau sub-cellulaire et ce, dans une cellule vivante, à l'aide d'un microscope (169). Comme la fluorescence émise par un laser est en général supérieure à la luminescence, la résolution spatiale est plus claire dans les essais

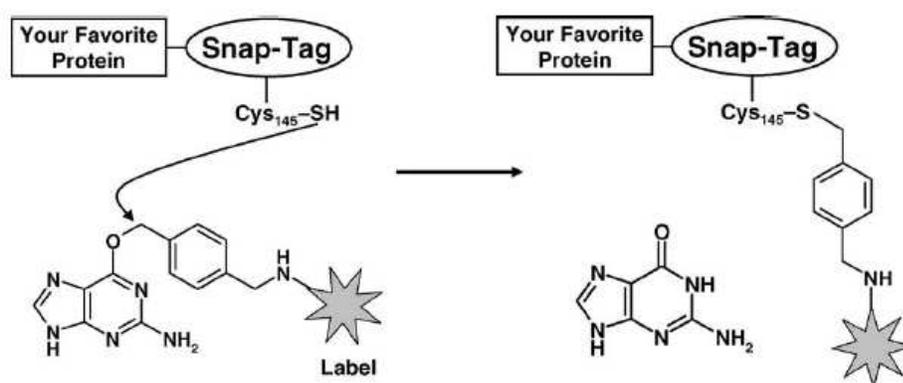
de FRET que dans ceux de BRET (130). Il est à noter qu'une étude récente, utilisant le BRET comme technique, a montré qu'il était possible de faire de l'imagerie par microscopie dans une cellule vivante ou encore dans un petit organisme vivant (36). Le principal avantage du BRET par rapport au FRET est que le donneur n'a pas besoin d'être excité par une source de lumière monochromatique. L'utilisation de cette source lumineuse peut entraîner l'excitation de l'accepteur et complique donc l'interprétation des résultats, en plus d'engendrer des phénomènes comme l'autofluorescence des cellules ainsi que le « photobleaching » (7). De plus, le ratio signal/bruit est plus élevé dans les expériences de BRET, puisque l'autoluminescence des cellules est généralement très faible (130). Le BRET permet aussi d'effectuer des études *in vivo* en temps réel (52). Le BRET est donc une technique polyvalente dans l'étude des interactions dynamiques entre les protéines dans un contexte cellulaire (7, 64).

Au cours des années, les techniques de RET devinrent populaires et sont maintenant de plus en plus acceptées par la communauté scientifique. Cependant, comme toutes les techniques, elles possèdent leurs inconvénients et les résultats obtenus peuvent être engendrés par des artefacts. Afin d'éviter ce phénomène, il est crucial de choisir les bons contrôles négatifs, d'effectuer des essais de compétition avec des récepteurs non étiquetés et de produire des courbes de saturation (7).

### 1.3.3 L'étiquette SNAP

L'étiquette SNAP est une nouvelle technologie développée par la compagnie Covalys. Cette étiquette est, en fait, basé sur l'acylguanine-ADN-acyltransférase (AGT) humaine. L'AGT est une protéine nucléaire permettant de réparer les brins d'ADN alkylés, ce n'est pas une enzyme, mais la réaction est effectuée une seule fois, de manière covalente et est irréversible en conditions physiologiques. L'étiquette SNAP, qui a un poids moléculaire de 22 kDa, est une

AGT qui a été modifiée de façon à ne plus avoir de localisation préférentielle au noyau, à ne plus interagir avec l'ADN et qui possède une réactivité augmentée pour les substrats de faible poids moléculaire (74, 79, 130, 159). Les substrats développés par la compagnie Covalys sont liés avec le 6-benzylguanine (BG), qui a la capacité d'interagir chimiquement avec l'AGT modifiée ce qui permet de lier de manière covalente un substrat à l'étiquette SNAP. Pour plus de détails concernant la réaction chimique, voir **figure 1.8**. Des études ont démontré que l'efficacité de réactivité entre le BG et l'étiquette SNAP n'est pas affectée par la nature du substrat relié à ce BG et que cette technique peut être réalisée dans différents organismes tels les bactéries, les levures et les cellules de mammifères (dépendamment de la perméabilité du substrat aux différentes membranes) (78).



**Figure 1.8 : Réaction chimique entre l'étiquette SNAP et son substrat BG** La cystéine 145 réagit avec le substrat 6-benzylguanine. Ce qui engendre la production d'une guanine libre ainsi que d'un dérivé benzyle du marqueur attaché par une liaison covalente à l'étiquette SNAP (159)

L'avantage le plus important de la technologie SNAP est qu'elle permet de marquer la même construction avec des substrats différents. De cette façon, il est possible de cloner une seule protéine qui sera ensuite marquée avec des fluorophores de couleurs différentes (77). Certains des fluorophores disponibles

sont perméables à la membrane plasmique tandis que d'autres ne le sont pas. Ainsi, les protéines intra- et extracellulaires peuvent être marquées de façon différentielle. Par conséquent, il est possible d'étudier les récepteurs dans le temps et dans l'espace lorsqu'ils transitent dans la cellule, d'étudier la synthèse *de novo* récepteur ainsi que l'internalisation engendrée par des agonistes et ce pendant plusieurs heures (79).

De plus, l'étiquette SNAP peut être utilisée lors d'essais de co-purification. Dans ce cas-là, c'est le substrat BG-biotine qui est employé. Des billes de streptavidine permettront de récupérer la protéine SNAP-biotine ainsi que les protéines qui interagissent avec celle-ci. Ce substrat biotine peut aussi servir à purifier la protéine SNAP. La protéine pure pourra ensuite être utilisée lors d'études de protéomique. Il est à noter qu'il existe un substrat permettant de détecter les protéines directement dans un gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) sans avoir à faire de transfert sur une membrane de nitrocellulose et sans l'utilisation d'anticorps (159). La liste complète des substrats BG est disponible sur le site Internet de la compagnie Covalys : [www.covalys.com](http://www.covalys.com).

En résumé, l'étiquette SNAP est très utile puisqu'elle permet de marquer la même construction avec différents substrats, ce qui la rend très polyvalente et diminue le nombre de constructions à générer. Par contre, c'est une étiquette de grande dimension (22 kDa) qui peut affecter le comportement naturel de la protéine marquée et qui nécessite de travailler en surexpression (avec des cellules transfectées). De plus, il est impossible de marquer différemment deux constructions distinctes dans la même cellule.

## 1.4 Hypothèse et objectifs

### 1.4.1 Développement d'un outil multi-stratégique pour les études des interactions protéines-protéines

La caractérisation complète des voies de signalisation des RCPGs sera cruciale dans le développement de la prochaine génération de cibles thérapeutiques. Il semble qu'en plus de cibler le site de liaison du ligand, situé à la membrane plasmique, il serait important de penser à cerner les récepteurs sur d'autres compartiments membranaires. Pour ce faire, les interactions menant à la formation des complexes de signalisation doivent être considérées comme de nouvelles approches dans le design et la génération de thérapies ayant moins d'effets secondaires (132). Des études récentes ont démontré que le complexe primaire de signalisation des RCPGs peut se former avant que chacune de ses composantes individuelles ne soit acheminée à leurs sites d'action. La formation du complexe semble prendre place au cours de la biosynthèse des protéines impliquées et des évidences suggèrent qu'il est même formé dans des compartiments membranaires internes comme le réticulum endoplasmique (44). Cependant, pour atteindre cet objectif, il est important de mieux comprendre comment l'assemblage et l'acheminement de ces complexes prennent place dans une cellule vivante.

Plusieurs outils ont été développés, afin de faciliter l'étude de la formation de ces complexes de signalisations. Ces derniers sont basés sur des étiquettes d'affinités et des épitopes qui permettent ainsi l'identification et la purification des protéines impliquées. De plus grandes étiquettes ont aussi été développées pour des stratégies d'imagerie telles que le BRET et le FRET. Un outil multifonctionnel, fondé sur une seule étiquette, ayant la capacité d'être utilisé au cours de différentes expériences, pourrait grandement faciliter et accélérer ces études. L'étiquette SNAP est possiblement le candidat idéal puisque grâce à sa polyvalence, il peut être employé dans une très grande variété d'expériences telles

que le FRET, le BRET, l'imagerie par microscopie confocale ou encore la purification de protéines. Une construction du récepteur  $\beta_2$ AR possédant une étiquette SNAP en C-terminal a été réalisée (HA- $\beta_2$ AR-SNAP). Plusieurs études ont été réalisées afin de s'assurer que son expression, sa capacité à lier un ligand, à atteindre la membrane plasmique et à homodimériser n'est pas altérée. L'aptitude de cette construction à agir en tant qu'accepteur de BRET lorsque utilisée en combinaison avec les substrats appropriés est analysée dans ce mémoire.

#### 1.4.2 Optimisation des outils pour le criblage des nouveaux ligands pour les récepteurs PAF et FP

Certains récepteurs, tels que le FP et le PAF jouent des rôles importants dans la fonction biologique chez l'homme et peuvent être impliqués dans certaines pathologies comme l'accouchement prématuré (FP), l'asthme (PAFR) et l'inflammation due à la présence d'allergènes (PAFR). Les complexes de signalisation de ces récepteurs sont peu ou pas caractérisés. Afin de trouver des traitements novateurs entraînant moins d'effets indésirables que ceux actuellement présents sur le marché, il est important de comprendre le fonctionnement de base de ces récepteurs. Dans le but de mieux définir les complexes de signalisations impliqués, des études sur les interactions entre les protéines G et le récepteur seront réalisées à l'aide de la technologie du BRET. La capacité de ces récepteurs à homodimériser ainsi qu'à hétérodimériser sera elle aussi étudiée à l'aide du BRET. Ces informations pourront par la suite être utilisées dans le développement de nouveaux ligands ainsi que dans le traitement de plusieurs maladies générées par ces récepteurs.

## 2 Matériel et Méthodes :

### 2.1 Anticorps et réactifs

#### 2.1.1 Construction d'ADN complémentaire

Les étiquettes provenant des vecteurs de : *Renilla* luciférase- (Rluc), protéine fluorescente verte 10 (GFP10)- (BRET<sup>2</sup>), protéine fluorescente verte augmentée (eGFP)- (BRET<sup>1</sup>) (Perkin-Elmer Life Analytical and Sciences), Venus- (Laboratoire Dr Michel Bouvier) (43, 45, 133) ou SNAP- (vecteur pSEMS1-25m (Covalys)) ont été utilisés afin d'obtenir des constructions de différents acides désoxyribonucléiques (ADN) complémentaires (ADNc).

#### 2.1.2 Réactifs de culture cellulaire, transfection et préparation des cellules

Milieu de culture Dulbecco's modified Eagle's medium 1 x (DMEM, Gibco, Invitrogen) avec une teneur élevée en glucose comprenant soit : 10 % de sérum fœtal bovin (FBS) (HyClone, TekniScience et Fisher Scientific) ainsi que 100 U/ml et 100 µg/ml de Penicillin/Streptomycin (Gibco, Invitrogen) respectivement ou 2.5 % de FBS ou sans aucun FBS. Agent chimique de transfection : polyéthylèneimine (PEI) (Polyscience, Cedarlane) dissout dans l'eau à une concentration de 1 mg/mL. Cellules embryonnaires de reins humaines 293 à croissance rapide (HEK 293) (HEK-293-F, Invitrogen). Tampon salin à base de phosphate (PBS) 1 x fait à partir d'une solution stock de 10 x : 1.37 M NaCl, 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 26.8 mM KCl, 17.6 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma) à pH 7.4 et autoclavé. Ces solutions sont conservées à la température de la pièce (TP).

### 2.1.3 Anticorps primaires

L'anticorps monoclonal dirigé contre l'étiquette hémagglutinine (HA) a été obtenu de la compagnie Covance, celui dirigé contre l'étiquette RLuc a été obtenu de la compagnie Chemicon. L'anticorps polyclonal dirigé contre les protéines kinases activées par un signal extracellulaire (ERK) phosphorylées (anti-phospho ERK, p44/42) provient de la compagnie Cell Signaling et celui contre le total ERK, vient du laboratoire du Dr Bruce G. Allen.

### 2.1.4 Anticorps secondaires

Des anticorps secondaires de souris et de lapin couplés à l'enzyme peroxydase de raifort (HRP) ainsi que les billes d'agaroses couplées à des anti-immunoglobulines (IgG) de souris ont été obtenues de la compagnie Sigma. L'anticorps secondaire de souris couplé au fluorophore Alexa 555 a, quant à lui, été obtenu de la compagnie Invitrogen.

### 2.1.5 Substrat 6-benzylguanine

Le substrat BG-430 (Covalys) a été dissous dans du dimethyl sulfoxyde (DMSO) (Sigma) à une concentration finale de 1 mM et a été conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$  en étant protégé de la lumière (cette solution devrait être stable pour une période de 6 mois). La solution de travail, d'une concentration variant entre 0.5 et 5  $\mu\text{M}$  a, quant à elle, été préparée dans du DMEM contenant 10 % de FBS (la solution de substrat BG diluée devrait être utilisée dans l'heure suivant sa préparation et protégée de la lumière).

### 2.1.6 BRET

L'instrument Fusion de la compagnie Packard (Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences), utilisant des filtres d'émissions de type "band pass" de 410/80 nm (RLuc) et 515/35 nm (GFP10) pour les expériences de BRET<sup>2</sup> ainsi que des filtres d'émissions de 450/58 nm (RLuc) et de 480/LP nm (eGFP) pour les expériences de BRET<sup>1</sup> ont été utilisés. Afin de contrôler la fluorescence, les filtres d'excitations de 425/20 nm (BRET<sup>2</sup>) ou de 475/20 nm (BRET<sup>1</sup>) et le filtre d'émission de 515/35 nm (BRET<sup>2</sup> et BRET<sup>1</sup>) devraient être utilisés. Le filtre d'excitation de 425/30 nm et celui d'émission de 480/LP nm ont été utilisés pour les lectures de la fluorescence des échantillons SNAP. Pour les expériences de BRET-SNAP, les filtres d'émissions 410/80 nm et 480/LP nm (BG-430) ont été utilisés. Des microplaques 96-puits blanches (optiplate blanche; Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences), la Coelenterazine 400 A (Biotium, 1 mM) pour les expériences de BRET<sup>2</sup> ainsi que celles utilisant le BG-430 et la Coelenterazine H (Molecular Probe, 1 mg/ml) pour les expériences de BRET<sup>1</sup> (ces poudres sont reconstituées dans de l'éthanol 100 % et conservés à - 20 °C, en petits aliquots protégés de la lumière) ont aussi été utilisés au cours des expériences de BRET.

### 2.1.7 Autres réactifs

Toutes les solutions ont été préparées à partir d'eau de grade nano pure ayant une résistance de 18.2 MΩ-cm. À moins d'indications contraires, les réactifs chimiques ont été obtenus de la compagnie Sigma Aldrich. Le cocktail d'inhibiteur de protéase (PI, 1000 x) est une solution stock composée de : 10 µg/mL benzamidine, 5 µg/mL, leupeptin, 5 µg/mL d'inhibiteur de trypsine de soja. La solution stock devrait être aliquotée en petit volume et conservée à - 20 °C. Les cycles de congélation/décongélation devraient être évités. Le réactif de chemiluminescence augmentée (ECL), les Films Kodak BioMax Light ainsi que le <sup>125</sup>I-cyanopindolol (<sup>125</sup>I-CYP) ont été obtenus de la compagnie PerkinElmer

Life Sciences. Le tris (trishydroxyméthylaminométhane), le PMSF (phénylméthanesulfonyl fluorure), le SDS (sodium dodécylsulfate) et le DTT (dithiothréitol) proviennent de la compagnie Roche. Le sérum normal de chèvre (NGS) provient de la compagnie Bio/Can Scientifique. Le lait en poudre sans gras vient de chez Carnation. Le HCl et l'EDTA (acide éthylène-diamine-tétraacétique) viennent de la compagnie Fisher Scientific. Le réactif de Bradford, le bis-acrylamide, les membranes de nitrocellulose 0.2  $\mu$ M proviennent de chez BioRad. Tandis que l'acrylamide et l'acrylamide liquide commercial 40 % (29 : 1) nous viennent de chez J.T. Baker, TeckniScience.

## 2.2 Sous-clonage moléculaire

Le récepteur HA- $\beta_2$ AR a été utilisé comme décrit précédemment (52, 92). Cette construction a été amplifiée par réaction en chaîne de la polymérase (PCR) en utilisant l'oligonucléotide sens (5'-ATAGAATTCATGTACCCATAC GACGTC-3') et l'oligonucléotide (5'-TATGAATTCCAGCAGTGAGTCATT TGA-3') en anti-sens. Le produit résultant de cette réaction a ensuite été sous-cloné dans le plasmide pSEMS1-26m en utilisant le site de restriction de l'enzyme EcoR1. Cette construction a été confirmée par séquençage bidirectionnel.

Tout d'abord, une étiquette cMyc a été créée par oligohybridization et ensuite introduite au vecteur pIREShyg3 (BD Bioscience, Clontech) en utilisant les sites de restrictions de NheI et de BamHI. Par la suite, la protéine luminescente RLuc a été sous-clonée dans le vecteur en utilisant les sites de BamHI et Bstx1. Les récepteurs FP et PAFR ont été introduits dans le vecteur pIREShyg3-cMyc-RLuc (entre le cMyc et le RLuc) linéarisé avec l'enzyme de restriction BamHI selon une recombinaison de type In-Fusion. Le produit résultant a été caractérisé par séquençage bidirectionnel.

Une étiquette HA a été créée par oligohybridization et ensuite introduite au vecteur pIRESpuro3 (BD Bioscience, Clontech) en utilisant les sites de restriction de Nhe1 et BamH1. La protéine fluorescente Venus a été sous-clonée dans le vecteur en utilisant les sites de restriction BamH1 et BstX1. Les récepteurs FP et PAFR ont été introduits dans le vecteur pIRESpuro3-HA-Venus (entre le HA et le Venus) linéarisé avec l'enzyme de restriction BamH1 selon une recombinaison de type In-Fusion. Le produit résultant a été caractérisé par séquençage bidirectionnel.

### **2.3 Culture cellulaire et transfection**

Les cellules HEK 293 ont été cultivées dans du milieu de culture DMEM avec une teneur élevée en glucose complet (comprend : 10 % de FBS ainsi que les antibiotiques Penicillin/Streptomycin) et ont été incubées à 37 °C en présence de 5 % CO<sub>2</sub>.

Les cellules ont été cultivées dans des flacons de 75 cm<sup>2</sup> pour les expériences d'expression, de liaison du ligand, de co-immunoprécipitation et dans des plaques de 6 puits pour les essais de marquage avec le substrat BG, les expériences de BRET, de stimulation des MAPKs et de microscopie confocale. Vingt-quatre heures avant la transfection, les cellules ont été préparées de façon à atteindre 50 % de confluence la journée de la transfection (elles devraient se trouver entre 40 et 60 % de confluence pour pouvoir être transfectées).

Les transfections ont été effectuées à l'aide de l'agent chimique PEI. Pour chaque flacon de 75 cm<sup>2</sup> transfecté, 5 µg de chaque type d'ADN ont été utilisés et dilués dans 500 µL de DMEM sans sérum. Quinze µg de PEI (ratio PEI/ADN : 3 : 1) ont été dilués dans un autre 500 µL de DMEM sans sérum. L'ADN et le PEI dilué ont par la suite été combinés, mélangés par inversion et incubés durant 15 minutes à TP. Ce mélange de PEI et d'ADN a été ajouté à des cellules contenant

du milieu de culture DMEM complété avec 2.5 % de FBS. Ces cellules ont été incubées pour une période de 24 heures dans un incubateur à 37 °C en présence de 5 % de CO<sub>2</sub>. Par la suite, le milieu de culture a été changé pour du DMEM complété avec 10 % de FBS ainsi que les antibiotiques Penicillin/Streptomycin. Quarante-huit heures post-transfection les expériences ont été effectuées. Pour ce qui est des transfections effectuées dans des plaques 6 puits, elles ont été réalisées exactement comme décrit pour les flacons de 75 cm<sup>2</sup> mais en utilisant 1 µg de chaque ADN et 3 µg de PEI dilué dans 100 µL de DMEM sans sérum. Il est à noter que la quantité totale d'ADNc transfectées doit être constante d'un puit à l'autre, au cours d'une même expérience.

## **2.4 Immunobuvardage de type western**

### **2.4.1 Préparation membranaire**

Quarante-huit heures post-transfection les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS. Elles ont, par la suite, été re-suspendues dans 1 mL de tampon de lyse froid (5 mM Tris-HCl pH 7.4, 2 mM EDTA, PI 1 x). Les cellules ont été homogénéisées sur glace à l'aide d'un polytron (cycle de 2 x 10 sec à 10 000 RPM) puis centrifugées à 400 x g, 10 min à 4 °C. Le surnageant a été centrifugé à 45 000 x g pour une période de 20 min à 4 °C. Le culot de membrane a été finalement re-suspendu dans 1 mL de tampon froid contenant 75 mM Tris-HCl pH 7.4, 2 mM EDTA, 12.5 mM MgCl<sub>2</sub>. Ces préparations membranaires ont été utilisées pour les analyses par immunobuvardage de l'expression de la construction HA-β<sub>2</sub>AR-SNAP ainsi que pour les essais de liaison d'un ligand radiomarqué.

### **2.4.2 Solubilisation des préparations membranaires**

Quarante-huit heures post-transfection, une préparation membranaire a été réalisée. Ces membranes ont été par la suite solubilisées selon ce protocole. Plutôt

que de re-suspendre les membranes dans le tampon froid contenant 75 mM Tris-HCl pH 7.4, 2 mM EDTA, 12.5 mM MgCl<sub>2</sub>, le culot de membranes a été re-suspendu dans 1 mL de tampon froid RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA (acide éthylène-glycol-tétraacétique), 1 % NP-40, 0.1 % SDS, 0.5 % sodium deoxycholate, PI 1 x, 1 mM PMSF). Ce lysat cellulaire a été homogénéisé avec 20 coups de piston d'un homogénéiseur Dounce et solubilisé pendant 1 h à 4 °C. Les échantillons ont été clarifiés par une centrifugation à 16 000 x g à 4 °C pour une période de 20 min. Le surnageant obtenu a été utilisé lors des expériences de co-immunoprécipitation.

#### 2.4.3 Dosage de protéines

Dans des cuvettes (semi-micro cuvette PS, Sarstedt) contenant 800 µL d'eau nano pure, une courbe d'étalonnage, a été préparée en duplicata, de 0, 2, 4, 6, 8 et 10 µg/mL en utilisant du sérum d'albumine bovin (BSA). Des cuvettes (en triplicata) contenant de 1 à 10 µL de l'échantillon de concentration à déterminer ont aussi été préparées. Deux cents µL de réactif de Bradford ont été ajoutés à chacune des cuvettes puis celles-ci ont été mélangées par inversion. La lecture a été prise à l'aide d'un spectrophotomètre à la longueur d'onde de 595 nm.

#### 2.4.4 Immunobuvardage de type Western

Du matériel provenant de préparation membranaire et de la co-immunoprécipitation a été dilué dans du tampon Laemmli 4 x (500 mM Tris-HCl pH 6.8, 10 % SDS, 2 M de β-mercaptoéthanol, 120 µM de sucrose, 4 mM d'EGTA et quelques grains de bleu de bromophénol) puis a été chauffé à 100 °C pendant 5 minutes. Cette solution a, par la suite, été déposée sur une électrophorèse sur gel SDS-PAGE de 7 à 10 %, selon le poids moléculaire des protéines à séparer, puis transférée sur une membrane de nitrocellulose. Les membranes ont été incubées dans 5 % (poids/volume) de lait en poudre sans gras

dans du PBS ou dans un tampon salin à base de Tris (TBS) (composé de : 25 mM Tris-HCl pH 7.5 et de 150 mM de NaCl) contenant 0.1 % de Tween-20 (PBST ou TBST) pour une période d'une heure à la température de la pièce. Une incubation pour toute la nuit à 4 °C avec l'anticorps primaire (indiqué à chaque figure) dilué dans 5 % de lait en poudre dans le PBST/TBST a été effectuée. Suite au retrait de l'anticorps primaire, la membrane a été lavée (3 x 10 min) avec du PBST (TBST, selon le cas) puis a été incubé pendant une heure avec l'anticorps secondaire (dilution indiquée à chaque figure) correspondant (anti-souris, anti-lapin) couplé à la HRP dilué dans 5 % de lait en poudre dans le PBST/TBST. La membrane a été lavée une dernière série de 4 x 10 min avec PBST (ou TBST selon le cas). Les complexes immuns ont été visualisés par chemiluminescence augmentée sur des films Kodak BioMax Light.

#### 2.4.5 Décapage (Stripping) des anticorps

La membrane de nitrocellulose a été incubée en présence de 0.2 M de NaOH (2 x 10 min). Puis, la membrane elle a été lavée (2 x 10 min) avec du PBST ou du TBST, puis bloquée pendant 1 h dans 5 % (poids/volume) de lait en poudre sans gras dans du PBST ou du TBST. Un nouvel anticorps primaire a ensuite été incubé, toute la nuit avec la membrane et l'IB a lieu comme indiqué ci-haut.

## 2.5 **Immunoprécipitation**

Quarante-huit heures post-transfection une solubilisation des préparations membranaires a été effectuée selon le protocole décrit plus haut. Un anticorps monoclonal dirigé contre l'épitote HA (10 µg) a été ajouté à 500 µL de protéines solubilisées et ce mélange a été incubé toute la nuit sous faible agitation à 4 °C. Cent µL de billes d'agaroses couplées à des anti-IgG de souris ont par la suite été ajoutés à la solution. Une incubation de 3 h à 4 °C sous agitation s'en est suivie.

