
Dépôt Institutionnel de l'Université libre de Bruxelles /
Université libre de Bruxelles Institutional Repository
Thèse de doctorat/ PhD Thesis

Citation APA:

El-Asmar, L. (2004). *Etude des interactions de CCR5 avec des partenaires cytosoliques et membranaires* (Unpublished doctoral dissertation). Université libre de Bruxelles, Faculté des Sciences – Sciences biologiques, Bruxelles.

Disponible à / Available at permalink : <https://dipot.ulb.ac.be/dspace/bitstream/2013/211160/15/2d39f128-e740-4563-bbd2-084d61744b15.txt>

(English version below)

Cette thèse de doctorat a été numérisée par l'Université libre de Bruxelles. L'auteur qui s'opposerait à sa mise en ligne dans DI-fusion est invité à prendre contact avec l'Université (di-fusion@ulb.be).

Dans le cas où une version électronique native de la thèse existe, l'Université ne peut garantir que la présente version numérisée soit identique à la version électronique native, ni qu'elle soit la version officielle définitive de la thèse.

DI-fusion, le Dépôt Institutionnel de l'Université libre de Bruxelles, recueille la production scientifique de l'Université, mise à disposition en libre accès autant que possible. Les œuvres accessibles dans DI-fusion sont protégées par la législation belge relative aux droits d'auteur et aux droits voisins. Toute personne peut, sans avoir à demander l'autorisation de l'auteur ou de l'ayant-droit, à des fins d'usage privé ou à des fins d'illustration de l'enseignement ou de recherche scientifique, dans la mesure justifiée par le but non lucratif poursuivi, lire, télécharger ou reproduire sur papier ou sur tout autre support, les articles ou des fragments d'autres œuvres, disponibles dans DI-fusion, pour autant que :

- Le nom des auteurs, le titre et la référence bibliographique complète soient cités;
- L'identifiant unique attribué aux métadonnées dans DI-fusion (permalink) soit indiqué;
- Le contenu ne soit pas modifié.

L'œuvre ne peut être stockée dans une autre base de données dans le but d'y donner accès ; l'identifiant unique (permalink) indiqué ci-dessus doit toujours être utilisé pour donner accès à l'œuvre. Toute autre utilisation non mentionnée ci-dessus nécessite l'autorisation de l'auteur de l'œuvre ou de l'ayant droit.

----- English Version -----

This Ph.D. thesis has been digitized by Université libre de Bruxelles. The author who would disagree on its online availability in DI-fusion is invited to contact the University (di-fusion@ulb.be).

If a native electronic version of the thesis exists, the University can guarantee neither that the present digitized version is identical to the native electronic version, nor that it is the definitive official version of the thesis.

DI-fusion is the Institutional Repository of Université libre de Bruxelles; it collects the research output of the University, available on open access as much as possible. The works included in DI-fusion are protected by the Belgian legislation relating to authors' rights and neighbouring rights. Any user may, without prior permission from the authors or copyright owners, for private usage or for educational or scientific research purposes, to the extent justified by the non-profit activity, read, download or reproduce on paper or on any other media, the articles or fragments of other works, available in DI-fusion, provided:

- The authors, title and full bibliographic details are credited in any copy;
- The unique identifier (permalink) for the original metadata page in DI-fusion is indicated;
- The content is not changed in any way.

It is not permitted to store the work in another database in order to provide access to it; the unique identifier (permalink) indicated above must always be used to provide access to the work. Any other use not mentioned above requires the authors' or copyright owners' permission.



Faculté des Sciences

**Institut de Recherche Interdisciplinaire en
Biologie Humaine et Moléculaire**

**Etudes des interactions de CCR5 avec des
partenaires cytosoliques et membranaires**

Promoteur de thèse : Marc Parmentier

Co-promoteur de thèse : Oberdan Léo

**Thèse présentée en vue de
l'obtention du grade
académique de Docteur en
Sciences Biologiques**

El-Asmar Laïla

Année académique 2003-2004

UNIVERSITE LIBRE DE BRUXELLES

Faculté des Sciences

**Institut de Recherche Interdisciplinaire en
Biologie Humaine et Moléculaire**

**Etudes des interactions de CCR5 avec des
partenaires cytosoliques et membranaires**

**Promoteur de thèse : Marc Parmentier
Co-promoteur de thèse : Oberdan Léo**

**Thèse présentée en vue de
l'obtention du grade
académique de Docteur en
Sciences Biologiques**

El-Asmar Laïla

Année académique 2003-2004

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier Marc Parmentier pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Au cours de ces années, j'ai apprécié l'intérêt qu'il a témoigné pour mon travail, ainsi que sa disponibilité malgré ses très nombreuses obligations. Je garderai un excellent souvenir des discussions ponctuées d'un rire tonitruant.

Je remercie également les professeurs Jacques Dumont et Gilbert Vassart pour m'avoir accueilli à l'IRIBHN, institut dans lequel j'ai rencontré des personnes de grande qualité, tant humaine que professionnelle.

Je tiens vivement à remercier les différentes personnes de « La Communauté Marc P. » :

- Jean-Yves, dont l'arrivée a été assez propice. Je te remercie pour tes conseils, le temps que tu m'as consacré, les glaces à répétition, les cramiques et mâtons que je n'ai pas encore goûté, et les journées du « grand cri ».
- Valérie, Arielle et Migi, qui ont supporté sans trop se vexer (euh...) mon humour « légèrement » grinçant ; Patrick, Agar et Cédric-Alphonse ; ainsi que la troupe du 6ème, Audrey, Jean-François et Logorrhée Aiguë ;
- Loulou, pour les heures passées à incuber-filtrer-compter, et Joost pour son utilisation accomplie de Corel Draw ;
- Sébastien, Jalal, et Cédric Blanpain, pour leurs conseils multiples et les discussions enrichissantes que nous avons eues ensemble.

Je remercie toutes les personnes de l'IRIBHN que je n'ai pas nommé spécifiquement pour les nombreux conseils prodigués, et particulièrement Eneko, Nath Su et David Communi. Je n'oublie pas non plus les personnes avec qui j'ai eu la chance de partager mon bureau : Hakim pour nos grandes discussions qui ont balayé des domaines variés, allant de la B.D., au double-hybride en passant bien évidemment par la musique. Barbock pour son soutien, sa bonne humeur permanente, et surtout ses blagues impayables. Pierre pour nos grandes conversations savantes sur le vin, le whisky, ainsi que la meilleure façon de participer à une dégustation tout en se rappelant le nom et le nombre de bouteilles consommées.

Je tiens également à remercier El Paso et les David (Gall et Blum) pour les midis détentes, et les pastis-pétanques des premières années.

Je voudrais également exprimer ma profonde reconnaissance à mes parents, ma sœur et mes proches qui ont toujours eu confiance en mes choix et qui m'ont laissé évoluer librement; Maxence pour m'avoir soutenu, aidé, et surtout pour avoir enduré sans broncher les réveils très très matinaux durant les longues heures de travail à la maison.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

I. INTRODUCTION	3
1. CCR5.....	3
1.1. Classification des chimiokines et de leurs récepteurs	3
1.2. Structure de CCR5	4
1.3 Pharmacologie.....	4
1.4. Domaines de liaison des ligands	5
1.5. Expression cellulaire de CCR5	5
2. CCR5, co-récepteur du VIH.....	6
2.1. L'interaction avec Env de VIH	6
2.2. CCR5 dans la transmission et la progression du VIH.....	6
2.3. Le tropisme du VIH.....	7
3. Cascades de signalisation des récepteurs couplés aux protéines G.....	8
3.1. Les récepteurs couplés aux protéines G	8
3.2. Voies de signalisation intracellulaire induites par l'activation de CCR5.....	9
3.3. Chimiotactisme.....	9
3.4. Signalisation impliquée dans la fonction co-réceptrice pour le VIH-1	11
4. Désensibilisation et endocytose du récepteur.....	11
4.1. Modèle général pour les RCPGs	11
4.2. Désensibilisation et endocytose de CCR5.....	13
4.3. Voies alternatives d'endocytose.....	14
5. Interactions indépendantes des protéines G	16
6. Oligomérisation des récepteurs couplés aux protéines G.....	17
II. BUT DU TRAVAIL	19
III. RECHERCHE DE NOUVEAUX PARTENAIRES INTRACELLULAIRES DE CCR5	20
1. Introduction	20
2. Résultats	21
2.1. Recherche de partenaires de CCR5 par la technique du double-hybride.....	21
2.1.1. Criblages de la banque de leucocytes humains	21
2.2. Glutathione-S-Transférase (GST)-Pulldown.....	23
2.2.1. Production des protéines de fusion	23
2.2.2. Analyse des gels monodimensionnels de polyacrylamide	24
2.2.3. Analyse des gels de polyacrylamide bidimensionnels et identification des protéines par spectrométrie de masse	24
3. Discussion	26
VI. ETUDE DES PHENOMENES D'OLIGOMERISATION DU RECEPTEUR CCR5	30
1. Introduction	30
2. Résultats	31
2.1. Immunoprécipitations.....	31
2.1.1. Immunoprécipitation des oligomères de CCR5	31
2.1.2. Caractérisation des clones cellulaires.....	31
2.1.3. Co-Immunoprécipitation des dimères	32
2.1.4. BRET.....	32
2.1.5. CCR5 homodimérise en l'absence de ligands.....	33
2.1.6. Effets des ligands de CCR5 sur la dimérisation du récepteur	35
2.1.7. Effet de MC-1 sur la dimérisation du récepteur	35
2.1.8. CCR2b homodimérise en l'absence de ligands.....	35
2.1.9. Modulation de l'homodimérisation de CCR2b par des anticorps monoclonaux	36
2.1.10. CCR5 et CCR2b hétérodimérisent en l'absence de ligands.....	37
2.1.11. Modulation de l'hétérodimérisation par les chimiokines.....	37
2.1.12. MC-1 module négativement la formation des hétérodimères CCR5/CCR2b	38

2.1.13. CCR2b et CCR5 n'interagissent pas avec des récepteurs non-apparentés.....	38
2.2. Etudes des implications fonctionnelles de la co-expression des récepteurs CCR5 et CCR2b.....	39
2.2.1. La co-stimulation de CCR5 et CCR2b ne démontre pas de coopérativité dans l'activation des cascades intracellulaires.....	39
2.2.2. MCP-1 inhibe la liaison de MIP-1 β sur les membranes des cellules co-exprimant CCR5 et CCR2b.....	39
2.2.3. MIP-1 β inhibe la liaison de MCP-1 sur les membranes des cellules co-exprimant CCR5 et CCR2b.....	40
2.2.4. Les anticorps monoclonaux ne déplacent pas la liaison des ligands.....	40
2.2.5. Mesure de la co-endocytose de CCR5 et de CCR2b au sein des cellules CHO-K1.....	41
2.3. Discussion.....	41
V. CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES	49
VI. MATERIEL ET METHODES	52
1. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	52
2. Construction des plasmides.....	52
3. Cellules et milieux de culture.....	53
4. Transformation et transfection	54
5. Criblage d'une banque d'ADNc par la technique du double-hybride.....	55
6. Extraction et solubilisation des leucocytes mononucléés circulants (PBMC)	56
7. GST-pulldown.....	56
8. Séparation des protéines par électrophorèse à une dimension	57
9. Séparation des protéines par électrophorèse à deux dimension	57
10. Coloration des gels	58
11. Spectrométrie de masse.....	58
12. Immunoprécipitation	59
13. Immunodétection.....	60
14. Cytométrie de flux.....	60
15. Endocytose des récepteurs	61
16. Mesure de la mobilisation de calcium intracellulaire (test Aequorine)	61
17. Préparation des membranes et tests de liaisons	62
18. BRET.....	63
VII. BIBLIOGRAPHIE	64
VIII. PUBLICATIONS.....	74
IX. RESUME	

I. INTRODUCTION

I. INTRODUCTION

1. CCR5

Les récepteurs aux chimiokines constituent une grande famille de récepteurs à sept domaines transmembranaires exprimés dans divers types cellulaires, particulièrement les populations de leucocytes. Les chimiokines assurent la coordination de la différenciation, de la distribution anatomique, du trafic intracellulaire, et des fonctions effectrices de ces populations leucocytaires, régulant ainsi les réponses immunitaires innées et adaptatives.

1.1. Classification des chimiokines et de leurs récepteurs

Les chimiokines sont des protéines solubles, de faible poids moléculaire (8-14 kDa ou 60-80 résidus). Leur classification au sein de 4 groupes est basée sur leur structure selon le nombre et l'espacement de cystéines conservées (Figure 1) : Les *CC-chimiokines* ont les 2 premières cystéines adjacentes, alors que dans les *CXC-chimiokines*, les 2 premières cystéines sont séparées par un acide aminé. Les CXC-chimiokines peuvent être subdivisées en deux sous-groupes selon la présence ou l'absence d'un motif ELR (Glu-Leu-Arg) au niveau de leur domaine amino-terminal. Les *CX3C-chimiokines*, où 3 acides aminés séparent les deux premières cystéines, ne comportent à ce jour qu'un seul membre, la fractalkine. Cette chimiokine présente aussi la particularité d'être ancrée dans la membrane plasmique par un domaine transmembranaire. La lymphotactine est aussi le seul membre de la famille des *C-chimiokines*, et ne contient que 2 des 4 cystéines conservées.

Une classification basée sur la fonction et le profil d'expression a également été proposée. Les chimiokines sont classées en *chimiokines inflammatoires* (dont la sécrétion est inductible) et en *chimiokines constitutives* (ou homéostatiques) (Rucker et al., 1996). Les chimiokines inflammatoires sont exprimées dans les tissus enflammés par les cellules épithéliales ou stromales ainsi que par les leucocytes résidents ou recrutés, en réponse à une stimulation par les cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-1, ...) ou suite au contact avec un pathogène. Ce groupe de chimiokines est spécialisé dans le recrutement, vers le site inflammatoire, de cellules de l'immunité non-spécifique (granulocytes), de cellules présentatrices d'antigènes (monocytes, macrophages, cellules dendritiques immatures) et de cellules effectrices (lymphocytes mémoires, NK, ...). Les chimiokines constitutives sont produites dans des microenvironnements discrets au sein des tissus lymphoïdes et non-lymphoïdes, comme la peau ou le tube digestif. Le rôle de ces chimiokines est de réguler le trafic physiologique des cellules immunitaires durant

cellules endothéliales de capillaires, certaines cellules épithéliales, des cellules musculaires lisses et des fibroblastes, sans qu'un rôle fonctionnel ne soit établi dans ces cas (Blanpain and Parmentier, 2000).

2. CCR5, co-récepteur du VIH

2.1. L'interaction avec Env de VIH

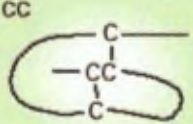
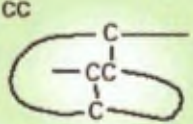
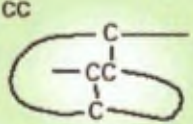
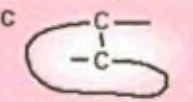
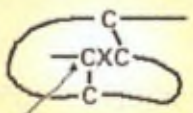
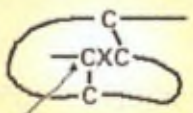
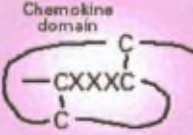
En plus de son rôle dans les phénomènes inflammatoires, CCR5, ainsi que d'autres récepteurs aux chimiokines, fonctionnent comme co-récepteurs, en coopération avec le CD4, pour permettre l'entrée du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) dans la cellule. Le VIH entre dans la cellule par fusion directe entre la membrane du virus et la membrane plasmique de la cellule cible. Le mécanisme d'entrée requiert tout d'abord la liaison de la protéine d'enveloppe virale (Env) avec le CD4 (Littman, 1998; Berger et al., 1999).

La protéine d'enveloppe du VIH consiste en l'association non-covalente de 2 sous-unités générées par le clivage protéolytique du précurseur gp160: (a) la sous-unité gp120, hautement glycosylée, contenant les sites d'interaction avec les récepteurs membranaires de l'hôte, et (b) la sous-unité transmembranaire gp41, contenant à son extrémité amino-terminale un peptide hydrophobe fusogénique, directement impliqué dans la fusion membranaire (Sodroski, 1999; Wyatt and Sodroski, 1998). La protéine d'enveloppe native est exprimée à la surface des virions ou des cellules infectées sous la forme de trimères de complexes gp120/gp41, associés de manière non-covalente (Figure 3).

La fusion entre le virus et la cellule cible est un processus séquentiel faisant intervenir des changements conformationnels multiples au sein de la protéine d'enveloppe du VIH (Figure 4). L'interaction entre la gp120 et CD4 induit un changement conformationnel de la gp120, qui expose, crée ou stabilise le déterminant qui permettra l'interaction avec le co-récepteur. L'interaction entre la gp120 et le co-récepteur induit un nouveau changement conformationnel dans Env qui se dissocie de la gp41 et lui permet d'exposer et d'insérer son peptide de fusion au sein de la membrane plasmique de la cellule cible, entraînant la fusion des membranes.

2.2. CCR5 dans la transmission et la progression du VIH

La démonstration définitive du rôle de CCR5 en tant que facteur déterminant dans la transmission virale, est venue de la découverte d'un allèle mutant de CCR5 (CCR5 Δ 32) associé à

Chemokine	Receptor	Cell Type
 MCP-3, -4; MIP-1 α ; RANTES MCP-3, -4; eotaxin-1, -2; RANTES	CCR1	Eosinophil 
	CCR3	
 MCP-1, -2, -3, -4, -5 MCP-3, -4; eotaxin-1, -2; RANTES	CCR2	Basophil 
	CCR3	
 MCP-3, -4; MIP-1 α ; RANTES MCP-1, -2, -3, -4, -5 MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES I-309 MDC, HCC-1, TECK	CCR1	Monocyte 
	CCR2	
	CCR5	
	CCR8	
Fractalkine	CX ₃ CR1	
SDF-1	CXCR4	
 MCP-3, -4; MIP-1 α ; RANTES MCP-1, -2, -3, -4, -5 TARC MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES MIP-3 β (ELC) PARC, SLC, 6CKine (Exodus-2)	CCR1	Activated T cell 
	CCR2	
	CCR4	
	CCR5	
	CCR7	
	?	
	CX ₃ CR1	
Fractalkine	CX ₃ CR1	
IP-10, MIG, I-TAC	CXCR3	
 PARC, DC-CK1 Lymphotactin	?	Resting T cell 
	?	
	CXCR4	
 MCP-3, -4; MIP-1 α ; RANTES MCP-1, -2, -3, -4, -5 MCP-3, -4; eotaxin-1, -2; RANTES TARC MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES MIP-3 α (LARC, Exodus-1) MDC, TECK	CCR1	Dendritic cell 
	CCR2	
	CCR3	
	CCR4	
	CCR5	
	CCR6	
	?	
SDF-1	CXCR4	
 Glutamic acid-leucine-arginine	CXCR1	Neutrophil 
	CXCR2	
Interleukin-8, GCP-2 Interleukin-8, GCP-2; GRO- α , - β , - γ ; ENA-78; NAP-2; LIX		
 MCP-1, -2, -3, -4, -5 MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES	CCR2	Natural killer cell 
	CCR5	
Fractalkine	CX ₃ CR1	
IP-10, MIG, I-TAC	CXCR3	

Luster (N. Eng. J. Med. 1998)

Figure 1. Les chimiokines et leurs récepteurs. Les chimiokines appartiennent à une famille de protéines de 8-10 kDa qui peut être subdivisée en 4 sous-familles en fonction de la position relative des 2 premières cystéines conservées. Dans les CXC-chimiokines, les 2 premières cystéines sont séparées par un acide aminé. Les 2 cystéines sont adjacentes dans les CC-chimiokines. La lymphotactine, la seule chimiokine C, ne possède que 2 des 4 cystéines conservées. Dans la fraktalkine, les 2 cystéines sont séparées par 3 résidus (CX₃C-chimiokine). Les récepteurs aux chimiokines sont des RCPGs exprimés à la surface des différentes populations leucocytaires.

l'hématopoïèse, la présentation d'antigènes au niveau des organes lymphoïdes secondaires et au cours de l'immuno-surveillance.

On dénombre actuellement 16 CXC-chimiokines, 26 CC-chimiokines, la fractalkine et la lymphotactine. La plupart des chimiokines lient plus d'un récepteur, et un récepteur lie en général plus d'une chimiokine. Cette redondance fonctionnelle est surtout une caractéristique des chimiokines inflammatoires. Les chimiokines constitutives n'activent le plus souvent qu'un seul récepteur. La redondance fonctionnelle des chimiokines conférerait une plus grande robustesse au système de recrutement des cellules immunitaires vers les sites inflammatoires. On dénombre actuellement 6 CXC-récepteurs, 11 CC-récepteurs, un récepteur à la lymphotactine (XCR1) et un récepteur à la fractalkine (CX3CR1) (Baggiolini, 1998; Murphy, 2002).

1.2. Structure de CCR5

CCR5 est un récepteur couplé aux protéines G (RCPG) typique de 352 acides aminés. Son poids moléculaire prédit est de 40,6 kDa. Comme les autres récepteurs aux chimiokines, CCR5 possède au niveau de ses domaines extracellulaires 4 cystéines impliquées dans la formation de 2 ponts disulfures (Blanpain et al., 1999a). Le pont disulfure qui connecte les domaines extracellulaires (ECL) ECL1 et ECL2 est conservé dans la plupart des RCPGs. Le second est spécifique de la famille des récepteurs de chimiokines et lie le domaine amino-terminal à ECL3 (Figure 2). Le poids moléculaire de la forme mature de CCR5 est d'environ 46 kDa (Rucker et al., 1996). Différentes modifications post-traductionnelles peuvent rendre compte de cette augmentation de la masse. CCR5 est O-glycosylé (Rucker et al., 1996), sulfaté sur des tyrosines amino-terminales (Farzan et al., 1999), et palmitoylé sur des cystéines carboxy-terminales (Blanpain et al., 2001; Kraft et al., 2001). De plus, CCR5 peut être phosphorylé par les GRKs sur des sérines carboxy-terminales (Oppermann et al., 1999).