Suite à des lavages répétés avec le tampon RIPA, les complexes immuns liés aux billes d'agarose ont été élués à l'aide de 25  $\mu$ L de tampon Laemmli 1 x contenant 100 mM de DTT et 0.8 M de  $\beta$ -mercaptoethanol et chauffés à 100 °C pendant 5 min. Vingt-cinq  $\mu$ L de tampon Laemmli 1 x contenant 4.5 M d'urée ont ensuite été ajoutés au mélange et cette solution a été incubée 30 min à la température de la pièce. Les échantillons obtenus ont été chargés sur un gel de polyacrylamide de type SDS-PAGE et l'immunobuvardage de type western a été réalisé en utilisant l'anticorps primaire anti-Luciférase de souris (1 : 1000) et un anti-IgG de souris couplé à la HRP (1 : 20 000) comme anticorps secondaire.

## **2.6 Essai de liaison de ligand radiomarqué**

Quarante-huit heures post-transfection des préparations membranaires ont été effectuées selon le protocole décrit précédemment. Ces préparations membranaires ont été dosées comme expliqué antérieurement (41) afin de déterminer la quantité de protéines présentes. La liaison du ligand hydrophobique  $^{125}$ I-CYP a été utilisée pour déterminer le nombre total de récepteurs, tandis que 10  $\mu$ M d'alprénolol a été utilisé afin de déterminer la quantité de liaisons non spécifique. Ces manipulations ont été effectuées à la température ambiante et les cellules ont été incubées avec le ligand  $^{125}$ I-CYP pour une période de 90 minutes et par la suite, filtrées avec le collecteur de cellules de type Brandel.

## **2.7 Marquage avec le substrat 6-benzylguanine**

Ces expériences peuvent être réalisées dans un environnement non stérile. Le marquage avec le substrat BG a été effectué selon les directives fournies par la compagnie Covalys (voir protocole du SNAP-cell 430 Starter Kit (32)). Le substrat BG a été utilisé à une concentration finale variant entre 2 et 5  $\mu$ M (indiqué sous chaque figure). Le substrat BG dilué dans du DMEM à haute teneur en glucose contenant 10 % de FBS a été incubé avec les cellules pour une période

de 15 min à 37 °C en présence de 5 % de CO<sub>2</sub> (600 µL de solution de marquage sont nécessaires pour chaque puits de 35 mm ou 200 µL pour chaque lamelle de microscopie confocale).

Par la suite, les cellules ont été lavées (2 x) avec du DMEM à haute teneur en glucose supplémenté avec 10 % de FBS, puis le milieu a été changé une fois de plus pour un 30 minutes d'incubation à 37 °C. Il est important de mentionner que les lavages doivent être effectués doucement afin d'éviter que les cellules ne se détachent. Puis, les cellules ont été lavées une fois avec du DMEM, 10 % FBS, afin d'enlever tout le substrat BG n'ayant pas réagit (si un lavage supplémentaire est indiqué, il signifie que suite à ce lavage le milieu a été changé pour du DMEM 10 % FBS puis incubé pendant 30 minutes à 37 °C en présence de 5 % de CO<sub>2</sub> avant les lavages avec le PBS 1 x). Ensuite, les cellules ont été lavées 2 x avec du PBS 1x froid. Ces cellules marquées au substrat BG ont par la suite été re-suspendues dans 90 µL de PBS froid 1 x et lues à l'aide d'un lecteur de microplaque Fusion. Le chromophore BG-430 a été excité à 425 nm (filtre 425/30 nm) (pic d'excitation : 421 nm) et la lecture de l'émission a été prise à 480 nm (filtre 480/LP nm) (pics d'émission du BG-430: 444 et 484 nm).

## 2.8 BRET

Un protocole détaillé et complet sur le BRET comme outils de détection pour les interactions protéine-protéine est sous presse et sera publié dans la deuxième édition du livre *Bioluminescence* (138). Il peut être intéressant de le consulter lors de l'élaboration d'une expérience.

Des cellules HEK 293 ont été co-transfectées avec des vecteurs exprimant soit une étiquette de type GFP10, eGFP, Venus ou encore SNAP et la protéine de fusion RLuc pertinente. À partir de maintenant, les expériences peuvent être réalisées dans un environnement non stérile. Quarante-huit heures post-

transfection, les cellules transfectées avec les protéines GFP ou Venus ont été récoltées puis lavées 2 x avec du PBS 1 x tandis que les cellules transfectées avec les constructions SNAP ont été marquées (avec 0.5, 2 ou 5  $\mu\text{M}$  de BG-430), lavées et re-suspendues comme mentionné précédemment. Quatre-vingt dix  $\mu\text{L}$  des cellules récoltées pour chaque condition de transfection ont été transférés dans une microplaque 96 puits blanche.

### 2.8.1 Considération préliminaire

Quelques informations doivent être prises en considération avant d'effectuer un essai BRET. Il est tout d'abord, très important d'ajouter des contrôles positifs et négatifs pertinents afin de bien analyser la signification des ratios de BRET obtenus. Un bon contrôle négatif, devrait en fait être composé de la protéine d'intérêt combinée avec une protéine connue comme n'interagissant pas avec cette première et étant exprimée au même niveau et dans le même compartiment cellulaire que la protéine qu'elle remplace. Ainsi, le ratio de BRET obtenu découle du bruit de fond. Un bon contrôle positif devrait être composé de deux protéines connues comme interagissant ensemble permettant ainsi de prouver que l'expérience est fonctionnelle.

Il est à noter que la magnitude de l'essai BRET varie selon l'appareil employé pour la prise de lecture ainsi que selon les partenaires d'interactions utilisés au cours de la manipulation. Les résultats présentés ici ont été montrés en utilisant un axe des Y facilitant leurs analyses.

Afin de s'assurer de la validité des interactions BRET détectées au cours d'une expérience, il est important d'effectuer des tests de saturation et de compétition. Ces essais permettront de conclure si nous nous trouvons en présence d'une interaction réelle ou d'artéfacts. Pour plus d'information sur ces expériences consultez l'article publié par le groupe du Dr Couturier (7).

### 2.8.2 BRET<sup>1</sup>

Pour les expériences utilisant la technologie du BRET<sup>1</sup> le substrat, la Coelenterazine H, a été utilisée à une concentration finale de 0.2 ng/μL pour chaque échantillon (dilution de la solution stock 1 mg/mL 1 :500 dans du PBS 1 x, ajoute 10 μL de cette solution de substrat dilué par puits). Cette solution doit être protégée de la lumière et conservée à la température de la pièce pour la durée de l'expérience et jetée à la fin de la manipulation. Les signaux obtenus ont été récoltés sur l'instrument Fusion de la compagnie Packard. Les filtres qui ont été utilisés lors de ces lectures sont : les filtres de type « band pass » 450/58 nm pour la luciférase et 480/LP pour le eGFP ou le Venus. Certaines expériences ont aussi été conduites en utilisant les filtres de type « band pass » 535/25 nm pour le eGFP. Les signaux de BRET<sup>1</sup> ont été déterminés par le ratio de la lumière émise captée par le filtre 450/58 (la luciférase) et le filtre 480/LP (GFP ou Venus). Afin de contrôler la fluorescence, le filtre d'excitation de 475/20 nm en combinaison avec le filtre d'émission de 515/35 nm devraient être utilisés.

### 2.8.3 BRET<sup>2</sup>

Pour les expériences utilisant la technologie du BRET<sup>2</sup> le substrat, la Coelenterazine 400A, a été utilisée à une concentration finale de 5 μM pour chaque échantillon (dilution de la solution stock 1mM 1 : 20 dans du PBS 1 x, ajoute 10 μL de cette solution de substrat dilué par puits). Il est important de préparer cette solution diluée pour un maximum de 2 échantillons à la fois. Comme le substrat s'oxyde très rapidement, un maximum de 2 échantillons devrait être lus avec le Fusion afin que les comptes de luciférase soient assez élevés. Cette solution doit être protégée de la lumière et conservée à la température de la pièce pour la durée de l'expérience. Les signaux obtenus ont été récoltés sur un instrument de type Fusion de la compagnie Packard. Les filtres qui ont été utilisés lors de ces lectures sont : les filtres de type « band pass » 410/80

nm pour la luciférase et 515/35 nm pour le GFP10. Les signaux de BRET<sup>2</sup> ont été déterminés par le ratio de la lumière émise captée par le filtre 410/80 (la luciférase) et le filtre 515/35 (GFP10). Afin de contrôler la fluorescence, le filtre d'excitation de 425/20 nm en combinaison avec le filtre d'émission de 515/35 nm devraient être utilisés.

#### 2.8.4 SNAP-BRET

Pour les expériences utilisant la technologie du SNAP-BRET le substrat, la Coelenterazine 400A, a été utilisée à une concentration finale de 5  $\mu$ M pour chaque échantillon (dilution de la solution stock 1 mM 1 : 20 dans du PBS 1 x, ajoute 10  $\mu$ L de cette solution de substrat dilué par puits). Il est important de préparer cette solution diluée pour un maximum de 2 échantillons à la fois. Comme le substrat s'oxyde très rapidement, un maximum de 2 échantillons devrait être lus avec le Fusion afin que les comptes de luciférase soient assez élevés. Cette solution doit être protégée de la lumière et conservée à la température de la pièce pour la durée de l'expérience. Les signaux obtenus ont été récoltés sur un instrument de type Fusion de la compagnie Packard. Les filtres qui ont été utilisés lors de ces lectures sont : les filtres de type « band pass » 410/80 nm pour la luciférase et 480/LP nm pour le BG-430. Les signaux de SNAP-BRET ont été déterminés par le ratio de la lumière émise captée par le filtre 410/80 (la luciférase) et le filtre 480/LP (BG-430). Les filtres d'excitation de 425/30 nm et d'émission 480/LP nm ont été utilisés pour les lectures de la fluorescence des échantillons SNAP (BG-430, excitation : 421 nm et émission : 444 et 484 nm).

Les ratios entre la lumière émise et captée par le filtre de la luciférase et le filtre du GFP10, eGFP, Venus ou du BG-430 ont été utilisés afin de déterminer si un BRET a eu lieu ou non entre les deux partenaires. Afin d'éviter les variations possibles dans les signaux de BRET engendrés par une fluctuation dans les niveaux d'expressions relatifs du donneur ou encore de l'accepteur d'énergie, des

conditions de transfections ont été conçues pour maintenir constants les ratios d'expressions de GFP/RLuc dans chaque série d'expériences. Dans le but de demeurer dans les limites de détection de l'appareil Fusion, il est important d'obtenir des comptes RLuc situés entre 50 000 et 130 000 pour le BRET<sup>2</sup> et entre 20 000 et 100 000 pour le BRET<sup>1</sup>. Il est à noter que le Fusion devrait être allumé une heure avant son utilisation, pour le permettre de se réchauffer il sera ainsi plus constant lors des prises de lectures. Au moins trois expériences indépendantes devraient être obtenues et concluantes avant de poursuivre avec des expériences de compétition pour confirmer la présence d'une véritable interaction.

#### 2.8.5 Essai de stimulation avec un agoniste

Les expériences ont été réalisées sur des cellules HEK 293 48 h suite à leur transfection. Les cellules ont été transfectées avec 5 µg d'ADNc de chacune des constructions (sauf pour RLuc où 10 µg ont été transfectés puisque les codons ne sont pas humanisés) dans des T-75.

Pour les essais de stimulations du récepteur PAF, le véhicule qui a été utilisé est composé de 495 µL de PBS + 5 µL d'éthanol 100 % et la concentration de cPAF elle est de 1 µM finale. La stimulation a été réalisée sur une période de 20 sec. Pour ce qui est de FP, le véhicule qui a été utilisé est composé de 999 µL de PBS + 1 µL d'éthanol et le PGF2α est lui aussi utilisé à une concentration finale de 1 µM. La stimulation a quant à elle été effectuée sur une période de 1 min. Chaque T-75 a été re-suspendu dans du PBS 1 x. Des cellules provenant du même T-75 ont été utilisées pour les essais de stimulation avec le véhicule ou avec l'agoniste et chaque stimulation a été effectuée en triplicata au cours de la même expérience. L'ordre de l'ajout des différentes composantes de l'expérience est la suivante : les cellules ont été déposées dans une microplaque 96 puits et la solution de stimulation a été ajoutée. La Coelenterazine a été ajoutée et la lecture a été prise lorsque le temps de stimulation a été écoulé.

La technologie de BRET<sup>1</sup> a été utilisée et les cellules ont été re-suspendues dans du PBS 1 x avant que 0.2 ng/ $\mu$ L de Coelenterazine H ne soit ajouté à l'échantillon (dilution de la solution stock 1 mg/mL 1 : 500 dans du PBS 1 x, ajoute 10  $\mu$ L de cette solution de substrat dilué par puits). Cette solution doit être protégée de la lumière et conservée à la température de la pièce pour la durée de l'expérience et jetée à la fin de la manipulation. Les données ont été récoltées à l'aide d'un appareil Fusion de la compagnie Packard. Les filtres qui ont été utilisés lors de ces lectures sont : les filtres de type « band pass » 450/58 nm pour la luciférase et 480/LP pour Venus. Les signaux de BRET<sup>1</sup> ont été déterminés par le ratio de la lumière émise captée par le filtre 450/58 (la luciférase) et le filtre 480/LP (GFP ou Venus). Afin de contrôler la fluorescence, le filtre d'excitation de 475/20 nm en combinaison avec le filtre d'émission de 515/35 nm devraient être utilisés.

## **2.9 Microscopie confocale**

Les essais ont été effectués sur un microscope à balayage laser LSM 510 de la compagnie Zeiss. Des cellules ont été transfectées dans des plaques 6 puits avec 2  $\mu$ g de récepteurs pour chacune des conditions, selon le protocole de transfection mentionné plus haut. Vingt-quatre heures suite à cette transfection, les cellules ont été transférées dans des plaques de 12 puits contenant des lamelles de verre stérile et incubées encore vingt-quatre heures à 37 °C en présence de 5 % CO<sub>2</sub>.

Les lames indiquées ont été marquées avec le substrat BG-430 selon le protocole décrit précédemment. Il est nécessaire d'utiliser 200  $\mu$ L de substrat BG dilué pour couvrir complètement la lamelle (concentration finale de 2  $\mu$ M). Il est à noter qu'un lavage supplémentaire de 30 min a été effectué et que le PBS 1 x qui a été utilisé est à pH 7.3.

Les cellules qui n'ont pas été marquées ont, quant à elles, été lavées 2 x avec une solution de PBS 1 x. La solution de fixation a été préparée fraîche selon le protocole suivant : 40 mL de PBS 1 x pH 7.3, contenant 2-3 gouttes de NaOH 10 M et 1 g de paraformaldéhyde ont été chauffés dans un bain-marie, sous la hotte chimique, jusqu'à la dissolution complète du paraformaldéhyde (ne JAMAIS chauffer à plus de 65 °C) puis attendre jusqu'à ce que la température de la solution redescende à celle de la température de la pièce. Par la suite, le pH a été ajusté entre 7.3 et 7.4 avec du HCl. Puis, les cellules ont été incubées dans la solution de fixation pendant 20 min à TP. Elles ont finalement été lavées 3 fois avec du PBS 1 x.

Les cellules ont été bloquées pour une période de 1 h à TP avec une solution composée de 2 % de NGS et de 0.2 % de Triton dans du PBS 1 x. Les lamelles ont été égouttées et l'anticorps primaire (anti-HA de Covance dans ce cas-ci à une dilution de 1 : 200) dilué dans la solution de dilution des anticorps (1 % NGS et 0.04 % de Triton, dilué dans du PBS 1 x) y a été ajouté. Les lamelles ont été incubées à 4 °C toute la nuit. Pour les contrôles sans anticorps primaire, il y a seulement la solution de dilution qui a été ajoutée. Ensuite, les lamelles ont été lavées 3 fois avec du PBS 1 x et elles ont été incubées avec l'anticorps secondaire anti-souris couplé au fluorophore Alexa 555 pendant 45 min à l'abri de la lumière (dilution 1 : 600). Encore une fois, les lamelles ont été lavées 3 fois avec du PBS 1 x et les lames ont été montées de la façon suivante : 8 µL de solution de montage (100 µL de DABCO 0.4 % dans 400 µL de glycérol (doit être préparée fraîche)) ont été déposés sur la lame, avant d'y ajouter la lamelle et de sceller le tout avec du vernis à ongles. Il est important de bien laisser sécher les lames avant de visualiser au microscope (les lectures devraient être effectuées dans les 2 semaines suivant la préparation).

Un objectif à immersion de 63X a été utilisé en combinaison avec les lasers et les filtres suivants pour la visualisation des cellules au microscope. Afin

de visualiser le fluorophore BG-430, le laser Argon2 qui possède des longueurs d'onde d'excitation de 458, 488 et 514 nm a été utilisé et le filtre de type « band pass » de 475 à 525 nm a servi à prendre les lectures d'émission des cellules. Pour ce qui est du fluorophore Alexa 555 le laser qui a été utilisé est le HeNe1 qui possède une longueur d'onde d'excitation de 543 nm et le filtre de type « long pass » de 560 nm a servi à prendre les lectures d'émission provenant des cellules marquées.

## **2.10 Stimulation des protéines MAPKs**

Des cellules ont été transfectées dans des plaques 6 puits avec 2 µg de récepteurs pour chacune des conditions de stimulation, selon le protocole expliqué précédemment. Quarante-huit heures post-transfection, les cellules ont été rincées, une fois, avec du PBS 1 x et elles ont été incubées dans 2 mL de DMEM sans FBS pour une période de 30 min à 37 °C en présence de 5 % de CO<sub>2</sub>.

Pendant ce temps, les différentes drogues pour la stimulation ont été préparées. Lors de cette manipulation, la drogue qui a été utilisée est l'isoprotérénol à une concentration finale de 10 µM. L'acide ascorbique empêche la dégradation de l'isoprotérénol (166), l'essai a donc été effectué en présence de 150 µM (concentration finale) de cet acide. Afin d'être certain que l'effet observé sur la phosphorylation des protéines ERK1/2 n'est pas engendré par l'acide ascorbique, le contrôle négatif (le véhicule) qui a été utilisé est composé de DMEM contenant 1.65 mM d'acide ascorbique (les solutions stock doivent être de 11 x, puisqu'on ajoute 200 µL de drogue au 2 mL de milieu déjà présent, nous sommes donc en présence d'un facteur de dilution de 11). Ce contrôle a permis aussi de mesurer le niveau de phosphorylation basal des ERK1/2 chez les cellules utilisées.

La stimulation a été effectuée dans un incubateur à 37 °C. Deux cents µL de drogue ou de véhicule ont été ajoutés au 2 mL de milieu sans sérum dans le puits à stimuler. Il est très important que toutes les stimulations des puits d'une même plaque se terminent au même moment. La plaque a été incubée à 37 °C pour une période de 0, 2, 5, 15 ou 30 minutes. Après le temps de stimulation désiré, la plaque a été prise délicatement et déposée sur glace. Le milieu a été prélevé et le puits a été lavé 2 x avec du PBS froid 1 x. Deux cent cinquante µL de tampon Laemmli 2 x (250 mM Tris-HCl pH 6.8, 2 % SDS, 10 % glycérol, 0.01 % bleu de bromophénol et ajouter 0.715 M de β-mercaptoéthanol frais) ont été ajoutés aux cellules. Les puits ont ensuite été grattés avec un patin et le contenu a été transféré dans un microtube 1.5 mL. Les lysats ont été incubés 15 min à 65 °C. Les échantillons ont été redescendus au fond du microtube 1.5 mL par centrifugation rapide et soniqués avec une sonde. Ils ont finalement été entreposés à – 80 °C.

Quarante µL d'échantillon ont été déposés sur un gel SDS-PAGE 10 % (voir protocole énoncé plus haut). Les anticorps suivants ont été utilisés : anticorps primaire anti-phospho ERK p44/42 à une dilution de 1 : 1000 et l'anticorps anti-total ERK C.T. à une dilution de 1 : 5000. La même membrane a été utilisée pour ces deux anticorps, il est donc nécessaire de faire un décapage entre chaque immunobuvardage selon le protocole précédant. Il est à noter que la membrane de nitrocellulose convient mieux à ce type d'expériences.

## 3 Résultats :

### 3.1 Clonage :

Le récepteur  $\beta_2$ AR humain a été sous-cloné dans le vecteur pSEMS1-26m. Ce récepteur possède maintenant une étiquette HA en N-terminal et une étiquette SNAP en C-terminal. (HA- $\beta_2$ AR-SNAP). Une étiquette cMyc a été créée par oligohybridization et ensuite introduite au vecteur pIREShyg3. Puis, la protéine luminescente RLuc a été sous-clonée dans le vecteur. Les récepteurs FP et PAFR ont par la suite été introduits dans ce vecteur pIREShyg3-cMyc-RLuc (entre le cMyc et le RLuc) (pIRESH-cMyc-FP-RLuc et pIRESH-cMyc-PAFR-RLuc). Une étiquette HA a été créée par oligohybridation et ensuite introduite au vecteur pIRESpuro3. La protéine fluorescente Venus a ensuite été sous-clonée dans le vecteur. Finalement, les récepteurs FP et PAFR ont été introduits dans ce vecteur pIRESpuro3-HA-Venus (entre le HA et le Venus) (pIRESP-HA-FP-Venus et pIRESp-HA-PAFR-Venus).

Des cellules HEK 293 transfectées de manière transitoire exprimant les différentes constructions (HA- $\beta_2$ AR-SNAP, pIRESH-cMyc-FP-RLuc, pIRESH-cMyc-PAFR-RLuc pIRESP-HA-FP-Venus et pIRESp-HA-PAFR-Venus) ont été utilisées pour les différentes expériences présentées ici.

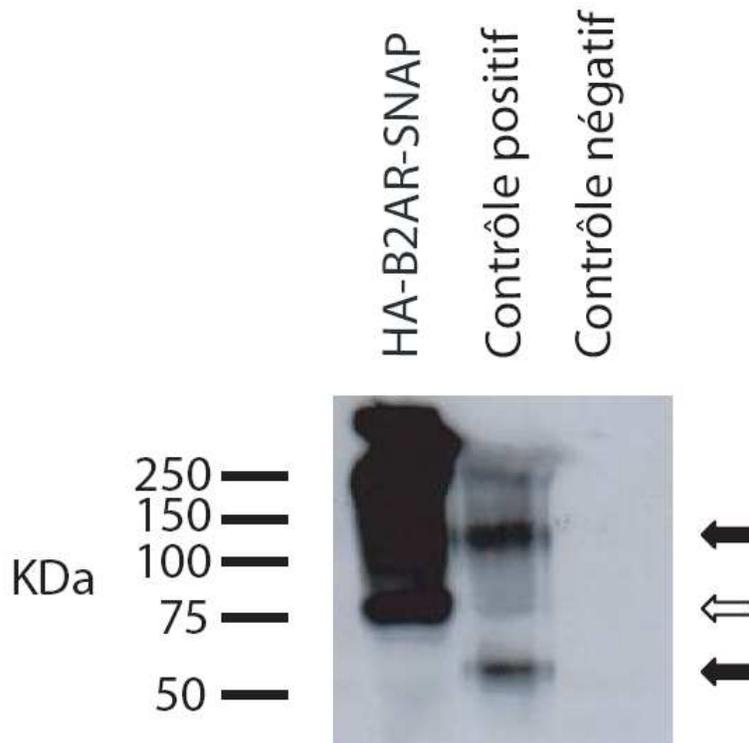
## 3.2 Caractérisation du récepteur $\beta_2$ AR marqué avec l'étiquette SNAP et développement d'un nouvel essai BRET

### 3.2.1 Expression et fonctionnalité des protéines de fusion dans des cellules HEK 293

L'expression et la fonctionnalité de la construction HA- $\beta_2$ AR-SNAP ont été testées dans des cellules HEK 293 afin de s'assurer que l'ajout de l'étiquette SNAP au RCPG n'a pas affecté son comportement cellulaire naturel connu.

#### 3.2.1.1 *Expression des protéines de fusion dans des cellules HEK 293*

Afin de confirmer la capacité de la construction à s'exprimer dans des cellules HEK 293, des préparations membranaires ont été effectuées et déposées sur un gel SDS-PAGE. L'IB montré à la **figure 3.1** démontre que la construction HA- $\beta_2$ AR-SNAP est exprimée à un niveau comparable à celui de la construction HA- $\beta_2$ AR, utilisé ici comme contrôle positif. Le poids moléculaire du monomère de HA- $\beta_2$ AR-SNAP est de 69 kDa tandis que celui du monomère de HA- $\beta_2$ AR possède un poids prédit de 47 kDa mais migre généralement autour de 55 kDa (attribuable à la glycosylation de la protéine) (25). La bande située à un poids moléculaire plus élevé, pour le récepteur HA- $\beta_2$ AR, représente en fait la forme dimérique de ce récepteur. Il est impossible d'observer cette bande pour le récepteur HA- $\beta_2$ AR-SNAP due à la présence d'une traînée de protéines.



**Figure 3.1 Expression de la construction HA-β2AR-SNAP** IB réalisé sur des préparations membranaires effectuées sur de cellules HEK 293 48 h post-transfection transitoire avec la construction HA-β2AR-SNAP, HA-β2AR (contrôle positif) ainsi que sur des cellules HEK 293 non transfectées (contrôle négatif). L'anticorps primaire utilisé pour la détection des protéines sur la membrane de nitrocellulose est l'anti-HA (dilution 1 : 1000). L'anticorps secondaire est, quant à lui, l'anti-IgG de souris couplé à la HRP utilisé à une dilution de 1 : 20 000.

### 3.2.1.2 Acheminement de protéines de fusion à la membrane plasmique

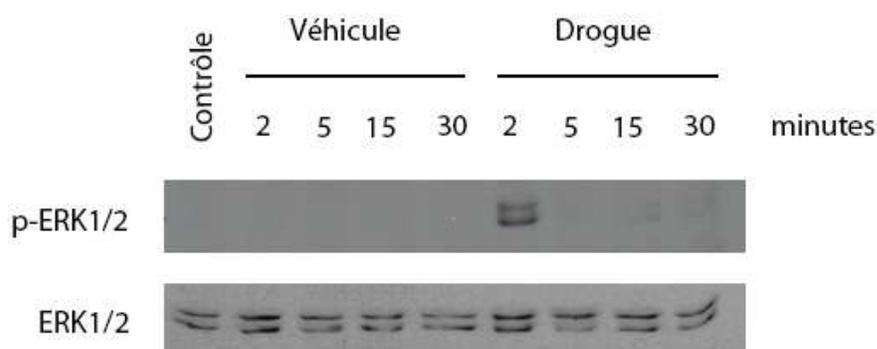
Au cours de l'introduction, il a été mentionné que les RCPGs sont capables d'entraîner la phosphorylation des protéines ERK suite à leur activation. Pour que ce phénomène soit observé, le récepteur doit être acheminé à la membrane plasmique et apte à lier un ligand. Plusieurs facteurs peuvent affecter transport des protéines à la membrane plasmique. Par exemple, le mauvais repliement d'une protéine qui peut être causé par l'ajout d'une étiquette de grande

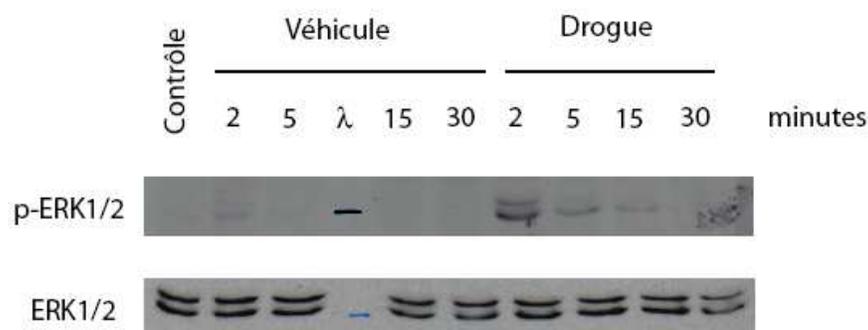
taille, des mutations dans la séquence. Si ce phénomène a lieu, il peut entraîner cette protéine vers des mécanismes de dégradations qui l'empêcheront d'atteindre la membrane plasmique.

Dans le but de s'assurer que l'ajout de l'étiquette SNAP n'a pas affecté la capacité du RCPG  $\beta_2$ AR à atteindre la membrane plasmique, un essai de stimulation des protéines MAPKs a été effectué. Il consiste en l'observation de la capacité de la construction étudiée à phosphoryler les protéines ERK1/2.

Pour la construction HA- $\beta_2$ AR-SNAP, l'essai a été effectué en utilisant 10  $\mu$ M d'isoprotérenol, une drogue inapte à traverser les membranes cellulaires. Des temps de stimulation de 2, 5, 15 et 30 minutes ont été testés. Afin de s'assurer que la présence de l'étiquette SNAP n'a pas affecté le comportement naturel du récepteur un contrôle positif utilisant le récepteur HA- $\beta_2$ AR a été effectué. La **figure 3.2** montre qu'avec ou sans l'étiquette SNAP le récepteur  $\beta_2$ AR engendre la phosphorylation des protéines ERK1/2 à 2 minutes en présence d'une quantité comparable de protéine ERK1/2 totale entre chacune des conditions.

### HA- $\beta_2$ AR-SNAP



HA- $\beta$ 2AR (Contrôle positif)

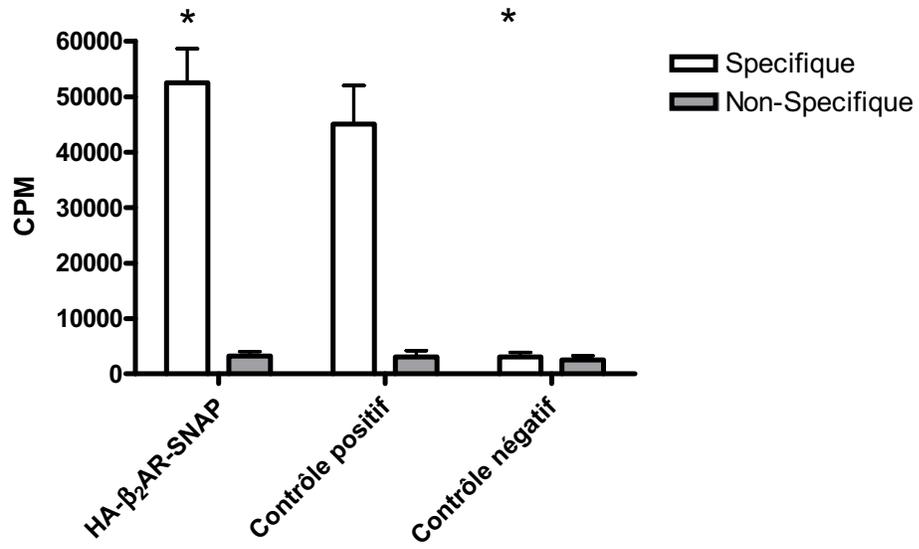
**Figure 3.2 Essai de stimulation des protéines MAPKs** *Construction HA- $\beta$ 2AR-SNAP* : L'IB a été réalisé sur des cellules HEK 293 qui ont été transfectées de manière transitoire et qui 48 h post-transfection ont été stimulées soit par un véhicule (dans ce cas-ci du DMEM contenant 150  $\mu$ M d'acide ascorbique) ou de la drogue (10  $\mu$ M d'isoprotérénol) et récoltées dans du tampon Laemmli (le contrôle représente des cellules HEK 293 transfectées avec le récepteur et directement re-suspendues dans du tampon Laemmli, sans drogue, ni véhicule). L'anticorps primaire utilisé pour la détection des protéines phosphorylées sur la membrane de nitrocellulose est l'anti-phospho ERK 1/2 (dilution 1 : 1000). L'anticorps primaire utilisé pour la détection des protéines ERK totales est l'anti-total ERK C.T (dilution 1 : 5000). L'anticorps secondaire est quant à lui l'anti-IgG de souris couplé à la HRP utilisé à une dilution de 1 : 20 000 ( $\lambda$  représente le marqueur de poids moléculaire)

### 3.2.1.3 Capacité des protéines de fusion à lier un ligand

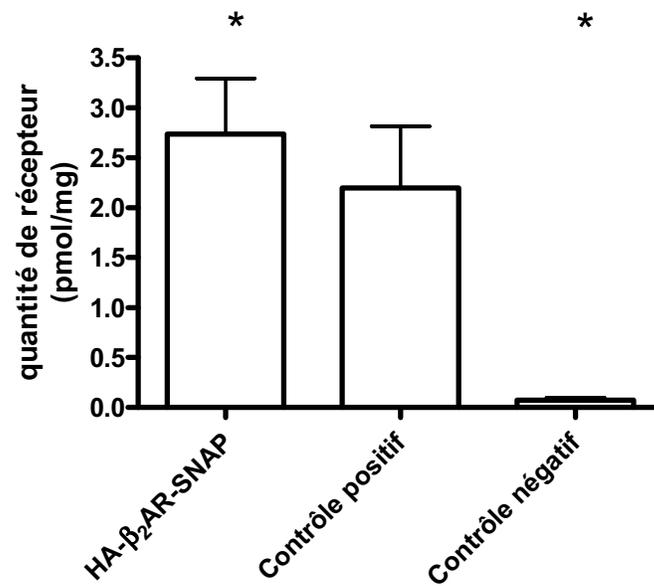
L'antagoniste radiomarqué  $^{125}$ I-CYP a été utilisé afin de tester la capacité de la construction HA- $\beta$ 2AR-SNAP à lier un ligand et donc son intégrité fonctionnelle. Cette expérience a démontré que HA- $\beta$ 2AR-SNAP est apte à lier ce ligand de façon comparable au récepteur non étiqueté avec SNAP (**figure 3.3 A et B**). Des tests statistiques de type *t* ont été effectués ( $p < 0.05$ ) et il n'existe pas de différence significative entre les données obtenues avec la construction HA- $\beta$ 2AR-SNAP et le contrôle positif dans la quantité de récepteurs (en pmol/mg) calculée. Nous pouvons donc conclure que la construction HA- $\beta$ 2AR-SNAP est

bien exprimée dans les cellules HEK 293 et que la présence de l'étiquette SNAP n'interfère en rien avec le repliement du récepteur puisque HA- $\beta_2$ AR-SNAP est capable de lier le  $^{125}$ I-CYP.

A)



B)



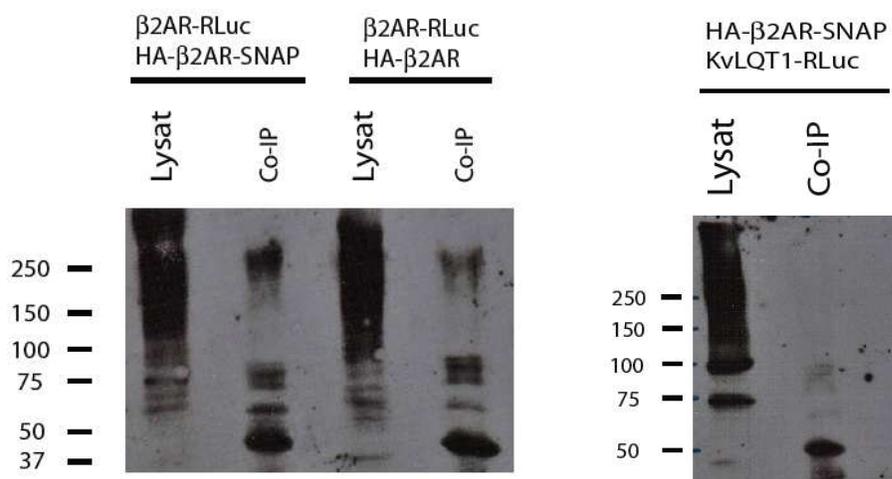
**Figure 3.3 Capacité d'un récepteur à lier un ligand A et B) Construction HA- $\beta_2$ AR-SNAP** : Les tests de liaison de l'antagoniste  $^{125}$ I-CYP ont été réalisés sur des préparations membranaires effectuées sur des cellules HEK 293 48 h suite à leur transfection avec le récepteur. L'alprenolol est utilisé pour évaluer la quantité de liaisons non spécifiques. Le récepteur  $\beta_2$ AR non marqué est utilisé à titre de contrôle positif et des cellules non transfectées à titre de contrôle négatif. **A)** Valeurs obtenues en cpm **B)** Quantification du récepteur en pmol/mg. Les données brutes (moyenne  $\pm$  l'erreur standard (S.E.)) de trois expériences indépendantes réalisées en triplicata pour la liaison spécifique du  $^{125}$ I- CYP, en cpm (compte par minute) sont les suivantes : HA- $\beta_2$ AR-SNAP,  $52,457 \pm 6164$ ; contrôle positif (HA- $\beta_2$ AR),  $45,047 \pm 6915$ ; contrôle négatif (cellules non transfectées),  $3,067 \pm 808$ . La quantité de récepteurs (en pmol/mg) a été calculée à partir de ces données brutes et les valeurs sont les suivantes : HA- $\beta_2$ AR-SNAP,  $2,737 \pm 0,557$ ; contrôle positif (HA- $\beta_2$ AR),  $2,197 \pm 0,615$ ; contrôle négatif (cellules non transfectées),  $0,070 \pm 0,025$ . Les astérisques indiquent une différence significative selon un test statistique de type  $t$  :  $p < 0,05$

#### 3.2.1.4 Homodimérisation du récepteur

Afin de s'assurer que la présence de l'étiquette SNAP en C-terminal de la construction HA- $\beta_2$ AR-SNAP n'interfère pas avec la capacité d'homodimérisation du récepteur, un essai de co-immunoprécipitation a été effectué. La **figure 3.4** montre la capacité des récepteurs HA- $\beta_2$ AR-SNAP et  $\beta_2$ AR-RLuc à interagir ensemble. Cette expérience n'a été effectuée qu'une seule fois, dans le but de d'établir une preuve de principe et de compléter les expériences de microscopie confocale et de BRET effectuées. Suite à l'interprétation de toutes ces données, il est possible de conclure que la présence de l'étiquette SNAP sur la construction HA- $\beta_2$ AR-SNAP ne nuit pas à sa capacité de dimérisation avec un autre récepteur.

Le récepteur HA- $\beta_2$ AR a été utilisé ici comme contrôle positif, afin de s'assurer que les récepteurs interagissent de la même façon en présence ou en absence de l'étiquette SNAP. Le canal KvLQT1-RLuc, ayant la même localisation cellulaire que la construction  $\beta_2$ AR-RLuc, a été utilisé comme contrôle négatif, puisqu'il est connu dans la littérature que c'est deux protéines n'interagissent pas ensemble (133). Les bandes sur l'IB présente à 50 kDa représentent les IgG anti-HA utilisé pour la co-immunoprécipitation des

récepteurs. Ensuite, celles situées à environ 75 kDa représentent le récepteur  $\beta_2$ AR-RLuc (poids moléculaire (PM): 83 kDa) et celles à 250 kDa sont en fait les oligomères de récepteurs. La bande présente à 60 kDa peut être soit une bande non spécifique reconnue par l'anticorps ou encore une forme immature du récepteur. Les bandes présentes dans le lysat ne sont pas très bien définies due à une mauvaise solubilisation des préparations membranaires. Le canal KvLQT1-RLuc est quant à lui présent dans le lysat (bande visible à 101 kDa) (la bande présente à 75 kDa peut être soit une forme immature du récepteur ou encore un produit de dégradation) mais n'est pas co-immunoprécipité par l'anticorps HA, ce qui signifie que les deux protéines n'interagissent pas ensemble.



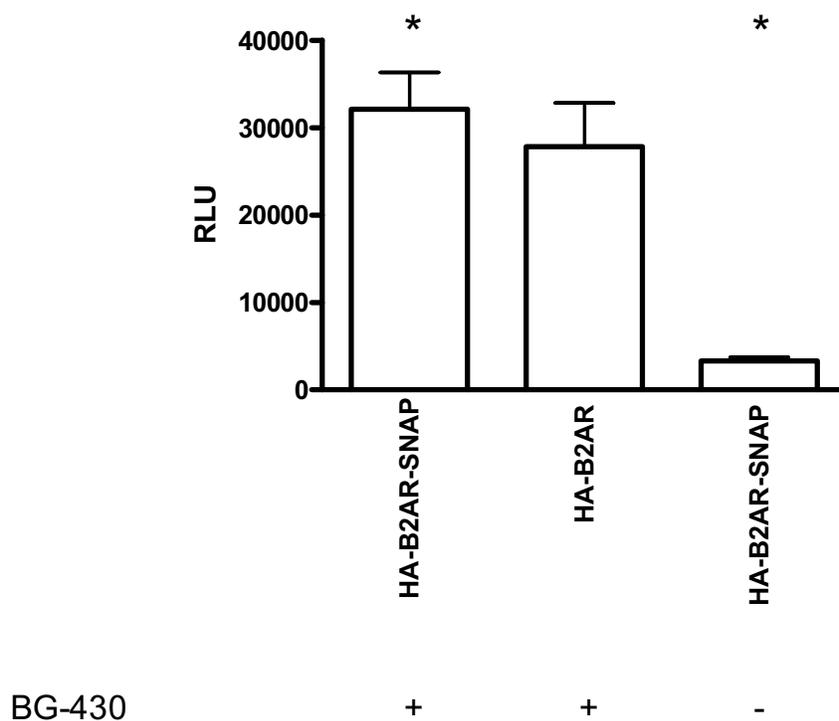
**Figure 3.4 Co-immunoprécipitation** Des préparations membranaires solubilisées provenant de cellules HEK 293 transfectées avec le récepteur HA- $\beta_2$ AR-SNAP (48 h post-transfection) ont été utilisées lors de cet essai. Les niveaux d'expressions de chacune des constructions sont confirmés par les lysats cellulaires présents sur le gel (qui représentent 7 % de la quantité totale de protéine utilisée pour l'expérimentation). Un anticorps dirigé contre l'étiquette HA a été utilisé pour co-immunoprécipité les récepteurs. Les protéines ont ensuite été révélées par IB utilisant un anticorps dirigé contre l'étiquette RLuc présente sur le récepteur, sur une membrane de nitrocellulose (Anti-HA, dilution 1 : 300, Anti-RLuc dilution 1 : 1 000, anti-IgG de souris HRP dilution 1 : 20 000) n = 1.

### 3.2.2 Développement d'un essai BRET utilisant la technologie SNAP

#### 3.2.2.1 *Marquage avec un substrat BG*

Le marquage de l'étiquette SNAP de la construction HA- $\beta_2$ AR-SNAP avec un chromophore BG est nécessaire à la visualisation de cette protéine à l'intérieur de la cellule par microscopie confocale ou encore par essai BRET. Différentes conditions de marquages ont été testées et les meilleurs résultats ont été obtenus avec une période de marquage de 30 min, suivie par deux lavages de 30 min avec une concentration de BG-430 de 5  $\mu$ M. La **figure 3.5** représente la fluorescence émise suite au marquage des différentes constructions du récepteur  $\beta_2$ AR exprimées dans des cellules HEK293. Les données ont été récoltées sur un appareil Fusion à l'aide des filtres d'excitation de 425/30 nm et d'émission 480/LP nm (BG-430, excitation : 421 nm et émission : 444 et 484 nm).

La fluorescence observée n'est pas causée par la seule présence de l'étiquette SNAP puisqu'en absence de substrat les valeurs obtenues sont très faibles. Il est à noter qu'elles sont significativement différentes de celles obtenues lorsque la construction est marquée avec le substrat BG-430. Par contre, en les comptes de fluorescence sont similaire, que ce soit en absence ou en présence de l'étiquette SNAP sur le récepteur  $\beta_2$ AR lorsque les cellules sont marquées avec 5  $\mu$ M de BG-430 (confirmer par test statistique de type *t*). Ce phénomène peut être causé par un marquage non spécifique par le substrat BG-430 ou encore par du substrat BG-430 non lié qui n'a pas réussi à être retiré de la cellule suite à la réaction de marquage. Afin de savoir si l'un ou l'autre de ces phénomènes est attribuable aux valeurs de fluorescence élevées, des essais de BRET et de microscopie confocale seront réalisés.



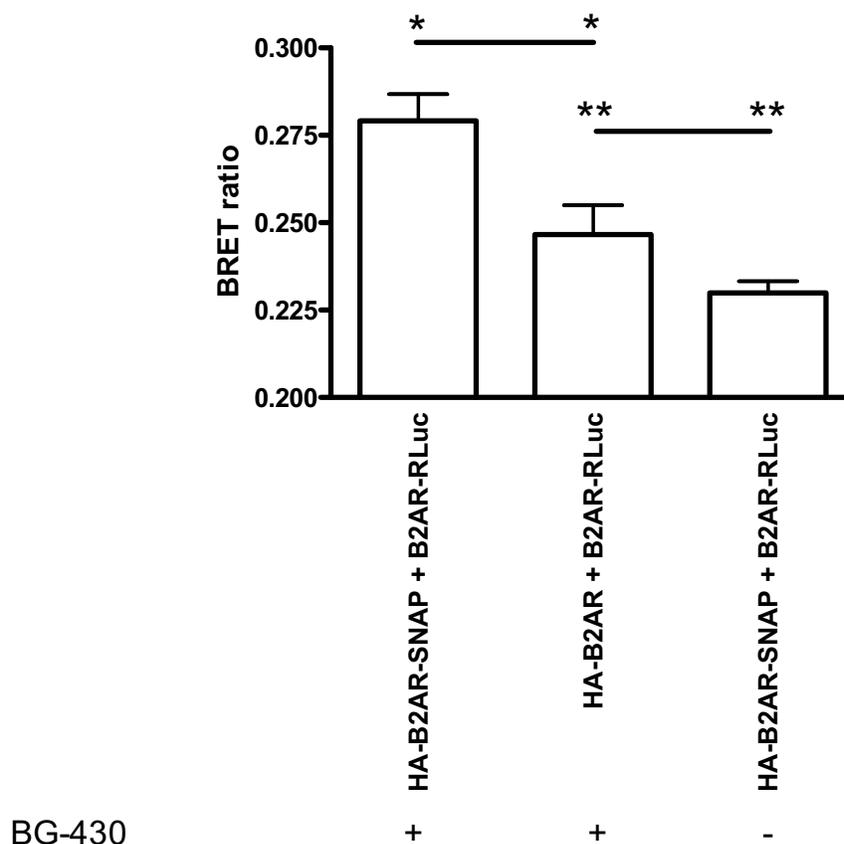
**Figure 3.5 Marquage du clone HA- $\beta_2$ AR-SNAP avec 5  $\mu$ M de BG-430** Quarante-huit heures post transfection avec 2  $\mu$ g d'ADNc des différents clones, des cellules HEK 293 ont été marquées avec 5  $\mu$ M de substrat BG-430 pendant 30 min. Suite au retrait du substrat, elles ont été rincées et lavées comme indiqué dans le protocole précédent. Les cellules ont par la suite été re-suspendues dans du PBS 1 x et lues avec un appareil Fusion à l'aide des filtres d'excitation 425/30 nm et d'émission 480/LP nm (BG-430, excitation : 421 nm et émission : 444 et 484 nm). Les données brutes de fluorescences (moyenne  $\pm$  S.E) de plusieurs expériences indépendantes pour le marquage avec le substrat BG-430 en unité relative de luminescence (RLU) sont les suivantes : HA- $\beta_2$ AR-SNAP, 32 084  $\pm$  4 219; contrôle négatif HA- $\beta_2$ AR, marqué, 27 802  $\pm$  5 013 ; et le contrôle négatif (HA- $\beta_2$ AR-SNAP, non-marqué), 3 297  $\pm$  410. Les astérisques indiquent une différence significative selon un test statistique de type *t* :  $p < 0.05$

### 3.2.2.2 Essai BRET

Le principal avantage de l'étiquette SNAP est sa polyvalence. Une très grande variété de substrats est disponible sur le marché tels différents

fluorophores perméables ou non à la membrane plasmique, de la biotine et des anticorps reconnaissant directement l'étiquette. Cette polyvalence pourrait faciliter l'étude de l'assemblage et de l'acheminement des RCPGs à la membrane plasmique en diminuant le nombre d'outils biochimiques nécessaires. Une des méthodes très utilisées dans l'étude des interactions entre deux protéines est le BRET. Un essai utilisant les différentes caractéristiques de cette étiquette a été développé. La construction HA- $\beta_2$ AR-SNAP a été utilisée en tant qu'accepteur BRET, suite à son marquage avec le substrat BG-430, en combinaison avec le récepteur  $\beta_2$ AR-RLuc, qui agit ici, en tant que donneur. Comme des essais de BRETs standards utilisant des récepteurs  $\beta_2$ AR étiquetés ont démontré que leur dimérisation était possible (2) et que ce phénomène a aussi été prouvé par des essais de co-immunoprécipitation (65), l'interaction entre les constructions HA- $\beta_2$ AR-SNAP et  $\beta_2$ AR-RLuc devrait être possible. C'est exactement ce qui est observé à la **figure 3.6**.

Les valeurs de BRET obtenues lorsque les cellules ont été marquées avec le substrat BG sont significativement différentes (selon un test statistique *t* type *t*) en présence ou non de l'étiquette SNAP. Il en est de même lorsque les cellules transfectées avec la construction HA- $\beta_2$ AR-SNAP sont marquées ou non avec le substrat BG. Ces données signifient qu'un transfert d'énergie a lieu entre le donneur et l'accepteur lorsque les cellules sont transfectées avec la construction HA- $\beta_2$ AR-SNAP et marquées avec le substrat BG-430 et que ce transfert d'énergie n'est pas causé ni par la présence seule de l'étiquette SNAP ou encore par un marquage des cellules avec le substrat. Il est donc possible d'utiliser l'étiquette SNAP comme accepteur de BRET.



**Figure 3.6 : Essai SNAP-BRET** Ces expériences ont été réalisées sur des cellules HEK 293 48 h suite à leur transfection. Les cellules ont été transfectées avec 2 µg d'ADNc des constructions indiquées. Une incubation de 30 min avec 5 µM de BG-430 a permis de marquer les cellules (selon le protocole indiqué plus haut) avant d'effectuer l'essai BRET. Ces cellules ont par la suite été re-suspendues dans du PBS 1 x et 5 µM de Coelenterazine 400A ont été ajoutés à l'échantillon juste avant sa lecture. Les données ont été récoltées à l'aide d'un appareil Fusion en utilisant un filtre de 410/80 nm pour les comptes d'émission de la luciférase ainsi qu'un filtre de 480/LP nm pour les comptes d'émission du BG-430. Le ratio de BRET représente les comptes d'émission du BG-430 divisés par les comptes d'émission de la luciférase. Les ratios de BRET obtenus lors de plusieurs expériences indépendantes sont les suivants (moyenne ± S.E) : HA-β<sub>2</sub>AR-SNAP avec β<sub>2</sub>AR-RLuc, 0.279 ± 0.008; contrôle négatif HA-β<sub>2</sub>AR, marqué avec β<sub>2</sub>AR-RLuc, 0.247 ± 0.008 ; et le contrôle négatif (HA-β<sub>2</sub>AR-SNAP, non-marqué avec β<sub>2</sub>AR-RLuc), 0.230 ± 0.003. Les astérisques indiquent une différence significative selon un test statistique de type *t* : *p* < 0.05

### 3.2.2.3 Localisation cellulaire

Les valeurs de fluorescence obtenues lors du marquage du clone HA- $\beta_2$ AR avec 5  $\mu$ M de BG-430 sont élevées. Afin de nous aider à en déterminer la cause, un essai de microscopie confocale a été réalisé. L'essai a été effectué parallèlement avec les constructions HA- $\beta_2$ AR et HA- $\beta_2$ AR-SNAP pour pouvoir ainsi comparer l'effet de la présence de l'étiquette SNAP sur le comportement cellulaire du récepteur ainsi que sur le marquage avec le substrat BG-430.