1.3 Pharmacologie

CCR5 a été initialement décrit comme un récepteur fonctionnel aux CC-chimiokines MIP-1 α , MIP-1 β et RANTES (Samson et al., 1996a). MCP-2, MCP-4, LD78 β , et HCC-1 [9-74] ont ensuite été décrits comme agonistes de CCR5 alors que MCP-3, qui lie CCR5 avec une bonne affinité mais ne l'active pas, peut être considéré comme un antagoniste naturel (Blanpain et al., 1999b; Ruffing et al., 1998; Gong et al., 1998; Detheux et al., 2000; Nibbs et al., 1999). LD78 β , qui ne diffère de MIP-1 α que par 3 résidus, est l'agoniste naturel de plus haute affinité pour

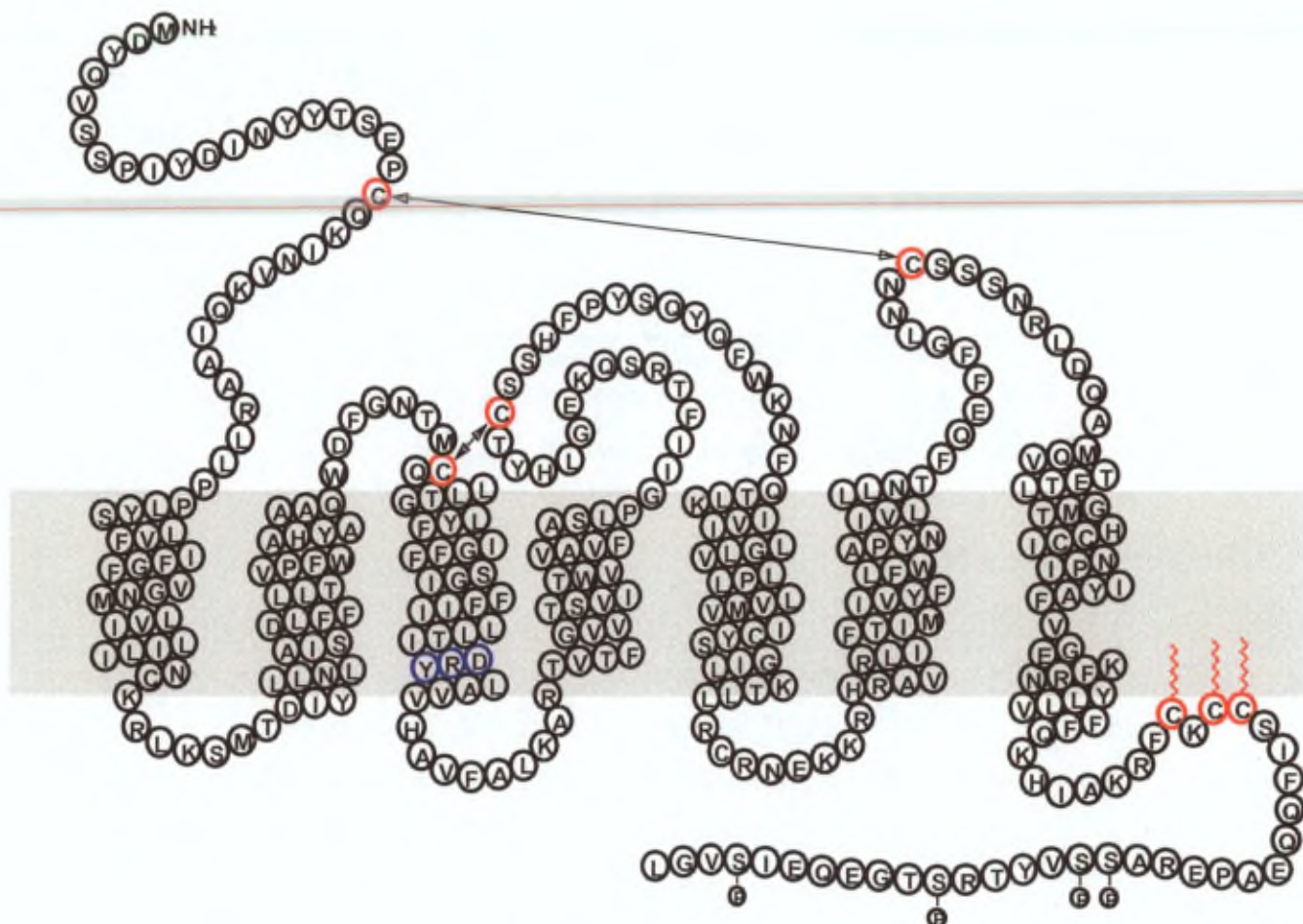


Figure 2. Représentation schématique de CCR5. La bicouche lipidique est schématisée par le rectangle gris. Les ponts disulfures entre les domaines ECL1 et ECL2 ainsi qu'entre les domaines N-terminal et ECL3 sont représentés par des flèches à double tête. Les cystéines impliquées, Cys-20, Cys-101, Cys-178, Cys-269, sont entourées en rouge. Le motif DRY conservé, au niveau du 3^{ème} domaine transmembranaire est entouré en bleu. Les sites de palmitoylation Cys-321, Cys-323, et Cys-324 sont indiqués en rouge. Les sites de phosphorylation Ser-336, Ser-337, Ser-342 et Ser-349 sont également représentés.

CCR5 (Nibbs et al., 1999). La proline en position 2, à la place d'une sérine dans MIP-1 α , serait responsable de cette augmentation d'activité biologique. Le clivage protéolytique d'une chimiokine abondamment exprimée dans le plasma (HCC-1) génère un peptide (HCC-1 [9-74]) qui lie CCR5 avec une haute affinité (Detheux et al., 2000). Deux sérine protéases, l'urokinase et la plasmine, sont responsables de la génération de ce peptide actif (Vakili et al., 2001).

1.4. Domaines de liaison des ligands

L'étude des relations structure-fonction de CCR5 a permis de déterminer les régions du récepteur impliquées dans la liaison des chimiokines, la signalisation intracellulaire, et l'interaction avec la protéine d'enveloppe virale. La première approche utilisée, l'étude de chimères entre CCR5 et CCR2b, ou entre CCR5 humain et CCR5 murin, a permis de montrer que la partie amino-terminale joue un rôle prépondérant dans l'activité co-réceptrice, mais que l'interaction entre CCR5 et Env est conformationnellement complexe et fait intervenir aussi la seconde, et dans une moindre mesure les première et troisième boucles extracellulaires (Rucker et al., 1996; Atchison et al., 1996; Bieniasz et al., 1997). Les mêmes chimères ont été utilisées pour montrer que la deuxième boucle extracellulaire de CCR5 détermine la spécificité de la liaison vis-à-vis des chimiokines MIP-1 α , MIP-1 β et RANTES (Samson et al., 1997). Ni la signalisation, ni l'endocytose de CCR5 n'apparaissent nécessaires pour l'activité co-réceptrice de CCR5 (Alkhatib et al., 1997; Aramori et al., 1997; Farzan et al., 1997; Gosling et al., 1997).

1.5. Expression cellulaire de CCR5

CCR5 est exprimé par différentes sous-populations leucocytaires mais aussi par d'autres types cellulaires comme les cellules microgliales et les cellules endothéliales (Murphy, 2002). CCR5 est exprimé sur les cellules T à mémoire (CD45RO, CD26^{high}, CD95⁺, CD4⁺ ou CD8⁺) et préférentiellement par les lymphocytes à polarisation T_{H1}. CCR5 est exprimé par 5% des monocytes circulants, et son expression est augmentée lors de leur différenciation en macrophages. CCR5 n'est pas exprimé sur les précurseurs hématopoïétiques précoces mais son expression devient détectable sur les progéniteurs commis aux lignées macrophagiques et mégacaryocytaires. CCR5 est exprimé à bas niveau sur les progéniteurs de thymocytes et les thymocytes doublement positifs (CD4⁺CD8⁺). CCR5 n'est que peu ou pas exprimé sur les lymphocytes B. CCR5 est exprimé sur différents types de cellules dendritiques (DC dérivés de monocytes ou de CD34⁺, mais aussi ceux isolés du sang périphérique) et sur les cellules de Langerhans. L'expression de CCR5 a aussi été décrite sur des neurones, des astrocytes, des

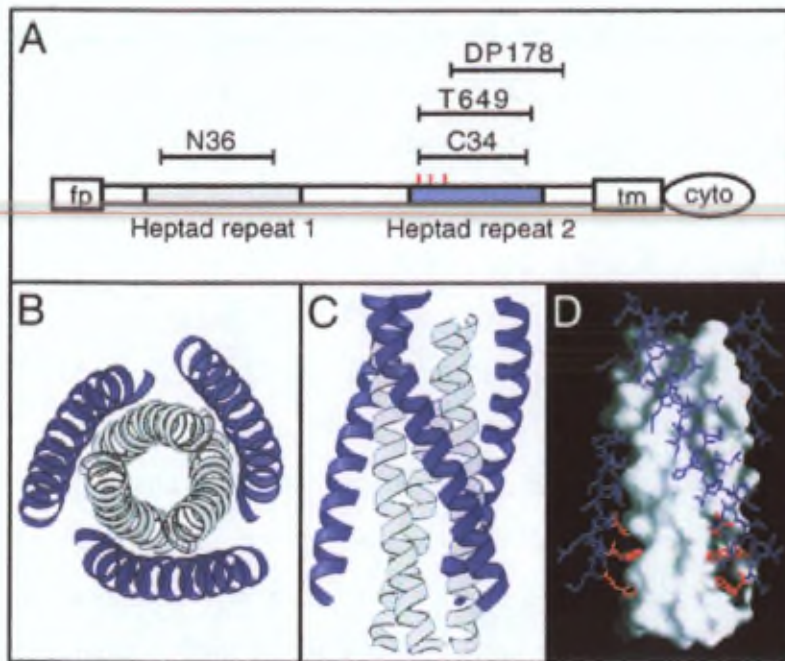


Figure 3. Structure de la gp41 du VIH. A. Représentation schématique de la gp41, montrant le peptide de fusion (fp), les 2 segments hydrophobes (Heptad repeat), le segment transmembranaire (tm) et la partie intracytoplasmique (cyto). B,C, D. Structure du complexe N36/C34 qui forme le cœur du domaine extracellulaire trimérique de la gp41. Les hélices N36 (en gris) forment un trimère central enroulé en spirale et entouré des 3 hélices C34 anti-parallèles (en bleu).
Cahn (Cell 1998)

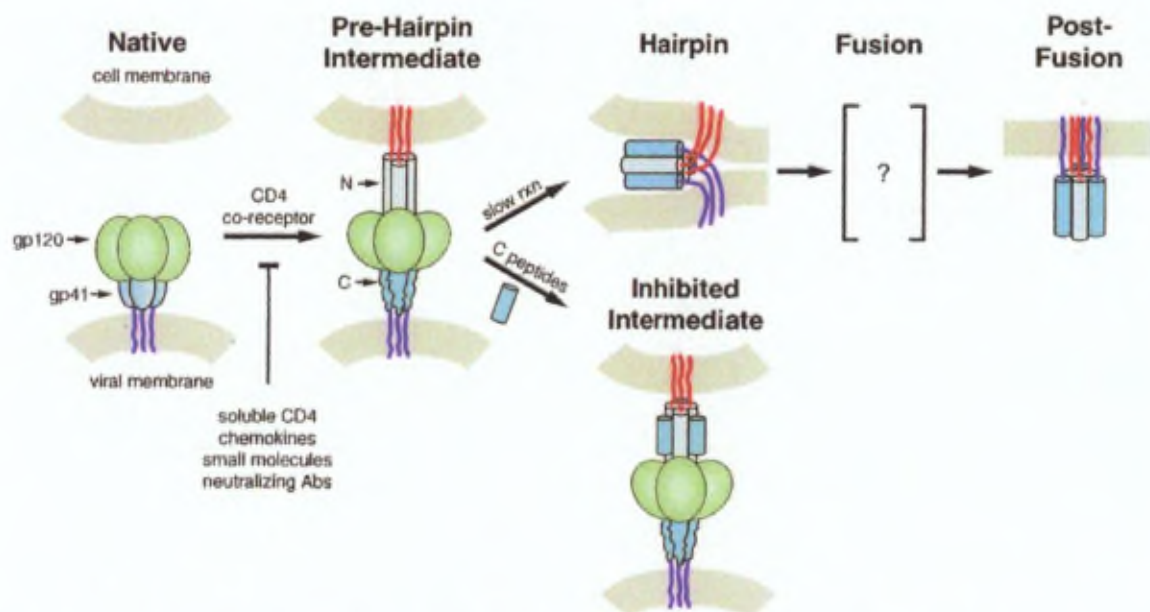
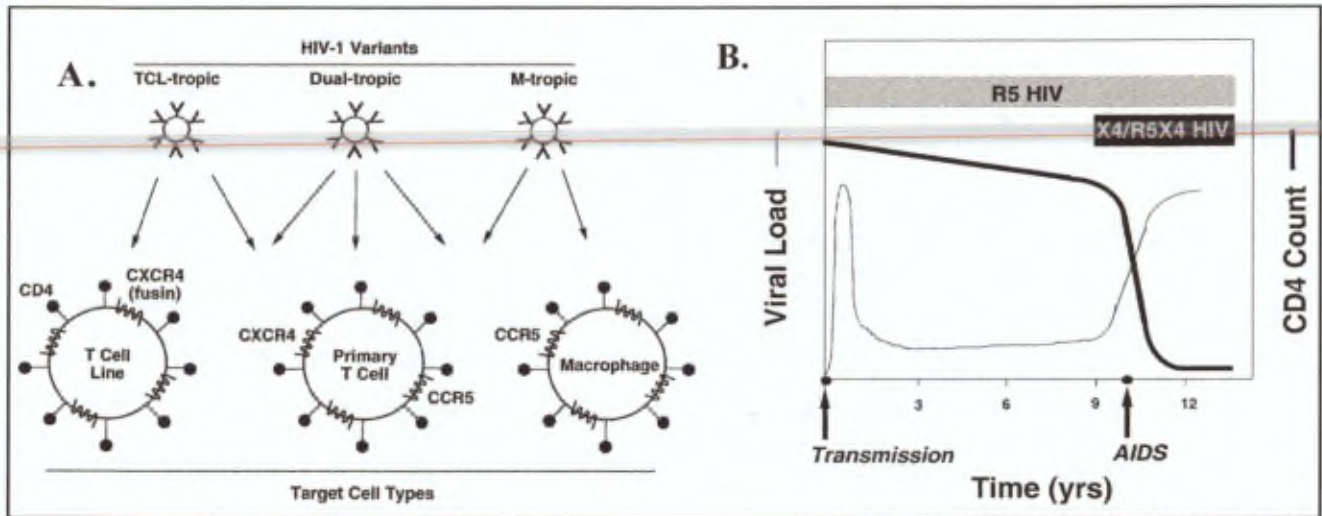


Figure 4. Modèle de la fusion membranaire du VIH. Dans le trimère natif de Env (gp120/gp41), le peptide de fusion est enfoui. Suite à l'interaction entre la gp120, son récepteur CD4 et son co-récepteur (CCR5 et CXCR4), le complexe gp120-gp41 se dissocie et la conformation de la gp41 change vers un état intermédiaire de pré-épingle à cheveux (Pre-Hairpin) dans lequel le peptide de fusion (en rouge) est inséré dans la membrane de la cellule cible. Cet état intermédiaire est converti en une structure en épingle à cheveux compétente pour la fusion membranaire lorsque les peptides C et N s'enroulent et adoptent une conformation hélicoïdale. Ce réarrangement conformationnel entraîne la fusion membranaire par un mécanisme encore mal compris.

Cahn (Cell 1998)



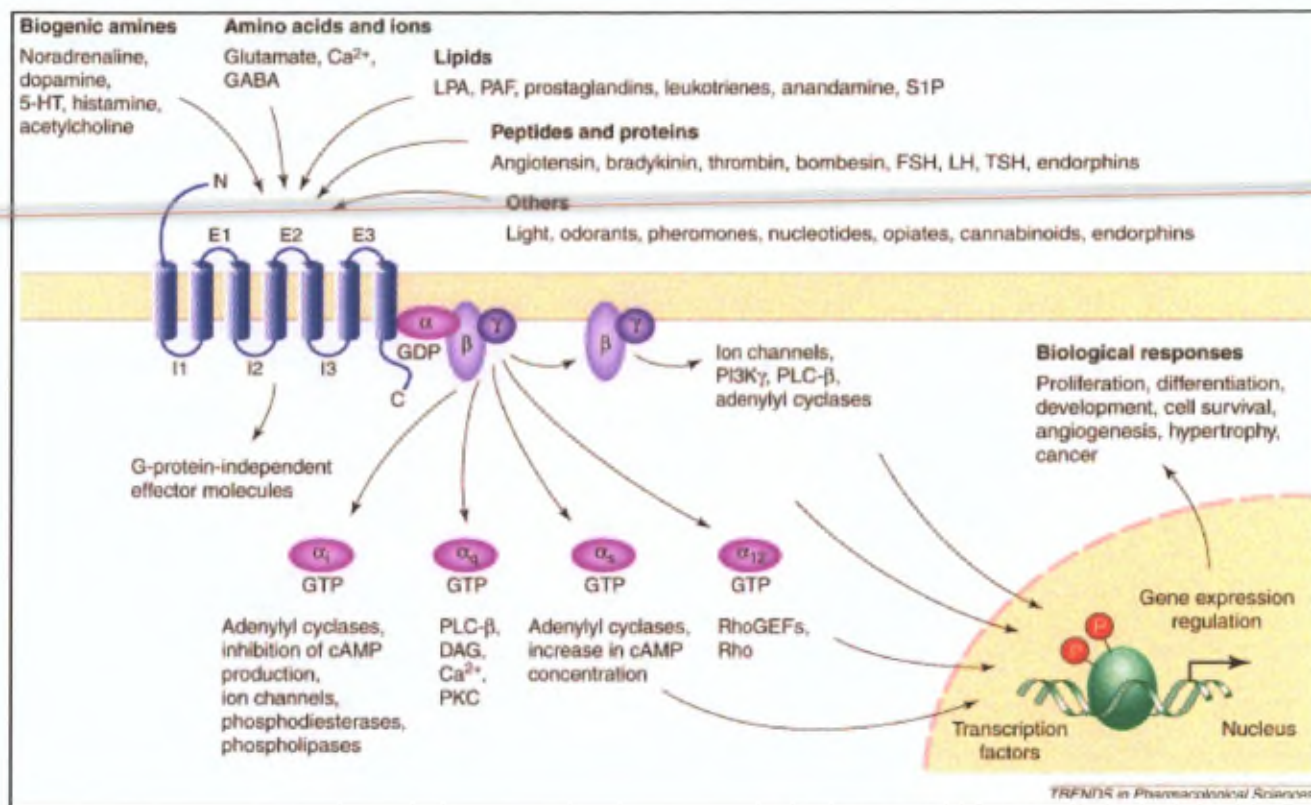
Berger, E. (Annu. Rev. Immunol. 1999)

Figure 5. L'utilisation des co-récepteurs et le tropisme du VIH. A. Les souches macrophage-tropiques utilisent CCR5 comme co-récepteur (M-tropiques ou R5 tropiques) et infectent efficacement les macrophages et les lymphocytes T CD4+. Les souches « dual-tropiques » peuvent utiliser à la fois CCR5 et CXCR4 comme co-récepteur (X4/R5 tropiques). Les souches T-tropiques utilisent uniquement CXCR4 comme co-récepteur (X4 tropiques) et peuvent infecter à la fois les lymphocytes T CD4+ mais aussi des lignées de cellules T (TCLA). B. Les souches R5 tropiques sont responsables de la transmission du VIH et prédominent durant les phases asymptomatiques de la séropositivité et également durant le SIDA. L'apparition de souches X4 tropiques est associée à une accélération de la maladie vers le SIDA.

une résistance à l'infection par le VIH. CCR5 Δ 32 consiste en une délétion de 32 paires de bases dans la séquence codante de CCR5, qui entraîne un saut de phase et l'apparition d'un codon stop prématuré situé après la quatrième hélice transmembranaire (Samson et al., 1996b). Des études d'épidémiologie moléculaire ont montré que l'allèle Δ 32 était trouvé à l'état homozygote chez un certain nombre d'individus exposés mais non infectés (Liu et al., 1996) et que l'on ne trouvait pas d'homozygotes chez les patients infectés (Samson et al., 1996b). Cette protection n'est cependant pas totale. Parmi les milliers d'individus infectés par le VIH et qui ont été génotypés pour la mutation Δ 32, quelques rares cas de patients homozygotes pour la mutation ont été identifiés. Dans un de ces cas, il a pu être démontré que le patient avait été contaminé par un variant T-tropique (O'Brien et al., 1997; Biti et al., 1997; Theodorou et al., 1997; Michael et al., 1997b).

2.3. Le tropisme du VIH

Le tropisme des différentes souches virales peut être largement expliqué par l'utilisation des deux co-récepteurs principaux, CCR5 et CXCR4 (Figure 5) (Littman, 1998; Berger et al., 1999). Une souche M-tropique utilisera CCR5 comme co-récepteur, une souche T-tropique utilisera CXCR4 et une souche « dual-tropique » utilisera CCR5 et CXCR4. Pour cette raison, une nouvelle nomenclature a été proposée, rebaptisant R5 les souches M-tropiques, X4 les souches T-tropiques et R5X4 les souches dual-tropiques (Berger et al., 1998). Une évolution temporelle du tropisme du VIH est observée au cours de la maladie (Connor et al., 1997). Les souches R5 tropiques sont responsables de la transmission virale et prédominent durant les stades initiaux de l'infection, mais sont aussi observées durant tous les autres stades de la maladie. Les souches X4 sont détectées chez certains individus (environ 30%), uniquement dans les stades tardifs de la maladie, et l'apparition de ces souches est généralement corrélée avec une accélération de la maladie. L'absence de souches X4 durant les phases initiales de la maladie se produit même si ces variants sont présents chez l'individu contaminant, et quel que soit le mode de transmission (sexuel ou parentéral). Les mécanismes responsables de cette transition sont encore mal compris, mais il est fort possible que la pression de sélection exercée par les ligands de CCR5 puisse y contribuer.



Marinissen et al. (TRENDS in Pharmacol. Sci. 2001)

Figure 6. Diversité des récepteurs couplés aux protéines G. Une grande variété de ligands, incluant amines biogéniques, acides aminés, ions, lipides, peptides et protéines utilisent les 7TMRs pour stimuler des effecteurs cytoplasmiques et nucléaires via ou indépendamment des protéines G. Ces voies de signalisation régulent des fonctions biologiques clés comme la prolifération cellulaire, la transmission synaptique, la signalisation hormonale et l'angiogenèse. Abréviations : DAG, diacylglycerol ; FSH, follicle-stimulating hormone ; GEF, guanine nucleotide exchange factor ; LH, leuteinizing hormone ; LPA, lysophosphatidic acid ; PAF, platelet-activating factor ; PI3K, phosphoinositide 3-kinase ; PKC, protein kinase C ; PLC, phospholipase C ; S1P, sphingosine-1-phosphate ; TSH, thyroid-stimulating hormone.