Afin de réussir à recueillir ces données, un microscope LSM 510 de la compagnie Zeiss a été utilisé. Le laser Argon2, qui possède une longueur d'onde d'excitation de 458, 488 et 514 nm, est utilisé en combinaison avec le filtre de type « band pass » de 475 à 525 nm pour les lectures d'émission des cellules lorsqu'elles sont marquées avec le BG-430. Pour ce qui est du fluorophore Alexa 555, le laser utilisé est le HeNe1, qui possède une longueur d'onde d'excitation de 543 nm et le filtre de type « long pass » de 560 nm sert à prendre les lectures d'émission.

Les cellules ont tout d'abord été détectées par immunofluorescence à l'aide de l'anticorps primaire dirigé contre l'étiquette HA présente sur les deux récepteurs (HA- $\beta_2$ AR et HA- $\beta_2$ AR-SNAP) et de l'anticorps secondaire couplé au fluorophore Alexa 555. Ainsi, il est possible de détecter les deux clones et de constater qu'ils s'expriment à l'intérieur de la cellule (possiblement dans le réticulum endoplasmique, qui occupe une grande partie du cytosol dans les cellules HEK 293) et aussi à la membrane plasmique. La présence de l'étiquette SNAP ne change pas le comportement du récepteur.

Par la suite, les cellules ont été marquées seulement avec 2  $\mu$ M de BG-430. Normalement, le substrat qui n'a pas réagi avec l'étiquette SNAP devrait être éliminé de la cellule au cours des étapes de lavages. Ce n'est par contre pas ce qui est observé. En fait, la quantité de substrat présente dans les cellules est

comparable qu'elles aient été transfectées avec HA- $\beta_2$ AR ou encore avec HA- $\beta_2$ AR-SNAP. Que ce soit en absence ou en présence de l'étiquette SNAP le substrat se retrouve partout dans le cytosol. Cependant, une autre section plus concentrée est détectée dans les cellules transfectées avec la construction HA- $\beta_2$ AR-SNAP qui représente probablement l'endroit où se trouve le récepteur. Par contre, ce n'est qu'au cours des essais de double marquage avec le substrat BG-430 et l'anticorps anti-HA qu'il sera possible de tirer des conclusions plus claires.

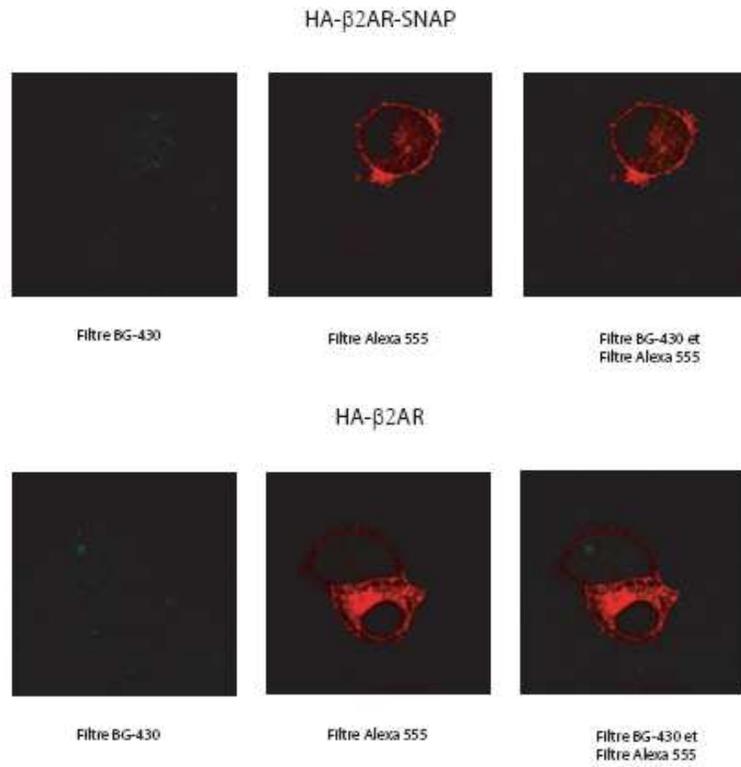
Le double marquage des récepteurs HA- $\beta_2$ AR et HA- $\beta_2$ AR-SNAP avec le substrat BG-430 et l'anticorps primaire anti-HA (avec l'anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé au fluorophore Alexa 555) permet de voir si les deux substrats co-localisent dans la cellule. Pour le récepteur HA- $\beta_2$ AR il est possible de constater que la quantité de co-localisation est quasi inexistante. Il est donc possible de supposer que le substrat BG-430, encore présent dans la cellule, est causé par un retrait inefficace du substrat non lié lors des différentes étapes de lavages. Pour le récepteur HA- $\beta_2$ AR-SNAP, il y a une certaine co-localisation entre le fluorophore Alexa 555 et le BG-430. Ces données signifient donc que le substrat BG-430 se lie à l'étiquette SNAP, mais qu'une certaine quantité de récepteurs n'est pas marquée avec le BG-430. Il est aussi possible de voir qu'une partie du BG-430 semble se trouver dans le cytosol et ne semble pas s'être lié au récepteur.

Un contrôle négatif utilisant seulement l'anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé au fluorophore Alexa 555 permet de constater que la réaction antigène anticorps entre l'anti-HA et l'anti-souris est spécifique. La fluorescence observée est donc associée à la présence des récepteurs couplés à l'antigène HA.

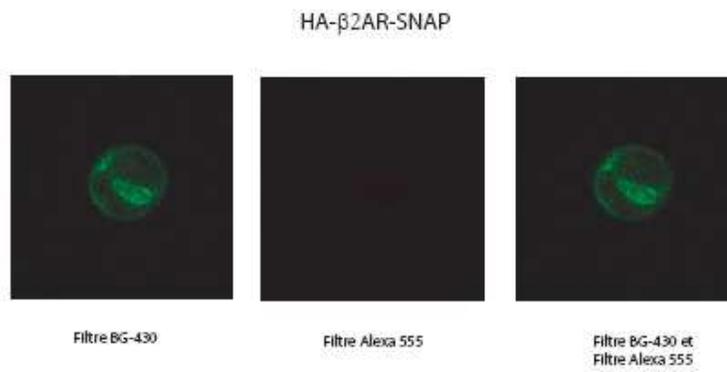
Ces résultats nous permettent de conclure que le BG-430 est capable de marquer spécifiquement l'étiquette SNAP mais que le substrat n'ayant pas réagi demeure à l'intérieur de la cellule. Cette méthode n'est donc pas très utile pour les essais de microscopie confocale, mais ne devrait en aucun cas interférer avec les

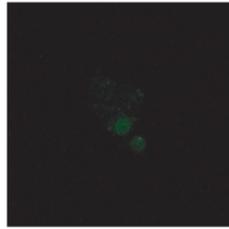
essais de BRET (puisque le substrat n'ayant pas réagi ne semble pas se trouver à proximité des récepteurs étudiés).

A)



B)

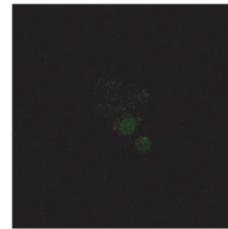


HA- $\beta$ 2AR

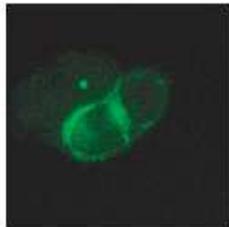
Filtre BG-430



Filtre Alexa 555

Filtre BG-430 et  
Filtre Alexa 555

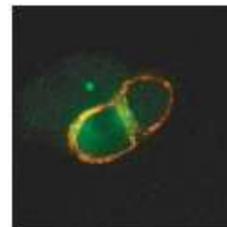
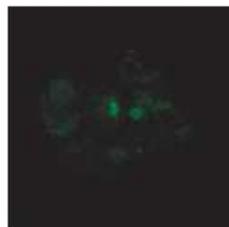
C)

HA- $\beta$ 2AR-SNAP

Filtre BG-430



Filtre Alexa 555

Filtre BG-430 et  
Filtre Alexa 555HA- $\beta$ 2AR

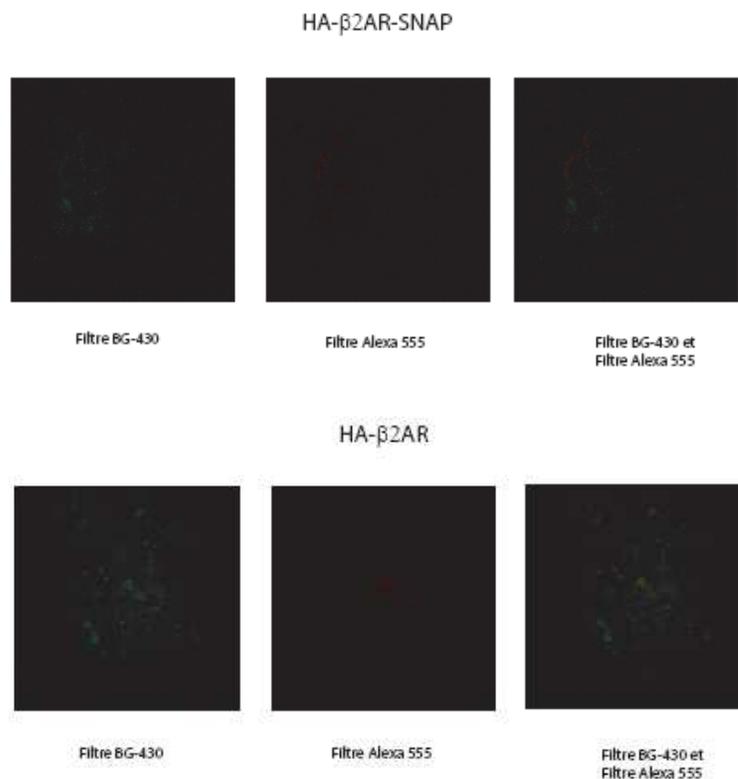
Filtre BG-430



Filtre Alexa 555

Filtre BG-430 et  
Filtre Alexa 555

D)



**Figure 3.7 Essai de microscopie confocale :** Les images ont été prises sur des cellules HEK 293 48 h suite à leur transfection avec les différentes constructions indiquées. **A)** En présence de l'anticorps anti-HA **B)** En présence du substrat BG-430 **C)** En présence de l'anticorps anti-HA et du substrat BG-430 **D)** En présence de l'anticorps secondaire seulement Deux  $\mu$ M de BG-430, anticorps primaire anti-HA 1 : 200 et anticorps secondaire anti-IgG souris couplé au fluorophore Alexa 555 1 : 600 sont utilisés lors de l'essai. Les photos ont été prises sur un microscope LSM510 de Zeiss à l'aide des lasers Argon 2 (BG-430) et HeNe1 (Alexa 555), des filtres de 475 à 525 nm (BG-430) ou encore de 560 nm (Alexa 555) et de l'objectif à immersion de 63 X.

### 3.3 Caractérisation initiale des complexes formés par les récepteurs PAF et FP : Identification de leurs partenaires d'interaction

Les constructions pIRESH-cMyc-FP-RLuc, pIRESH-cMyc-PAFR-RLuc pIRESp-HA-FP-Venus et pIRESp-HA-PAFR-Venus ont été réalisées et caractérisées par Darlaine Pétrin et Eugénie Goupil. Il est possible de voir une partie des expériences qu'elles ont réalisées en **annexe 1** aux **figures 7.1 et 7.2**. Les récepteurs PAF et FP ayant une étiquette RLuc ou Venus sont aptes à lier un ligand et à activer les protéines MAPKs et sont exprimés dans des cellules HEK 293, comme montré sur les images de microscopie confocale.

Afin de mieux caractériser les récepteurs PAF et FP, de comprendre les voies de signalisations utilisées et ainsi de trouver des médicaments plus efficaces pour traiter des maladies impliquant ces récepteurs, il est primordial de comprendre leur comportement de base. Les expériences qui suivent ont donc été réalisées en se basant sur cette idée à l'aide de la technologie BRET. Ces manipulations représentent en fait les premières étapes d'un vaste projet ayant pour but de caractériser les hétérodimères de récepteurs. Ce projet tentera de déterminer les implications de ces dimères dans la signalisation des récepteurs et par la suite de développer des ligands spécifiques à ces hétérodimères. Comme il a été mentionné précédemment le BRET est une technique de base reconnue pour l'identification d'interactions protéines/protéines comme par exemple pour des études de dimérisation et de liaison des protéines  $G\alpha$  et  $G\beta\gamma$ .

#### 3.3.1 Homodimérisation des récepteur

Au cours des dernières années, plusieurs études ont démontré à l'aide de différentes techniques la capacité des RCPGs à dimériser (21, 104, 120, 158). En fait, plusieurs études tendent à prouver que l'homodimère est l'unité de base de signalisation des RCPGs, il est donc intéressant de voir si cette théorie s'applique

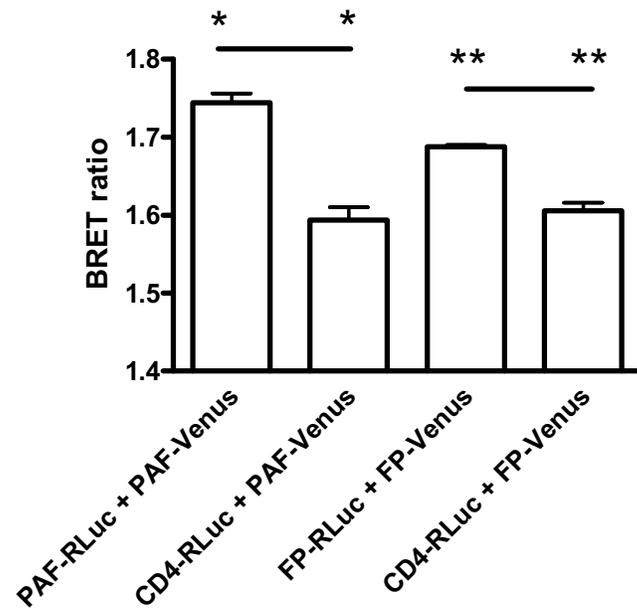
aussi aux récepteurs PAF et FP. La **figure 3.8 A** représente les résultats obtenus lors de plusieurs expériences indépendantes. Des tests statistiques de type *t* confirment l'homodimérisation des récepteurs PAF et FP puisque les ratios de BRET obtenus entre les deux récepteurs sont significativement différents de ceux obtenus lorsque les cellules ont été transfectées avec la protéine CD4-RLuc et le récepteur (PAF ou encore FP). La protéine CD4-RLuc est utilisée en tant que contrôle négatif. Cette protéine est impliquée dans la réponse immunitaire et est exprimée à la membrane plasmique, mais elle n'interagit pas avec les RCPGs. Elle a déjà été utilisée en tant que contrôle négatif au cours de différentes études faites par notre laboratoire (45) (44). Les valeurs de BRET obtenues en combinaison avec ce partenaire d'interaction découlent donc des interactions non spécifiques qui ont lieu dans la cellule, attribuables à la proximité et à la surexpression des protéines de fusions étudiées.

Toutefois, afin de s'assurer que la protéine CD4 est un contrôle négatif valable, et que le BRET obtenu représente bel et bien une véritable interaction, des essais de compétition (125), utilisant une quantité croissante de récepteurs non marqués, sont réalisés. Ces essais sont basés sur le principe que si nous sommes en présence d'une interaction réelle, la présence d'une plus grande quantité de récepteurs non marqués devrait entrer en compétition avec l'interaction observée entre les deux récepteurs, ce qui entraînera une diminution dans les valeurs des ratios de BRET. Les résultats de ces essais de compétition sont présentés chez les **figures 3.8 B** (pour le récepteur PAFR) et **3.8 C** (pour le récepteur FP). Des analyses statistiques (test ANOVA) montrent qu'aucune différence significative n'est observée dans les données de BRET lors de l'augmentation de la quantité de récepteur non marqué, et ce chez tant chez le récepteur PAFR que chez le récepteur FP. Il est tout de même possible d'observer une tendance vers la compétition de l'essai BRET. Par contre, comme cette compétition n'est pas marquée les résultats ne peuvent être pris en ligne de compte.

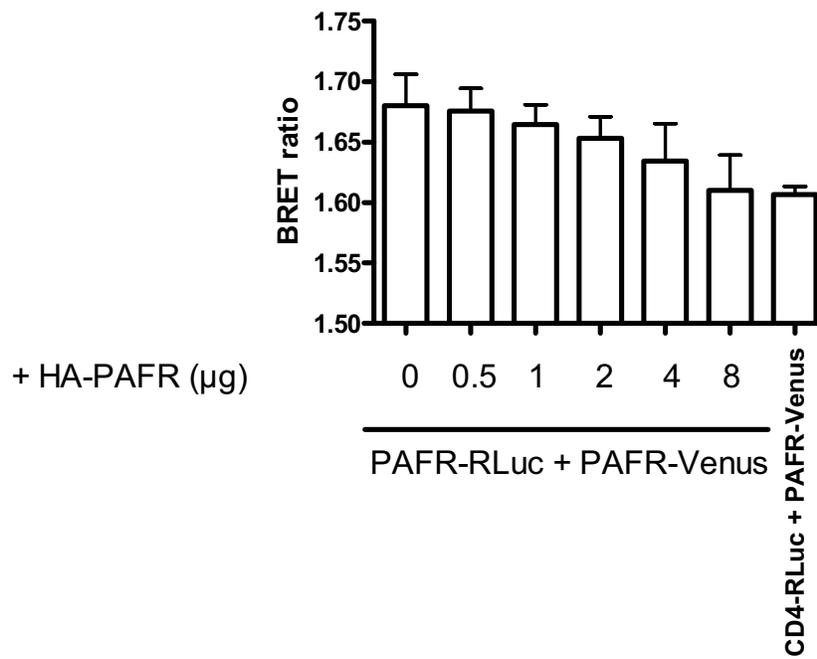
C'est pour cette raison qu'il serait aussi important de procéder à des études de saturation. Il est à noter que pour plusieurs autres expériences, nous avons pu prouver, à l'aide de ces courbes de saturation, que la protéine CD4 n'interagit pas avec les protéines étudiées et qu'elle représente un contrôle négatif adéquat. L'essai de saturation se base sur le principe suivant : une quantité fixe de la protéine couplée à la luciférase est exprimée dans les cellules en combinaison avec une quantité croissante de protéine couplée à l'accepteur. Les interactions non-spécifiques tenderont à augmenter de façon linéaire tandis que les véritables interactions augmenteront de manière hyperbolique jusqu'à l'atteinte d'un plateau représentant la saturation complète de toutes les protéines donneuses présentes à l'intérieure de la cellule (7). Comme les expériences présentées ici ce sont que préliminaires, ces essais n'ont pas encore été effectués.

C'est donc, la combinaison des essais de compétition et de saturation qui permettront de conclure que l'interaction observée est belle et bien réelle et que le choix des contrôles est convenable.

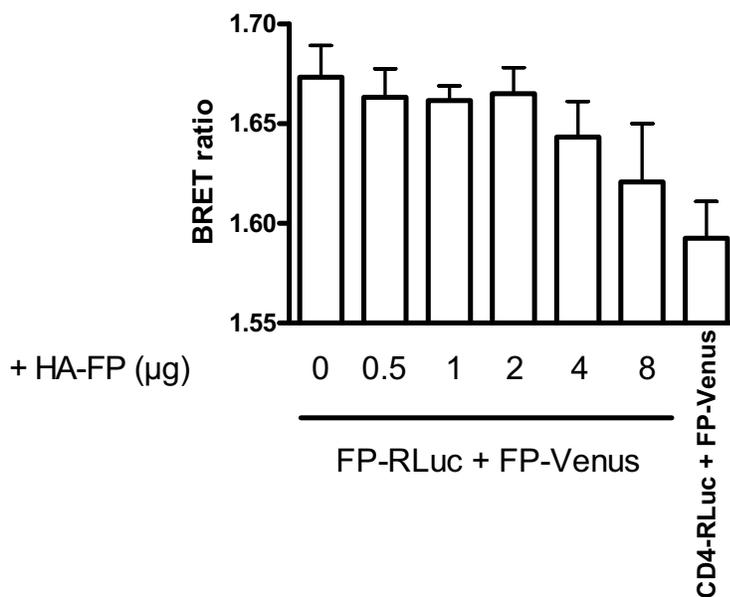
**A)**



B)



C)



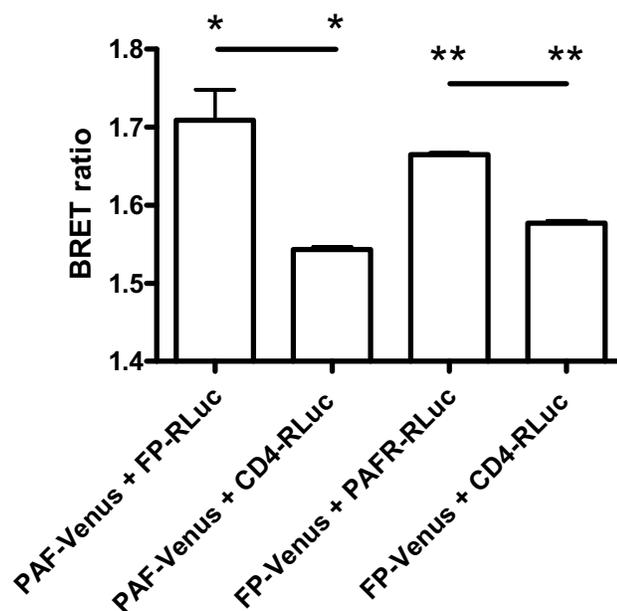
**Figure 3.8 : Homodimérisation des récepteurs PAF et FP (essai BRET) A)**

Homodimérisation des récepteurs PAF et FP l'essai B) Compétition de l'interaction entre les récepteurs PAFR-RLuc et PAFR-Venus C) Compétition de l'interaction entre les récepteurs FP-RLuc et FP-Venus Toutes ces expériences ont été réalisées sur des cellules HEK 293 48 h suite à leur transfection. Les cellules ont été transfectées avec 1 µg d'ADNc des constructions PAF et FP, 0.5 µg de CD4-RLuc et entre 0 et 8 µg de HA-FP et HA-PAFR. La technologie de BRET<sup>1</sup> est utilisée et les cellules ont été re-suspendues dans du PBS 1 x avant que 0.2 ng/µL de Coelenterazine H ne soit ajouté à l'échantillon. Les données ont été récoltées à l'aide d'un appareil Fusion en utilisant un filtre de 450/58 nm pour les comptes d'émission de la luciférase ainsi qu'un filtre de 480/LP nm pour les comptes d'émission de Venus. Le ratio de BRET représente les comptes d'émission de la protéine Venus divisés par les comptes d'émission de la luciférase. Les valeurs des ratios de BRET sont les suivantes (moyenne ± S.E) pour la figure A : PAFR-RLuc avec PAFR-Venus,  $1.744 \pm 0.012$  ; CD4-RLuc avec PAFR-Venus,  $1.594 \pm 0.017$ ; FP-RLuc avec FP-Venus,  $1.688 \pm 0.002$  et CD4-RLuc avec FP-Venus,  $1.606 \pm 0.011$ . Les valeurs des ratios de BRET obtenus (moyenne ± S.E) au cours d'au moins trois expériences indépendantes pour la figure B sont : en présence de 0 µg de HA-PAFR,  $1.680 \pm 0.026$  ; de 0.5 µg de HA-PAFR,  $1.676 \pm 0.019$  ; de 1 µg de HA-PAFR,  $1.664 \pm 0.016$  ; de 2 µg de HA-PAFR,  $1.653 \pm 0.018$  ; de 4 µg de HA-PAFR,  $1.634 \pm 0.031$  ; de 8 µg de HA-PAFR,  $1.610 \pm 0.029$  ; et du CD4-RLuc avec PAFR-Venus,  $1.607 \pm 0.007$ . Pour ce qui est des ratios de BRET obtenus lors de l'essai de la figure C ils sont les suivants : en présence de 0 µg de HA-FP,  $1.673 \pm 0.016$  ; de 0.5 µg de HA-FP,  $1.663 \pm 0.014$  ; de 1 µg de HA-FP,  $1.662 \pm 0.007$  ; de 2 µg de HA-FP,  $1.665$

$\pm 0.013$  ; de 4  $\mu\text{g}$  de HA-FP,  $1.643 \pm 0.018$  ; et de 8  $\mu\text{g}$  de HA-FP,  $1.621 \pm 0.029$ . Le contrôle négatif de CD4-RLuc avec FP-Venus donne un ratio de BRET d'une valeur de  $1.593 \pm 0.018$ . Les astérisques indiquent une différence significative selon un test statistique de type  $t$  :  $p < 0.05$

### 3.3.2 Hétérodimérisation de récepteurs

Des études ont aussi démontré que les RCPGs hétérodimérisent entre eux (120). Les récepteurs PAF et FP sont exprimés dans le même type de cellule dans le corps, ce qui est particulièrement vrai chez les cellules utérines (69, 117) il est donc possible qu'ils interagissent ensemble. Encore une fois, c'est la méthode de BRET qui a été privilégiée pour l'étude de cette interaction. La **figure 3.9** représente les résultats obtenus lors de trois expériences indépendantes. Encore une fois la protéine CD4-RLuc est utilisée en tant que contrôle négatif. L'essai a été réalisé en parallèle avec les deux combinaisons possibles FP-RLuc + PAFR-Venus et PAFR-RLuc + FP-Venus afin de m'assurer que les résultats sont constants et ne dépendent pas des étiquettes présentes. Il est à noter que le clone FP-Venus s'exprime moins bien que le clone PAFR-Venus, c'est probablement pour cette raison que les comptes sont moins élevés pour les essais avec cette construction. Les valeurs sont tout de même significativement différentes de celle du contrôle négatif, nous sommes donc en présence d'une interaction entre les récepteurs PAF et FP dans les cellules HEK 293.



**Figure 3.9 : Hétérodimérisation entre les récepteurs PAF et FP** Les expériences ont été réalisées sur des cellules HEK 293 48 h suite à leur transfection. Les cellules ont été transfectées avec 2  $\mu$ g d'ADNc des constructions PAF, FP et CD4-RLuc. La technologie de BRET<sup>1</sup> est utilisée et les cellules ont été re-suspendues dans du PBS 1 x avant que 0.2 ng/ $\mu$ L de Coelenterazine H ne soit ajouté à l'échantillon. Les données ont été récoltées à l'aide d'un appareil Fusion en utilisant un filtre de 450/58 nm pour les comptes d'émission de la luciférase ainsi qu'un filtre de 480/LP nm pour les comptes d'émission de Venus. Le ratio de BRET représente les comptes d'émission de la protéine Venus divisés par les comptes d'émission de la luciférase. Les valeurs des ratios de BRET sont les suivantes (moyenne  $\pm$  S.E) : FP-RLuc avec PAFR-Venus,  $1.709 \pm 0.039$  ; CD4-RLuc avec PAFR-Venus,  $1.543 \pm 0.003$  ; PAFR-RLuc avec FP-Venus,  $1.664 \pm 0.003$  et CD4-RLuc avec FP-Venus,  $1.577 \pm 0.003$ . Les astérisques indiquent une différence significative selon un test statistique de type *t* :  $p < 0.05$

### 3.3.3 Interaction avec les protéines G

Les RCPGs ont été tout d'abord connus pour leur capacité à activer et signaler via les protéines G hétérotrimériques. C'est donc pour cette raison que des essais BRET impliquant les protéines  $G\beta\gamma$  et  $G\alpha$  ont été réalisés. Il est connu que PAFR et FP se lient à  $G\alpha_q$ . Des essais de BRET ont donc été réalisés afin de

déterminer si la protéine  $G\alpha_q$  se lie aux récepteurs de façon constitutive ou encore suite à sa stimulation par un ligand et si la présence des protéines  $G\beta\gamma$  est nécessaire pour que cette interaction prenne place.

Il est possible d'observer à la **figure 3.10 A** les résultats obtenus lors de l'essai entre le récepteur PAF et la protéine  $G\alpha_q$ . Un test statistique de type ANOVA a été réalisé et il n'y a pas de différence significative entre les ratios de BRET obtenus pour le contrôle négatif et ceux de l'essai que ce soit en présence ou en absence des protéines  $G\beta_1\gamma_2$ . Ces résultats mènent à deux conclusions possibles : soit la protéine  $G\alpha_q$  ne se lie pas au récepteur PAF de façon constitutive ou les deux partenaires d'interaction ne sont pas dans une orientation permettant le transfert d'énergie entre les protéines RLuc et Venus.

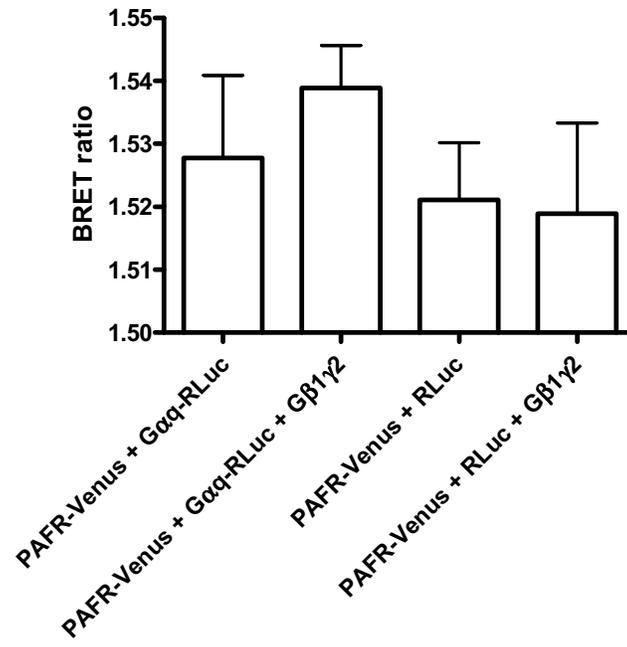
L'expérience montrée à la **figure 3.10 B** entre le récepteur PAF et la protéine  $G\alpha_q$  sous l'effet de la stimulation du récepteur PAF avec  $1\ \mu\text{M}$  de cPAF pour une période de 20 sec n'a été réalisée qu'une seule fois, puisqu'aucun effet n'est observé l'expérience a donc été abandonnée. Un test statistique ANOVA a montré qu'il existe une différence significative entre PAFR-Venus avec  $G\alpha_q$ -RLuc ou encore avec RLuc lorsque stimulé avec le véhicule ainsi qu'entre PAFR-Venus avec  $G\alpha_q$ -RLuc en présence de  $G\beta_1\gamma_2$  ou encore avec RLuc en présence de  $G\beta_1\gamma_2$  lorsque stimulé avec le véhicule. Il existe aussi une différence lorsque PAFR-Venus avec RLuc stimulé avec le véhicule se retrouve en présence ou non de  $G\beta_1\gamma_2$ . Une autre différence entre PAFR-Venus lorsque stimulé avec cPAF en présence de  $G\alpha_q$ -RLuc ou de RLuc est observée. Malgré le fait qu'il n'y ait aucune différence significative, il est possible d'observer une tendance vers l'interaction entre la protéine PAFR-Venus et la protéine  $G\alpha_q$ -RLuc lorsque celles-ci sont stimulées avec cPAF en comparaison avec le même essai, mais en présence de la protéine RLuc seule (sans  $G\alpha_q$ ). Ces résultats peuvent suggérer plusieurs choses : soit que la protéine  $G\alpha_q$  est recrutée au récepteur PAF à un temps de stimulation avec cPAF différent de ceux utilisés lors de l'essai, soit que

la protéine G $\alpha$ q et le récepteur PAF ne se retrouvent dans une orientation permettant un transfert efficace d'énergie entre les protéines PLuc et Venus.

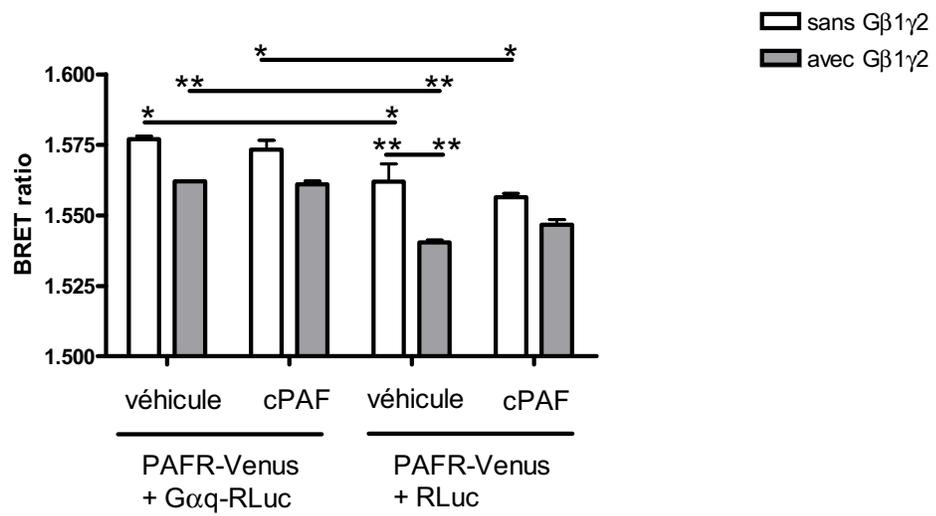
La **figure 3.10 C** représente les résultats obtenus lors de l'essai entre le récepteur FP et la protéine G $\alpha$ q. Un test statistique de type ANOVA a été réalisé et il n'y a pas de différence significative entre les ratios de BRET obtenus pour le contrôle négatif et ceux de l'essai que ce soit en présence ou en absence des protéines G $\beta$ 1 $\gamma$ 2. Ces résultats mènent encore une fois aux deux conclusions énumérées plus haut : soit la protéine G $\alpha$ q ne se lie pas au récepteur FP de façon constitutive ou les deux partenaires d'interaction ne sont pas dans une orientation permettant le transfert d'énergie entre les protéines RLuc et Venus.

Pour ce qui est de la **figure 3.10 D** entre le récepteur FP et la protéine G $\alpha$ q sous l'effet de la stimulation avec 1  $\mu$ M de PGF2 $\alpha$  pour une période de 1 min, elle a été effectuée en triplicata pour trois expériences indépendantes. Un test statistique de type ANOVA indique qu'il n'existe aucune différence significative entre les essais décrits ici. Ces résultats peuvent suggérer plusieurs choses : soit la protéine G $\alpha$ q est recrutée au récepteur FP à un temps de stimulation avec PGF2 $\alpha$  différent de ceux utilisés lors de l'essai, soit que la protéine G $\alpha$ q et le récepteur FP ne se retrouvent dans une orientation permettant un transfert efficace d'énergie entre les protéines PLuc et Venus.

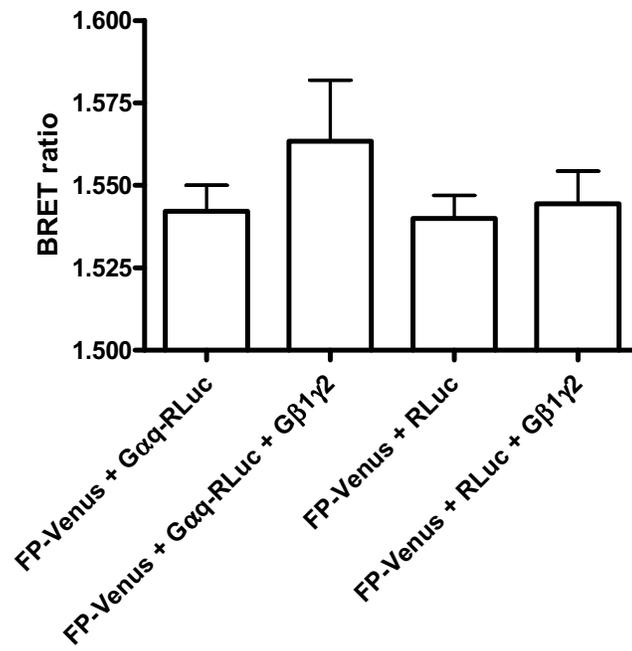
A)



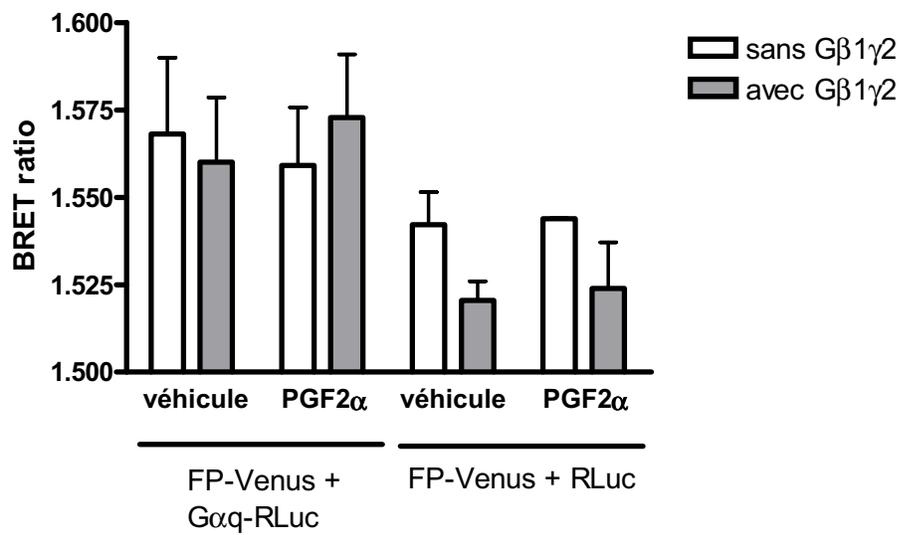
B)



C)



D)



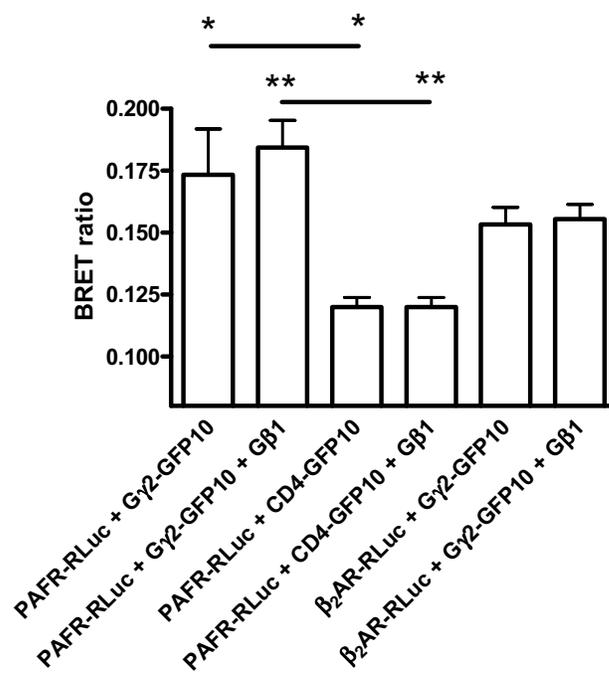
**Figure 3.10 : Interaction de la protéine Gαq avec les récepteurs PAF et FP** Les expériences ont été réalisées sur des cellules HEK 293 48 h suite à leur transfection. Les cellules ont été transfectées avec 1 µg d'ADNc pour les clones PAFR-Venus, FP-Venus et Gαq-RLuc et 2 µg du clone RLuc (puisque les codons ne sont pas humanisés). Pour les essais de stimulation 5 µg d'ADNc de chacune des constructions (sauf pour RLuc où 10 µg ont été transfectés) ont été transfectés dans des T-75. **A) Interaction de Gαq avec le récepteur PAF B) Interaction de Gαq avec le récepteur PAF suite à une stimulation par cPAF** Le véhicule est composé de 495 µL de PBS + 5 µL d'éthanol 100 % et la concentration de cPAF utilisée est de 1 µM finale. La stimulation est réalisée sur une période de 20 sec. **C) Interaction de Gαq avec le récepteur FP D) Interaction de Gαq avec le récepteur FP suite à une stimulation par PGF2α.** Le véhicule est composé de 999 µL de PBS + 1 µL d'éthanol et le PGF2α est aussi utilisé à une concentration finale de 1 µM. La stimulation est quant à elle effectuée sur une période de 1 min. Pour tous les essais, la technologie de BRET<sup>1</sup> est utilisée et les cellules ont été re-suspendues dans du PBS 1 x avant que 0.2 ng/µL de Coelenterazine H ne soit ajouté à l'échantillon. Les données ont été récoltées à l'aide d'un appareil Fusion en utilisant un filtre de 450/58 nm pour les comptes d'émission de la luciférase ainsi qu'un filtre de 480/LP nm pour les comptes d'émission de Venus. Le ratio de BRET représente les comptes d'émission de la protéine Venus divisés par les comptes d'émission de la luciférase. Les ratios de BRET récoltés sont les suivants (moyenne ± S.E) pour la figure **A** : PAFR-Venus avec Gαq-RLuc, 1.528 ± 0.013; PAFR-Venus avec Gαq-RLuc en présence de Gβ1γ2, 1.539 ± 0.007; PAFR-Venus avec RLuc, 1.521 ± 0.009; PAFR-Venus avec RLuc en présence de Gβ1γ2, 1.519 ± 0.014, pour la figure **B** PAFR-Venus avec Gαq-RLuc stimulé avec le véhicule, 1.577 ± 0.001; PAFR-Venus avec Gαq-RLuc en présence de Gβ1γ2 stimulé avec le véhicule, 1.562 ± 0.000; PAFR-Venus avec Gαq-RLuc stimulé avec 1 µM de cPAF, 1.573 ± 0.003; PAFR-Venus avec Gαq-RLuc en présence de Gβ1γ2 stimulé avec 1 µM de cPAF, 1.561 ± 0.001; PAFR-Venus avec RLuc stimulé avec le véhicule, 1.562 ± 0.006; PAFR-Venus avec RLuc en présence de Gβ1γ2 stimulé avec le véhicule, 1.540 ± 0.001; PAFR-Venus avec RLuc stimulé avec 1 µM de cPAF, 1.556 ± 0.001; PAFR-Venus avec RLuc en présence de Gβ1γ2 stimulé avec 1 µM de cPAF, 1.547 ± 0.002. pour la figure **C** FP-Venus avec Gαq-RLuc, 1.542 ± 0.008; FP-Venus avec Gαq-RLuc en présence de Gβ1γ2, 1.563 ± 0.019; FP-Venus avec RLuc, 1.540 ± 0.007; FP-Venus avec RLuc en présence de Gβ1γ2, 1.544 ± 0.010. ainsi que pour la figure **D** FP-Venus avec Gαq-RLuc stimulé avec le véhicule, 1.568 ± 0.022; FP-Venus avec Gαq-RLuc en présence de Gβ1γ2 stimulé avec le véhicule, 1.560 ± 0.018; FP-Venus avec Gαq-RLuc stimulé avec 1 µM de PGF2α, 1.559 ± 0.017; FP-Venus avec Gαq-RLuc en présence de Gβ1γ2 stimulé avec 1 µM de PGF2α, 1.573 ± 0.018; FP-Venus avec RLuc stimulé avec le véhicule, 1.542 ± 0.009; FP-Venus avec RLuc en présence de Gβ1γ2 stimulé avec le véhicule, 1.520 ± 0.006; FP-Venus avec RLuc stimulé avec 1 µM de PGF2α, 1.544 ± 0.000; FP-Venus avec RLuc en présence de Gβ1γ2 stimulé avec 1 µM de PGF2α, 1.524 ± 0.013. Les astérisques indiquent une différence significative selon un test statistique de type ANOVA : \* signifie p < 0.05 et \*\* signifie p < 0.01

Finalement, l'interaction entre les protéines Gβγ et les récepteurs PAF et FP est étudiée. En fait, c'est l'interaction avec la protéine Gγ2 en absence ou en présence de la protéine Gβ1 qui est analysée. La **figure 3.11 A** représente les

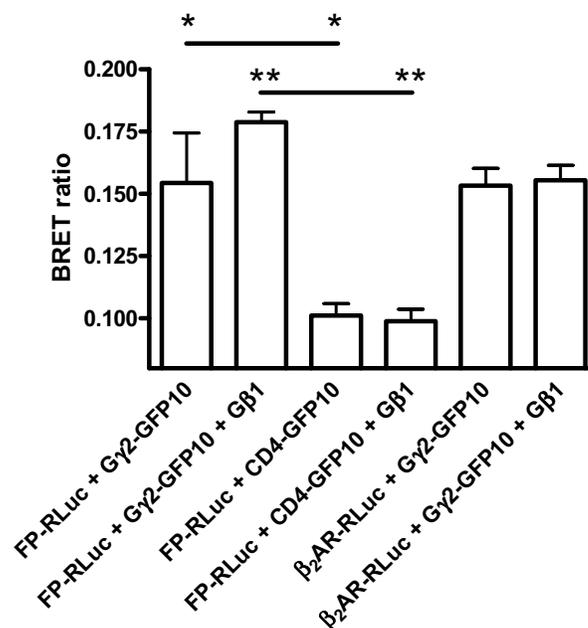
résultats obtenus lors de l'essai avec le récepteur PAF. La **figure 3.11 B** quant à elle représente les résultats obtenus lors de l'essai avec le récepteur FP.

Le récepteur  $\beta_2$ AR été utilisé comme contrôle positif lors de cet essai puisqu'une expérience similaire a été effectuée sur ce récepteur (52). Les résultats obtenus sous-entendent que la protéine  $G\gamma 2$  interagit de manière constitutive avec le récepteur  $\beta_2$ AR et que la présence de  $G\beta 1$  n'affecte pas l'interaction. Un test statistique de type ANOVA a été réalisé et il n'y a pas de différence significative entre les ratios de BRET obtenus en présence ou en absence  $G\beta 1$  pour chacune des protéines testées. Il est à noter que  $G\beta 1\gamma 2$  sont reconnus comme étant des dimères obligés, la présence de  $G\beta 1$  transfecté n'affecte pas l'interaction entre le récepteur et la protéine  $G\gamma 2$  puisque les cellules HEK 293 contiennent une quantité de  $G\beta 1$  endogène suffisante.

A)



B)



**Figure 3.11 : Interaction de la protéine G $\gamma$ 2 avec ou sans G $\beta$ 1 pour les récepteurs PAF et FP** Les expériences ont été réalisées sur des cellules HEK 293 48 h suite à leur transfection. Les cellules ont été transfectées avec 1  $\mu$ g d'ADNc pour les clones PAFR-RLuc, FP-RLuc,  $\beta$ 2AR-RLuc, G $\beta$ 1 et G $\gamma$ 2-GFP10 et 2  $\mu$ g du clone CD4-GFP10. **A) Interaction de G $\gamma$ 2 avec le récepteur PAF** **B) Interaction de G $\gamma$ 2 avec le récepteur FP.** Pour tous les essais, la technologie de BRET<sup>2</sup> est utilisée et les cellules ont été resuspendues dans du PBS 1 x avant que 5  $\mu$ M de Coelenterazine 400A ne soient ajoutés à l'échantillon juste avant sa lecture. Les données ont été récoltées à l'aide d'un appareil Fusion en utilisant un filtre de 410/80 nm pour les comptes d'émission de la luciférase ainsi qu'un filtre de 51/35 nm pour les comptes d'émission de GFP10. Le ratio de BRET représente les comptes d'émission de la protéine GFP10 divisés par les comptes d'émission de la luciférase. Les ratios de BRET récoltés sont les suivants (moyenne  $\pm$  S.E) pour la figure **A** : PAFR-RLuc avec G $\gamma$ 2-GFP10,  $0.173 \pm 0.019$ ; PAFR-RLuc avec G $\gamma$ 2-GFP10 en présence de G $\beta$ 1,  $0.184 \pm 0.011$ ; PAFR-RLuc avec CD4-GFP10,  $0.120 \pm 0.004$ ; PAFR-RLuc avec CD4-GFP10 en présence de G $\beta$ 1,  $0.120 \pm 0.004$ ;  $\beta$ 2AR-RLuc avec G $\gamma$ 2-GFP10  $0.153 \pm 0.007$ ;  $\beta$ 2AR-RLuc avec G $\gamma$ 2-GFP10 en présence de G $\beta$ 1,  $0.156 \pm 0.006$  et pour la figure **B** FP-RLuc avec G $\gamma$ 2-GFP10,  $0.154 \pm 0.020$ ; FP-RLuc avec G $\gamma$ 2-GFP10 en présence de G $\beta$ 1,  $0.179 \pm 0.004$ ; FP-RLuc avec CD4-GFP10,  $0.101 \pm 0.005$ ; FP-RLuc avec CD4-GFP10 en présence de G $\beta$ 1,  $0.099 \pm 0.005$ ;  $\beta$ 2AR-RLuc avec G $\gamma$ 2-GFP10  $0.153 \pm 0.007$ ;  $\beta$ 2AR-RLuc avec G $\gamma$ 2-GFP10 en présence de G $\beta$ 1,  $0.156 \pm 0.006$ . Les astérisques indiquent une différence significative selon un test statistique de type ANOVA : \* signifie  $p < 0.05$  et \*\* signifie  $p < 0.01$

En conclusion, les récepteurs PAF et FP interagissent de manière constitutive avec les protéines  $G\beta\gamma$ , mais il reste encore des études à réaliser avant de pouvoir déterminer de quelle façon la protéine  $G\alpha_q$  se lie à ces récepteurs, suite à une stimulation par un agoniste ou encore de manière constitutive?

## 4 Discussion :

### 4.1 Les protéines de fusion sont exprimées dans les cellules HEK 293

De nouvelles constructions des récepteurs  $\beta_2$ AR, PAF et FP ont été réalisées et des étiquettes leur ont été ajoutées. Afin de s'assurer que les modifications ajoutées à ces récepteurs n'ont altéré en aucun cas leur comportement, ainsi que leur fonction biologique initiale, des études ont été réalisées. Ces étapes préliminaires sont très importantes puisqu'il faut s'assurer que la construction engendrée fonctionne de manière similaire à celle du récepteur naturel afin de pouvoir analyser les résultats convenablement.

Il est tout d'abord important de s'assurer que le récepteur est bel et bien exprimé dans les cellules. Des préparations membranaires de la construction HA- $\beta_2$ AR-SNAP ont été visualisées par IB (montré à la **figure 3.1**). Le monomère ainsi que le dimère de cette construction sont exprimés. Il est à noter que les formes monomériques ainsi que dimériques sont elles aussi visible pour le récepteur HA- $\beta_2$ AR, qui sert ici de contrôle positif, et que la différence observée entre les deux monomères est due à la présence de l'étiquette SNAP (qui a un poids moléculaire de 22 kDa). Il est, par contre, impossible de déterminer si la construction HA- $\beta_2$ AR-SNAP est bel et bien exprimée à la membrane plasmique par cet essai, puisque les préparations membranaires permettent de récolter toutes les membranes présentes dans la cellule, dont celle du noyau et du réticulum endoplasmique. D'autres manipulations, telles qu'un essai de stimulation des protéines MAPKs ou encore un essai de microscopie confocale, devront être réalisées afin de s'assurer que la construction est bien acheminée à la surface cellulaire.

Pour ce qui est de la construction HA-PAFR-Venus, elle a été visualisée à l'aide d'un microscope confocal. Sur la **figure 7.1 B** il est possible de voir que le

récepteur est exprimé en grande majorité à la membrane plasmique, bien qu'une certaine quantité de récepteurs se trouve dans la cellule. La construction HA-FP a été détectée elle aussi par microscopie confocale. La **figure 7.1 A** montre bien que le récepteur est lui aussi exprimé à la membrane plasmique et encore une fois qu'une certaine quantité est visible à l'intérieur de la cellule.

Les constructions générées sont donc convenablement exprimées dans les cellules HEK 293 et seront par conséquent utilisées au cours des prochaines expériences.