3. Cascades de signalisation des récepteurs couplés aux protéines G

3.1. Les récepteurs couplés aux protéines G

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) sont codés par la plus grande famille génique contenue dans le génome humain (plus de 1000 membres) et répondent à un nombre impressionnant de stimuli différents, comprenant des amines biogéniques, peptides, glycoprotéines, lipides, nucléotides, ions, et protéases (Figure 6). Pendant de nombreuses années, cette famille de récepteurs a été désignée comme étant couplée aux protéines G (RCPGs), terminologie basée sur le paradigme fortement documenté que ces récepteurs interagissent avec, et signalent via la famille des protéines G hétérotrimériques. Lorsque ces récepteurs sont stimulés par leur ligand, leurs segments transmembranaires subissent des changements conformationnels permettant à la surface intracellulaire du récepteur d'interagir avec les protéines G. Les récepteurs activés servent ainsi de facteurs d'échange de nucléotides guanyliques pour les sous-unités α de l'hétérotrimère $\alpha\beta\gamma$. Le relargage du GDP, associé à la liaison de GTP à la sous-unité α , conduit à la dissociation des sous-unités α et $\beta\gamma$. Les sous-unités libres vont alors lier et réguler des effecteurs intracellulaires variés (Gether, 2000).

Cependant, au cours de ces dernières années, de nombreuses recherches ont suggéré que l'activation des RCPGs pouvait stimuler des réponses physiologiques indépendantes des protéines G. Le développement en parallèle de nombreuses techniques permettant la détection des interactions protéine-protéine comme le système double-hybride, le « phage display », et les techniques d'« overlay » et de « pulldown » utilisant des protéines de fusion, ont révélé des associations de RCPGs avec des partenaires intracellulaires différents des protéines G hétérotrimériques. Il a été montré qu'une variété de réponses cellulaires est médiée par l'activation de molécules effectrices via de nouveaux mécanismes moléculaires, dont la plupart n'impliquent pas la stimulation de seconds messagers classiques. De plus, la majorité des réponses biologiques induites par les RCPGs ne dépendent pas d'une seule voie de signalisation biochimique, mais constituent plutôt le résultat d'une intégration de l'activité fonctionnelle d'un réseau complexe de voies de signalisation intracellulaires (Jordan et al., 2000; Marinissen and Gutkind, 2001).

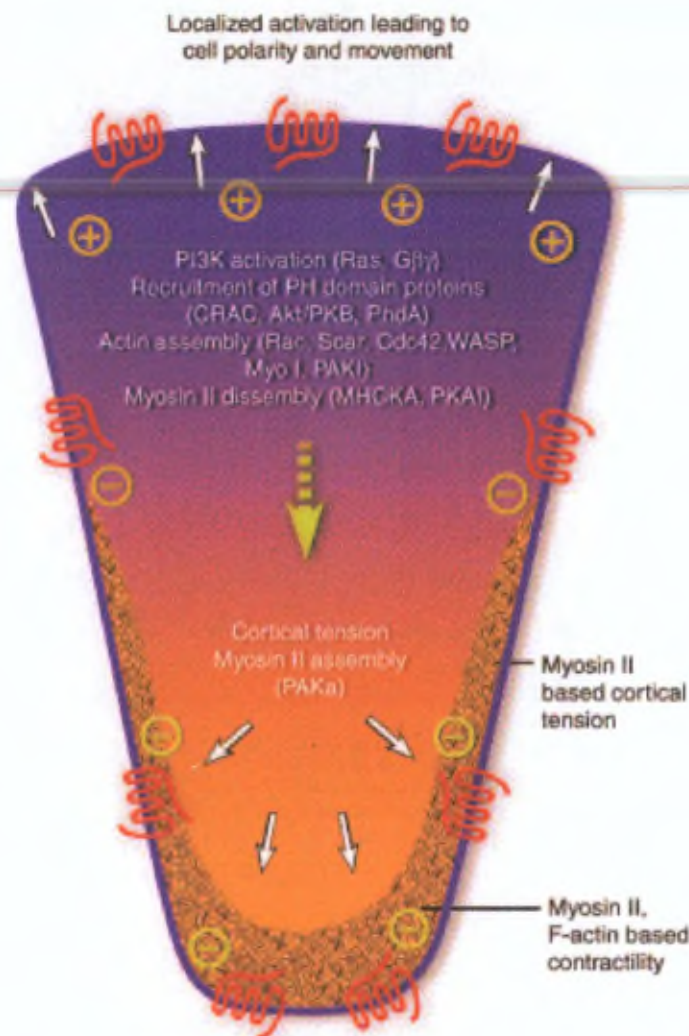


Figure 7. Modèle représentatif de la formation d'un domaine d'activation au front de migration d'une cellule. Les RCPGs sont uniformément distribués au sein de la cellule. L'activation localisée de la PI3K abouti à l'accumulation de PIP3 et sa réduction en PIP2 (non schématisés), formant un gradient membranaire de produits lipidiques plus fort que le gradient de chimioattractant extracellulaire qui l'a engendré. La PI3K γ (classe 1B) est activée par les sous-unités G $\beta\gamma$, tandis que les autres isoformes (classe 1A ; α , β et δ) de la kinase sont activées par Ras. La formation de ce gradient de médiateurs intracellulaires implique des boucles de rétrocontrôle positif au front de migration (indiquées par '+') combinées à une inhibition plus générale dans le reste de la cellule (indiquées par '-'). La conséquence en est l'établissement de réseaux de signalisation robustes préférentiellement au front de migration, avec notamment la localisation préférentielle de multiples protéines de signalisation, comprenant des protéines à domaine PH. L'assemblage de la F-actine est déclenché par l'activation des petites GTPases (Rac1/Cdc42) et de leurs effecteurs. Abréviations: Akt/PKB, protéine kinase B; F-actine, actine filamentueuse; PAK, p21-activated kinase; PH, pleckstrin homology; PI3K, phosphatidylinoside 3-kinase; PtdIns(3,4) P_2 , phosphatidylinositol (3,4) bisphosphate; PtdIns(3,4,5) P_3 , phosphatidylinositol (3,4,5) trisphosphate; WASP, Wiskott-Aldrich syndrome protein.

Chung et al. (TRENDS in Biochemical Sciences 2001).

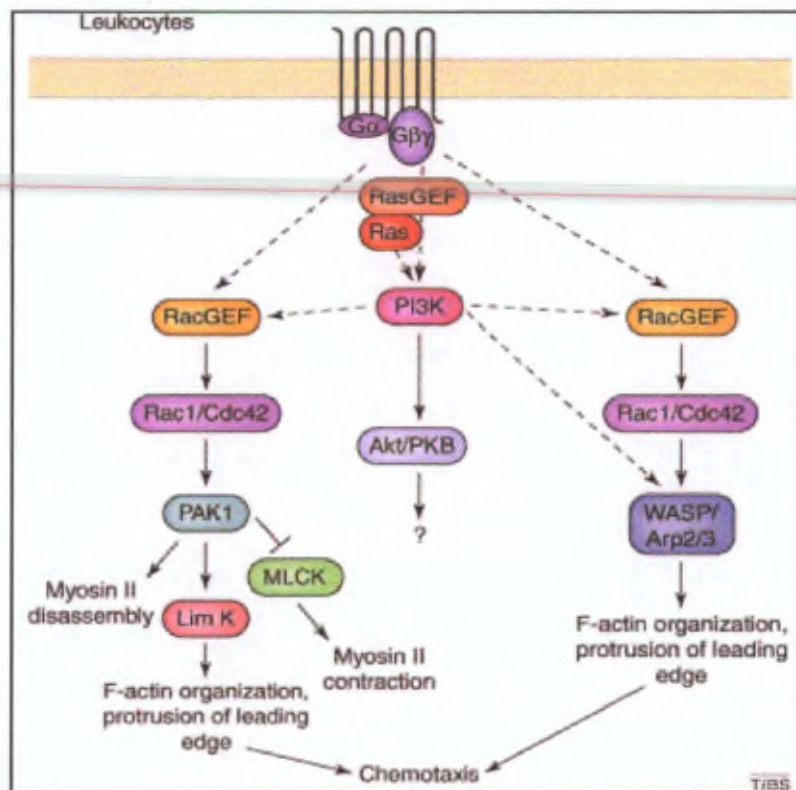
3.2. Voies de signalisation intracellulaires induites par l'activation de CCR5

L'activation de CCR5 par ses ligands est relayée par les protéines G_i hétérotrimériques. Les sous-unités α_i et $\beta\gamma$ libérées suite à l'activation des protéines G inhibent l'adénylate cyclase et stimulent des isoformes de la phospholipase $C\beta$, entraînant l'hydrolyse de phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate (PIP2) en phosphatidylinositol (1,4,5)-triphosphate (IP3) et en (1,2)-diacylglycérol (DAG). L'IP3 permet ensuite la libération de calcium intracellulaire à partir du réticulum endoplasmique, induisant des réponses cellulaires variées (Raport et al., 1996; Bacon et al., 1995). Le DAG généré active à son tour les protéines kinase C qui phosphorylent alors des cibles cellulaires variées via leur activité kinase. Un flux calcique résiduel en réponse à des ligands de CCR5 peut être observé dans des cellules primaires prétraitées par la toxine pertussique. Ceci suggère que CCR5 puisse être couplé à d'autres protéines G que celles de la famille des G_i , sans doute une protéine de la famille des G_q (Farzan et al., 1997). La stimulation de CCR5 ne génère que peu d'IP3. Il est donc possible que les flux calciques observés ne proviennent pas uniquement de la libération des réserves intracellulaires, mais aussi de l'ouverture de canaux calciques de la membrane plasmique (Atchison et al., 1996; Gosling et al., 1997). L'activation de CCR5 peut en effet réguler l'ouverture de différents canaux ioniques dans des macrophages en culture primaire (Liu et al., 2000).

3.3. Chimiotactisme

La migration leucocytaire en réponse à un gradient d'agent chimioattractant, ou chimiotactisme, constitue la principale fonction régulée par les chimiokines. Le chimiotactisme requiert l'acquisition et la maintenance d'une asymétrie à la fois spatiale et fonctionnelle (polarisation) entre des parties de la cellule initialement équivalentes. Au sein des leucocytes, cette asymétrie se développe entre deux extrémités de la cellule : l'une devient le front de migration exhibant des structures membranaires spécialisées que sont les lamellipodes et les filopodes, tandis que l'autre se développe en un uropode subissant une rétraction progressive (Lauffenburger and Horwitz, 1996).

La voie de signalisation aboutissant à la migration progressive des cellules débute par la stimulation de la phosphatidylinositol 3-kinase γ (PI3K γ) par les dimères $\beta\gamma$ de la protéine G_i . La PI3K γ joue un rôle central dans l'établissement et le maintien de la polarité morphologique, en contrôlant la localisation et l'activation d'effecteurs indispensables au processus de chimiotactisme (Jin et al., 2000) (Figure 7).

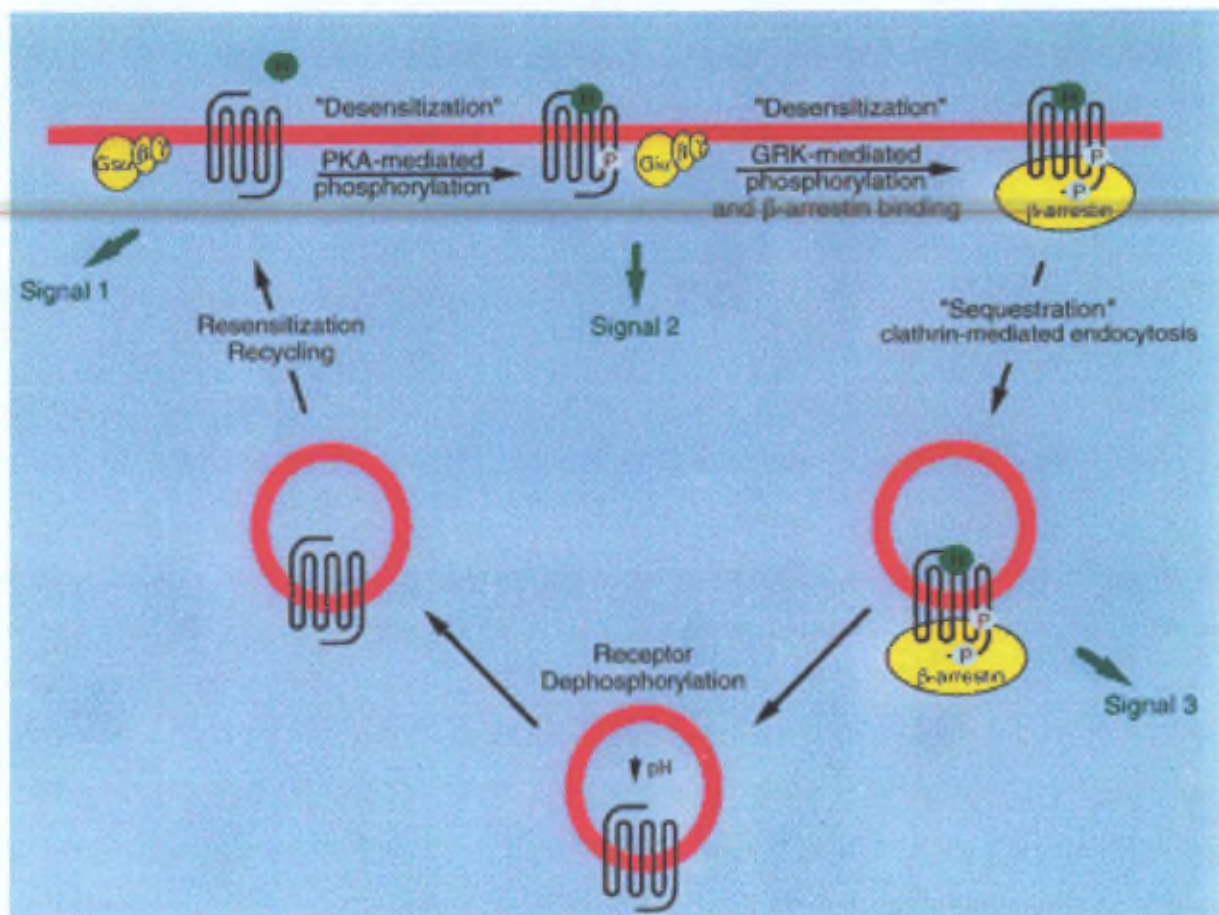


Chung et al. (TRENDS in Biochemical Sciences 2001)

Figure 8. Modèle des voies de signalisation régulant le chimiotactisme via les RCPGs au sein des leucocytes. L'activation de la protéine G mène à l'activation de Rac1 et Cdc42, qui activent à leur tour les protéines de la famille WASP, et via ces dernières le complexe Arp2/3 et PAK1. Rac1/Cdc42 peuvent également être activé par des voies indépendantes de la PI3K. PAK1 contrôle la fonction de la myosine II via différents mécanismes. De plus, PAK1 phosphoryle directement et active la Lim kinase, protéine impliquée dans l'organisation de la F-actine. Les chimioattractants activent également la protéine Akt/PKB, mais son rôle dans le chimiotactisme n'est pas encore connu. Les lignes pointillées désignent les voies de signalisation potentielles sans que celles-ci aient été directement démontrées au sein des leucocytes. Abréviations : Akt/PKB, protéine kinase B; F-actin, actine filamenteuse; GEF, guanine nucleotide exchange factor; Lim K, Lim kinase; MLCK, myosin light chain kinase; PAK, p21-activated kinase; PI3K, phosphatidylinoside 3-kinase; WASP, Wiskott-Aldrich syndrome protein

CCR5, comme les autres récepteurs aux chimiokines, stimule l'activité de la P13K γ via les sous-unités $\beta\gamma$ libres des protéines G_i (Figure 8). La formation du produit lipidique phosphatidylinositol (3, 4, 5)-triphosphate (PIP3), et/ou sa réduction en phosphatidylinositol (3, 4)-biphosphate (PIP2), modifient le recrutement et l'activation de protéines à domaines PH (la PKB/Akt par exemple), à proximité du site d'activation (Servant et al., 1999; Servant et al., 2000) résultant ainsi en une activation localisée des effecteurs de la cascade de signalisation (Parent and Devreotes, 1999; Rickert et al., 2000). Les phosphatidylinositols produits par l'action de la PI3K semblent aussi réguler l'activation des Rho GTPases via leurs GEFs (guanine exchange factor), protéines régulant l'échange GDP/GTP au niveau de la GTPase (Han et al., 1998; Missy et al., 1998). Rac1 et Cdc42 activent à leur tour les protéines de la famille WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein), et via ces dernières, le complexe Arp2/3 et la p21-activated kinase (PAK1) (Dharmawardhane et al., 1999; Machesky and Insall, 1998; Bokoch, 2000). Ces deux protéines jouent un rôle important dans la polymérisation de l'actine, respectivement au niveau de la nucléation de l'actine, et au niveau de son assemblage en réseau branché au sein des lamellipodes (Mullins et al., 1998; Dharmawardhane et al., 1999). PAK1 phosphoryle directement et active la kinase Lim (Lim K), protéine impliquée dans l'organisation de la F-actine (Edwards et al., 1999). D'autre part, PAK1 contrôle la fonction de la myosine II via deux mécanismes indépendants. PAK1 est impliqué dans le désassemblage des filaments formés par les dimères de myosine II au front de migration, via la phosphorylation de la protéine par une voie non totalement déterminée, mais aussi via la régulation de la myosine regulatory light chain kinase (MLCK), diminuant la phosphorylation et l'activation de la chaîne légère régulatrice de la myosine, inhibant ainsi la contractilité basée sur la myosine II (Sanders et al., 1999; Wong and Fish, 1998; Kiosses et al., 1999). Rac1/Cdc42 peuvent également être activés par des voies indépendantes de la PI3K (Bokoch, 2000). D'autres voies, incluant la kinase Rho-dépendante (RhoK), pourraient également jouer un rôle dans la contraction du réseau d'actine dans le corps cellulaire et l'uropode. Les chimioattractants activent également la protéine Akt/PKB, mais son rôle dans la migration cellulaire n'est pas encore connu (Hirsch et al., 2000).

Le recrutement sélectif de protéines à domaines PH au niveau du front de migration des leucocytes jouerait un rôle important dans la capacité des cellules à détecter et répondre fonctionnellement à de faibles différences (de l'ordre de 1 à 2 %) du taux d'occupation des récepteurs par l'agent chimioattractant entre le front et la queue de migration. Une régulation spatiale et temporelle fine et rapide des cascades de signalisation est critique pour permettre aux cellules de sentir les changements discrets de concentrations de chimiokines lors de leur migration. De nombreuses études montrent que la désensibilisation et l'internalisation sont des phénomènes essentiels au processus de chimiotactisme.



Lefkowitz R. (J. Biol. Chem. 1998)

Figure 9. Régulation de l'activité des RCPGs illustrée pour le récepteur β_2 adrénergique.

L'occupation du récepteur par un agoniste entraîne l'activation de G_s et de l'adénylate cyclase (signal 1). La phosphorylation du récepteur par la PKA inhibe son couplage à $G_{\alpha s}$ et facilite son interaction avec $G_{\alpha i}$, qui inhibe l'adénylate cyclase (signal 2). La phosphorylation du récepteur par la GRK et la liaison de l'arrestine qui en découle, découplent le récepteur des protéines G (désensibilisation). La β -arrestine médie également l'internalisation du récepteur par un mécanisme dépendant de la clathrine. L'interaction avec l'arrestine et/ou l'endocytose du récepteur permet l'activation des MAPK Erk1/Erk2 (signal 3). L'endocytose permet aussi la déphosphorylation du récepteur qui mène à sa resensibilisation. Le récepteur peut alors regagner la membrane plasmique.

3.4. Signalisation impliquée dans la fonction co-réceptrice pour le VIH-1

La signalisation de CCR5 ne semble pas nécessaire à l'entrée du VIH, car des mutants non-activables de CCR5 (par exemple le mutant R126N) continuent à fonctionner comme co-récepteur (Alkhatib et al., 1997; Aramori et al., 1997; Farzan et al., 1997; Gosling et al., 1997). Cependant, certaines protéines d'enveloppe virale peuvent induire dans des leucocytes humains une élévation du calcium intracellulaire, ainsi que l'ouverture de canaux ioniques, le chimiotactisme et une phosphorylation de Pyk2 (Weissman et al., 1997; Davis et al., 1997; Liu et al., 2000; Iyengar et al., 2000; Iyengar et al., 1999). Le rôle de la signalisation intracellulaire générée par l'interaction de la gp120 avec ses co-récepteurs reste quelque peu mystérieux. Il est possible que l'activation des cascades intracellulaires rende certaines étapes tardives de la réplication virale plus efficaces. Dans certains modèles d'infection, la signalisation induite par les chimiokines peut en effet augmenter la réplication virale (Kinter et al., 1998; Arthos et al., 2000).

4. Désensibilisation et endocytose du récepteur

4.1. Modèle général pour les RCPGs

Lors de l'activation d'un récepteur, des processus de régulation dynamique de la cascade de transduction sont mis en route, afin de permettre à la cellule de s'adapter aux changements de son environnement. Un des processus régulateurs les plus importants est connu sous le nom de désensibilisation. D'une manière générale, la désensibilisation se définit par une diminution de l'intensité de la réponse cellulaire malgré la présence continue d'un stimulus d'égale intensité. De nombreux mécanismes adaptateurs ont été découverts, qui agissent à différents niveaux de la biologie des récepteurs (transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel).

En ce qui concerne les régulations post-traductionnelles, responsables d'une modification rapide (en minutes) de la fonction du récepteur, trois familles de protéines participent à la désensibilisation des RCPGs (Figure 9) : les kinases non spécifiques régulées par les 2nd messagers (protéine kinase A (PKA) et protéine kinase C (PKC)), les kinases spécifiques des RCPGs ou GRKs (G protein-coupled receptor kinases), et les arrestines (Lefkowitz, 1998).

Un des modes de désensibilisation les mieux connus est le feedback négatif médié par les kinases PKC (pour les récepteurs couplés à $G_{\alpha q}$) et PKA (pour ceux couplés à $G_{\alpha s}$). La phosphorylation du récepteur, secondaire à l'augmentation des seconds messagers intracellulaires, entraînerait un changement conformationnel qui l'empêcherait de se coupler à

certaines protéines G, mais qui pourrait aussi augmenter son couplage à d'autres protéines G (« signal switching »). Ces kinases phosphorylent les protéines indépendamment de leur état d'activation. De ce fait, des récepteurs inactifs, y compris de classes différentes, peuvent aussi être phosphorylés et désensibilisés. Cette forme de désensibilisation est dès lors appelée *désensibilisation hétérologue*.

Un certain nombre de récepteurs ne possèdent pas de sites de phosphorylation ni pour la PKC, ni pour la PKA, mais peuvent être désensibilisés par phosphorylation après stimulation par un agoniste. Le mécanisme cellulaire majeur qui est à la base de cette *désensibilisation homologue* est un mécanisme en deux temps, dans lequel le récepteur occupé par son agoniste est d'abord phosphorylé par une GRK. Cette phosphorylation du récepteur permet ensuite la liaison d'une arrestine qui, en s'interposant entre la protéine G et le récepteur, découple la signalisation intracellulaire. Les GRKs comprennent 6 membres (GRK-1 à 6) et sont activés essentiellement par les récepteurs occupés par leurs agonistes via un mécanisme allostérique, mais d'autres facteurs (PKC, lipides membranaires, protéines liant le calcium) contribuent également à réguler leurs activités (Lefkowitz, 1998; Palczewski, 1997). Les protéines GRK-2 et -3 sont cytosoliques dans la cellule non stimulée, et sont transloquées à la membrane plasmique lors de l'activation du récepteur grâce à la liaison coordonnée de leur domaine PH avec la sous-unité $\beta\gamma$ libre et le phosphatidylinositol biphosphate (PIP2).