#### **4.2 Les récepteurs $\beta$ 2AR, PAFR et FP sont aptes à lier un ligand**

Afin de s'assurer que les constructions engendrées ont la capacité de lier leur ligand respectif, des expériences de stimulation des protéines MAPKs ont été réalisées. Les RCPGs couplés à la protéine G $\alpha$ q ont la capacité d'activer les protéines MAPKs via la phospholipase C. Dans le cas de la protéine G $\alpha$ s, l'activation de la voie de signalisation des MAPKs s'effectue via la protéine kinase A (105). L'activation de la voie de signalisation des MAPKs entraîne une cascade de phosphorylation des différents joueurs impliqués. Des anticorps très spécifiques sont maintenant disponibles sur le marché et permettent de détecter cette activation des protéines MAPKs par l'identification des protéines ERK 1/2 phosphorylées.

Un article publié par le groupe du Dr Stankova a démontré que le récepteur PAF a la capacité de provoquer la phosphorylation des protéines ERK1/2. Cette activation est amorcée 2 minutes après l'ajout du ligand cPAF. La phosphorylation des protéines ERK1/2 atteint son maximum dans les 5 minutes suivant l'ajout du ligand et continue jusqu'au temps 10 minutes (27). À la **figure 7.2** la phosphorylation de ERK1/2, pour la construction HA-PAFR, HA-PAFR-Venus et cMyc-PAFR-RLuc, a été testée au temps 5 minutes et est bien visible.

Les contrôles des protéines ERK1/2 totales permettent de s'assurer que les changements observés dans la quantité de protéines phosphorylées ne sont pas causés par une modification dans la quantité de protéines ERK totales présentes dans la cellule lors de l'essai.

Pour ce qui est du récepteur FP, un essai de stimulation des protéines MAPKs a été effectué dans des cellules granulaires lutéales avec le ligand PGF2 $\alpha$ . Une phosphorylation des protéines ERK1/2 est observée après 5 minutes de stimulation et cette phosphorylation est soutenue sur une période d'au moins 20 minutes (156). À la **figure 7.2** la phosphorylation de ERK1/2, pour la construction HA-FP, HA-FP-Venus et cMyc-FP-RLuc a été testée au temps 5 minutes et est bien visible. Les contrôles des protéines ERK1/2 totales permettent de s'assurer que les changements observés dans la quantité de protéines phosphorylées ne sont pas causés par une modification dans la quantité de protéines ERK totales présentes dans la cellule lors de l'essai.

Les différentes constructions générées du récepteur PAF ainsi que du récepteur FP ont la capacité de lier un ligand et d'activer la voie de signalisation des MAPKs. Comme les ligands cPAF et PGF2 $\alpha$  sont des molécules hydrophobes, il est impossible de déterminer par cet essai que les constructions sont spécifiquement acheminées à la membrane plasmique.

Dans le cas de la construction HA- $\beta_2$ AR-SNAP, deux essais différents permettent de s'assurer que le ligand se lie au récepteur de façon convenable. L'essai de stimulation des protéines MAPKs montré à la **figure 3.2** montre que les protéines ERK1/2 sont phosphorylées dans les 2 minutes suivant l'ajout de l'isoprotérénol. Encore une fois, la quantité de protéine ERK totale est constante d'un puits à l'autre, ce qui indique que les différences observées dans les résultats obtenus ne sont pas causées par un changement dans la quantité de protéines déposée sur gel. Il est très important de noter que le récepteur HA- $\beta_2$ AR-SNAP et le récepteur HA- $\beta_2$ AR génère une phosphorylation chez les protéines ERK1/2

identiques. Ainsi, l'ajout de l'étiquette SNAP au récepteur HA- $\beta_2$ AR n'affecte en rien sa capacité de signalisation (qui est similaire à celle retrouvée dans la littérature (93)). Cette expérience permet aussi de savoir que le récepteur est correctement acheminé à la membrane plasmique. Comme le ligand utilisé lors de l'essai de la **figure 3.2**, l'isoprotérénol, n'a pas la capacité de traverser la membrane plasmique due à son caractère hydrophile, il n'est apte qu'à se lier aux récepteurs présents à la membrane. En conclusion, le récepteur HA- $\beta_2$ AR-SNAP est acheminé à la membrane plasmique et engendre la phosphorylation des protéines MAPKs de façon similaire au récepteur  $\beta_2$ AR.

Un essai de liaison d'un ligand radiomarqué a aussi été réalisé. Encore une fois, la construction HA- $\beta_2$ AR-SNAP a été comparée à la construction HA- $\beta_2$ AR afin de s'assurer que l'ajout de l'étiquette SNAP ne modifie pas la quantité de récepteurs exprimée dans la cellule ainsi que sa capacité à lier un ligand. Comme dans cet article, publié au milieu des années 1980, c'est le ligand radioactif  $^{125}$ I-CYP qui a été utilisé pour l'essai de la **figure 3.3** (143). Un antagoniste des récepteurs  $\beta$ -adrénergique, l'alprénolol, a été utilisé pour calculer la quantité de liaisons non spécifiques ayant lieu au cours de l'essai. La quantité radioactivité se liant à la construction HA- $\beta_2$ AR-SNAP est similaire à celle interagissant avec le récepteur HA- $\beta_2$ AR. Par le fait même, la quantité de récepteurs exprimée dans la cellule est comparable pour les deux constructions et significativement différente de celle obtenue pour les cellules HEK 293 non transfectées et de celle obtenue lors du calcul de la quantité de liaisons non spécifiques. Par conséquent, la construction HA- $\beta_2$ AR-SNAP est apte à s'exprimer dans des cellules HEK 293 ainsi qu'à lier un ligand radioactif le  $^{125}$ I-CYP.

### 4.3 Les récepteurs $\beta_2$ AR, PAFR et FP dimérisent

Peu d'information concernant les complexes de signalisation des récepteurs PAF et FP sont disponibles dans la littérature. Afin de mieux comprendre comment et quand ces complexes de signalisation sont formés des

études de BRET ont été réalisées. La capacité des récepteurs à homodimériser a tout d'abord été étudiée. La **figure 3.8 A** montre que le récepteur PAF ainsi que le récepteur FP ont la capacité de former des homodimères. Afin de s'assurer que les valeurs de BRET obtenues sont bien les résultats de réelles interactions, un essai de compétition a été réalisé (125). Les résultats, montrés à la **figure 3.8 B** (pour le récepteur PAF) et **3.8 C** (pour le récepteur FP), ne peuvent confirmer que l'interaction vue à la **figure 3.8 A** est bien réelle. Ainsi, un essai de saturation devra être réalisé afin de s'assurer que les récepteurs PAF et FP ont la capacité d'homodimériser et que ce complexe représente l'unité de base de signalisation de ces deux récepteurs.

Comme il a été démontré que beaucoup de RCPGs ont la capacité d'hétérodimériser entre eux (120) et que les récepteurs PAF et FP sont tous deux exprimés dans les cellules du muscle utérin (69, 117) il est possible que ceux-ci hétérodimérisent. Afin de vérifier cette hypothèse, une expérience de BRET a été réalisée. Il est possible de voir à la **figure 3.9** que les récepteurs PAF et FP ont la capacité d'hétérodimériser. Cet hétérodimère pourrait en fait modifier la signalisation prenant place dans les cellules utérines soit en modifiant la réponse provoquée par la liaison de certains ligands ou encore modifier les cascades de signalisation activée suite à la liaison de ce ligand. Afin de déterminer le rôle exact que pourrait jouer ce dimère, des expériences plus poussées devront être réalisées.

Il est connu que le récepteur  $\beta_2$ AR a la capacité de dimériser. Plusieurs groupes de recherche différents l'ont montré en utilisant des techniques variées comme celle de la co-immunoprécipitation (65) ou encore lors d'essai de BRET (3). Afin de s'assurer encore une fois que la présence de l'étiquette SNAP n'altère en rien le comportement naturel du récepteur  $\beta_2$ AR, un essai de co-immunoprécipitation entre le récepteur HA- $\beta_2$ AR-SNAP et le récepteur  $\beta_2$ AR-RLuc est montré à la **figure 3.4**. Il est possible de voir que la présence de l'étiquette SNAP n'affecte en rien la dimérisation du récepteur et que les formes

monomériques ainsi que dimériques sont visibles sur l'IB, tout comme c'est le cas pour le récepteur ne possédant pas l'étiquette SNAP. Ainsi, la présence de l'étiquette SNAP ne modifie pas le comportement naturel du récepteur  $\beta_2$ AR, qui est encore apte à dimériser et la construction HA- $\beta_2$ AR-SNAP pourra donc être utilisée au cours d'expériences ultérieures.

#### **4.4 L'étiquette SNAP comme nouvel outil d'étude, un mauvais candidat...**

La première étape dans l'utilisation de l'étiquette SNAP en tant qu'outil pour l'étude de l'assemblage et de l'acheminement à la membrane plasmique du récepteur  $\beta_2$ AR, a été de marquer l'étiquette avec le fluorophore BG-430. En se basant sur le protocole fourni par la compagnie Covalys (32), il a été possible de déterminer les conditions de réactions optimales (qui en fait, sont loin d'être parfaites !). Tel que montré à la **figure 3.5**, malgré plusieurs modifications dans la concentration de substrat utilisé, les temps de réaction et de lavage, la quantité de fluorescence demeure élevée dans la cellule en absence de l'étiquette SNAP. Un contrôle négatif de cellules transfectées avec la construction HA- $\beta_2$ AR-SNAP mais non marquées avec le substrat BG, a permis de s'assurer que la fluorescence n'est en aucun cas causée par la présence de l'étiquette SNAP. Deux raisons principales peuvent expliquer la quantité de fluorescence élevée chez les cellules transfectées avec la construction HA- $\beta_2$ AR et marquées avec le substrat : le BG-430 n'est pas spécifique à l'étiquette SNAP et s'est lié à d'autres endroits ou encore le substrat BG-430 non lié n'a pas été retiré de la cellule au cours des étapes de lavages. Afin de déterminer laquelle de ces raisons est en cause, un essai BRET a été réalisé.

Comme il a déjà été vérifié que la présence de l'étiquette SNAP n'altère en rien la capacité du récepteur  $\beta_2$ AR à dimériser, il devrait être possible de voir l'interaction entre le récepteur HA- $\beta_2$ AR-SNAP et le récepteur  $\beta_2$ AR-RLuc lors

d'un essai BRET. Puis, des essais BRET entre le récepteur  $\beta_2$ AR-GFP et le récepteur  $\beta_2$ AR-RLuc ont déjà été réalisés (3), cette expérience devrait donc être simple à exécuter. En fait, cet essai BRET va permettre de déterminer si le substrat BG-430 se lie de manière spécifique ou non à l'étiquette SNAP. Les résultats présentés à la **figure 3.6** montrent qu'un signal BRET a lieu entre le récepteur HA- $\beta_2$ AR-SNAP marqué et le récepteur  $\beta_2$ AR-RLuc, mais qu'aucun BRET n'a lieu entre ces deux récepteurs si le HA- $\beta_2$ AR-SNAP n'est pas marqué avec le substrat BG. Le point le plus important dans cette figure est de noter qu'en absence de l'étiquette SNAP (soit le récepteur HA- $\beta_2$ AR) même si les cellules sont marquées avec le substrat BG-430 le BRET entre les deux récepteurs n'a pas lieu. Ce qui signifie donc que le substrat BG-430 encore présent dans la cellule est en fait du substrat résiduel qui n'a pas été retiré au cours des étapes de lavages. La fluorescence mesurée au cours de l'essai de marquage n'est donc pas causée par une liaison non spécifique du substrat BG dans la cellule.

Un essai de microscopie confocale a été par la suite réalisé. Cet essai permet de déterminer si le substrat BG qui n'a pas réagi avec l'étiquette SNAP se trouve libre dans le cytosol ou encore retenus dans des vésicules. À la **figure 3.7** il est possible de voir que la présence de l'étiquette SNAP n'altère en rien la distribution du récepteur  $\beta_2$ AR dans la cellule, une grande partie se trouve à la surface cellulaire tandis qu'une autre portion des récepteurs est présente dans la cellule, probablement en majorité dans le RE (164). Le marquage avec le substrat BG-430 à quant à lui permis de constater qu'en l'absence de l'étiquette SNAP il n'existe pas de colocalisation entre le récepteur HA- $\beta_2$ AR et le BG-430. La présence de l'étiquette SNAP est donc nécessaire au marquage spécifique avec le substrat BG-430. Ainsi, le substrat non lié se trouve donc libre dans le cytosol de la cellule. Les étapes de lavages sont donc inefficaces et ne permettent pas de retirer convenablement le substrat BG-430 qui n'a pas réagi.

Toutes ces informations permettent donc d'affirmer que l'étiquette SNAP n'est pas un outil d'étude polyvalent qui permettrait de bien étudier l'assemblage

et l'acheminement à la membrane plasmique des RCPGs. Comme le substrat résiduel demeure coincé dans les cellules, il pourrait interférer avec les expériences ou encore avec leur interprétation. Cet outil pourrait donc être utilisé dans le cas où l'étiquette SNAP serait extracellulaire et que le substrat utilisé ne serait pas perméable, ce qui éviterait une trop grande quantité de bruit de fond et faciliterait les étapes de manipulations ainsi que l'analyse des résultats (comme présenté dans cette lettre de la compagnie Covalys (33)). Un essai utilisant l'étiquette SNAP comme accepteur FRET a été développé et permet d'analyser en temps réel et de manière quantitative les interactions protéines-protéines de la surface cellulaire, comme par exemple l'oligomérisation des RCPGs. Cette technique ne présente pas de problèmes majeurs, comme ceux rencontrés au cours des expériences ici présentées. Ceci s'explique par le fait que l'étiquette SNAP se trouve à l'extrémité N-terminale du RCPG et par conséquent le substrat BG utilisé ne pénètre pas à l'intérieur de la cellule (donc aucune présence de bruit de fond) (108). Cette méthode représente donc une meilleure candidate et pourrait être utilisée au cours des études sur l'assemblage et l'acheminement à la membrane plasmique des RCPGs.

#### **4.5 Les récepteurs PAFR et FP interagissent avec les protéines G $\beta$ et G $\gamma$ de manière constitutive**

Comme le complexe de signalisation de base des récepteurs PAF et FP n'est pas très bien caractérisé, le moment, le lieu ainsi que la façon dont les protéines G $\beta\gamma$  interagissent avec ceux-ci ne sont pas connus. L'essai de BRET présenté à la **figure 3.11** répond en partie à ces questions. Les résultats présentés montrent que la sous unité G $\gamma$ 2 interagit avec les récepteurs de manière constitutive. Aucune activation par un agoniste n'est nécessaire au recrutement de cette protéine. L'absence de la protéine G $\beta$ 1 n'affecte en rien la formation de cette interaction. Il est toutefois important de noter que les protéines G $\beta\gamma$  forment des dimères obligés (144). Mais comme l'essai présenté à la **figure 3.11** est réalisé

dans des cellules HEK 293 et que celles-ci contiennent une très grande quantité de protéine G $\beta$  endogène, il est possible que celle-ci soit suffisante pour compenser pour l'absence de protéine G $\beta$  transfectée. La liaison des protéines G $\beta\gamma$  pour les récepteurs PAF et FP est comparable à celle observée pour le récepteur  $\beta_2$ AR (52).

#### **4.6 Les récepteurs PAFR et FP ne semblent pas interagir avec la protéine G $\alpha$ en absence de stimulation par l'agoniste**

L'interaction entre les récepteurs PAF et FP et la protéine G $\alpha$  a par la suite été étudiée. Encore une fois, c'est la technique de BRET qui a été privilégiée. Contrairement à ce qui a été découvert pour le récepteur  $\beta_2$ AR, où la protéine G $\alpha$  interagit constitutivement (52), les résultats de la **figure 3.10 A et C** démontrent que les récepteurs PAF et FP ne semblent pas interagir avec la G $\alpha$  de façon constitutive. Afin de déterminer si cette interaction nécessite la présence d'un agoniste pour prendre place un essai a été réalisé. Dans le cas du récepteur PAF (**figure 3.10 B**) l'ajout de l'agoniste cPAF n'entraîne pas une modification dans les ratios de BRET obtenus. Il en va de même pour le récepteur FP (**figure 3.10 D**) l'ajout de son agoniste naturel le PGF2 $\alpha$  ne modifie en rien les ratios de BRET détectés. La présence des protéines G $\beta\gamma$  favorise l'interaction de la protéine G $\alpha$  avec le récepteur  $\beta_2$ AR (52). Mais pour ce qui est des récepteurs PAF et FP les résultats de la **figure 3.10** démontrent que la présence des protéines G $\beta\gamma$  n'a aucun effet sur la liaison de G $\alpha$  et ce, en présence ou en absence d'agoniste. Par conséquent, la liaison d'un agoniste aux récepteurs PAF et FP ne favorise pas le recrutement de la protéine G $\alpha$  au complexe de signalisation et la présence des protéines G $\beta\gamma$  ne change en rien les résultats obtenus. Ces résultats peuvent en fait avoir signification tout à fait différente. Il est possible que l'orientation des deux protéines de fusion ne soit pas optimale pour permettre au transfert d'énergie de prendre place (64) malgré le fait que les deux protéines interagissent ensemble. Il est aussi possible que le choix du contrôle négatif CD4, ne soit pas convenable. Si

jamais ce dernier interagissait avec les récepteurs PAF et FP, les résultats obtenus ici auraient une signification tout à fait différente. Afin d'exclure cette possibilité des essais de compétition et de saturation devront être réalisés. Ainsi il est impossible d'exclure une interaction entre la protéine Gαq et les récepteurs PAFR et FP (de façon constitutive ou encore suite à sa stimulation par un ligand). D'autres expériences devront être réalisées afin de déterminer à quel moment, comment et en présence de quel partenaire d'interaction la protéine Gαq se lie aux récepteurs PAF et FP.

#### **4.7 Ce que vous ne lirez pas**

Le travail présenté ici se base sur deux projets sur lesquels j'ai concentré mes efforts, mais j'ai aussi eu l'opportunité de travailler sur deux autres projets. Le premier consistait en l'identification du site d'interaction des protéines Gβγ sur le récepteur β<sub>2</sub>AR. Le site d'interaction supposé se trouve sur la queue C-terminale à proximité des sites de phosphorylation par les protéines GRKs et correspond à la séquence FXXXF, comme celui trouvé chez le récepteur muscarinique M<sub>3</sub> (170). Des constructions de la queue C-terminale complète ainsi que tronquée du récepteur, couplées à la protéine GST, ont été réalisées dans notre laboratoire. Ces constructions ont été utilisées afin de déterminer si la perte du site d'interaction présumé entraînait la perte de la liaison de protéines Gβγ. Il était aussi possible de déterminer si la perte des sites de phosphorylation par GRK modifiait la liaison de protéines Gβγ à son site d'interaction. Pour ce faire, des études de précipitation à l'aide de billes glutathione ont été réalisées en utilisant des protéines Gβγ purifiées ou encore des lysats cellulaires totaux effectués sur des cellules surexprimant les protéines Gβγ. Plusieurs problèmes ont été rencontrés au cours de ces manipulations, mais le plus important est que les protéines Gβγ collent directement aux billes glutathione. La bande du contrôle négatif sur l'IB est donc très importante ce qui a pour effet de biaiser l'interprétation des résultats. Pour contrer ce problème, plusieurs modifications au

protocoles ont été réalisées, que ce soit un changement dans la composition du tampon utilisé (comme une augmentation de la quantité de sel pour permettre de diminuer les interactions non spécifiques), une modification dans la quantité et le type de détergent utilisé, ou encore dans la façon de pré-traiter les billes avant l'expérience. Aucune de ces modifications n'a permis de résoudre les problèmes de liaisons non spécifiques des protéines  $G\beta\gamma$  aux billes. Un essai d'immunobuvardage de type lointain a donc été designé. Au cours de cet essai, les étiquettes GST ont été séparées des queues C-terminales grâce au site de clivage de la thrombine présent entre l'étiquette GST et la protéine d'intérêt. Ce qui a permis de vérifier si l'interaction entre la partie C-terminale du récepteur  $\beta_2AR$  complète ou encore les sections tronquées étaient aptes à interagir avec les protéines  $G\beta\gamma$  et ce, en l'absence de l'étiquette GST. Les résultats obtenus ne sont pas significatifs et beaucoup de mise au point reste encore à faire afin de réussir à obtenir les conditions optimales. C'est à cette étape que le projet a été mis de côté.

Pour ce qui est du second projet sur lequel j'ai travaillé et dont aucune mention n'est faite dans ce mémoire, il consiste en l'identification de différentes modifications post-traductionnelles du récepteur  $\beta_2AR$  et l'endroit exact où elles prennent place dans la cellule. Pour ce faire, des constructions de dominants négatifs des petites protéines G Rab et Sar (qui permettent le transport des protéines formées dans le RE d'un compartiment cellulaire à l'autre) ont été utilisées. Des résultats préliminaires ont été obtenus pour ce projet, mais mes efforts ont été concentrés plus particulièrement sur un des projets décrits dans cet ouvrage.

J'ai donc eu l'occasion de travailler sur quatre projets différents au cours de ces deux dernières années et demie. Je termine donc ma maîtrise avec un grand bagage dans la mise au point et la résolution de problèmes liés aux manipulations, ce qui me sera fort utile au cours de ma carrière.

## 5 Conclusions et Perspectives :

Les résultats obtenus au cours de cette étude ont démontré que la construction générée du récepteur  $\beta_2$ AR avec une étiquette SNAP à son extrémité C-terminale est fonctionnelle. Cette construction est exprimée dans des cellules HEK 293, est apte à lier son ligand, à être acheminée à la membrane plasmique et à homodimériser. Cette construction a été marquée avec le fluorophore BG-430. La quantité de fluorescence résiduelle présente dans la cellule est très élevée, même en absence de l'étiquette SNAP sur le récepteur. Un essai BRET a été réalisé et la construction HA- $\beta_2$ AR-SNAP est capable d'agir en tant qu'accepteur.

Malgré le fait que l'étiquette SNAP aurait pu grandement accélérer les études de l'assemblage et de l'acheminement des RCPGs à la membrane plasmique, elle n'est finalement pas une bonne candidate. Le substrat libre dans la cellule est difficile à retirer ce qui cause un bruit de fond trop élevé. Des outils de travail plus traditionnels déjà disponibles sur le marché et possédant de bons rendements permettent d'obtenir de meilleurs résultats et leur coût de production est, en général, moins élevé. Afin d'améliorer cet essai, il serait possible de designer une construction de récepteur contenant l'étiquette SNAP à son extrémité extra-cellulaire. Dans ce cas-là, le marquage pourrait être effectué avec un substrat BG non perméable à la membrane, ce qui éliminerait la présence de bruit de fond à l'intérieur de la cellule.

Dans le cas des récepteurs PAF et FP, les constructions générées sont elles aussi capables de lier un ligand et de stimuler la voie de signalisation des protéines ERK 1/2. Ils ont aussi la capacité d'atteindre la membrane plasmique. Des expériences de BRET ont permis de déterminer que les récepteurs PAF et FP homodimérisent. Cet essai n'a par contre, pas pu être compétitionné. Un hétérodimère formé des récepteurs PAF et FP est lui aussi détecté. Les protéines  $G\beta\gamma$  interagissent de manière constitutive avec ces récepteurs. Afin de s'assurer

que chacune des interactions observées au cours des ces essais BRET sont bel et bien réelles, des essais de de compétition et de saturation devront être réalisés. Dans le cas de la protéine  $G\alpha_q$ , aucun signal de BRET n'est détecté et ce en présence ou en absence de stimulation par un agoniste. Afin d'optimiser cet essai, il serait intéressant de modifier l'emplacement des protéines de fusion RLuc et Venus au sein des constructions des récepteurs PAF, FP ou encore de la protéine  $G\alpha_q$ . Cette modification permettrait peut-être aux deux protéines fluorescentes se trouver dans une orientation favorisant le transfert d'énergie entre le donneur et l'accepteur, ainsi, l'interaction entre les récepteurs PAF ou FP et la protéine  $G\alpha_q$  pourrait peut-être être détectée.

Des études plus poussées concernant la liaison des protéines  $G\alpha$  au récepteur PAF et FP doivent être réalisées afin de déterminer dans quelle condition cette interaction prend place. Le rôle et les conséquences de l'hétérodimérisation des récepteurs PAF et FP sur sa signalisation et son activation par des agonistes doivent être étudiés. Des études concernant les effecteurs liés à ces récepteurs doivent aussi être réalisées. Bref, les expériences présentées ici ne représentent que la première étape dans la compréhension du complexe de signalisation formé par les récepteurs PAF et FP.