La phosphorylation du récepteur augmente son affinité pour la β -arrestine de 10 à 30 fois. Cette liaison de la β -arrestine, qui provoque le découplage du récepteur vis à vis de la protéine G, est aussi une étape cruciale dans le processus d'endocytose du récepteur. La β -arrestine joue en effet le rôle de protéine adaptatrice dans l'endocytose des RCPGs médiée par la clathrine, en se liant à l'une des sous-unités du complexe AP2. Une autre GTPase, la dynamine, joue également un rôle important dans l'endocytose des RCPGs (Palczewski, 1997).

Une fois les récepteurs internalisés, ils peuvent soit retourner à la membrane plasmique (phénomène de recyclage) ou être dirigés vers les lysosomes où ils seront dégradés. Le recyclage des récepteurs, après leur déphosphorylation par des phosphatases, participe à la resensibilisation de la réponse cellulaire. Bien que la désensibilisation, comme son nom l'indique, soit associée à une inhibition de la signalisation, les mécanismes moléculaires qui l'accompagnent peuvent aussi être impliqués dans le déclenchement de nouveaux signaux activateurs. Par exemple, l'activation des MAP kinases Erk1 et Erk2 par le récepteur β 2-adrénérique est bloquée par des agents inhibant l'endocytose médiée par la clathrine (sucrose hypertonique, concavalline A, déplétion potassique,...), mais aussi par l'expression de dominants négatifs de la β -arrestine ou de la dynamine (Luttrell et al., 1999). Il est probable que c'est le recrutement de protéines adaptatrices comme la dynamine qui serait responsable de l'activation de Erk en servant d'échafaudage pour le complexe de signalisation, plutôt que l'endocytose elle-même.

4.2. Désensibilisation et endocytose de CCR5

Les CC-chimiokines induisent une phosphorylation rapide de CCR5 sur quatre résidus sérine (Ser) C-terminaux selon un processus dépendant de l'action conjointe de GRKs et de la protéine kinase C. Les quatre sites de phosphorylation impliqués dans la désensibilisation sont les Ser 336, 337, 342, et 349 (Figure 2). Bien que CCR5 ne possède pas de sites consensus de phosphorylation par la PKC, cette kinase semble capable de phosphoryler CCR5 sur le résidu Ser-337 (Pollok-Kopp et al., 2003). Cet effet avait été mis en évidence auparavant, sans que le site précis soit identifié (Oppermann et al., 1999; Deng et al., 1999; Shen et al., 2000). L'utilisation d'inhibiteurs de PKC (bisindolylmaleimide) induit une diminution limitée mais significative de la phosphorylation de CCR5 induite par RANTES ou AOP-RANTES (Oppermann et al., 1999). Il a été également observé que CCR5 pouvait être désensibilisé d'une manière hétérologue et dépendante de la PKC, suite à l'activation du récepteur FPRL1 par des peptides synthétiques dérivés de gp120 de VIH (Deng et al., 1999; Shen et al., 2000).

Les CC-chimiokines induisent une phosphorylation rapide de CCR5 par les GRK -2 et -3, suivi de la liaison des arrestines sur le récepteur phosphorylé, provoquant ainsi le découplage du récepteur vis-à-vis de la protéine G. La β -arrestine agit également comme protéine adaptatrice liant une des sous-unités du complexe AP2, dirigeant le récepteur vers les vésicules à clathrine par un mécanisme dépendant de la dynamine (Aramori et al., 1997; Oppermann et al., 1999). L'importance de chacune des 4 sérines impliquées semble équivalente, comme l'ont montré des études de mutagenèse dirigée des sérines en alanines (Ala), mutations individuelles ou combinées. Les mutants arborant le remplacement de n'importe quelle combinaison de 2 des 4 Ser en Ala conservent leur capacité à recruter les β -arrestines et à subir les désensibilisation et resensibilisation consécutives à la liaison du ligand. Un minimum de 2 Ser est donc requis, sans que la position exacte des résidus ne semble importante (Kraft et al., 2001; Oppermann et al., 1999).

Il y a peu, une étude approfondie a montré que la β -arrestine 1 purifiée lie avec des affinités similaires l'extrémité C-terminale de CCR5, qu'elle soit phosphorylée ou non, suggérant ainsi que les β -arrestines utilisent un ou des sites additionnels permettant de différencier les récepteurs activés des non-activés (Huttenrauch et al., 2002). Ce site a été identifié comme étant le motif conservé DRY (Asp-Arg-Tyr) localisé à l'extrémité cytoplasmique du troisième segment transmembranaire de CCR5, et impliqué dans l'activation des protéines G.

De plus, si les arrestines ont un effet prononcé sur l'internalisation rapide de CCR5 endéans les premières minutes du phénomène, elles ne semblent pas nécessaires aux phénomènes

Soluble ligand	Membrane receptor	Rafts?	Cholesterol sensitive?	Itinerary in cell	Refs
Cholera toxin B subunit	GM1 (glycosphingolipid)	Yes	Yes	Endosomes, Golgi, ER	731
Shiga toxin B subunit	Gb3 (glycosphingolipid)	Yes	Yes	Endosomes, Golgi, ER	730
Verotoxin B subunit	Gb3	?	Yes	Endosomes, Golgi, ER	40
Diphtheria toxin	GPI-linked diphtheria toxin Receptor (an artificial chimera)	Yes	No	Acidic endosomal compartment	33
Murine leukemia virus	Cationic amino acid transporter	?	Yes	?	4950
SV40	MHC I	?	Yes	Caveosome, ER	5
Interleukin 2	IL-2 receptor	Yes	Yes	Late endosomes/lysosome (b subunit)	11
—	CD59	Yes	Yes	Golgi	7
—	GPI-linked GFP	Yes	Yes	Golgi	7
Factor VIIa	Tissue factor	?	?	?	51
Urokinase plasminogen activator	UPA receptor (GPI-linked)	Yes	?	?	34
Adenosine	E-cadherin	Yes	Yes	?	52
	A1 adenosine receptor and adenosine deaminase	Yes	Yes	?	53
Cytotoxic necrotizing factor 1	?	?	?	Acidic endosomal compartment	54
	N-Formyl peptide and C5a chemottractant receptors	?	?	?	32
Adrenaline	Muscarinic adrenergic receptors	?	?	?	36
Dopamine	Dopamine D2 receptors	?	?	?	35
Angiotensin	Angiotensin II type 1A receptor	?	?	?	55
Interferon γ	Interferon γ receptor	?	?	?	56

Nichols et al. (TRENDS in Cell Biol. 2001)

Table 1. Diversité des molécules et récepteurs, décrits comme endocytés via des mécanismes indépendants des vésicules à clathrine.

d'endocytose ayant cours à plus long terme. Cette observation a suggéré l'utilisation de voies alternatives, indépendantes des arrestines, et pouvant par exemple impliquer les cavéoles.

4.3. Voies alternatives d'endocytose

D'autres voies d'endocytose, indépendantes de la clathrine et de la dynamine, semblent aussi intervenir dans l'internalisation des RCPGs. Malgré une liste croissante de ligands et récepteurs décrits comme utilisant des voies indépendantes des vésicules à clathrine (Table 1), le rôle et les protéines responsables de ces voies alternatives, ainsi que les mécanismes moléculaires sous-jacents restent à éclaircir. Ces voies feraient intervenir des domaines particuliers de la membrane plasmique enrichis en protéines cargo ou échafaudages comme par exemple les RAFTS impliqués dans les voies d'endocytose comme la phagocytose et la macropinocytose (Nichols and Lippincott-Schwartz, 2001). Les RAFTS constituent des régions dynamiques de la membrane plasmique, résistantes aux détergents. Ces régions sont enrichies en cholestérol, en glycosphingolipides, en protéines à ancrage GPI (glycophosphatidylinositol), ainsi qu'en certaines protéines transmembranaires.

La présence de CCR5 au sein de structures de type RAFTS a été proposée, avec comme postulat qu'une ségrégation initiale de protéines membranaires au sein de ces structures constituerait un facteur primordial dans la distribution de molécules spécialisées à des endroits spécifiques durant la migration cellulaire (Manes et al., 1999). Ce postulat était étayé par certains travaux fortement controversés proposant une polarisation des récepteurs aux chimioattractants au front de migration des cellules en mouvement. La densité de récepteurs au front de migration est considérée dans cette hypothèse comme responsable de la capacité des leucocytes à migrer en réponse à un gradient extrêmement discret de chimiokines (Nieto et al., 1997; Vicente-Manzanares et al., 1998). De plus, il a également été suggéré que les RAFTS constitueraient les plate-formes indispensables à la fusion entre les membranes virale et cellulaire lors de l'infection des cellules par VIH-1 (Manes et al., 2000).

Divers auteurs utilisant des systèmes permettant la visualisation instantanée de la distribution des récepteurs, au sein des cellules vivantes en migration, plutôt que des techniques d'immunohistochimie sur cellules fixées, ont cependant démontré l'absence de polarisation des récepteurs (Xiao et al., 1997; Servant et al., 1999). En effet, des récepteurs d'agents chimioattractants comme cAR1, le récepteur à l'AMPc de *Dictyostelium*, et le récepteur au C5a, facteur du complément, ont été exprimés sous forme de protéines de fusion avec la GFP au sein de leur système naturel (*Dictyostelium*, et une lignée leucocytaire, respectivement), et leur distribution a été analysée en microscopie confocale à fluorescence. Dans les deux cas, les récepteurs conservent une distribution homogène sur toute la surface cellulaire et au sein des

projections membranaires, pendant le chimiotactisme. La polarisation intracellulaire de la cellule ne résulte donc pas d'une distribution asymétrique, induite par le gradient, des récepteurs aux chimioattractants, mais reposerait plutôt sur le recrutement de protéines à domaine PH vers le feuillet interne de la membrane plasmique au niveau du front de migration (Parent et al., 1998) (voir ci-dessus, et revues sur le sujet ((Rickert et al., 2000; Chung et al., 2001; Weiner, 2002)). D'autre part, la présence même de CCR5 au sein des RAFTS est actuellement controversée. Dans la plupart des études concernant ce sujet, la localisation de CCR5 a été étudiée par co-localisation du récepteur avec des marqueurs de cavéoles ou de RAFTS. D'autre part, les fonctions du récepteur ont été analysées dans des expériences de déplétion de la membrane plasmique en cholestérol (Manes et al., 1999; Blanpain et al., 2002; Venkatesan et al., 2003). Par exemple, des expériences d'internalisation de CCR5 en présence d'agents déplétifs de stérols (filipine, nystatine, méthyl- β -cyclodextrine) ont mis en évidence une inhibition partielle ou complète de l'endocytose, en fonction de l'agoniste utilisé (Venkatesan et al., 2003; Blanpain et al., 2002; Mueller et al., 2002).

Il en est de même pour les expériences d'infection par VIH-1. L'inhibition de la synthèse des glycosphingolipides (Puri et al., 1998; Hug et al., 2000), ainsi que la déplétion du cholestérol de la membrane plasmique (Manes et al., 2000; Liao et al., 2001) ont été décrits comme inhibant l'entrée du VIH-1 dans ses cellules cibles. Cet effet a été attribué à la perturbation de l'intégrité des RAFTS. Cependant, l'inhibition de la synthèse des glycosphingolipides n'empêche pas la formation des RAFTS (Ostermeyer et al., 1999), et la déplétion en cholestérol perturbe les propriétés de l'ensemble de la membrane plasmique et pas seulement l'organisation des RAFTS (Lagane et al., 2002; Ilangumaran and Hoessli, 1998). Deux études récentes suggèrent que le cholestérol membranaire est important dans le maintien de la conformation de CCR5, indépendamment de l'intégrité des RAFTS (Nguyen and Taub, 2002; Percherancier et al., 2003). En effet, l'extraction de cholestérol de cellules T exprimant CCR5 a pour effet de réduire significativement la liaison de MIP-1 β , et la signalisation induite par cette chimiokine, tandis que la liaison de différents anticorps monoclonaux est perturbée à des degrés divers. De plus, l'utilisation d'une version fluorescente de la chimiokine montre une co-localisation importante avec le marqueur GM1, tandis que lorsque des anticorps sont utilisés, la majorité du CCR5 présent sur les cellules ne co-localise pas avec GM1. Cette observation semble suggérer que la liaison du ligand pourrait induire la translocation vers les RAFTS lipidiques ou encore que l'association avec les RAFTS favorise une conformation de plus haute affinité de CCR5 (Nguyen and Taub, 2002). Il est d'ailleurs actuellement acquis que les RCPGs peuvent exister dans des états conformationnels actifs et inactifs multiples, chacun de ces états correspondant à un éventail spécifique de propriétés fonctionnelles. Une autre étude a montré que, malgré la palmitoylation de CCR5 sur 3 cystéines C-terminales, signal identifié comme permettant la localisation de

protéines au sein de RAFTS, le récepteur se partage préférentiellement au sein de domaines non-RAFTS, dans les lignées cellulaires T. Cette observation démontre que l'infection par VIH-1 ne dépend pas de la présence de CD4 et CCR5 au sein de RAFTS. Par contre, en déplaçant la membrane plasmique en cholestérol, ces auteurs confirment bien l'inhibition de l'entrée du virus dans les cellules, suggérant que des propriétés membranaires dépendantes du cholestérol, mais indépendantes de la formation des RAFTS, jouent un rôle majeur dans l'efficacité de l'infection virale (Percherancier et al., 2003).

5. Interactions indépendantes des protéines G

Outre le couplage classique aux protéines G hétérotrimériques, et les interactions avec les protéines kinases spécifiques (GRKs) et non-spécifiques (PKA et PKC), ainsi que les arrestines, les récepteurs à sept domaines transmembranaires (7TMR) sont capables d'interagir aussi avec d'autres protéines intracellulaires, régulant de cette façon certaines fonctions propres au récepteur et au type cellulaire au sein duquel il est exprimé (Table 2).

L'activation par RANTES des lymphocytes T induit une voie de signalisation classique sensible à la toxine pertussique (PTX), mais également une voie dépendante de tyrosines kinases et indépendante des protéines G_q , comme le prouve sa résistance à la PTX (Bacon et al., 1995). CCR5 est aussi capable d'activer les différentes classes de MAP kinases, JNK/SAPK, la p38, et p42/44 (Dairaghi et al., 1998; Ganju et al., 1998). CCR5 stimule également l'activité d'une tyrosine kinase calcium-dépendante (RAFT/Pyk2), qui à son tour permet le recrutement et la phosphorylation de tyrosines kinases associées au cytosquelette (paxilline, p130Cas, FAK), la kinase associé au CD4 (p56Lck), des tyrosines phosphatases (SHP-1 et 2), des kinases de la famille de Src (Syk), et des protéines adaptatrices (Grb2). Au moins dans certains cas, l'activation de certaines MAP kinases (SAPK), est dépendante de la formation d'un complexe de signalisation (signalosome) initié par l'activation de Pyk2 (Ganju et al., 2000; Ganju et al., 1998; Cicala et al., 1999).

Il a aussi été rapporté que RANTES pouvait, dans les cellules PM-1 et Jurkat, activer via CCR5, les kinases JAK-2 et JAK-3 et les protéines STAT 1 et STAT3, dans un processus dépendant de la phosphorylation sur tyrosine du récepteur (Wong et al., 2001; Wong and Fish, 1998). Bien que de nombreuses cytokines médient leurs effets par la voie de transduction STAT et malgré l'hypothèse du recrutement des kinases JAKs par CCR5 activé, cette interaction n'a pas pu être clairement démontrée. De plus, la phosphorylation sur tyrosine de CCR5 est elle-même controversée (Pollok-Kopp et al., 2003). La recherche de nouveaux partenaires intracellulaires constitue la première partie du travail présenté ici et sera développé dans la section « résultats ».

6. Oligomérisation des récepteurs couplés aux protéines G

Durant ces dernières années, un nombre croissant de travaux ont démontré l'existence des RCPGs sous formes d'entités oligomériques, composées au moins de deux unités de récepteur. Le concept d'oligomérisation des RCPGs remonte au milieu des années 1970, où de nombreuses observations pharmacologiques ont mené les chercheurs à envisager que les RCPGs pouvaient également fonctionner sous forme de dimères, comme c'est le cas pour d'autres récepteurs transmembranaires (récepteurs des facteurs de croissance, récepteurs aux cytokines, par exemple). De nombreuses études sur la coopérativité négative ou positive de liaison d'agonistes et d'antagonistes sur les récepteurs se révélaient en effet difficilement compatibles avec le modèle selon lequel un RCPG est couplé à une protéine G, qui active à son tour un effecteur. La structure des RCPGs n'était cependant pas connue à cette époque, et ces hypothèses n'ont pu être confirmées. Ce n'est qu'après le clonage des premiers RCPGs que des expériences de trans-complémentation (Maggio et al., 1993; Monnot et al., 1996; Bai et al., 1999) ont démontré que la dimérisation des récepteurs était en effet possible. Ceci n'impliquait cependant pas que le processus de dimérisation soit nécessaire à la fonction des récepteurs, ou soit même susceptible d'affecter une de leurs fonctions (liaison, signalisation, désensibilisation, internalisation,...).

Depuis lors, un grand nombre de travaux ont rapporté la formation d'homodimères de RCPGs. Il est actuellement considéré que la plupart, sinon tous les RCPGs sont susceptibles de former des dimères. Un grand nombre d'hétérodimères ont également été décrits. Dans la majorité des cas, les conséquences fonctionnelles de la formation de dimères ne sont pas établies. Cependant, il existe quelques exceptions notables où la dimérisation apparaît soit indispensable à la fonction du récepteur, soit modifie de façon significative les propriétés. Un premier exemple concerne les récepteurs métabotropiques du glutamate ($GABA_B$). La caractérisation de $GABA_{B1}$ a mis en évidence un récepteur non-fonctionnel séquestré dans le réticulum endoplasmique sous une forme immature (Couve et al., 1998), tandis que $GABA_{B2}$ a été identifié comme un récepteur inactif lorsqu'il est exprimé seul. La co-expression de ces deux molécules restaure cependant les caractéristiques d'un récepteur $GABA_B$ fonctionnel, comparable à ce qui est observé dans les tissus natifs (Kaupmann et al., 1998; White et al., 1998; Jones et al., 1998; Kuner et al., 1999; Ng et al., 1993). Ces observations furent interprétées comme une indication que l'hétérodimérisation des récepteurs $GABA_{B1}$ et $GABA_{B2}$ est nécessaire au trafic vers la surface cellulaire d'un récepteur $GABA_B$ fonctionnel : $GABA_{B2}$ permet l'expression en surface de $GABA_{B1}$, et $GABA_{B1}$ permet la transmission d'un signal vers le cytoplasme.

Les travaux menés par Jordan et Devi sur les récepteurs aux opiacés ont récemment montré que les récepteurs δ et κ peuvent également hétérodimériser, soulevant l'hypothèse que l'hétérodimérisation entre les sous-types de récepteurs pourrait constituer un phénomène général contribuant à la diversité pharmacologique (Jordan and Devi, 1999). L'hétérodimère formé par ces deux récepteurs en effet exhibait des propriétés de liaison de ligands, et des caractéristiques fonctionnelles différentes de chacun des récepteurs exprimés seuls. Il reste encore à déterminer si l'hétérodimérisation de ces deux sous-types pourrait mener à l'émergence d'un nouveau récepteur pour un peptide opiacé endogène encore inconnu, ou à un mécanisme régulateur originel de la fonction des sous-types classiques. Dans tous les cas, il semble clair que l'oligomérisation des RCPGs pourrait représenter un niveau de complexité supplémentaire susceptible d'influencer la spécificité de liaison des ligands, l'activation des cascades intracellulaires et/ou la régulation de la fonction des récepteurs.

La dimérisation des récepteurs de chimiokines en général, et de CCR5 en particulier, a rapidement été proposée suite aux premières descriptions convaincantes de dimères de RCPGs. L'hypothèse d'une dimérisation de CCR5 a notamment été proposée dans le cadre du mutant non-fonctionnel CCR5 Δ 32. Il a en effet été postulé que, chez les individus hétérozygotes pour cette mutation, le mutant CCR5 Δ 32 se comportait comme un mutant dominant-négatif et provoquerait par dimérisation la rétention intracellulaire du récepteur sauvage, aboutissant à une réduction importante de l'expression en surface du récepteur (Benkirane et al., 1997). Cette hypothèse n'a cependant pas été confirmée, et d'autres études ont démontré l'absence d'effet dominant-négatif. La réduction de l'expression de surface de CCR5 chez les hétérozygotes CCR5 Δ 32 est due uniquement à la présence d'un seul gène fonctionnel (Venkatesan et al., 2002). En effet, contrastant avec les observations de Benkirane et al. (Benkirane et al., 1997), la surexpression de CCR5 Δ 32, ainsi que d'autres mutants de CCR5, n'affecte pas de manière significative l'expression en surface ou la fonction du récepteur sauvage.

Un polymorphisme du récepteur CCR2b, CCR2V64I, a également été associé à un retard du développement du SIDA chez les sujets séropositifs (Smith et al., 1997a; Smith et al., 1997b). Comme CCR2b ne constitue pas un co-récepteur important, un effet dominant-négatif de CCR2V64I, conséquence d'une hétérodimérisation avec CCR5 et CXCR4 a été proposé (Mellado et al., 2001; Vila-Coro et al., 2000). Cette hypothèse a cependant été réfutée par d'autres études démontrant plutôt l'existence d'un déséquilibre de liaison entre l'allèle ccr2V64I et des variants du promoteur de CCR5, les deux gènes faisant partie d'un « cluster » de gènes de récepteurs aux chimiokines comprenant CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR8, HCR et CX3CR1 sur le chromosome 3p21 (Martin et al., 1998). Le gène codant pour CCR5 est en effet localisé à 17 kb du gène CCR2 (Samson et al., 1996c; Maho et al., 1999). L'étude des phénomènes d'oligomérisation du récepteur CCR5 constitue la seconde partie du travail.

II. BUT DU TRAVAIL

II. BUT DU TRAVAIL

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressé à deux types d'interactions potentielles de CCR5, sur base des données de la littérature disponibles au moment de l'initier. En effet, pour certains récepteurs couplés aux protéines G, la mise en évidence de telles interactions non classiques a permis de replacer le récepteur dans un contexte d'interactions complexes entre protéines membranaires et solubles, et a fortement modifié la manière de concevoir la signalisation et la régulation de ces récepteurs dans leur environnement naturel.