## 6 Références :

1. **Abel, M. H., and D. T. Baird.** 1980. The effect of 17 beta-estradiol and progesterone on prostaglandin production by human endometrium maintained in organ culture. *Endocrinology* **106**:1599-606.
2. **Angers, S., A. Salahpour, and M. Bouvier.** 2001. Biochemical and biophysical demonstration of GPCR oligomerization in mammalian cells. *Life Sci* **68**:2243-50.
3. **Angers, S., A. Salahpour, E. Joly, S. Hilairet, D. Chelsky, M. Dennis, and M. Bouvier.** 2000. Detection of  $\beta_2$ -adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:3684-9.
4. **Apaja, P. M., J. T. Tuusa, E. M. Pietila, H. J. Rajaniemi, and U. E. Petaja-Repo.** 2006. Luteinizing hormone receptor ectodomain splice variant misroutes the full-length receptor into a subcompartment of the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* **17**:2243-55.
5. **Arnis, S., and K. P. Hofmann.** 1995. Photoregeneration of bovine rhodopsin from its signaling state. *Biochemistry* **34**:9333-40.
6. **Attramadal, H., J. L. Arriza, C. Aoki, T. M. Dawson, J. Codina, M. M. Kwatra, S. H. Snyder, M. G. Caron, and R. J. Lefkowitz.** 1992.  $\beta$ -arrestin2, a novel member of the arrestin/beta-arrestin gene family. *J Biol Chem* **267**:17882-90.
7. **Bacart, J., C. Corbel, R. Jockers, S. Bach, and C. Couturier.** 2008. The BRET technology and its application to screening assays. *Biotechnol J* **3**:311-24.
8. **Benovic, J. L., H. Kuhn, I. Weyand, J. Codina, M. G. Caron, and R. J. Lefkowitz.** 1987. Functional desensitization of the isolated  $\beta$ -adrenergic receptor by the  $\beta$ -adrenergic receptor kinase: potential role of an analog of the retinal protein arrestin (48-kDa protein). *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:8879-82.
9. **Berggard, T., S. Linse, and P. James.** 2007. Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions. *Proteomics* **7**:2833-42.
10. **Bermak, J. C., M. Li, C. Bullock, and Q. Y. Zhou.** 2001. Regulation of transport of the dopamine D1 receptor by a new membrane-associated ER protein. *Nat Cell Biol* **3**:492-8.
11. **Bernier, V., M. Lagace, M. Lonergan, M. F. Arthus, D. G. Bichet, and M. Bouvier.** 2004. Functional rescue of the constitutively internalized V2 vasopressin receptor mutant R137H by the pharmacological chaperone action of SR49059. *Mol Endocrinol* **18**:2074-84.
12. **Berthet, J., T. W. Rall, and E. W. Sutherland.** 1957. The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase. IV. Effect of epinephrine and glucagon on the reactivation of phosphorylase in liver homogenates. *J Biol Chem* **224**:463-75.

13. **Boivin, B., G. Vaniotis, B. G. Allen, and T. E. Hebert.** 2008. G protein-coupled receptors in and on the cell nucleus: a new signaling paradigm? *J Recept Signal Transduct Res* **28**:15-28.
14. **Brandt, D. R., and E. M. Ross.** 1985. GTPase activity of the stimulatory GTP-binding regulatory protein of adenylate cyclase, G<sub>s</sub>. Accumulation and turnover of enzyme-nucleotide intermediates. *J Biol Chem* **260**:266-72.
15. **Braquet, P., and M. Rola-Pleszczynski.** 1987. The role of PAF in immunological responses: a review. *Prostaglandins* **34**:143-8.
16. **Breyer, M. D., and R. M. Breyer.** 2001. G protein-coupled prostanoid receptors and the kidney. *Annu Rev Physiol* **63**:579-605.
17. **Broadley, K. J.** 2006.  $\beta$ -adrenoceptor responses of the airways: for better or worse? *Eur J Pharmacol* **533**:15-27.
18. **Brodth-Eppley, J., and L. Myatt.** 1999. Prostaglandin receptors in lower segment myometrium during gestation and labor. *Obstet Gynecol* **93**:89-93.
19. **Brown, S. L., V. R. Jala, S. K. Raghuvanshi, M. W. Nasser, B. Haribabu, and R. M. Richardson.** 2006. Activation and regulation of platelet-activating factor receptor: role of G<sub>i</sub> and G<sub>q</sub> in receptor-mediated chemotactic, cytotoxic, and cross-regulatory signals. *J Immunol* **177**:3242-9.
20. **Brum, P. C., N. P. Rolim, A. V. Bacurau, and A. Medeiros.** 2006. Neurohumoral activation in heart failure: the role of adrenergic receptors. *An Acad Bras Cienc* **78**:485-503.
21. **Bulenger, S., S. Marullo, and M. Bouvier.** 2005. Emerging role of homo- and heterodimerization in G-protein-coupled receptor biosynthesis and maturation. *Trends Pharmacol Sci* **26**:131-7.
22. **Bylund, D. B., D. C. Eikenberg, J. P. Hieble, S. Z. Langer, R. J. Lefkowitz, K. P. Minneman, P. B. Molinoff, R. R. Ruffolo, Jr., and U. Trendelenburg.** 1994. International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol Rev* **46**:121-36.
23. **Cabrera-Vera, T. M., J. Vanhauwe, T. O. Thomas, M. Medkova, A. Preininger, M. R. Mazzoni, and H. E. Hamm.** 2003. Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr Rev* **24**:765-81.
24. **Calver, A. R., M. J. Robbins, C. Cosio, S. Q. Rice, A. J. Babbs, W. D. Hirst, I. Boyfield, M. D. Wood, R. B. Russell, G. W. Price, A. Couve, S. J. Moss, and M. N. Pangalos.** 2001. The C-terminal domains of the GABA<sub>B</sub> receptor subunits mediate intracellular trafficking but are not required for receptor signaling. *J Neurosci* **21**:1203-10.
25. **Chelikani, P., P. J. Reeves, U. L. Rajbhandary, and H. G. Khorana.** 2006. The synthesis and high-level expression of a  $\beta_2$ -adrenergic receptor gene in a tetracycline-inducible stable mammalian cell line. *Protein Sci* **15**:1433-40.
26. **Chen, Z., D. J. Dupre, C. Le Gouill, M. Rola-Pleszczynski, and J. Stankova.** 2002. Agonist-induced internalization of the platelet-activating factor receptor is dependent on arrestins but independent of G-protein

- activation. Role of the C terminus and the (D/N)PXXY motif. *J Biol Chem* **277**:7356-62.
27. **Chen, Z., M. Rola-Pleszczynski, and J. Stankova.** 2003. Activation of ERK1/2 by platelet-activating factor receptor is independent of receptor internalisation and G-protein activation. *Cell Signal* **15**:843-50.
  28. **Cherezov, V., D. M. Rosenbaum, M. A. Hanson, S. G. Rasmussen, F. S. Thian, T. S. Kobilka, H. J. Choi, P. Kuhn, W. I. Weis, B. K. Kobilka, and R. C. Stevens.** 2007. High-resolution crystal structure of an engineered human  $\beta_2$ -adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* **318**:1258-65.
  29. **Chou, K. C.** 2005. Coupling interaction between thromboxane A2 receptor and alpha-13 subunit of guanine nucleotide-binding protein. *J Proteome Res* **4**:1681-6.
  30. **Christopoulos, G., K. J. Perry, M. Morfis, N. Tilakaratne, Y. Gao, N. J. Fraser, M. J. Main, S. M. Foord, and P. M. Sexton.** 1999. Multiple amylin receptors arise from receptor activity-modifying protein interaction with the calcitonin receptor gene product. *Mol Pharmacol* **56**:235-42.
  31. **Claing, A., W. Chen, W. E. Miller, N. Vitale, J. Moss, R. T. Premont, and R. J. Lefkowitz.** 2001.  $\beta$ -Arrestin-mediated ADP-ribosylation factor 6 activation and  $\beta_2$ -adrenergic receptor endocytosis. *J Biol Chem* **276**:42509-13.
  32. **Covalys** 2006, posting date. SNAP-cell 430 Starter Kit, for labeling SNAP-TAG<sup>TM</sup> fusion proteins in cells with BG-430. [Online.]
  33. **Covalys.** 2007, March. SNAP-tag for GPCR Internalization Assays.
  34. **Crespo, P., N. Xu, W. F. Simonds, and J. S. Gutkind.** 1994. Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein  $\beta\gamma$  subunits. *Nature* **369**:418-20.
  35. **Daaka, Y., L. M. Luttrell, and R. J. Lefkowitz.** 1997. Switching of the coupling of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* **390**:88-91.
  36. **De, A., A. M. Loening, and S. S. Gambhir.** 2007. An improved bioluminescence resonance energy transfer strategy for imaging intracellular events in single cells and living subjects. *Cancer Res* **67**:7175-83.
  37. **DeFea, K. A., Z. D. Vaughn, E. M. O'Bryan, D. Nishijima, O. Dery, and N. W. Bunnett.** 2000. The proliferative and antiapoptotic effects of substance P are facilitated by formation of a  $\beta$ -arrestin-dependent scaffolding complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:11086-91.
  38. **Digby, G. J., R. M. Lober, P. R. Sethi, and N. A. Lambert.** 2006. Some G protein heterotrimers physically dissociate in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:17789-94.
  39. **Digby, G. J., P. R. Sethi, and N. A. Lambert.** 2008. Differential dissociation of G protein heterotrimers. *J Physiol* **586**:3325-35.
  40. **Dratz, E. A., J. F. Van Breemen, K. M. Kamps, W. Keegstra, and E. F. Van Bruggen.** 1985. Two-dimensional crystallization of bovine rhodopsin. *Biochim Biophys Acta* **832**:337-42.

41. **Dunigan, C. D., Q. Hoang, P. K. Curran, and P. H. Fishman.** 2002. Complexity of agonist- and cyclic AMP-mediated downregulation of the human  $\beta_1$ -adrenergic receptor: role of internalization, degradation, and mRNA destabilization. *Biochemistry* **41**:8019-30.
42. **Dupre, D. J., Z. Chen, C. Le Gouill, C. Theriault, J. L. Parent, M. Rola-Pleszczynski, and J. Stankova.** 2003. Trafficking, ubiquitination, and down-regulation of the human platelet-activating factor receptor. *J Biol Chem* **278**:48228-35.
43. **Dupre, D. J., and T. E. Hebert.** 2006. Biosynthesis and trafficking of seven transmembrane receptor signalling complexes. *Cell Signal* **18**:1549-59.
44. **Dupre, D. J., M. Robitaille, N. Ethier, L. R. Villeneuve, A. M. Mamarbachi, and T. E. Hebert.** 2006. Seven transmembrane receptor core signaling complexes are assembled prior to plasma membrane trafficking. *J Biol Chem* **281**:34561-73.
45. **Dupre, D. J., M. Robitaille, M. Richer, N. Ethier, A. M. Mamarbachi, and T. E. Hebert.** 2007. Dopamine receptor-interacting protein 78 acts as a molecular chaperone for  $G\gamma$  subunits before assembly with  $G\beta$ . *J Biol Chem* **282**:13703-15.
46. **Duthey, B., S. Caudron, J. Perroy, B. Bettler, L. Fagni, J. P. Pin, and L. Prezeau.** 2002. A single subunit (GB2) is required for G-protein activation by the heterodimeric GABA<sub>B</sub> receptor. *J Biol Chem* **277**:3236-41.
47. **Feldman, D. S., C. A. Carnes, W. T. Abraham, and M. R. Bristow.** 2005. Mechanisms of disease:  $\beta$ -adrenergic receptors--alterations in signal transduction and pharmacogenomics in heart failure. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* **2**:475-83.
48. **Fredriksson, R., M. C. Lagerstrom, L. G. Lundin, and H. B. Schioth.** 2003. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* **63**:1256-72.
49. **Fujino, H., and J. W. Regan.** 2001. FP prostanoid receptor activation of a T-cell factor/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *J Biol Chem* **276**:12489-92.
50. **Fujino, H., and J. W. Regan.** 2003. Prostanoid receptors and phosphatidylinositol 3-kinase: a pathway to cancer? *Trends Pharmacol Sci* **24**:335-40.
51. **Fujino, H., D. Srinivasan, K. L. Pierce, and J. W. Regan.** 2000. Differential regulation of prostaglandin F<sub>2 $\alpha$</sub>  receptor isoforms by protein kinase C. *Mol Pharmacol* **57**:353-8.
52. **Gales, C., R. V. Rebois, M. Hogue, P. Trieu, A. Breit, T. E. Hebert, and M. Bouvier.** 2005. Real-time monitoring of receptor and G-protein interactions in living cells. *Nat Methods* **2**:177-84.
53. **Gales, C., J. J. Van Durm, S. Schaak, S. Pontier, Y. Percherancier, M. Audet, H. Paris, and M. Bouvier.** 2006. Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes. *Nat Struct Mol Biol* **13**:778-86.

54. **Galvez, T., B. Duthey, J. Kniazeff, J. Blahos, G. Rovelli, B. Bettler, L. Prezeau, and J. P. Pin.** 2001. Allosteric interactions between GB1 and GB2 subunits are required for optimal GABA<sub>B</sub> receptor function. *Embo J* **20**:2152-9.
55. **Galvez, T., L. Prezeau, G. Milioti, M. Franek, C. Joly, W. Froestl, B. Bettler, H. O. Bertrand, J. Blahos, and J. P. Pin.** 2000. Mapping the agonist-binding site of GABA<sub>B</sub> type 1 subunit sheds light on the activation process of GABA<sub>B</sub> receptors. *J Biol Chem* **275**:41166-74.
56. **Gether, U., and B. K. Kobilka.** 1998. G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation. *J Biol Chem* **273**:17979-82.
57. **Gobeil, F., Jr., I. Dumont, A. M. Marrache, A. Vazquez-Tello, S. G. Bernier, D. Abran, X. Hou, M. H. Beauchamp, C. Quiniou, A. Bouayad, S. Choufani, M. Bhattacharya, S. Molotchnikoff, A. Ribeiro-Da-Silva, D. R. Varma, G. Bkaily, and S. Chemtob.** 2002. Regulation of eNOS expression in brain endothelial cells by perinuclear EP<sub>3</sub> receptors. *Circ Res* **90**:682-9.
58. **Goin, J. C., and N. M. Nathanson.** 2006. Quantitative analysis of muscarinic acetylcholine receptor homo- and heterodimerization in live cells: regulation of receptor down-regulation by heterodimerization. *J Biol Chem* **281**:5416-25.
59. **Goodman, O. B., Jr., J. G. Krupnick, F. Santini, V. V. Gurevich, R. B. Penn, A. W. Gagnon, J. H. Keen, and J. L. Benovic.** 1996.  $\beta$ -arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor. *Nature* **383**:447-50.
60. **Greer, L. F., 3rd, and A. A. Szalay.** 2002. Imaging of light emission from the expression of luciferases in living cells and organisms: a review. *Luminescence* **17**:43-74.
61. **Guillet-Deniau, I., A. F. Burnol, and J. Girard.** 1997. Identification and localization of a skeletal muscle serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor coupled to the Jak/STAT pathway. *J Biol Chem* **272**:14825-9.
62. **Haga, K., and T. Haga.** 1992. Activation by G protein  $\beta\gamma$  subunits of agonist- or light-dependent phosphorylation of muscarinic acetylcholine receptors and rhodopsin. *J Biol Chem* **267**:2222-7.
63. **Hata, A. N., and R. M. Breyer.** 2004. Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacol Ther* **103**:147-66.
64. **Hebert, T. E., C. Gales, and R. V. Rebois.** 2006. Detecting and imaging protein-protein interactions during G protein-mediated signal transduction in vivo and in situ by using fluorescence-based techniques. *Cell Biochem Biophys* **45**:85-109.
65. **Hebert, T. E., S. Moffett, J. P. Morello, T. P. Loisel, D. G. Bichet, C. Barret, and M. Bouvier.** 1996. A peptide derived from a  $\beta_2$ -adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation. *J Biol Chem* **271**:16384-92.

66. **Hurowitz, E. H., J. M. Melnyk, Y. J. Chen, H. Kouros-Mehr, M. I. Simon, and H. Shizuya.** 2000. Genomic characterization of the human heterotrimeric G protein  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$  subunit genes. *DNA Res* **7**:111-20.
67. **Ingraham, L. M., T. D. Coates, J. M. Allen, C. P. Higgins, R. L. Baehner, and L. A. Boxer.** 1982. Metabolic, membrane, and functional responses of human polymorphonuclear leukocytes to platelet-activating factor. *Blood* **59**:1259-66.
68. **Ishida, N., N. Odani-Kawabata, A. Shimazaki, and H. Hara.** 2006. Prostanoids in the therapy of glaucoma. *Cardiovasc Drug Rev* **24**:1-10.
69. **Ishii, S., and T. Shimizu.** 2000. Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice. *Prog Lipid Res* **39**:41-82.
70. **Jares-Erijman, E. A., and T. M. Jovin.** 2003. FRET imaging. *Nat Biotechnol* **21**:1387-95.
71. **Jares-Erijman, E. A., and T. M. Jovin.** 2006. Imaging molecular interactions in living cells by FRET microscopy. *Curr Opin Chem Biol* **10**:409-16.
72. **Jockers, R., A. Da Silva, A. D. Strosberg, M. Bouvier, and S. Marullo.** 1996. New molecular and structural determinants involved in  $\beta_2$ -adrenergic receptor desensitization and sequestration. Delineation using chimeric  $\beta_3/\beta_2$ -adrenergic receptors. *J Biol Chem* **271**:9355-62.
73. **Jones, K. A., B. Borowsky, J. A. Tamm, D. A. Craig, M. M. Durkin, M. Dai, W. J. Yao, M. Johnson, C. Gunwaldsen, L. Y. Huang, C. Tang, Q. Shen, J. A. Salon, K. Morse, T. Laz, K. E. Smith, D. Nagarathnam, S. A. Noble, T. A. Branchek, and C. Gerald.** 1998. GABA<sub>B</sub> receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA<sub>B</sub>R1 and GABA<sub>B</sub>R2. *Nature* **396**:674-9.
74. **Juillerat, A., T. Gronemeyer, A. Keppler, S. Gendreizig, H. Pick, H. Vogel, and K. Johnsson.** 2003. Directed evolution of O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase for efficient labeling of fusion proteins with small molecules in vivo. *Chem Biol* **10**:313-7.
75. **Kaupmann, K., B. Malitschek, V. Schuler, J. Heid, W. Froestl, P. Beck, J. Mosbacher, S. Bischoff, A. Kulik, R. Shigemoto, A. Karschin, and B. Bettler.** 1998. GABA<sub>B</sub>-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature* **396**:683-7.
76. **Kelleher, D. J., and G. L. Johnson.** 1988. Transducin inhibition of light-dependent rhodopsin phosphorylation: evidence for  $\beta\gamma$  subunit interaction with rhodopsin. *Mol Pharmacol* **34**:452-60.
77. **Keppler, A., C. Arrivoli, L. Sironi, and J. Ellenberg.** 2006. Fluorophores for live cell imaging of AGT fusion proteins across the visible spectrum. *Biotechniques* **41**:167-70, 172, 174-5.
78. **Keppler, A., S. Gendreizig, T. Gronemeyer, H. Pick, H. Vogel, and K. Johnsson.** 2003. A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules in vivo. *Nat Biotechnol* **21**:86-9.

79. **Keppler, A., H. Pick, C. Arrivoli, H. Vogel, and K. Johnsson.** 2004. Labeling of fusion proteins with synthetic fluorophores in live cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:9955-9.
80. **Kim, C. M., S. B. Dion, and J. L. Benovic.** 1993. Mechanism of  $\beta$ -adrenergic receptor kinase activation by G proteins. *J Biol Chem* **268**:15412-8.
81. **Knall, C., and G. L. Johnson.** 1998. G-protein regulatory pathways: rocketing into the twenty-first century. *J Cell Biochem Suppl* **30-31**:137-46.
82. **Kobilka, B. K., R. A. Dixon, T. Frielle, H. G. Dohlman, M. A. Bolanowski, I. S. Sigal, T. L. Yang-Feng, U. Francke, M. G. Caron, and R. J. Lefkowitz.** 1987. cDNA for the human  $\beta_2$ -adrenergic receptor: a protein with multiple membrane-spanning domains and encoded by a gene whose chromosomal location is shared with that of the receptor for platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:46-50.
83. **Kohout, T. A., F. S. Lin, S. J. Perry, D. A. Conner, and R. J. Lefkowitz.** 2001.  $\beta$ -Arrestin 1 and 2 differentially regulate heptahelical receptor signaling and trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:1601-6.
84. **Kolch, W., G. Heidecker, G. Kochs, R. Hummel, H. Vahidi, H. Mischak, G. Finkenzeller, D. Marme, and U. R. Rapp.** 1993. Protein kinase  $C_{\alpha}$  activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature* **364**:249-52.
85. **Kuhn, B., C. Christel, T. Wieland, G. Schultz, and T. Gudermann.** 2002. G-protein  $\beta\gamma$ -subunits contribute to the coupling specificity of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor to  $G_s$ . *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **365**:231-41.
86. **Kuruvilla, A., G. Putcha, E. Poulos, and W. T. Shearer.** 1993. Tyrosine phosphorylation of phospholipase C concomitant with its activation by platelet-activating factor in a human B cell line. *J Immunol* **151**:637-48.
87. **Kyriakis, J. M., and J. Avruch.** 1996. Sounding the alarm: protein kinase cascades activated by stress and inflammation. *J Biol Chem* **271**:24313-6.
88. **Lambright, D. G., J. P. Noel, H. E. Hamm, and P. B. Sigler.** 1994. Structural determinants for activation of the  $\alpha$ -subunit of a heterotrimeric G protein. *Nature* **369**:621-8.
89. **Lambright, D. G., J. Sondek, A. Bohm, N. P. Skiba, H. E. Hamm, and P. B. Sigler.** 1996. The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature* **379**:311-9.
90. **Laporte, S. A., R. H. Oakley, J. Zhang, J. A. Holt, S. S. Ferguson, M. G. Caron, and L. S. Barak.** 1999. The  $\beta_2$ -adrenergic receptor/ $\beta$ arrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:3712-7.
91. **Lattin, J., D. A. Zidar, K. Schroder, S. Kellie, D. A. Hume, and M. J. Sweet.** 2007. G-protein-coupled receptor expression, function, and signaling in macrophages. *J Leukoc Biol* **82**:16-32.
92. **Lavine, N., N. Ethier, J. N. Oak, L. Pei, F. Liu, P. Trieu, R. V. Rebois, M. Bouvier, T. E. Hebert, and H. H. Van Tol.** 2002. G protein-coupled

- receptors form stable complexes with inwardly rectifying potassium channels and adenylyl cyclase. *J Biol Chem* **277**:46010-9.
93. **Lavoie, C., J. F. Mercier, A. Salahpour, D. Umapathy, A. Breit, L. R. Villeneuve, W. Z. Zhu, R. P. Xiao, E. G. Lakatta, M. Bouvier, and T. E. Hebert.** 2002.  $\beta_1/\beta_2$ -adrenergic receptor heterodimerization regulates  $\beta_2$ -adrenergic receptor internalization and ERK signaling efficacy. *J Biol Chem* **277**:35402-10.
  94. **Leclerc, P. C., M. Auger-Messier, P. M. Lanctot, E. Escher, R. Leduc, and G. Guillemette.** 2002. A polyaromatic caveolin-binding-like motif in the cytoplasmic tail of the type 1 receptor for angiotensin II plays an important role in receptor trafficking and signaling. *Endocrinology* **143**:4702-10.
  95. **Lee, A., B. K. Rana, H. H. Schiffer, N. J. Schork, M. R. Brann, P. A. Insel, and D. M. Weiner.** 2003. Distribution analysis of nonsynonymous polymorphisms within the G-protein-coupled receptor gene family. *Genomics* **81**:245-8.
  96. **Lee, E., R. Taussig, and A. G. Gilman.** 1992. The G226A mutant of  $G_{s\alpha}$  highlights the requirement for dissociation of G protein subunits. *J Biol Chem* **267**:1212-8.
  97. **Lefkowitz, R. J., and E. J. Whalen.** 2004.  $\beta$ -arrestins: traffic cops of cell signaling. *Curr Opin Cell Biol* **16**:162-8.
  98. **Liu, B., S. Nakashima, H. Kanoh, T. Takano, T. Shimizu, and Y. Nozawa.** 1994. Activation of phospholipase D in Chinese hamster ovary cells expressing platelet-activating factor receptor. *J Biochem* **116**:882-91.
  99. **Liu, G., J. Shi, L. Yang, L. Cao, S. M. Park, J. Cui, and S. O. Marx.** 2004. Assembly of a  $Ca^{2+}$ -dependent BK channel signaling complex by binding to  $\beta_2$  adrenergic receptor. *Embo J* **23**:2196-205.
  100. **Lohse, M. J., J. L. Benovic, J. Codina, M. G. Caron, and R. J. Lefkowitz.** 1990.  $\beta$ -Arrestin: a protein that regulates  $\beta$ -adrenergic receptor function. *Science* **248**:1547-50.
  101. **Lohse, M. J., M. Bunemann, C. Hoffmann, J. P. Vilardaga, and V. O. Nikolaev.** 2007. Monitoring receptor signaling by intramolecular FRET. *Curr Opin Pharmacol* **7**:547-53.
  102. **Luttrell, L. M., S. S. Ferguson, Y. Daaka, W. E. Miller, S. Maudsley, G. J. Della Rocca, F. Lin, H. Kawakatsu, K. Owada, D. K. Luttrell, M. G. Caron, and R. J. Lefkowitz.** 1999.  $\beta$ -arrestin-dependent formation of  $\beta_2$  adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* **283**:655-61.
  103. **Luttrell, L. M., B. E. Hawes, T. van Biesen, D. K. Luttrell, T. J. Lansing, and R. J. Lefkowitz.** 1996. Role of c-Src tyrosine kinase in G protein-coupled receptor- and  $G\beta\gamma$  subunit-mediated activation of mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* **271**:19443-50.
  104. **Maggio, R., F. Novi, M. Scarselli, and G. U. Corsini.** 2005. The impact of G-protein-coupled receptor hetero-oligomerization on function and pharmacology. *Febs J* **272**:2939-46.