D'une part, nous avons formulé l'hypothèse que CCR5 pouvait interagir avec des protéines intracellulaires appartenant à des classes différentes des protéines G hétérotrimériques ou des protéines de régulation traditionnelles de ces récepteurs (protéines kinases, arrestines). Ces interactions additionnelles pourraient en effet jouer des rôles important dans le trafic, la signalisation ou les mécanismes d'internalisation du récepteur. Nous nous sommes focalisé sur le domaine C-terminal de CCR5, en raison des interactions décrites pour d'autres récepteurs, et de la conservation d'un motif compatible avec une interaction avec des protéines à domaine PDZ. Dans le but de rechercher de nouveaux partenaires potentiels, nous avons utilisé une approche génétique, basée sur le système du double hybride en levure, et une approche biochimique, basée sur la sélection de protéines d'interaction à l'aide d'une protéine de fusionnée à la GST.

D'autre part, nous avons étudié la formation d'homodimères de CCR5, ainsi que d'hétérodimères entre CCR5 et le récepteur structurellement le plus apparenté, CCR2b. En effet, la formation de dimères entre récepteurs est parfois associée à des modifications importantes de leurs caractéristiques fonctionnelles. En ce qui concerne CCR5, les données de la littérature étaient contradictoires, particulièrement en ce qui concerne les conséquences fonctionnelles de la dimérisation, et nous avons voulu clarifier ces aspects. Des techniques de co-immunoprécipitation et de transfert d'énergie de luminescence ont été utilisées pour étudier les interactions physiques entre récepteurs. Nous nous sommes par ailleurs concentrés sur les modifications fonctionnelles associées à la formation de dimères, en termes de liaison des agonistes et anticorps monoclonaux, de signalisation et d'internalisation.

**III. RECHERCHE DE NOUVEAUX
PARTENAIRES INTRACELLULAIRES
DE CCR5**

III. RECHERCHE DE NOUVEAUX PARTENAIRES INTRACELLULAIRES DE CCR5

1. Introduction

Durant ces dix dernières années, il est devenu de plus en plus évident que la famille des RCPGs pouvait être couplée à des cascades intracellulaires beaucoup plus diverses que celles traditionnellement associées à ces récepteurs. Il s'agit notamment de l'activation de petites protéines G (Rho, Ras, Arf), ainsi que des cascades impliquant les MAP kinases. Au moment de commencer ce travail, divers RCPGs avaient aussi été décrits comme régulant l'activité de protéines intracellulaires sans passer par l'intermédiaire des protéines G hétérotrimériques. Quelques exemples de ces interactions incluent:

- des récepteurs appartenant à la famille de la rhodopsine ont été co-immunoprécipités avec des petites protéines G de type Rho et ARF. Cette interaction directe est rapportée pour impliquer la région terminale du domaine transmembranaire VII et/ou l'extrémité C-terminale (Mitchell et al., 1998);
- le récepteur β_2 -adrénergique (β_2 -AR) est capable d'interagir directement avec NHERF (Na^+/H^+ -exchanger regulatory factor), le facteur murin régulateur de l'échangeur Na^+/H^+ (NHE3), ainsi que son homologue humain EBP50, qui agissent en diminuant la réabsorption d'ions Na^+ par les tubules rénaux. Outre son rôle régulateur de l'échangeur Na^+/H^+ , EBP-50 joue également un rôle important dans le contrôle du tri endocytaire du récepteur β_2 entre la voie de dégradation lysosomiale, et la voie de recyclage vers la surface cellulaire, suite à l'endocytose induite par le ligand (Hall et al., 1998b; Hall et al., 1998a; Cao et al., 1999);
- l'extrémité C-terminale de la rhodopsine interagit directement avec la dynéine, facteur responsable de l'adressage du récepteur vers le compartiment membranaire approprié au sein des photorécepteurs (Tai et al., 1999);
- l'extrémité C-terminale du récepteur à l'angiotensine II de type 1 (récepteur AT_{1a}) interagit avec ATRAP, une protéine qui serait impliquée dans la désensibilisation et l'internalisation de ce récepteur (Daviet et al., 1999).

Les petites protéines G, ainsi que EBP50, la dynéine et ATRAP ont été montrés comme impliqués dans le trafic des protéines et/ou le remaniement du cytosquelette. Comme le chimiotactisme est une fonction cellulaire où le cytosquelette joue un rôle primordial, nous avons

Souche de levure	Vecteur DBD	ADNc (μ g)	Clones indépendants	Clones His+	Clones LacZ+	Clones Ade+
Y190 [^]	pAS2 $\Delta\Delta$	38	1,37 x 10 ⁵	1842	33	-
PJ69-4A*	pGBT9	115	5,68 x 10 ⁷	730	-	59
			5,69 x 10 ⁷			

[^] protocole de transfection de Gietz et Woods.

* protocole de transfection de Yamada et al.

Table 2. Tableau récapitulatif des criblages de la banque de leucocytes humains. Ce tableau reprend pour les deux souches de levure et plasmides utilisés pour l'expression de la protéine cible, le nombre de clones indépendants de la banque testés, le nombre de clones satisfaisant un des critères de sélection (His⁺) et le nombre de clones satisfaisant le second critère de sélection (LacZ⁺ ou Ade⁺). Abréviation: vecteur DBD, vecteur exprimant les séquences cibles fusionnées au domaine de liaison à l'ADN de Gal4.

postulé que les récepteurs d'agents chimioattractants comme CCR5 pouvaient être impliqués dans des interactions similaires, via leur extrémité C-terminale. De plus, divers mutants de CCR5, naturels ou créés dans le laboratoire, et affectant l'extrémité C-terminale du récepteur, se caractérisent par une altération du trafic intracellulaire (Blanpain et al., 2001). Les récepteurs CCR5 et CCR2b comportent un motif C-terminal conservé compatible avec une interaction avec des domaines de type PDZ.

Nous avons donc exploré les possibilités d'interactions nouvelles de CCR5 avec des partenaires intracellulaires. La stratégie que nous avons adoptée est d'utiliser l'extrémité C-terminale de ce récepteur comme appât dans 2 techniques complémentaires d'identification d'interactions « protéine-protéine ». Ces techniques sont d'une part le double-hybride, constituant l'approche génétique de ce travail, et d'autre part, une technique apparentée au « GST-Pulldown » constituant l'approche biochimique.

2. Résultats

2.1. Recherche de partenaires de CCR5 par la technique du double-hybride

La séquence codant pour l'extrémité C-terminale de CCR5 a été clonée en aval de la séquence codant pour le domaine de liaison à l'ADN du facteur transcriptionnel de levure GAL4 (domaine DBD), afin de cribler une banque de leucocytes humains dont les ADNc ont été fusionnés au domaine d'activation de la transcription du même facteur.

2.1.1. Criblages de la banque de leucocytes humains

Dans une première série d'expériences, le criblage des préparations de banque par le vecteur DBD pAS2ΔΔ-CCR5 C-ter a été réalisé au sein de la souche de levure Y190. La sélection des clones s'est basée sur la croissance des cellules transformées sur un milieu sélectif dépourvu d'histidine (Clones His⁺) et l'expression d'une activité β-galactosidase (Clones His⁺/LacZ⁺). Afin de contrôler l'efficacité des transfections, une fraction des cellules est étalée sur des boîtes de milieu minimum contenant de l'histidine (Table 2).

Les criblages suivants ont été ensuite effectués au sein de la souche PJ69-4A, par le vecteur cible pGBT9-CCR5 C-ter. La sélection des clones est réalisée d'abord sur un milieu de croissance dépourvu d'histidine, pour se poursuivre sur un milieu carencé en adénine (Clones His⁺/Ade⁺). Au total, 6 expériences différentes ont permis de cribler 56,9 x 10⁶ clones de la

Criblage 1	Identité	Commentaires
33 clones His+/LacZ+		
10 clones identiques	Triose phosphate isomérase	échec systématique des co-transformations lors des contrôles de spécificité
1 clone	2-5A synthétase	activation des gènes indicateurs en présence de n'importe quel plasmide DBD
2 clones	Facteurs transcriptionnels	activation des gènes indicateurs en présence de n'importe quel plasmide DBD
15 clones	Séquences génomiques inconnues	échec systématique des co-transformations lors des contrôles de spécificité
5 clones	Protéines ribosomiales/mitochondriales	-
Criblage 2	Identité	Commentaires
59 clones His+/Ade+		
1 clone	LSP-1/WP-34	activation des gènes indicateurs en présence de n'importe quel plasmide DBD
1 clone	DYRK1B	activation des gènes indicateurs en présence de n'importe quel plasmide DBD
1 clone	BAT1 (DEAD-box protein)	activation des gènes indicateurs en présence de n'importe quel plasmide DBD
1 clone	annexin family-related protein	ORF déphasée par rapport à l'ORF de GAL4 AD
1 clone	DAZAP2 (DAZ-associated protein-2)	ORF déphasée par rapport à l'ORF de GAL4 AD
1 clone	Interleukine-8 (IL-8)	ligand du récepteur de CXCR2
5 clones	Indéterminé	échec de la séparation des vecteurs DBD des vecteurs AD en bactérie
14 clones	Séquences génomiques inconnues	échec systématique des co-transformations lors des contrôles de spécificité
2 clones	Indéterminé	vecteur AD sans ADNc
9 clones	Facteurs transcriptionnels	activation des gènes indicateurs en présence de n'importe quel plasmide DBD
8 clones	Protéines ribosomiales/mitochondriales	-
2 clones	Ferritin heavy chain	activation des gènes indicateurs en présence de n'importe quel plasmide DBD
13 clones	Indéterminé	pas de croissance en milieu liquide

Table 3. Tableau récapitulatif de la caractérisation des clones positifs isolés par la technique du double-hybride. Abréviations: plasmide ou vecteur DBD, vecteur portant la séquence codant pour le domaine de liaison à l'ADN de la protéine GAL4; GAL4 AD, domaine d'activation de la transcription de la protéine GAL4; vecteur AD, vecteur portant la séquence codant pour le domaine d'activation de la transcription de la protéine GAL4.

banque d'ADNc donc la complexité initiale d'après le fournisseur est de 9 millions de clones indépendants (Table 2).

Etant donné le nombre limité de clones positifs, nous avons effectué en parallèle les tests de spécificité et le séquençage de ces clones. Le résultat de ces séquences peut-être résumé comme suit (Table 3) :

Criblages de la banque par pAS2ΔΔ-CCR5 C-ter au sein de la souche Y190 (Criblage 1)

- 10 clones correspondent au même fragment de la séquence codante de la Triose Phosphate Isomérase (TPI), enzyme impliquée dans le métabolisme du glucose. Cette redondance importante témoigne d'un biais d'amplification au cours de la procédure de cette fraction de la banque. De plus, la co-transformation du vecteur isolé portant la TPI avec le vecteur pAS2ΔΔ-CCR5 n'a pas permis de reconstruire l'interaction.
- un clone correspondait à la 2-5A synthétase (2-5AS) induite par l'interféron α . Cet enzyme, après induction, se lie aux ARNs simples brins et polymérise l'ATP en oligomères d'adénine. Il active la RNase L, qui clive à son tour les ARNs simple brin, ce qui résulte en l'inhibition de la synthèse protéique et de la réplication virale. La 2-5AS joue donc un rôle important dans l'action antivirale des interférons. Cette enzyme fait partie des gènes cellulaires induits par HIV avec pour conséquence de diminuer la réplication du virus et de protéger la cellule contre d'autres pathogènes viraux. Les tests de spécificité ont montré que l'activation des gènes indicateurs se faisait en présence de plasmides DBD portant des cibles non-apparentées à CCR5. Ceci suggère donc que la protéine de fusion codée par ce « clone positif » est capable de se lier directement au domaine de liaison à l'ADN quelle que soit la séquence fusionné à celui-ci. De plus, les protéines de type « tRNA synthase » constituent généralement des faux-positifs fréquents du système double-hybride (<http://www.fccc.edu/research/labs/golemis/Table1.html>) ;
- les autres clones correspondaient à des facteurs transcriptionnels ou des protéines ribosomiales, faux-positifs classiques du système double-hybride

Criblages de la banque par pGBT9-CCR5 C-ter au sein de la souche PJ694A (Criblage 2)

- 1 clone constituait un partenaire intéressant, puisque son ADNc codait pour la protéine LSP1 (Lymphocyte Specific gene 1) ou WP34, impliquée dans la régulation de la croissance et de la différenciation des lymphocytes. Les tests de spécificité ont malheureusement montré l'activation des gènes indicateurs en présence de n'importe quel vecteur DBD
- les ADNc de plusieurs clones ont été identifiés via l'algorithme BLASTN (comparaison de la séquence avec les bases de données nucléotidiques) comme dérivés de l'ADN génomique non codant. Nous avons cependant tenté d'identifier dans ces séquences génomiques une phase de lecture qui aurait pu échapper aux algorithmes détecteurs de séquences exoniques,

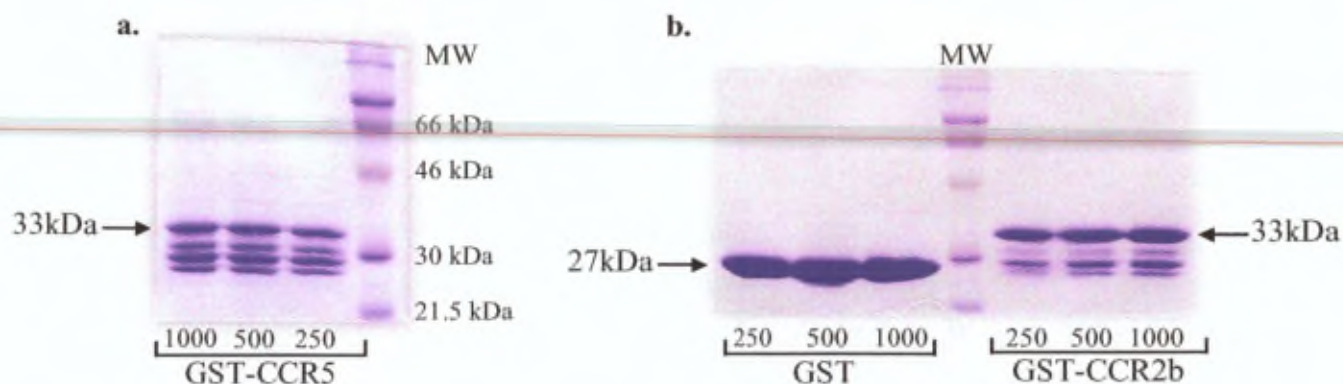


Figure 10. Production et purification des protéines de fusion GST-CCR5 C-terminal et GST-CCR2b C-terminal. Des quantités différentes de surnageant (250, 500 et 1000 µl) contenant la protéine de fusion purifiée sont mis en contact avec les billes de glutathione-agarose 50 % (50 µl) afin d'analyser le produit de solubilisation, et d'estimer la quantité saturante pour les billes. Les protéines de fusion GST-CCR5, migrant à 33 kDa (a), GST (27 kDa) et GST-CCR2b migrant à 33 kDa sont désignées par les flèches noires. Les échantillons correspondent à 1/4 (20 µl) de la resuspension finale des billes saturées par les protéines de fusion dans 100 µl de tampon Laemmli et ont été analysés sur gel d'acrylamide 12 % coloré au bleu de Coomassie. L'abréviation MW désigne les poids moléculaires.

mais sans succès. En parallèle, les tests de spécificités n'ont par ailleurs pas permis de reconstruire l'interaction avec la protéine cible au sein des levures. Ces clones constituent vraisemblablement des artéfacts de clonage de la construction de la banque ayant mené à l'incorporation de fragments d'ADN génomiques

- plusieurs clones dont les ADNc correspondent à des artéfact classiques de la méthode ont également été identifiés (protéines mitochondriales, polypeptides ribosomiaux). Ces « faux-positifs », qui semblent fréquents dans la technique du double-hybride (<http://www.fccc.edu/research/labs/golemis/Table1.html>) sont considérés comme non-pertinents. En effet, ces peptides sont encodés par les ARN ribosomiaux et mitochondriaux, ARNs qui ne sont théoriquement pas représentés dans la banque d'ADNc de leucocytes humains.

2.2. « Glutathion-S-Transférase (GST)-Pull-down »

En parallèle à nos expériences de double-hybride, des expériences de « GST-pulldown » ont également été réalisées. Dans ce type d'expérience, une protéine d'intérêt est fusionnée à la GST qui peut être rapidement purifiée par affinité sur une résine de glutathion-agarose. La protéine de fusion purifiée est ensuite utilisée comme appât soit pour confirmer une interaction avec une protéine connue, soit pour tester sa liaison à des protéines de séquences inconnues. Le complexe formé par la protéine de fusion et son partenaire éventuel sont ensuite analysés par gel de polyacrylamide mono- ou bidimensionnel en vue d'une identification par spectrométrie de masse. Nous avons donc purifié des protéines de fusion entre la GST et la partie C-terminale de CCR5, de CCR2b, de TSHR et du récepteur opioïde-like ORL-1, et recherché de nouveaux partenaires dans un lysat de leucocytes mononucléés circulants (PBMC).

2.2.1. Production des protéines de fusion

Les protéines de fusion entre la GST et l'extrémité C-terminale du récepteur sont produites et purifiées à partir des souches bactériennes BL21, suivant la méthode de Frangioni et Neel (Frangioni and Neel, 1993). L'analyse du surnageant obtenu après la lyse des bactéries montre la solubilisation et la récupération par liaison aux billes de glutathion-agarose de nos protéines de fusion, avec le poids moléculaire attendu d'environ 33 kDa, ainsi que d'une série de bandes contaminantes de poids moléculaire plus petit et qui pourraient correspondre en partie à des protéines de fusion tronquées par protéolyse (Figure 10).

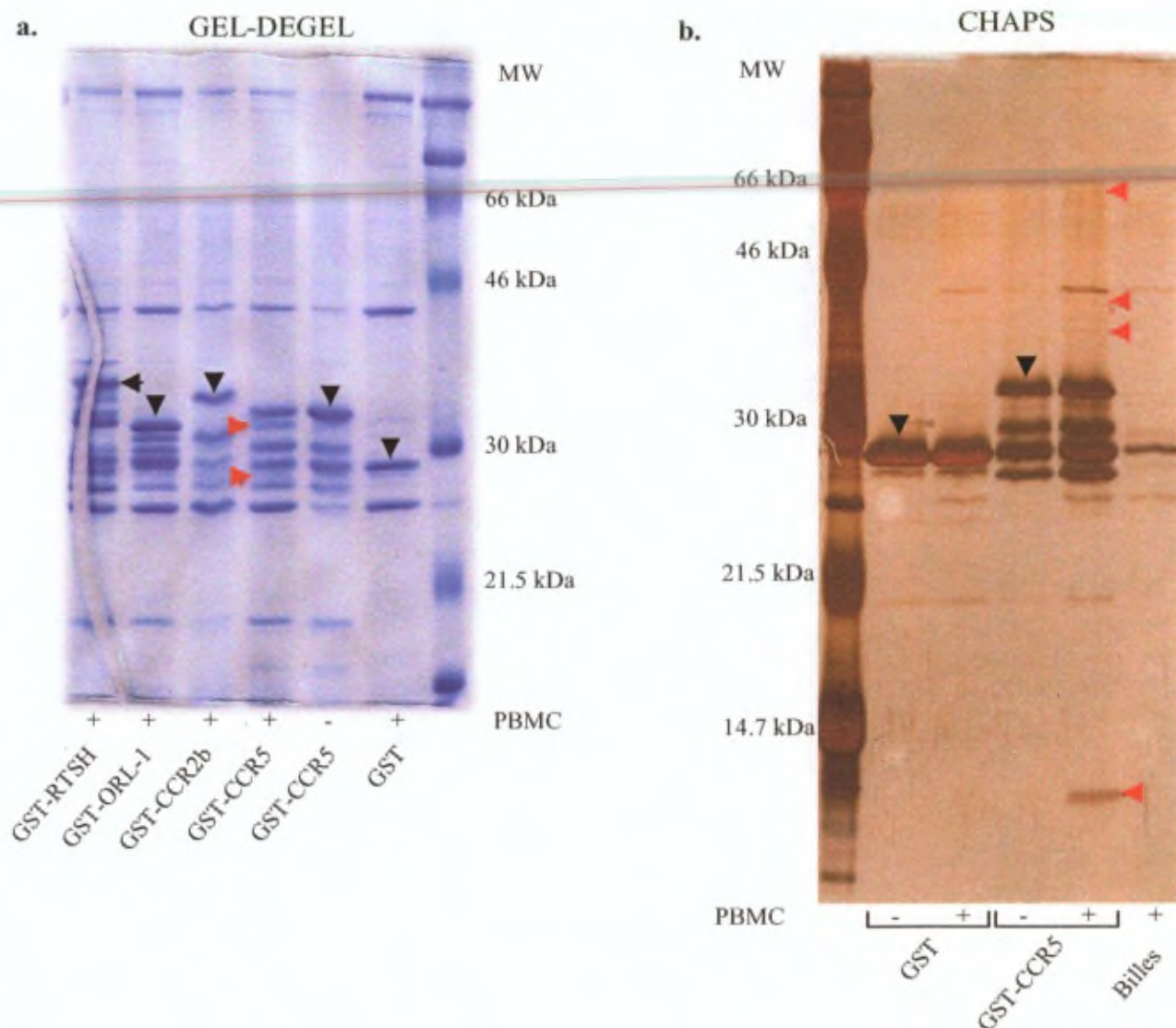


Figure 11. Analyse des expériences de GST Pull-down sur gels d'acrylamide monodimensionnels. Les différentes protéines de fusion ont été incubées ou non en présence des extraits de PBMC solubilisés (a) par la méthode de gel-dégel, (b) en présence de CHAPS. Les flèches noires désignent les différentes protéines de fusion, GST seule (27 kDa), GST-CCR5 C-ter (33 kDa), GST-CCR2C-ter (35 kDa), GST-ORL-1 C-ter (32 kDa), et GST-RTSH C-ter (40 kDa). Les têtes de flèches rouges désignent les bandes spécifiques correspondant à des protéines liant GST-CCR5 C-ter. Les gels d'acrylamide 12% (a) et 7.5 % (b) ont été colorés au Bleu de Coomassie colloïdal (a) ou au nitrate d'argent (b). Les standards de poids moléculaires sont désignés par l'abréviation MW.

2.2.2. Analyse des gels monodimensionnels de polyacrylamide

Les cellules mononuclées du sang sont séparées sur gradient de ficoll et lysées par différentes méthodes afin d'optimiser l'extraction des protéines (méthode de gel-dégel, lyse en présence de CHAPS). Les lysats sont incubés en présence de la protéine de fusion GST-CCR5 C-ter, ou en présence de la GST non fusionnée, utilisée comme contrôle négatif. Dans certaines expériences, des contrôles supplémentaires constitués par l'extrémité C-terminale d'autres récepteurs (CCR2b; ORL1, et TSHR), fusionnée à la GST, ont également été inclus.

Criblage des PBMC lysés par Gel-Dégel

Parmi le profil de migration (Figure 11a), nous avons identifié deux bandes d'environ 26 et 32 kDa (têtes de flèches rouges). Ces bandes sont spécifiques de l'interaction avec l'extrémité C-terminale de CCR5 (puit GST-CCR5 + PBMC), étant donné qu'elles ne sont pas présentes lorsque la GST seule est incubée en présence des extraits cellulaires (piste GST + PBMC).

Criblage des PBMC lysés en présence de CHAPS :

Nous avons identifié quatre bandes spécifiques de l'interaction avec CCR5 (têtes de flèches rouges, Figure 11b). Ces bandes présentent des poids moléculaires de l'ordre de 10, 40, 43 et 60 kDa, et ne se retrouvent pas au niveau de la GST seule mise en présence des PBMC lysés.

2.2.3. Analyse des gels de polyacrylamide bidimensionnels et identification des protéines par spectrométrie de masse

Les gels monodimensionnels nous ont permis de confirmer la présence de partenaires spécifiques de l'extrémité C-terminale de CCR5 dans les extraits de PBMC. Afin d'isoler ces partenaires pour les identifications en spectrométrie de masse, nous avons décidé d'analyser nos échantillons sur gels de polyacrylamide bidimensionnels, permettant une meilleure résolution des complexes de protéines, et une optimisation de la quantité de protéine chargée sur gel.

Criblage des PBMC lysés par Gel-Dégel

Quatre signaux (désignés par spots 1, 2, 3 et 4) ont été identifiés comme des partenaires spécifiques de l'extrémité C-terminale de CCR5 (Figure 12). Les signaux différentiels de 26 et 32 kDa, correspondants aux bandes de poids moléculaires observés sur les gels à une dimension ont été retrouvés. Le signal identifié à 26 kDa correspondrait au(x) spot(s) 2 et/ou 3. En comparant la zone correspondant à 32 kDa sur les gels repris dans les figures 12 et 13, le signal identifié s'est avéré non spécifique (Figure 12 et 13). Des signaux supplémentaires ont été identifiés et leur spécificité a été confirmée par leur absence sur le gel correspondant aux extraits mis en présence

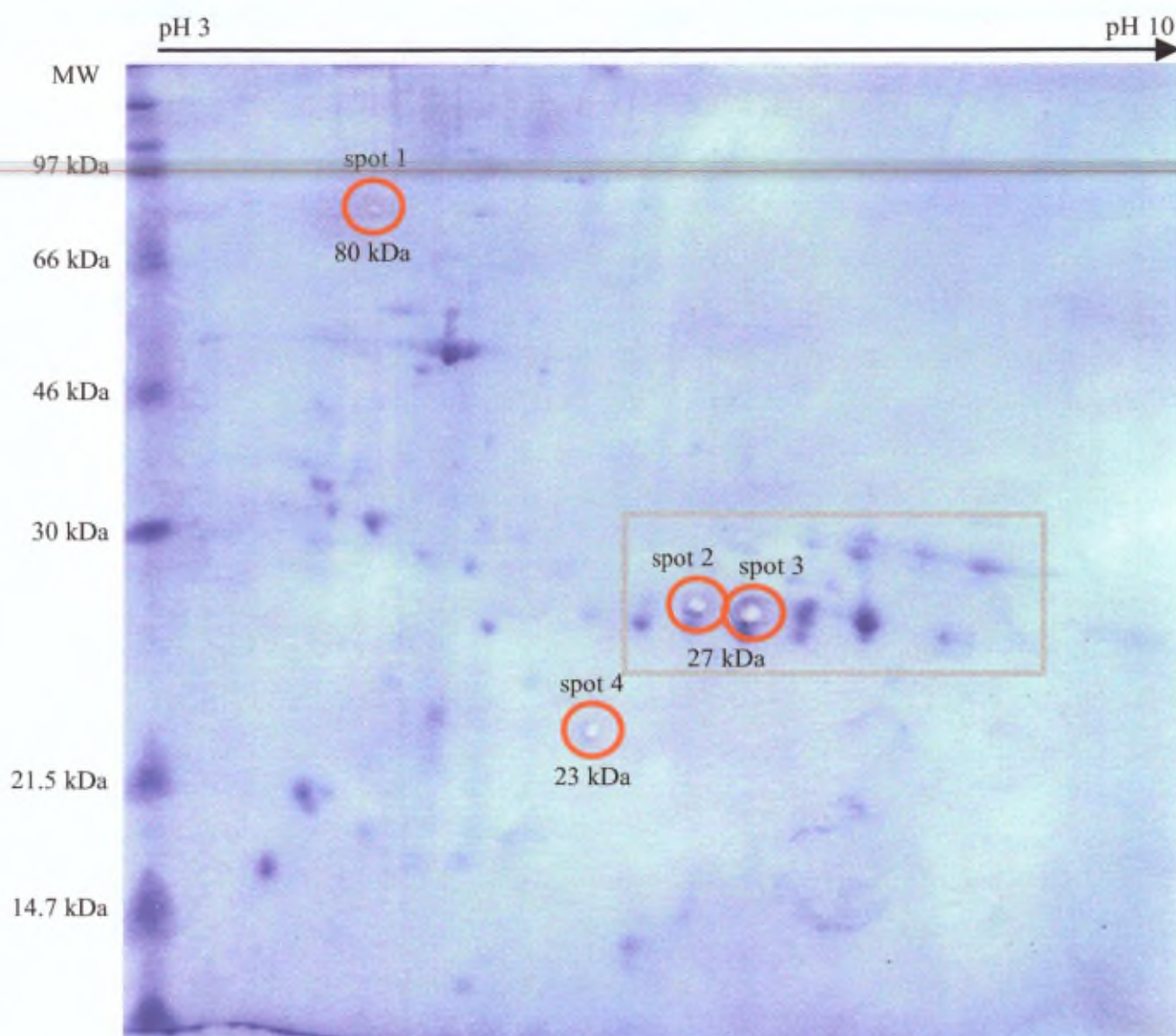


Figure 12. Analyse du pulldown des protéines lysées par gel-dégel par la protéine de fusion GST-CCR5 C-ter (2nde phase de séparation du gel d'acrylamide bidimensionnel). La 1^{ère} dimension de la séparation s'effectue dans une gamme de pH situés entre 3 et 10. La seconde phase de séparation des échantillons est effectuée sur un gel d'acrylamide 12%, coloré au bleu de Coomassie colloïdal. Afin de pouvoir visualiser clairement les signaux, l'équivalent de 2 expériences de pulldown ont été déposées sur gel. Les spots découpés pour l'analyse en spectrométrie de masse ont été entourés en rouge et désignés par spots 1, 2, 3, et 4. L'aire du gel délimitée par le rectangle gris désigne le profil de bandes correspondant aux formes progressivement dégradées de la protéine de fusion. Les standards de poids moléculaires sont désignés par l'abréviation MW.

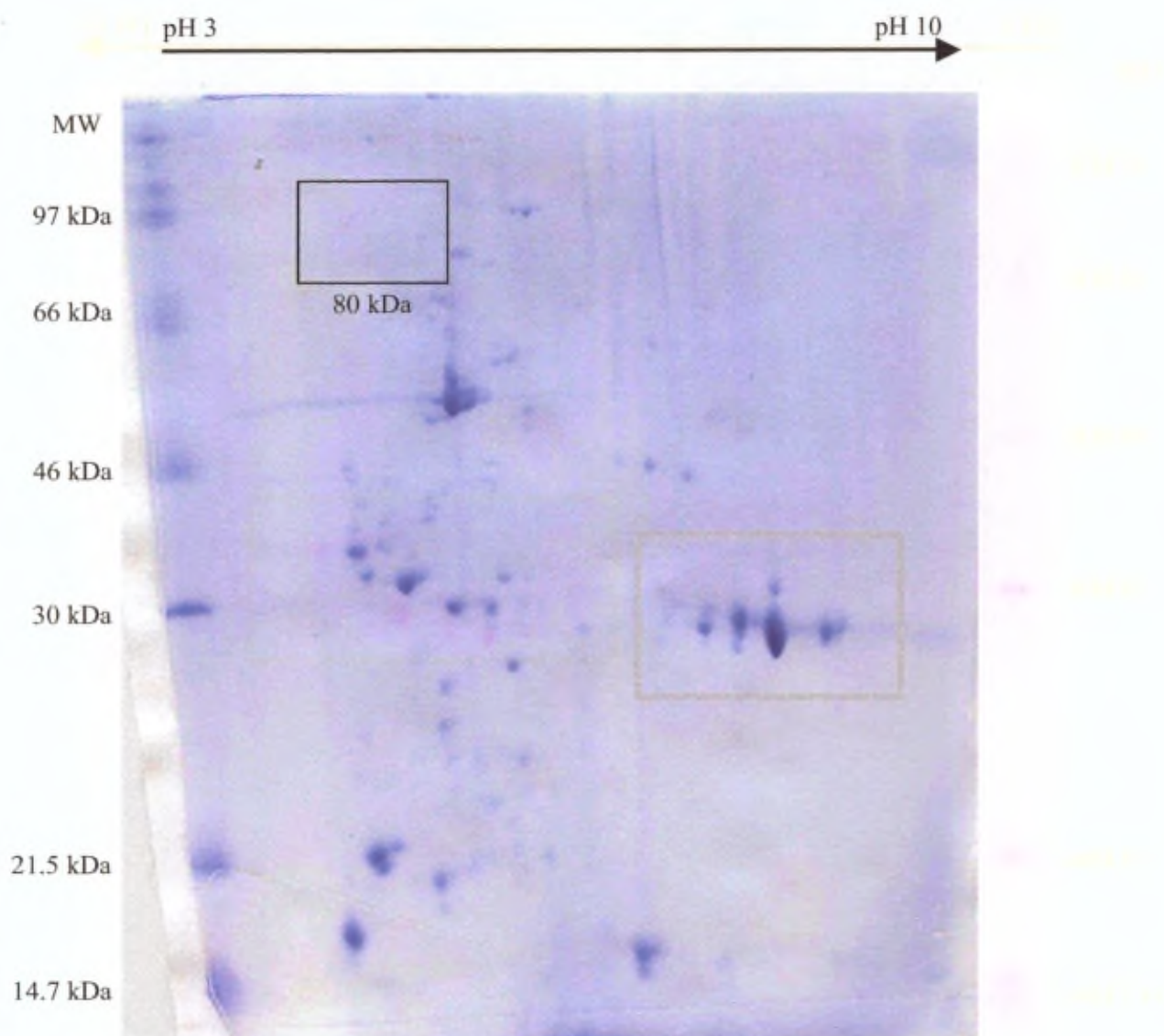


Figure 13. Analyse du pulldown des protéines lysées par gel-dégel par la protéine GST non fusionnée (2nde phase de séparation du gel d'acrylamide bidimensionnel). L'absence du spot 1 de 80 kDa spécifique de l'interaction avec CCR5 est indiqué par un rectangle noir. L'aire du gel délimitée par le rectangle gris désigne la protéines GST. Les standards de poids moléculaires sont désignés par l'abréviation MW.

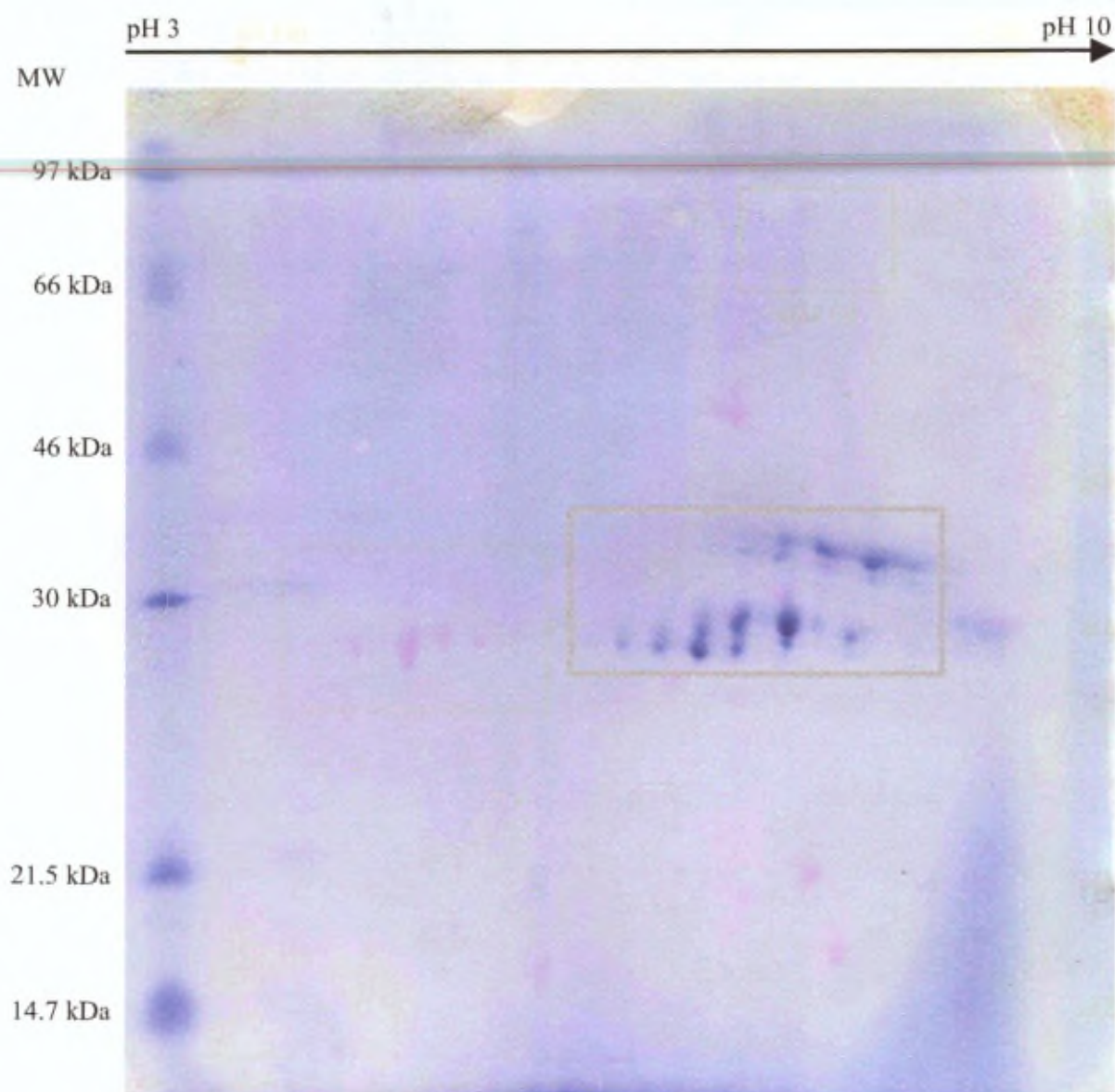


Figure 14. Analyse de la protéine de fusion GST-CCR5 C-ter (2nde phase de séparation du gel d'acrylamide bidimensionnel). La protéine de fusion GST-CCR5 C-terminal a été incubée en présence du tampon de lyse dépourvus d'extraits protéiques, a suivi le même protocole d'analyse que les autres échantillons.. L'aire du gel délimitée par le rectangle gris désigne le profil de bandes correspondant aux formes progressivement dégradées de la protéine de fusion. Les standards de poids moléculaires sont désignés par l'abréviation MW.

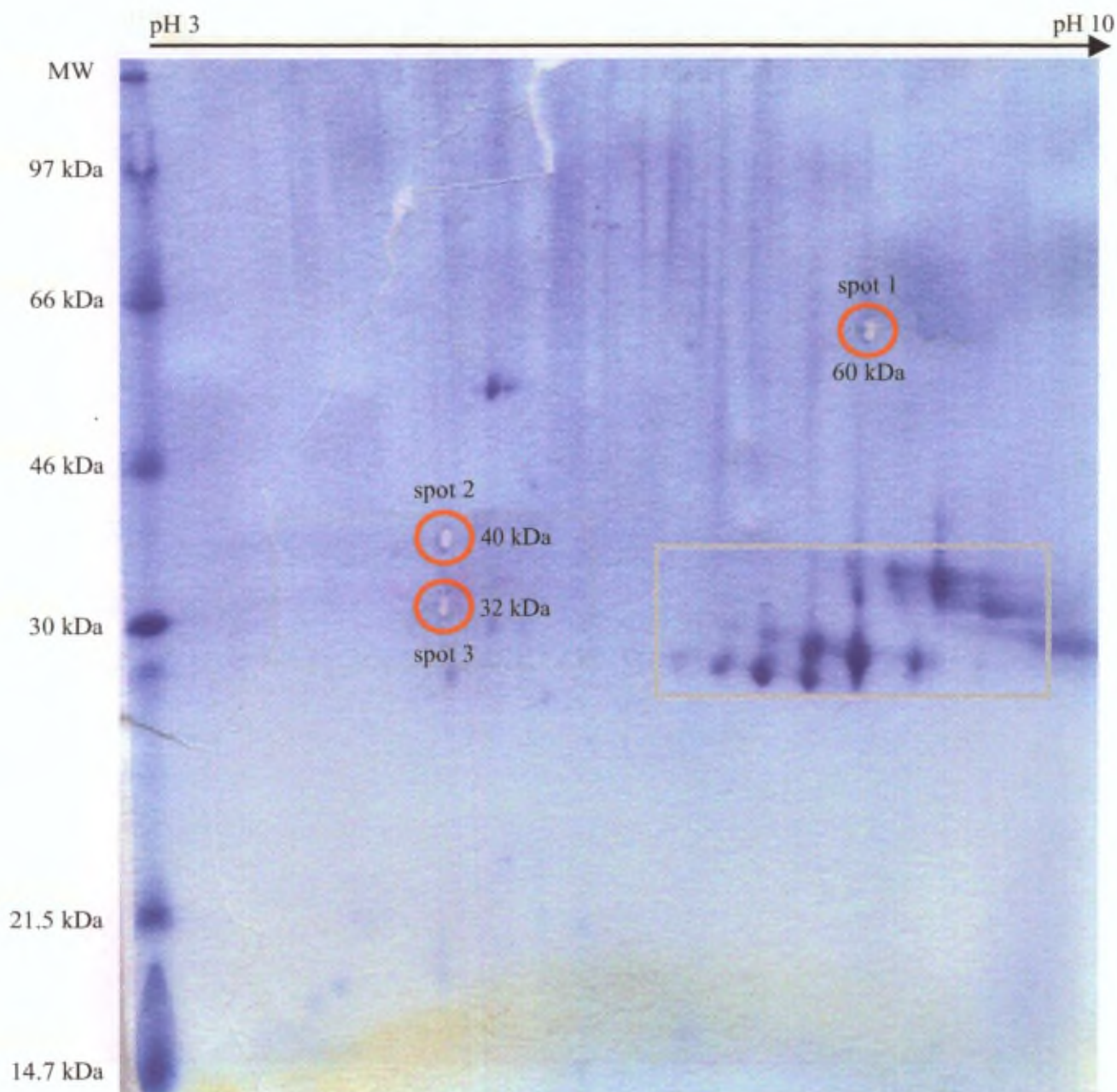


Figure 15. Analyse du pulldown des protéines lysées en présence de CHAPS par la protéine de fusion GST-CCR5 C-ter (2nde phase de séparation du gel d'acrylamide bidimensionnel). La 1^{ère} dimension de la séparation s'effectue dans une gamme de pH situés entre 3 et 10. La seconde phase de séparation des échantillons est effectuée sur un gel d'acrylamide 12%, coloré au bleu de Coomassie colloïdal. Afin de pouvoir visualiser clairement les signaux, l'équivalent de 4 expériences de pulldown ont été déposées sur gel. Les spots découpés pour l'analyse en spectrométrie de masse ont été entourés en rouge et désignés par spots 1, 2, et 3. L'aire du gel délimitée par le rectangle gris désigne le profil de bandes correspondant aux formes progressivement dégradées de la protéine de fusion. Les standards de poids moléculaires sont désignés par l'abréviation MW.