105. **Marinissen, M. J., and J. S. Gutkind.** 2001. G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci* **22**:368-76.
106. **Marrache, A. M., F. Gobeil, Jr., S. G. Bernier, J. Stankova, M. Rola-Pleszczynski, S. Choufani, G. Bkaily, A. Bourdeau, M. G. Sirois, A. Vazquez-Tello, L. Fan, J. S. Joyal, J. G. Filep, D. R. Varma, A. Ribeiro-Da-Silva, and S. Chemtob.** 2002. Proinflammatory gene induction by platelet-activating factor mediated via its cognate nuclear receptor. *J Immunol* **169**:6474-81.
107. **Matsumoto, T., N. Sagawa, M. Yoshida, T. Mori, I. Tanaka, M. Mukoyama, M. Kotani, and K. Nakao.** 1997. The prostaglandin E<sub>2</sub> and F<sub>2α</sub> receptor genes are expressed in human myometrium and are down-regulated during pregnancy. *Biochem Biophys Res Commun* **238**:838-41.
108. **Maurel, D., L. Comps-Agrar, C. Brock, M. L. Rives, E. Bourrier, M. A. Ayoub, H. Bazin, N. Tinel, T. Durroux, L. Prezeau, E. Trinquet, and J. P. Pin.** 2008. Cell-surface protein-protein interaction analysis with time-resolved FRET and snap-tag technologies: application to GPCR oligomerization. *Nat Methods* **5**:561-7.
109. **McCudden, C. R., M. D. Hains, R. J. Kimple, D. P. Siderovski, and F. S. Willard.** 2005. G-protein signaling: back to the future. *Cell Mol Life Sci* **62**:551-77.
110. **McLatchie, L. M., N. J. Fraser, M. J. Main, A. Wise, J. Brown, N. Thompson, R. Solari, M. G. Lee, and S. M. Foord.** 1998. RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* **393**:333-9.
111. **McLaughlin, N. J., A. Banerjee, M. R. Kelher, F. Gamboni-Robertson, C. Hamiel, F. R. Sheppard, E. E. Moore, and C. C. Silliman.** 2006. Platelet-activating factor-induced clathrin-mediated endocytosis requires β-arrestin-1 recruitment and activation of the p38 MAPK signalosome at the plasma membrane for actin bundle formation. *J Immunol* **176**:7039-50.
112. **Minneman, K. P., L. R. Hegstrand, and P. B. Molinoff.** 1979. The pharmacological specificity of *Beta-1* and *Beta-2* adrenergic receptors in rat heart and lung *in Vitro*. *Mol Pharmacol* **16**:21-33.
113. **Morello, J. P., A. Salahpour, A. Laperriere, V. Bernier, M. F. Arthus, M. Lonergan, U. Petaja-Repo, S. Angers, D. Morin, D. G. Bichet, and M. Bouvier.** 2000. Pharmacological chaperones rescue cell-surface expression and function of misfolded V2 vasopressin receptor mutants. *J Clin Invest* **105**:887-95.
114. **Murakami, A., T. Yajima, H. Sakuma, M. J. McLaren, and G. Inana.** 1993. X-arrestin: a new retinal arrestin mapping to the X chromosome. *FEBS Lett* **334**:203-9.
115. **O'Malley, K. L., Y. J. Jong, Y. Gonchar, A. Burkhalter, and C. Romano.** 2003. Activation of metabotropic glutamate receptor mGlu5 on nuclear membranes mediates intranuclear Ca<sup>2+</sup> changes in heterologous cell types and neurons. *J Biol Chem* **278**:28210-9.

116. **Oakley, R. H., S. A. Laporte, J. A. Holt, M. G. Caron, and L. S. Barak.** 2000. Differential affinities of visual arrestin,  $\beta$ arrestin1, and  $\beta$ arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J Biol Chem* **275**:17201-10.
117. **Olson, D. M., D. B. Zaragoza, M. C. Shallow, J. L. Cook, B. F. Mitchell, P. Grigsby, and J. Hirst.** 2003. Myometrial activation and preterm labour: evidence supporting a role for the prostaglandin F receptor--a review. *Placenta* **24 Suppl A**:S47-54.
118. **Pagano, A., G. Rovelli, J. Mosbacher, T. Lohmann, B. Duthey, D. Stauffer, D. Ristig, V. Schuler, I. Meigel, C. Lampert, T. Stein, L. Prezeau, J. Blahos, J. Pin, W. Froestl, R. Kuhn, J. Heid, K. Kaupmann, and B. Bettler.** 2001. C-terminal interaction is essential for surface trafficking but not for heteromeric assembly of GABA<sub>B</sub> receptors. *J Neurosci* **21**:1189-202.
119. **Palczewski, K., T. Kumasaka, T. Hori, C. A. Behnke, H. Motoshima, B. A. Fox, I. Le Trong, D. C. Teller, T. Okada, R. E. Stenkamp, M. Yamamoto, and M. Miyano.** 2000. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **289**:739-45.
120. **Park, P. S., S. Filipek, J. W. Wells, and K. Palczewski.** 2004. Oligomerization of G protein-coupled receptors: past, present, and future. *Biochemistry* **43**:15643-56.
121. **Pearson, G., F. Robinson, T. Beers Gibson, B. E. Xu, M. Karandikar, K. Berman, and M. H. Cobb.** 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* **22**:153-83.
122. **Percherancier, Y., Y. A. Berchiche, I. Slight, R. Volkmer-Engert, H. Tamamura, N. Fujii, M. Bouvier, and N. Heveker.** 2005. Bioluminescence resonance energy transfer reveals ligand-induced conformational changes in CXCR4 homo- and heterodimers. *J Biol Chem* **280**:9895-903.
123. **Perry, S. W., J. A. Hamilton, L. W. Tjoelker, G. Dbaiibo, K. A. Dzenko, L. G. Epstein, Y. Hannun, J. S. Whittaker, S. Dewhurst, and H. A. Gelbard.** 1998. Platelet-activating factor receptor activation. An initiator step in HIV-1 neuropathogenesis. *J Biol Chem* **273**:17660-4.
124. **Pfleger, K. D., and K. A. Eidne.** 2005. Monitoring the formation of dynamic G-protein-coupled receptor-protein complexes in living cells. *Biochem J* **385**:625-37.
125. **Pfleger, K. D., R. M. Seeber, and K. A. Eidne.** 2006. Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) for the real-time detection of protein-protein interactions. *Nat Protoc* **1**:337-45.
126. **Phillips, W. J., and R. A. Cerione.** 1992. Rhodopsin/transducin interactions. I. Characterization of the binding of the transducin- $\beta\gamma$  subunit complex to rhodopsin using fluorescence spectroscopy. *J Biol Chem* **267**:17032-9.
127. **Phizicky, E. M., and S. Fields.** 1995. Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol Rev* **59**:94-123.

128. **Pierce, K. L., T. J. Bailey, P. B. Hoyer, D. W. Gil, D. F. Woodward, and J. W. Regan.** 1997. Cloning of a carboxyl-terminal isoform of the prostanoid FP receptor. *J Biol Chem* **272**:883-7.
129. **Pierce, K. L., H. Fujino, D. Srinivasan, and J. W. Regan.** 1999. Activation of FP prostanoid receptor isoforms leads to Rho-mediated changes in cell morphology and in the cell cytoskeleton. *J Biol Chem* **274**:35944-9.
130. **Prinz, A., G. Reither, M. Diskar, and C. Schultz.** 2008. Fluorescence and bioluminescence procedures for functional proteomics. *Proteomics* **8**:1179-96.
131. **Rasmussen, S. G., H. J. Choi, D. M. Rosenbaum, T. S. Kobilka, F. S. Thian, P. C. Edwards, M. Burghammer, V. R. Ratnala, R. Sanishvili, R. F. Fischetti, G. F. Schertler, W. I. Weis, and B. K. Kobilka.** 2007. Crystal structure of the human  $\beta_2$  adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **450**:383-7.
132. **Rebois, R. V., B. G. Allen, and T. E. Hébert.** 2004. The targetable G protein proteome : where is the next generation of drug targets ? *DDT : Targets* **3**:8.
133. **Rebois, R. V., M. Robitaille, C. Gales, D. J. Dupre, A. Baragli, P. Trieu, N. Ethier, M. Bouvier, and T. E. Hebert.** 2006. Heterotrimeric G proteins form stable complexes with adenylyl cyclase and Kir3.1 channels in living cells. *J Cell Sci* **119**:2807-18.
134. **Reddy, P. S., and R. B. Corley.** 1998. Assembly, sorting, and exit of oligomeric proteins from the endoplasmic reticulum. *Bioessays* **20**:546-54.
135. **Revankar, C. M., D. F. Cimino, L. A. Sklar, J. B. Arterburn, and E. R. Prossnitz.** 2005. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* **307**:1625-30.
136. **Rhee, S. G.** 2001. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu Rev Biochem* **70**:281-312.
137. **Robison, G. A., R. W. Butcher, and E. W. Sutherland.** 1967. Adenyl cyclase as an adrenergic receptor. *Ann N Y Acad Sci* **139**:703-23.
138. **Robitaille, M., Héroux, I., Baragli, A. and Hébert, T.E. .** 2008. Novel tools for use in bioluminescence resonance energy transfer assays., 2nd Edition ed.
139. **Rosenbaum, D. M., V. Cherezov, M. A. Hanson, S. G. Rasmussen, F. S. Thian, T. S. Kobilka, H. J. Choi, X. J. Yao, W. I. Weis, R. C. Stevens, and B. K. Kobilka.** 2007. GPCR engineering yields high-resolution structural insights into  $\beta_2$ -adrenergic receptor function. *Science* **318**:1266-73.
140. **Ross, E. M., and A. G. Gilman.** 1977. Resolution of some components of adenylyl cyclase necessary for catalytic activity. *J Biol Chem* **252**:6966-9.
141. **Salahpour, A., S. Angers, J. F. Mercier, M. Lagace, S. Marullo, and M. Bouvier.** 2004. Homodimerization of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor as a prerequisite for cell surface targeting. *J Biol Chem* **279**:33390-7.

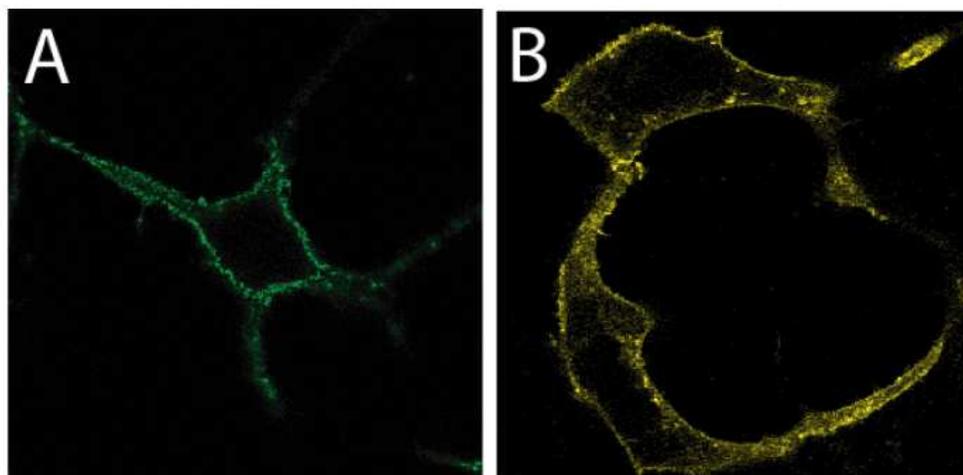
142. **Salahpour, A., H. Bonin, S. Bhalla, U. Petaja-Repo, and M. Bouvier.** 2003. Biochemical characterization of  $\beta$ 2-adrenergic receptor dimers and oligomers. *Biol Chem* **384**:117-23.
143. **Sandnes, D., T. E. Sand, G. Sager, G. O. Bronstad, M. R. Refsnes, I. P. Gladhaug, S. Jacobsen, and T. Christoffersen.** 1986. Elevated level of  $\beta$ -adrenergic receptors in hepatocytes from regenerating rat liver. Time study of [<sup>125</sup>I]iodocyanopindolol binding following partial hepatectomy and its relationship to catecholamine-sensitive adenylate cyclase. *Exp Cell Res* **165**:117-26.
144. **Schmidt, C. J., and E. J. Neer.** 1991. *In Vitro* synthesis of G protein  $\beta\gamma$  dimers. *J Biol Chem* **266**:4538-44.
145. **Selvin, P. R.** 2000. The renaissance of fluorescence resonance energy transfer. *Nat Struct Biol* **7**:730-4.
146. **Shaner, N. C., P. A. Steinbach, and R. Y. Tsien.** 2005. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Methods* **2**:905-9.
147. **Shinohara, T., B. Dietzschold, C. M. Craft, G. Wistow, J. J. Early, L. A. Donoso, J. Horwitz, and R. Tao.** 1987. Primary and secondary structure of bovine retinal S antigen (48-kDa protein). *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:6975-9.
148. **Srinivasan, D., H. Fujino, and J. W. Regan.** 2002. Differential internalization of the prostaglandin  $F_{2\alpha}$  receptor isoforms: role of protein kinase C and clathrin. *J Pharmacol Exp Ther* **302**:219-24.
149. **Strosberg, A. D.** 1993. Structure, function, and regulation of adrenergic receptors. *Protein Sci* **2**:1198-209.
150. **Stryer, L.** 1986. Cyclic GMP cascade of vision. *Annu Rev Neurosci* **9**:87-119.
151. **Stryer, L.** 1978. Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annu Rev Biochem* **47**:819-46.
152. **Stryer, L., and R. P. Haugland.** 1967. Energy transfer: a spectroscopic ruler. *Proc Natl Acad Sci U S A* **58**:719-26.
153. **Sugimoto, Y., A. Yamasaki, E. Segi, K. Tsuboi, Y. Aze, T. Nishimura, H. Oida, N. Yoshida, T. Tanaka, M. Katsuyama, K. Hasumoto, T. Murata, M. Hirata, F. Ushikubi, M. Negishi, A. Ichikawa, and S. Narumiya.** 1997. Failure of parturition in mice lacking the prostaglandin F receptor. *Science* **277**:681-3.
154. **Susanna, R., Jr., P. Chew, and Y. Kitazawa.** 2002. Current status of prostaglandin therapy: latanoprost and unoprostone. *Surv Ophthalmol* **47 Suppl 1**:S97-104.
155. **Sutherland, E. W., and T. W. Rall.** 1958. Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. *J Biol Chem* **232**:1077-91.
156. **Tai, C. J., S. K. Kang, K. C. Choi, C. R. Tzeng, and P. C. Leung.** 2001. Role of mitogen-activated protein kinase in prostaglandin  $F_{2\alpha}$  action in human granulosa-luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab* **86**:375-80.

157. **Taussig, R., and G. Zimmermann.** 1998. Type-specific regulation of mammalian adenylyl cyclases by G protein pathways. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* **32**:81-98.
158. **Terrillon, S., and M. Bouvier.** 2004. Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep* **5**:30-4.
159. **Tirat, A., F. Freuler, T. Stettler, L. M. Mayr, and L. Leder.** 2006. Evaluation of two novel tag-based labelling technologies for site-specific modification of proteins. *Int J Biol Macromol* **39**:66-76.
160. **van Biesen, T., B. E. Hawes, D. K. Luttrell, K. M. Krueger, K. Touhara, E. Porfiri, M. Sakaue, L. M. Luttrell, and R. J. Lefkowitz.** 1995. Receptor-tyrosine-kinase- and G  $\beta\gamma$ -mediated MAP kinase activation by a common signalling pathway. *Nature* **376**:781-4.
161. **van Biesen, T., B. E. Hawes, J. R. Raymond, L. M. Luttrell, W. J. Koch, and R. J. Lefkowitz.** 1996. G<sub>o</sub>-protein  $\alpha$ -subunits activate mitogen-activated protein kinase via a novel protein kinase C-dependent mechanism. *J Biol Chem* **271**:1266-9.
162. **Vassilatis, D. K., J. G. Hohmann, H. Zeng, F. Li, J. E. Ranchalis, M. T. Mortrud, A. Brown, S. S. Rodriguez, J. R. Weller, A. C. Wright, J. E. Bergmann, and G. A. Gaitanaris.** 2003. The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:4903-8.
163. **Vilardaga, J. P., V. O. Nikolaev, K. Lorenz, S. Ferrandon, Z. Zhuang, and M. J. Lohse.** 2008. Conformational cross-talk between  $\alpha_{2A}$ -adrenergic and  $\mu$ -opioid receptors controls cell signaling. *Nat Chem Biol* **4**:126-31.
164. **von Zastrow, M., and B. K. Kobilka.** 1992. Ligand-regulated internalization and recycling of human  $\beta_2$ -adrenergic receptors between the plasma membrane and endosomes containing transferrin receptors. *J Biol Chem* **267**:3530-8.
165. **Vossler, M. R., H. Yao, R. D. York, M. G. Pan, C. S. Rim, and P. J. Stork.** 1997. cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-dependent pathway. *Cell* **89**:73-82.
166. **Weinberger, M. H., W. Aoi, and D. P. Henry.** 1975. Direct effect of  $\beta$ -adrenergic stimulation on renin release by the rat kidney slice in vitro. *Circ Res* **37**:318-24.
167. **Wilson, T., and J. W. Hastings.** 1998. Bioluminescence. *Annu Rev Cell Dev Biol* **14**:197-230.
168. **Wolfe, B. L., and J. Trejo.** 2007. Clathrin-dependent mechanisms of G protein-coupled receptor endocytosis. *Traffic* **8**:462-70.
169. **Wouters, F. S., P. J. Verveer, and P. I. Bastiaens.** 2001. Imaging biochemistry inside cells. *Trends Cell Biol* **11**:203-11.
170. **Wu, G., G. S. Bogatkevich, Y. V. Mukhin, J. L. Benovic, J. D. Hildebrandt, and S. M. Lanier.** 2000. Identification of G $\beta\gamma$  binding sites in the third intracellular loop of the M<sub>3</sub>-muscarinic receptor and their role in receptor regulation. *J Biol Chem* **275**:9026-34.

171. **Xiao, R. P.** 2001.  $\beta$ -adrenergic signaling in the heart: dual coupling of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor to  $G_s$  and  $G_i$  proteins. *Sci STKE* **2001**:RE15.
172. **Xiao, R. P., W. Zhu, M. Zheng, C. Cao, Y. Zhang, E. G. Lakatta, and Q. Han.** 2006. Subtype-specific  $\alpha_1$ - and  $\beta$ -adrenoceptor signaling in the heart. *Trends Pharmacol Sci* **27**:330-7.
173. **Xu, J., J. He, A. M. Castleberry, S. Balasubramanian, A. G. Lau, and R. A. Hall.** 2003. Heterodimerization of  $\alpha_{2A}$ - and  $\beta_1$ -adrenergic receptors. *J Biol Chem* **278**:10770-7.
174. **Xu, Y., D. W. Piston, and C. H. Johnson.** 1999. A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: application to interacting circadian clock proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:151-6.
175. **Ye, R. D., E. R. Prossnitz, A. H. Zou, and C. G. Cochrane.** 1991. Characterization of a human cDNA that encodes a functional receptor for platelet activating factor. *Biochem Biophys Res Commun* **180**:105-11.
176. **Yuan, N., J. Friedman, B. S. Whaley, and R. B. Clark.** 1994. cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C consensus site mutations of the  $\beta$ -adrenergic receptor. Effect on desensitization and stimulation of adenylyl cyclase. *J Biol Chem* **269**:23032-8.
177. **Yue, T. L., J. M. Stadel, H. M. Sarau, E. Friedman, J. L. Gu, D. A. Powers, M. M. Gleason, G. Feuerstein, and H. Y. Wang.** 1992. Platelet-activating factor stimulates phosphoinositide turnover in neurohybrid NCB-20 cells: involvement of pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide-binding proteins and inhibition by protein kinase C. *Mol Pharmacol* **41**:281-9.

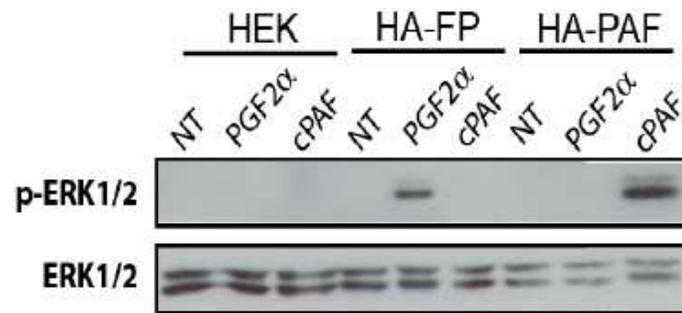
## 7 Annexes :

### 7.1 Annexe 1 : Résultats décrivant la fonctionnalité des constructions utilisées pour les récepteurs PAF et FP

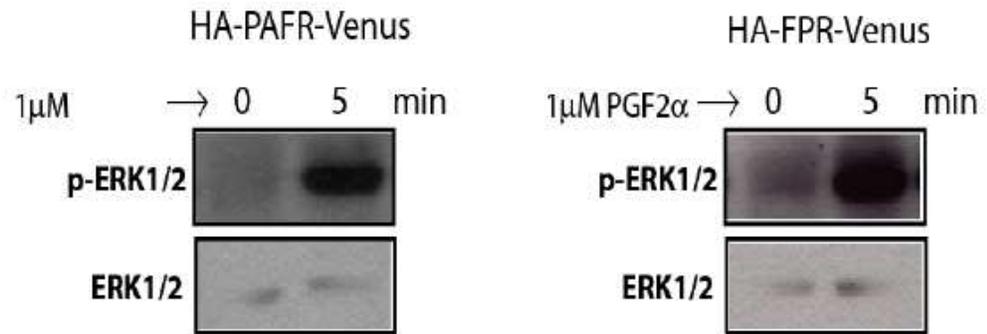


**Figure 7.1 Essai de microscopie confocale :** Les images ont été prises sur des cellules HEK 293 48 h suite à leur transfection avec les différentes constructions indiquées. **A)** *HA-FP* Anticorps primaire utilisé : anti-FPR clone 3E12-2B2 provenant du CTiGAR 1 : 100 dans du PBS1X-BSA4%-0,025%Triton-X-100 pendant 1h30 à RT et anticorps secondaire : anti-IgG souris couplé au fluorophore Alexa 488 1 : 1000 dans même solution que le primaire, pour 45 min à TP sont utilisés lors de l'essai **B)** *HA-PAFR-Venus* Les photos ont été prises sur un microscope LSM510 de Zeiss à l'aide du laser Argon2 qui a une excitation à 458, 488 et 514 nm et du filtre de HFT488 et de type « band pass » 505-530 nm pour le fluorophore Alexa 488 ou encore du laser Argon2 qui a une excitation à 458, 488 et 514 nm utilisé en combinaison avec le filtre « band pass » 530-600 nm pour la protéine fluorescente Venus. L'objectif à immersion de 63 X a été utilisé.

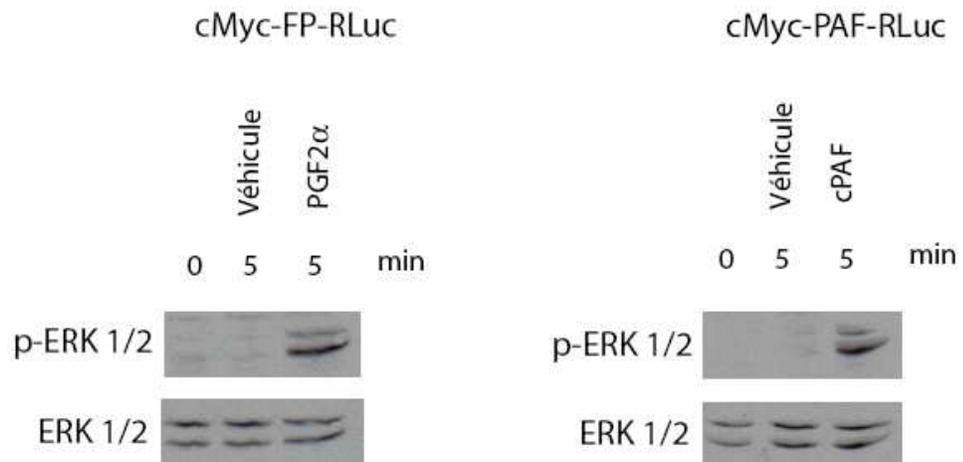
A)



B)



C)



**Figure 7.2 Essai de stimulation des protéines MAPKs** A) *Constructions HA-PAFR et HA-FP*, B) *Constructions HA-PAF-Venus et HA-FP-Venus* C) *Constructions cMyc-PAFR-RLuc et cMys-FP-Venus* L'IB a été réalisé sur des cellules HEK293 qui ont été transfectées de manière transitoire et qui 48 h post-transfection ont été stimulées de la drogue (1  $\mu$ M de cPAF ou 1  $\mu$ M de PGF2 $\alpha$ ) ou encore avec le véhicule (eau et DMEM) et récoltées dans du tampon Laemmli. (Le temps 0 représente des cellules HEK 293 transfectées avec le récepteur et directement re-suspendues dans tu tampon Laemmli, sans drogue). L'anticorps primaire utilisé pour la détection des protéines phosphorylées sur la membrane de nitrocellulose est l'anti-phospho ERK 1/2 (dilution 1 : 1000). L'anticorps primaire utilisé pour la détection des protéines ERK totales est l'anti-total ERK C.T. (dilution 1 : 5000). L'anticorps secondaire est quant à lui l'anti-IgG de souris couplé à la HRP utilisé à une dilution de 1 : 20 000.

## 7.2 Accord des coauteurs

### Darlaine Pétrin

Assistante de Recherche

Laboratoire du Dr Terry Hébert

Département de Pharmacologie et Thérapeutique

Université McGill

### Eugénie Goupil

Étudiante au doctorat

Laboratoire du Dr Terry Hébert et du Dr Stéphane Laporte

Département de Pharmacologie et Thérapeutique

Université McGill

Darlaine Pétrin a réalisé les clones pIRESHyg3-cMyc-FP-RLuc, pIRESpuro3-HA-FP-Venus, pIRESHyg3-cMyc-PAFR-RLuc, pIRESpuro3-HA-PAFR-Venus.

Eugénie Goupil a réalisé les expériences présentées dans l'**Annexe 1** aux **figures 7.1 A et B** ainsi que les résultats de la figure **7.2 A et B**.

À titre d'auteure des résultats identifiés ci-dessus, je suis en accord pour que **Isabelle Héroux** inclue ces résultats dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre : *Nouvelles stratégies d'imageries afin de faciliter l'étude des interactions entre les récepteurs couplés aux protéines G.*

---

Coauteur	Signature	Date
----------	-----------	------

---

Coauteur	Signature	Date
----------	-----------	------