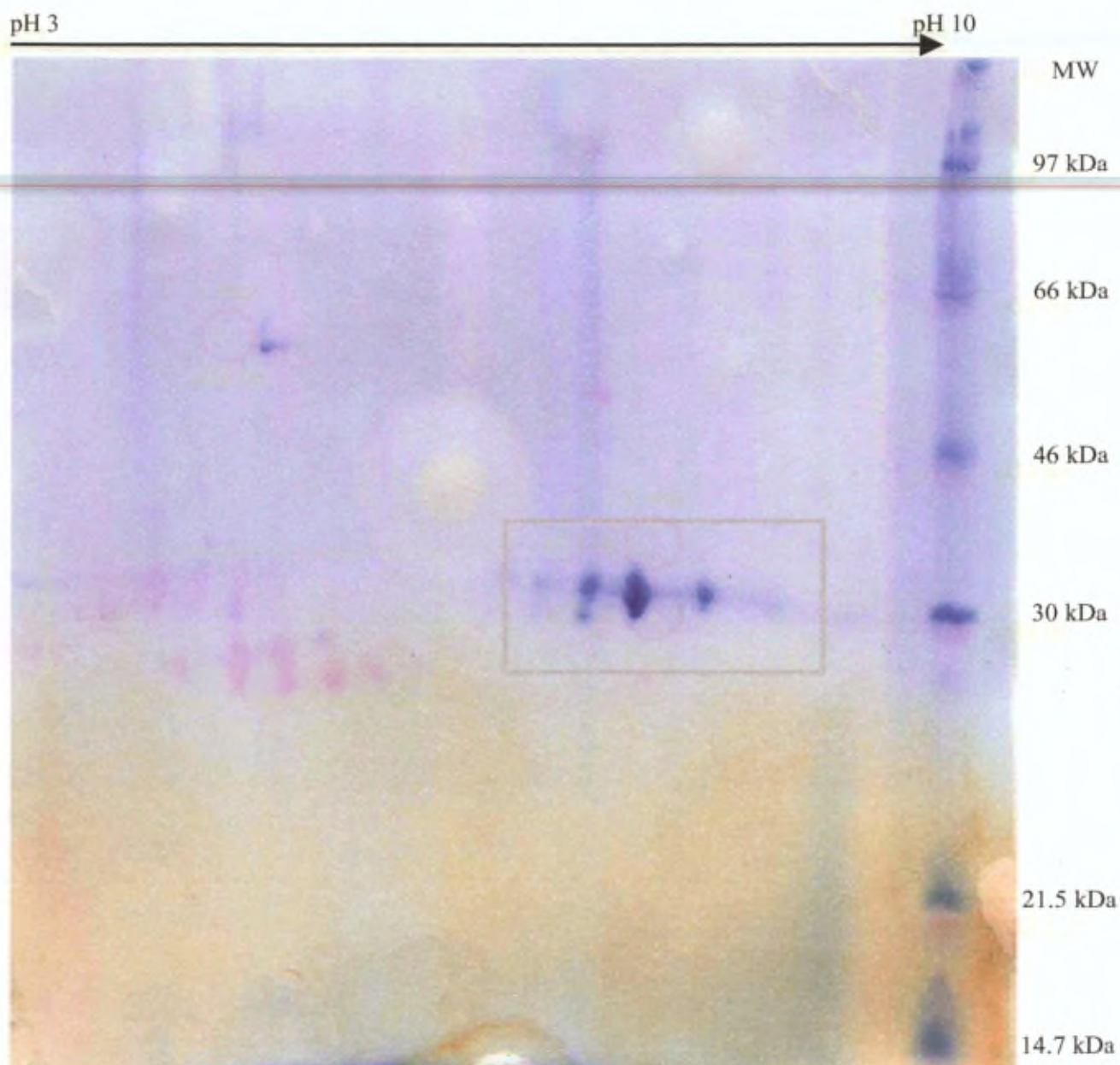


Figure 16. Analyse du pulldown des protéines lysées en présence de CHAPS par la protéine GST non fusionnée (2^{de} phase de séparation du gel d'acrylamide bidimensionnel). L'aire du gel délimitée par le rectangle gris désigne le profil de bandes correspondant aux formes progressivement dégradées de la protéine de fusion. Les standards de poids moléculaires sont désignés par l'abréviation MW.

de la GST seule (Figure 13). Ces quatre protéines ont été extraites du gel et analysées par spectrométrie de masse après digestion à la trypsine. Les caractéristiques en sont données ci-après :

- **Spot 1 :** Cette protéine, caractérisée par un poids moléculaire apparent de 80 kDa et un point isoélectrique de 4.5, a été identifiée comme étant la DnaK, une protéine chaperonne d'*E. Coli*, équivalente à l'Hsp70 eucaryote. Le peptide tryptique obtenu correspond seulement à la séquence procaryotique, et proviendrait donc des bactéries BL21 au sein desquelles la protéine de fusion GST-CCR5 C-ter a été synthétisée. Il est probable que la DnaK se lie à la protéine de fusion au niveau de segments hydrophobes exposés. Nous ne pouvons expliquer pourquoi ce signal n'est pas observé lorsque la protéine GST-CCR5 C-ter a été incubée uniquement en présence du tampon de lyse (Figure 14). Ceci pourrait être dû à l'absence d'une compétition pour l'interaction avec l'extrémité C-ter de ces récepteurs, compétition intervenant lorsque les protéines de fusion sont incubées en présence des extraits de PBMC. La DnaK se détacherait alors de la protéine de fusion, et serait éliminée au cours des lavages ultérieurs.
- **Spots 2 et 3 :** Ces signaux correspondant à des protéines de 27 kDa et de point isoélectrique de 6.8 et 7.2 ont été identifiés comme correspondant à la GST. La séquence des peptides tryptiques identifiés ne nous a pas permis de caractériser la différence structurale entre ces deux signaux, ni s'il restait ou non un fragment de l'extrémité C-terminale du récepteur en aval de la GST. Ces spots font partie d'un ensemble de signaux (délimité par un rectangle gris) correspondant probablement aux formes progressivement dégradées de la protéine de fusion GST-CCR5 C-ter. Les fragments pourraient être générés par l'action de protéases présentes dans les extraits cellulaires.
- **Spot 4 :** Cette protéine de 23 kDa et d'un point isoélectrique de 6 correspond également à la GST. Comme la taille attendue de la GST est de 27 kDa, cette protéine est vraisemblablement aussi le résultat d'une dégradation par des protéases extraites des PBMCs.

Criblage des PBMC lysés en présence de CHAPS

Trois signaux (désignés par spots 1, 2, et 3) ont été extraits à partir des gels d'analyse correspondant aux GST-pulldown par la protéine de fusion GST-CCR5 C-ter (Figure 15). La comparaison avec le gel correspondant au contrôle GST + PBMC montre que ces signaux sont spécifiques de l'interaction avec CCR5 (Figure 16).

- **Spot 1 :** Cette protéine est caractérisée par un poids moléculaire de 60 kDa et un point isoélectrique de 8.2, et correspondrait au signal de même poids moléculaire observé lors de l'analyse en gel de polyacrylamide monodimensionnel. Un peptide tryptique correspond à

une séquence de la GST. Comme le poids moléculaire de ce signal est supérieur à la masse attendue pour la protéine de fusion, il est probable qu'il soit le résultat d'une liaison covalente entre la GST et une autre protéine, sans que la nature exacte de cette protéine puisse être déterminée.

- **Spot 2 :** Cette protéine est caractérisée par un poids moléculaire de 40 kDa et un point isoélectrique de 8.2, correspond au précurseur de l' α -caséine S1, protéine sécrétée par les glandes mammaires ayant un rôle important dans le transport du phosphate de calcium dans le lait. La α -caséine S1 est décrite comme possédant un pouvoir chimioattractant (Siddiqui et al., 1999). L'expression en dehors de la glande mammaire n'est pas décrite, et nous n'expliquons dès lors pas sa présence dans nos extraits. Nous ne l'avons pas considérée comme un partenaire intéressant dans le cadre de notre recherche de partenaires intracellulaires de CCR5.
- **Spot 3 :** Cette protéine, caractérisée par un poids moléculaire apparent de 32 kDa et un point isoélectrique de 5.2, correspond au précurseur de la β -caséine. Cette protéine est également rapportée pour être exprimée exclusivement dans la glande mammaire, et pour les raisons mentionnées ci-dessus, nous ne l'avons pas considérée comme un partenaire intéressant.

3. Discussion

Les expériences de double-hybride et de GST-pulldown ne nous ont donc pas permis d'isoler des partenaires de l'extrémité C-terminale du récepteur CCR5. Les explications possibles de cet échec sont multiples. L'utilisation des techniques de double-hybride et de « GST-pulldown » font l'hypothèse que le domaine C-terminal du récepteur exprimé en fusion avec le domaine de liaison à l'ADN de GAL4 ou avec la protéine GST, adopte une conformation similaire à celle rencontrée dans l'environnement naturel du récepteur. D'autre part, il faut aussi que l'interaction avec les partenaires éventuels ne nécessite pas de modifications post-traductionnelles, soit de l'extrémité C-terminale, soit du partenaire lui-même. De plus, cette interaction doit être suffisamment stable pour permettre une activation significative des gènes rapporteurs, dans le cadre de la méthode du double-hybride, ou pour résister aux étapes de lavages multiples, dans le cadre des expériences de « GST-pulldown ». Or s'il est considéré généralement que l'extrémité C-terminale des récepteurs couplés aux protéines G constituent un domaine peu structuré, la démonstration formelle n'en a pas été faite. Il est par ailleurs connu que les cystéines palmitoylées du domaine C-terminal de CCR5 ancrent ce domaine dans le feuillet interne de la membrane plasmique, et cette interaction est connue pour de nombreux récepteurs pour être responsable de la formation d'une quatrième

boucle intracellulaire nécessaire à l'interaction efficace avec certaines protéines, comme les protéines G (Gosling et al., 1997). Cette structuration du domaine C-terminal n'était bien sûr pas présente dans les protéines de fusion. D'autre part, il est par exemple connu que la phosphorylation de l'extrémité C-terminale des RCPGs augmente l'affinité de l'arrestine pour le récepteur (Lefkowitz, 1998). Cette phosphorylation, ou d'autres modifications post-traductionnelles inconnues actuellement, pourraient être nécessaires aux interactions. De la même façon, de nombreuses protéines de signalisation sont également régulées par des modifications post-traductionnelles, particulièrement la phosphorylation, et ces modifications pourraient affecter l'efficacité d'interactions avec CCR5. D'autres protéines, comme les GRKs, sont aussi dépendantes pour leur recrutement vers le récepteur d'interactions autres, telles que la liaison aux dimères $\beta\gamma$ ou l'ancrage membranaire par acylation.

Enfin, des problèmes plus techniques pourraient également expliquer notre échec. Des interactions intermoléculaires au sein des protéines de fusion pourraient empêcher l'établissement de contacts intermoléculaires efficaces. Dans le cas de la technique du double-hybride, il est également possible que la librairie que nous avons utilisée ne contienne pas les clones d'intérêt. Des éléments suggérant une contamination significative par des clones d'origine génomique, et des biais d'amplification ont été observés, avec comme conséquence que la complexité réelle de la librairie pourrait être inférieure à la complexité déclarée. Dans le cas des expériences de « GST-pulldown », la présence de protéines en quantités trop faibles dans les extraits a pu empêcher leur détection par les techniques utilisées. La présence de la protéine bactérienne DnaK dans des expériences de « GST-pulldown » n'est pas rare et est une conséquence immédiate du système employé pour synthétiser les protéines de fusion. Cette liaison suggère un problème conformationnel au niveau de la protéine de fusion, qui exposerait des motifs hydrophobes. Cette reconnaissance par les chaperonnes pourrait s'accompagner d'une dégradation de la protéine, et expliquer en partie les produits de dégradation purifiés et retrouvés sur nos gels. La présence systématique de la DnaK pourrait aussi contribuer à inhiber la liaison entre le domaine C-terminal et d'éventuels partenaires, rendant notre appât peu efficace. Un phénomène similaire a été observé dans le cadre de recherches concernant le domaine minimum de liaison de petites protéines G activées (Herrmann et al., 1996).

Différents groupes utilisant les mêmes approches ont mis en évidence des interactions directes des RCPGs avec des partenaires intracellulaires différents des protéines G. Par exemple, l'extrémité C-terminale du récepteur β_2 -adrénergique (80 aa) a été utilisée pour isoler NHERF (Na^+/H^+ -exchanger regulatory factor) ou EBP50 (ERM-binding protein 50) dans des expériences d'« overlays » (Hall et al., 1998b). La spécificité de cette interaction a été confirmée par l'immunodétection par des anticorps anti-NHERF de la protéine purifiée via la chromatographie

Heptahelical receptor	Interacting protein ^b	Region of involved receptor
Angiotensin AT _{1A}	*ATRAP (AT ₁ -binding-protein)	C-terminus
	*Calmodulin	C-terminus
	*eNOS	C-terminus
	JAK2, possibly via SHP adapter protein	YIPP motif
	PLCγ1 (contains SH2 domain)	YIPP motif
	Small G-proteins, ARF and RhoA	NPXXY motif in carboxyl-terminus
β ₁ -adrenergic	Endophilins (SH3p4/p8/p13)	Third intracellular loop
β ₂ -adrenergic	GRB2	
	SRC / β-Arrestin	Third intracellular loop
	SHC	
	GRK	Third intracellular loop
	*Na ⁺ /H ⁺ exchange factor (NHERF)	PDZ motif at carboxyl-terminus
α _{2A} -, α _{2B} -, α _{2C} -, and β ₂ -adrenergic	*eiF2Bα	C-terminus
Bradykinin B ₂	PLCg1 (contains SH2 domain)	YIPP motif
	*eNOS	C-terminus
Dopamine D ₃	GABA _A receptor	
Dopamine D ₂	Spinophilin	Third intracellular loop
Dopamine D ₃ and D ₄	SH3 binding-proteins (GRB2, NCK)	Third intracellular loop
Endothelin 1 receptor	*eNOS	C-terminus
mGluR ₁ and mGluR ₅	*Homer	PPXXFR motif (Wasp)
mGluR ₅	*Calmodulin	C-terminus
mGluR ₇	*Calmodulin	C-terminus
Muscarinic m ₃	Small G-proteins, ARF and RhoA	NPXXY motif in carboxyl-terminus
Muscarinic m ₄	SH3 binding-proteins (GRB2, NCK)	Third intracellular loop
Opioid receptor	Calmodulin	Third intracellular loop
Purinergic P2Y ₁	*Na ⁺ /H ⁺ exchange factor	PDZ motif C-terminus
Purinergic P2Y ₂	*eNOS	C-terminus
Rhodopsin	InaD	PDZ motif C-terminus
	*Tctex-1/dynein	C-terminus
5-HT _{2C}	*MUPP1	PDZ motif C-terminus
5-HT _{2B}	iNOS	PDZ motif C-terminus
Somatostatin sst ₂	*Cortactin-binding-protein	PDZ motif C-terminus
	*Somatostatin receptor interacting-protein	PDZ motif C-terminus

Heuss et al. (TiNS 2000)

Table 4. Les partenaires des 7TMRs. La majorité des protéines identifiées ces dernières années pour leur interaction avec les récepteurs à sept domaines transmembranaires sont reprises dans ce tableau, à l'exclusion des protéines G, des GRKs et des arrestines. Les astérisques désignent les interactions mises en évidence par différentes techniques (double-hybride, "GST-pulldown", "overlays",...) utilisant l'extrémité C-terminale des récepteurs comme "appât".

d'affinité, et par des expériences de co-localisation. Des expériences de double-hybride utilisant la séquence codant pour l'extrémité C-terminale de AT_{1a}R (62 aa) ont également permis d'isoler la protéine ATRAP (AT₁ receptor associated protein). Cette association a ensuite été confirmée par chromatographie d'affinité, co-immunoprécipitation, et par co-localisation *in vivo* en microscopie à fluorescence (Daviot et al., 1999).

Depuis 1998, de très nombreux exemples sont venus enrichir la liste de partenaires de RCPGs. Soit par double-hybride, soit par des méthodes biochimiques dérivées de la chromatographie d'affinité, des partenaires interagissant directement avec des protéines recombinantes constituées de l'extrémité C-terminale de différents RCPGs, ont été identifiés (Table 4). Ceci démontre l'efficacité de ces deux approches pour identifier des interactions moléculaires et valide l'utilisation d'un domaine C-terminal de taille modeste. Le fait de n'utiliser que la partie C-terminale de CCR5 ne devait donc pas constituer un handicap dans nos expériences.

De plus, il a notamment été montré que l'extrémité C-terminale de la rhodopsine interagit avec un nouveau partenaire en double-hybride, la protéine Tctex-1, correspondant à l'une des trois chaînes légères de la dynéine. L'association Tctex-1- rhodopsine a été confirmée par chromatographie d'affinité, co-sédimentation, et *in vivo* par immunomarquage en microscopie électronique (Tai et al., 1999). L'absence de modifications post-traductionnelles lors de l'expression de l'extrémité C-terminale de RCPGs dans des systèmes hétérologues ne semble donc pas empêcher systématiquement la mise en évidence de partenaires non-apparentés aux protéines G hétérotrimériques.

Malgré des efforts réalisés par de nombreux groupes, une seule interaction entre CCR5 et une protéine intracellulaire a été démontrée. En effet, une interaction constitutive entre CCR5 et la sous-unité ζ du protéasome 26S a été mise en évidence par les techniques de double-hybride en levures et en cellules de mammifères (Fernandis et al., 2002). Le protéasome semble jouer un rôle important dans l'internalisation induite par MIP-1 β et la protéine gp120 de VIH-1. Il exerce également un effet modulateur sur l'endocytose de CXCR4 lors de la stimulation du récepteur par SDF-1 α et gp120. Le protéasome 26 S est impliqué dans le turnover de nombreuses protéines cellulaires, et joue un rôle majeur dans l'endocytose d'une variété de récepteurs (Wojcik, 1999; Yu and Malek, 2001). Il a été d'ailleurs récemment impliqué dans le tri endosomal et la dégradation de CXCR4 (Marchese and Benovic, 2001).

Le domaine C-terminal de CCR5 arbore différents motifs qui constituent les cibles de processus régulateurs divers (Figure 17). Quatre sérines C-terminales (Ser 336, Ser 337, Ser 342, et Ser 349), sont impliquées dans la désensibilisation et constituent les sites de phosphorylation



Position	Consensus			
	[S/T]XΦ*	[Φ/Ψ]XΦ*	[D/E]XV*	XΨ[D/E]*
	class I	class II	class III	class IV
P ⁰	hydrophobic or aromatic	hydrophobic or aromatic	hydrophobic or aromatic	negative or #
P ⁻¹	any (Trp or Asp)	any (Trp or Asp)	any	aromatic
P ⁻²	Ser or Thr	hydrophobic or aromatic	negative	any
P ⁻³	any (Glu)	any (Glu)	Gly or Glu	any

Vaccaro P. et al.(FEBS Lett. 2002)

Table 5. Classification des domaines PDZ. Les domaines C-terminaux reconnus par les différentes classes de domaines PDZ sont représentés. La nomenclature des résidus compris au sein du motif de liaison est la suivante : le résidu C-terminal est dénommé P0 et les résidus précédents sont qualifiés de P-1, P-2, P-3, etc.

par les GRKs-2 et -3. Ce domaine, une fois phosphorylé, interagit avec les arrestines, provoquant ainsi le découplage du récepteur vis-à-vis de la protéine G (Oppermann et al., 1999). Trois cystéines palmitoylées (Cys 321, Cys 323, et Cys 324) assurent un ancrage de l'extrémité C-terminale du récepteur à la membrane plasmique, créant ainsi une 4^{ème} boucle intracellulaire (Blanpain et al., 2001; Kraft et al., 2001). L'intégrité de ces cystéines semble nécessaire à la désensibilisation et l'internalisation du récepteur (Kraft et al., 2001). Elles jouent également un rôle important dans le trafic intracellulaire de CCR5, et sont nécessaires au couplage du récepteur à une partie de son répertoire de cascades de signalisation (Blanpain et al., 2001). Un domaine basique (-KHIAKRF-) a été décrit comme nécessaire, en coopération avec le motif de trois cystéines palmitoylées, pour une expression optimale du récepteur à la membrane (Venkatesan et al., 2001). Un motif dileucine (Leu 308 et Leu 309), constitue un site potentiel de liaison pour la protéine exportatrice AP-2, contribuerait à l'internalisation de CCR5 de manière indépendante de sa phosphorylation (Kraft et al., 2001). Les quatre derniers acides aminés (-SVGL) représentent quant à eux un domaine potentiel d'interaction avec les protéines à domaine PDZ. En général, les protéines à domaines PDZ semblent jouer un rôle important dans l'organisation des complexes de protéines impliquées dans diverses voies de signalisation cellulaire. De nombreuses protéines à domaines PDZ jouent un rôle important dans le transport, la localisation et l'assemblage de ces complexes de signalisation supramoléculaire. Ces domaines reconnaissent de manière spécifique des motifs C-terminaux relativement courts (approximativement 5 aa) ainsi que des séquences internes imitant structurellement une extrémité terminale (Harris and Lim, 2001). Le premier motif d'interaction identifié liant les protéines PDZ était -S/TXV où X représente n'importe quel aa, mais de larges variations existent (Songyang et al., 1997). En effet, les domaines PDZ sont actuellement divisés en 4 catégories sur base de leur motif de reconnaissance préférentiel ; les domaines de classe I reconnaissent le motif S/T-X-Φ-COOH (où Φ est un aa hydrophobe) ; la classe II reconnaît le motif Φ/Ψ-X-F-COOH (où Ψ est un aa aromatique) ; la classe III reconnaît le motif D/E-X-V-COOH ; et les domaines de classe IV reconnaissent le motif X-Φ-D/E-COOH (Table 5). CCR5 possède donc un domaine potentiel de type II à son extrémité C-terminale.

**IV. ETUDE DES PHENOMENES
D'OLIGOMERISATION DU
RECEPTEUR CCR5**

Receptor	Technique	Reference
Homodimers		
α_2 -Adrenergic	Radiation inactivation	Venter et al., 1983
β_2 -Adrenergic	Binding assays	Limbird et al., 1975; Limbird & Lefkowitz, 1976
	Radiation inactivation	Fraser & Venter, 1982
	Western Blot	Hebert et al., 1996
	Immunoprecipitation	Hebert et al., 1998
	BRET	Angers et al., 2000
ATII	Crosslinking studies	Paglin & Jamieson, 1982; Rogers, 1984; Carson et al., 1987; Rondeau et al., 1990; Siemens et al., 1991
	Gel extrusion chromatography	Capponi & Catt, 1980; Guillemette & Escher, 1983; Carson et al., 1987
Bradykinin B2	Crosslinking studies	Abdalla et al., 1999
Ca ²⁺ sensing	Crosslinking studies	Bai et al., 1998
	Immunoprecipitation	Ward et al., 1998; Pace et al., 1999
CCR2	Immunoprecipitation	Rodriguez-Frade et al., 1999
	Crosslinking studies	Rodriguez-Frade et al., 1999
D1 dopamine	Radiation inactivation	Gredal & Nielsen, 1987
D2 dopamine	Immunoprecipitation	Ng et al., 1994
	Radiation inactivation	Gredal & Nielsen, 1987
	Photoaffinity labeling	Zawarynski et al., 1998
	Crosslinking studies	Ng et al., 1994
D3 dopamine	Immunoprecipitation	Nimchinsky et al., 1997
Glutamate R1 α	Immunoprecipitation	Robbins et al., 1999
	Crystallography	Kunishima et al., 2000
GnRH	Binding assays	Conn et al., 1982
	Radiation inactivation	Conn & Venter, 1985
	FRET	Cornea et al., 2001
Human chorionic gonadotropin	Immunoprecipitation	Indrapichate et al., 1992
H2 histamine	Immunoprecipitation	Fukushima et al., 1997
Immunoglobulin-Hepta	Immunoprecipitation	Abe et al., 1999
Luteinizing hormone	Ligand blotting	Vu Hai et al., 1990
	Radiation inactivation	Salesse et al., 1991
	Immunoprecipitation	Indrapichate et al., 1992
Muscarinic	Binding assays	Mattera et al., 1985; Galper et al., 1987; Potter & Ferrendelli, 1989
	Radiation inactivation	Shirakawa & Tanaka, 1985
	Photoaffinity labeling	Avissar et al., 1983
	Western blot analysis	Wreggett & Wells, 1995
	Immunoprecipitation	Zeng & Wess, 1999
Opioid	Binding assays	Hazum et al., 1982
	Radiation inactivation	Ott et al., 1986
	Hydrodynamic analysis	Simon et al., 1986
	Immunoprecipitation	Cvejic & Devi, 1997; Jordan & Devi, 1999
	FRET	McVey et al., 2001
Platelet-activating factor	Immunoprecipitation	Ali et al., 1994
Thyrotropin	Radiation inactivation	Nielsen et al., 1984; Gennick et al., 1987
	Immunoprecipitation	Ban et al., 1992; Grossman et al., 1995
	BRET	Kroeger et al., 2001
V2 Vasopressin	Immunoprecipitation	Zhu & Wess, 1998

Rios C.D. (Pharmacol. Ther. 2001)

Table 6. Homodimères de RCPGs décrits dans la littérature.

Receptor	Technique	Reference
Heterodimers		
β_2 -Adrenergic/ α_2 -adrenergic	Binding studies	Maggi et al., 1980
Cholecystokinin-dopamine	Binding studies	Fuxe et al., 1981
Vasoactive intestinal peptide-serotonin	Binding studies	Rostene et al., 1983
α_{2c} -Adrenergic/M3 muscarinic	Binding studies	Maggio et al., 1993
μ - δ Opioid	Binding studies	Rothman et al., 1986, 1988, 1989
GABA _B R1-GABA _B R2	Immunoprecipitation immunoprecipitation	Gomes et al., 2000; George et al., 2000 Marshall et al., 1999; Jones et al., 1998; Kaupmann et al., 1998; White et al., 1998
M2-M3 muscarinic	Binding studies	Maggio et al., 1999
κ - δ Opioid	Immunoprecipitation	Jordan & Devi, 1999
5-HT 1B-5-HT 1D	Immunoprecipitation	Xie et al., 1999
SSTR1-SSTR5 somatostatin	pbFRET	Rocheville et al., 2000b
D2 dopamine-SSTR5 somatostatin	pbFRET	Rocheville et al., 2000a
AT1 AT-B2 bradykinin	Crosslinking/Western blot	Abdalla et al., 2000
A1 adenosine-D1 dopamine	Immunoprecipitation	Gines et al., 2000
β_2 -Adrenergic- δ opioid	Immunoprecipitation	Jordan et al., 2001
β_2 -Adrenergic- κ opioid	Immunoprecipitation	Jordan et al., 2001

Rios C.D. (Pharmacol. Ther. 2001)

Table 7. Hétérodimères de RCPGs décrits dans la littérature.

VI. ETUDE DES PHENOMENES D'OLIGOMERISATION DU RECEPTEUR CCR5

1. Introduction

Ces dernières années, les phénomènes de dimérisation ont été décrits pour de nombreux récepteurs, et il est actuellement acquis que la plupart, si pas la totalité des RCPGs, est capable de former des homodimères (Table 6). Des phénomènes d'hétérodimérisation ont également été publiés pour un nombre croissant de récepteurs (Table 7). Dans certaines situations, la dimérisation a été démontrée comme étant essentielle pour l'acheminement du récepteur à la membrane plasmique ainsi que pour la réponse fonctionnelle (Kaupmann et al., 1998; White et al., 1998). Pour d'autres récepteurs, il a été montré que l'hétérodimère génère un site de liaison présentant une pharmacologie différente, en comparaison du récepteur sous forme monomérique, ou homodimérique (Jordan and Devi, 1999). Cependant, dans la plupart des cas, la signification exacte du processus d'hétérodimérisation observé dans des conditions d'expression hétérologue n'a pas été établie, et les conséquences fonctionnelles de ce processus restent obscures.

Au moment de commencer ce travail, une étude avait mis en évidence l'homodimérisation par co-immunoprécipitation de CCR5 et de CCR2b, ainsi que l'hétérodimérisation de CCR5 et de CCR2b. Concrètement, ces travaux montraient que des cellules co-exprimant CCR2b et CCR5 produisaient une réponse fonctionnelle maximale pour des concentrations en chimiokines 10 à 100 fois inférieures aux concentrations nécessaires pour obtenir une réponse maximale lorsque les cellules n'expriment qu'un seul récepteur. Il a été suggéré que la formation d'hétérodimères augmenterait la sensibilité et l'efficacité de la réponse aux chimiokines (Mellado et al., 2001). Ces travaux montraient également que la formation d'homo- et d'hétérodimères nécessitait la présence d'agonistes (Rodriguez-Frade et al., 1999b; Rodriguez-Frade et al., 1999a; Mellado et al., 2001). D'autres études, auxquelles notre laboratoire a participé, montraient par contre que la formation d'homodimères de CCR5 ne semblait pas nécessiter de stimulation par les ligands (Benkirane et al., 1997; Issafras et al., 2002). Nous nous sommes donc proposé de continuer notre étude débutée sur les phénomènes d'homodimérisation de CCR5 (Issafras et al., 2002), et de l'élargir aux processus d'hétérodimérisation avec le récepteur CCR2b ainsi qu'à l'homodimérisation de CCR2b. Nous avons analysé par des méthodes complémentaires les conséquences fonctionnelles du processus de dimérisation en terme de liaison des ligands, stimulation des cascades intracellulaires, et internalisation.

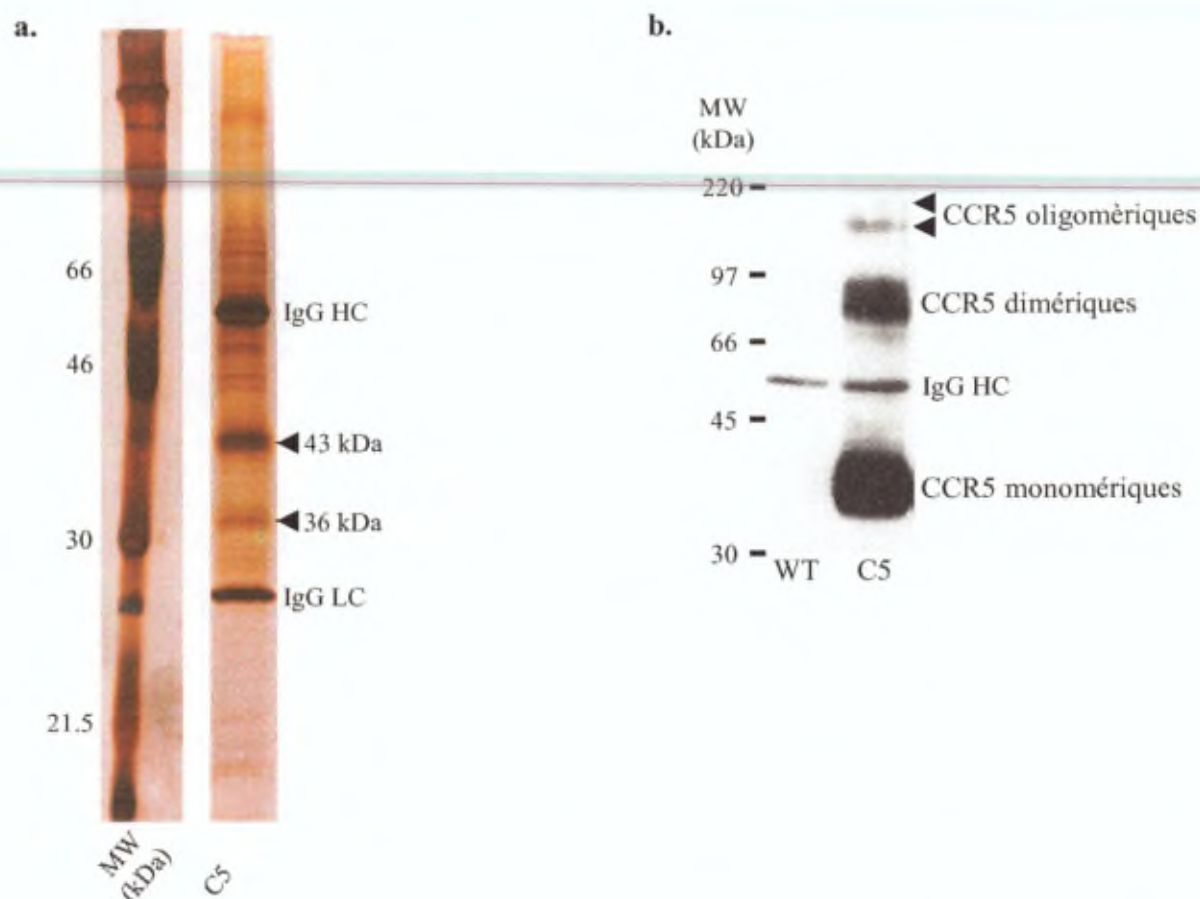


Figure 18. Immunoprécipitation de CCR5 par l'anticorps 2D7. (a) Un lysat de cellules CHO-K1 exprimant CCR5 (clone C5, 70×10^6 cellules) a été immunoprécipité par l'anticorps 2D7. Le précipité a été séparé sur gel de polyacrylamide et coloré à l'argent. La forme immature de 36 kDa, ainsi que la forme mature de 43 kDa sont désignées par les têtes de flèches. Une autre forme immature de 40 kDa parfois décrite dans la littérature n'est pas visible; (b) les cellules CHO-K1 non transfectées (WT) ou exprimant CCR5 (C5) ont été lysées (5×10^6 cellules par puits) et immunoprécipitées. Les réactions d'immunoprécipitations ont été analysées sur gels d'acrylamide 12 %, transférées sur membrane de nitrocellulose, immunodétectés par l'anticorps monoclonal MC-5 et révélés par chimioluminescence afin de visualiser les formes de haut poids moléculaire de CCR5. On observe les formes monomériques (43 kDa), dimériques (80 kDa) et oligomériques (entre 150 et 200 kDa, désignées par les têtes de flèches) du récepteur.

Les abréviations IgG HC et IgG LC désignent respectivement les chaînes lourdes et légères de l'anticorps 2D7. Les standards de poids moléculaires sont désignés par l'abréviation MW.

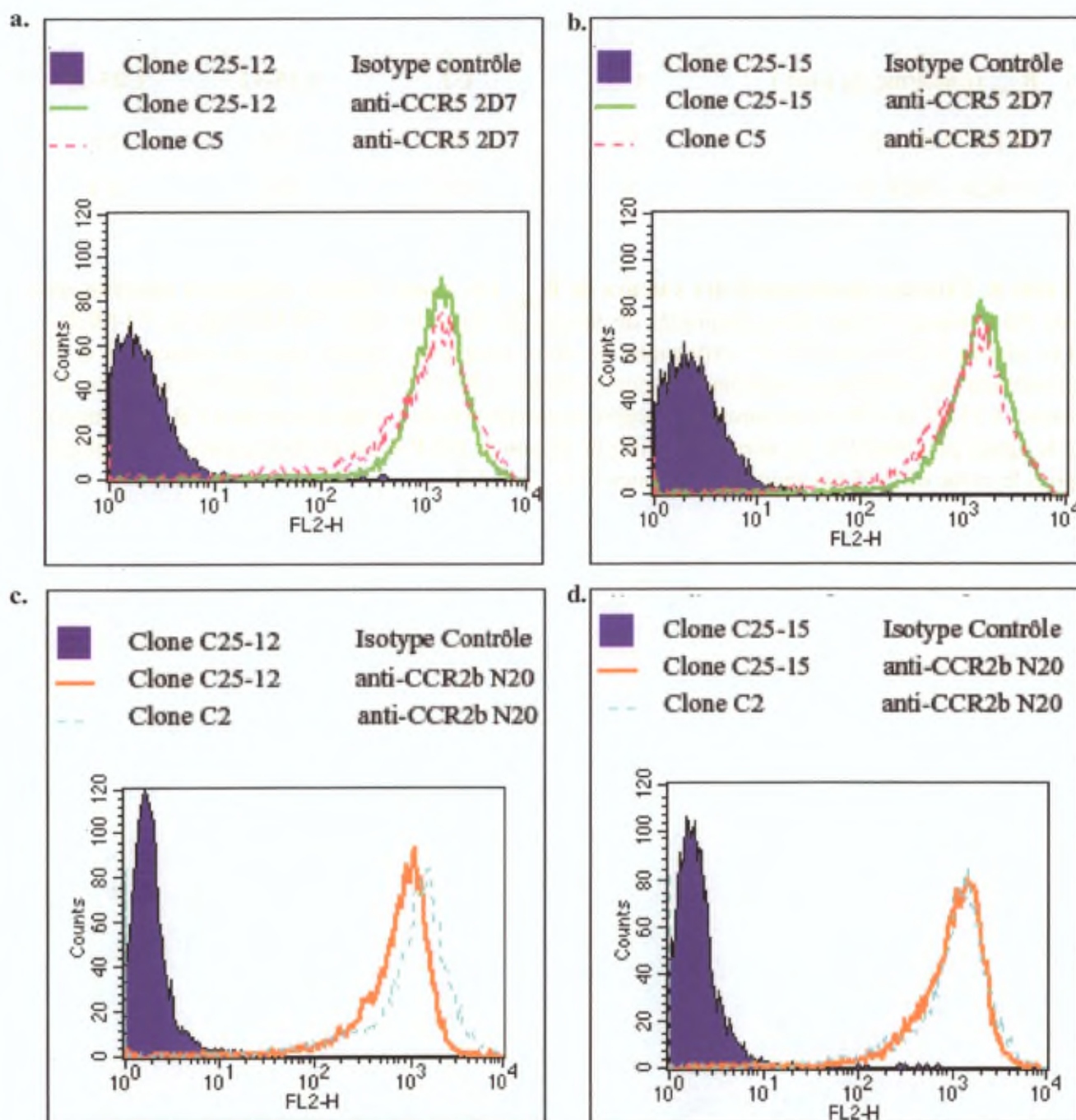


Figure 19. Caractérisation des clones CHO-K1 co-exprimant CCR5 et CCR2b par FACS.

Les cellules CHO-K1 exprimant de manière stable le récepteur CCR5 (clone C5) ont été transfectées par le récepteur CCR2b. Deux clones (clones C25-12 et C25-15) ont été sélectionnés et les niveaux d'expression de CCR5 (a, b) et de CCR2b (c, d) évalués par FACS, en utilisant les anticorps monoclonaux 2D7 (anti-CCR5) et N20 (anti-CCR2b) couplés à la phycoérythrine (-PE). L'expression de CCR5 à la surface des cellules est homogène pour les différents clones testés (C5 + 2D7, C25-12 + 2D7, et C25-15 + 2D7) (a et b). L'expression de CCR2b à la surface des cellules a été comparée avec un clone CHO-K1 de référence exprimant de manière stable CCR2b (C2 + N20): (c) le clone C25-12 présente un niveau d'expression de CCR2b légèrement inférieur (C25-12 + N20) tandis que le clone C25-15 (d) montre un niveau d'expression similaire (C25-15 + N20).

$B_{\max}$ (pmol/mg de prot.)	C5	C2	C25-12	C25-15
CCR5 / MIP-1 β	2.7	0	2.9	3.5
CCR2b / MCP-1	0	0.5	0.6	2.4

Table 8. Tableau récapitulatif des valeurs de $B_{\max}$. Les quatre lignées cellulaires sélectionnées ont été comparées pour leurs propriétés de liaison des ligands iodés ^{125}I -MIP-1 β et ^{125}I -MCP-1. Les clones C25-12 et C25-15 expriment les deux récepteurs, tandis que les clones C5 et C2 constituent les références exprimant respectivement CCR5 et CCR2b, de manière exclusive. Les clones C25-12 et C25-15 montrent une légère augmentation de l'expression de CCR5 par rapport à la lignée parentale C5. Le nombre de sites de liaison de MCP-1 est environ quatre fois supérieur pour le clone C25-15 par rapport aux clones C25-12 ou C2.

2. Résultats

2.1. Immunoprécipitations

2.1.1. Immunoprécipitation des oligomères de CCR5

Des lignées cellulaires CHO-K1 exprimant de manière stable CCR5 (C5) (Blanpain et al., 1999a) ont été solubilisées (Mirzabekov et al., 1999) et immunoprécipitées à l'aide d'un anticorps monoclonal, 2D7, dirigé contre la seconde boucle extracellulaire du récepteur, et dont la particularité est de reconnaître CCR5 dans sa conformation native. L'anticorps monoclonal MC-5 a permis la visualisation du signal monomérique à 43 kDa (forme mature D-glycosylée), et à 36 kDa (forme immature) (Figure 18a), ainsi que des espèces de plus hauts poids moléculaires (Figure 18b). Les signaux se situant entre 70-80 kDa, et 150-200 kDa pourraient correspondre à des dimères et des oligomères. Ces résultats montrent clairement que le récepteur CCR5 existe sous forme mono- et oligomérique en l'absence de ligand.

2.1.2. Caractérisation des clones cellulaires

Dans le but de caractériser les phénomènes de dimérisation de CCR5 avec CCR2b, des lignées cellulaires exprimant de manière stable CCR5 et/ou CCR2b ont dans un premier temps été isolées et caractérisées par cytométrie de flux (FACS) (Figure 19) et par des tests de saturation utilisant les traceurs ^{125}I -MIP-1 β et ^{125}I -MCP-1 (Table 8). La lignée cellulaire parentale C5 a été transfectée par le vecteur pEFIB3-CCR2b. Deux clones (C25-12 et C25-15) exprimant les deux récepteurs de manière stable ont été sélectionnés sur base des résultats de FACS et des tests de liaison. L'analyse par FACS montre une expression similaire de CCR5 entre la lignée parentale et les deux lignées co-exprimant CCR2b (Figure 19a et b), les deux clones sélectionnés présentant un niveau d'expression qui ne semble pas avoir été perturbé par l'introduction de CCR2b. Une lignée clonale isolée de manière indépendante et exprimant CCR2b seul (clone C2) a été utilisée comme contrôle de l'expression du récepteur (Figure 19c et d). Par comparaison, le clone C25-12 semble avoir un niveau d'expression de CCR2b légèrement inférieur (Figure 19c) tandis que le clone 15 montre un niveau d'expression de CCR2b similaire au clone C2 (Figure 19d). Les tests de saturation ont permis d'estimer le nombre de sites spécifiques de liaison de chimiokines MIP-1 β et MCP-1 (B_{max}) et confirment les résultats obtenus en FACS. Le niveau d'expression du récepteur CCR5 est similaire pour le clone parental C5 et pour les clones dérivés C25-12 et C25-15, avec une légère augmentation du nombre de sites de liaison de MIP-1 β chez les lignées co-exprimant les deux récepteurs. L'expression de CCR2b a été déterminée de

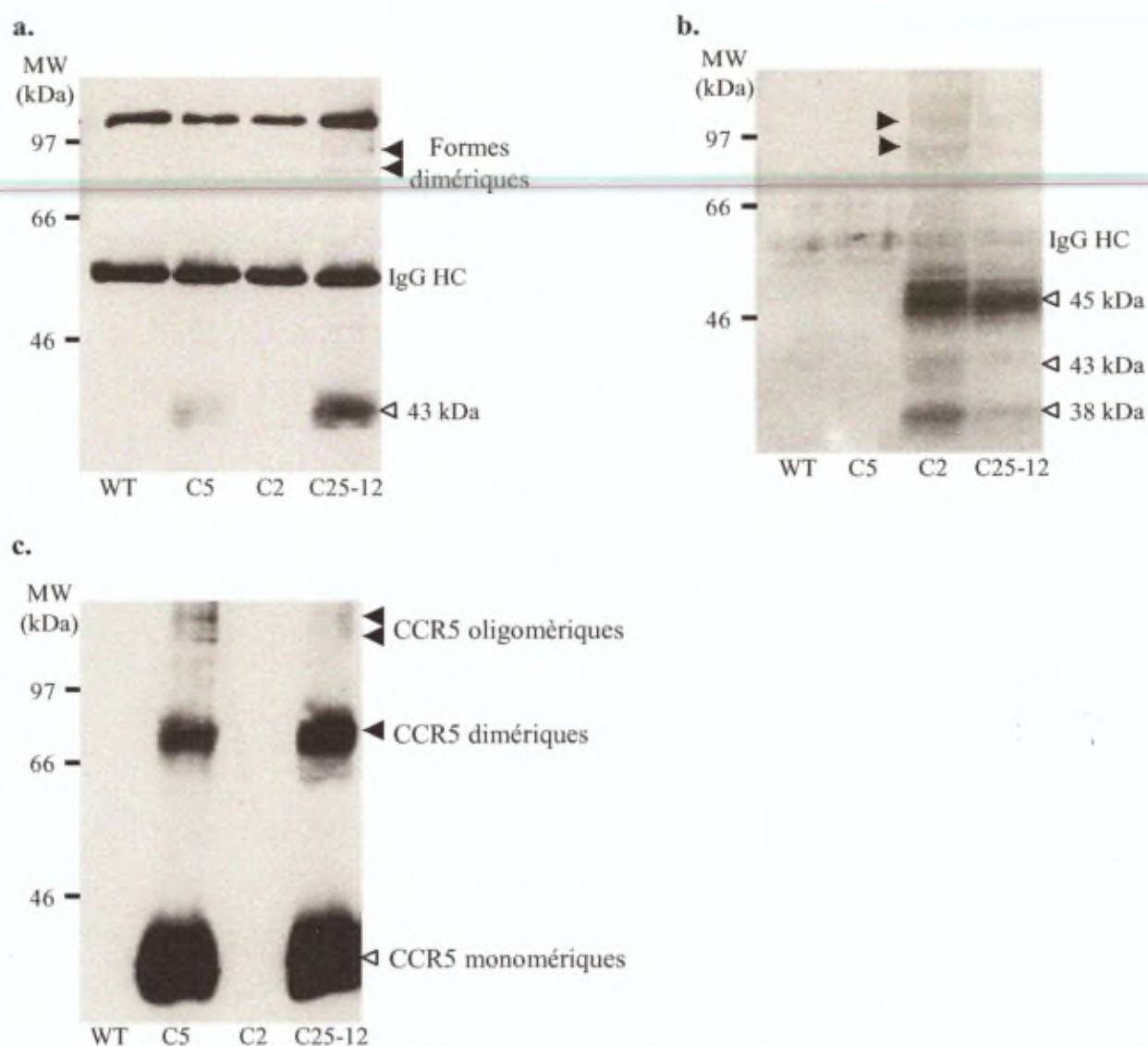


Figure 20. Co-immunoprécipitation de CCR5 et CCR2b. Les cellules CHO-K1 non-transfectées (WT), ou exprimant CCR5 (C5), CCR2b (C2) ou les deux récepteurs à la fois (clone C25-12) ont été lysées (2×10^6 cellules par puit), et le lysat immunoprécipité par les anticorps anti-CCR5 (2D7) ou anti-CCR2b (Doc-2). Les réactions d'immunoprécipitations ont été séparées sur gels de polyacrylamides monodimensionnels (10 %), transférés sur membranes de nitrocellulose, et détectées par les anticorps anti-CCR5 (MC-5) ou anti-CCR2b (SC-20). (a) Immunoprécipitation par Doc-2 et immunodétection par MC5. Les bandes correspondant au monomère de CCR5 (43 kDa) et aux formes dimériques (entre 80 et 90 kDa) ont été indiquées. (b) Immunoprécipitation par Doc-2 et immunodétection par SC-20. Les têtes de flèches blanches indiquent la position des différentes formes glycosylées de CCR2b (38, 40 et 43 kDa), tandis que les têtes de flèches noires indiquent les formes dimériques (90 et 100 kDa). (c) Immunodétection de CCR5 (MC5) dans les lysats bruts des mêmes populations cellulaires (3×10^5 cellules par puits). Les têtes de flèches indiquent la position des formes monomériques, dimériques et oligomériques. Les bandes correspondant à la chaîne lourde de l'IgG sont indiquées par IgG HC. Les standards de poids moléculaires sont désignés par l'abréviation MW.

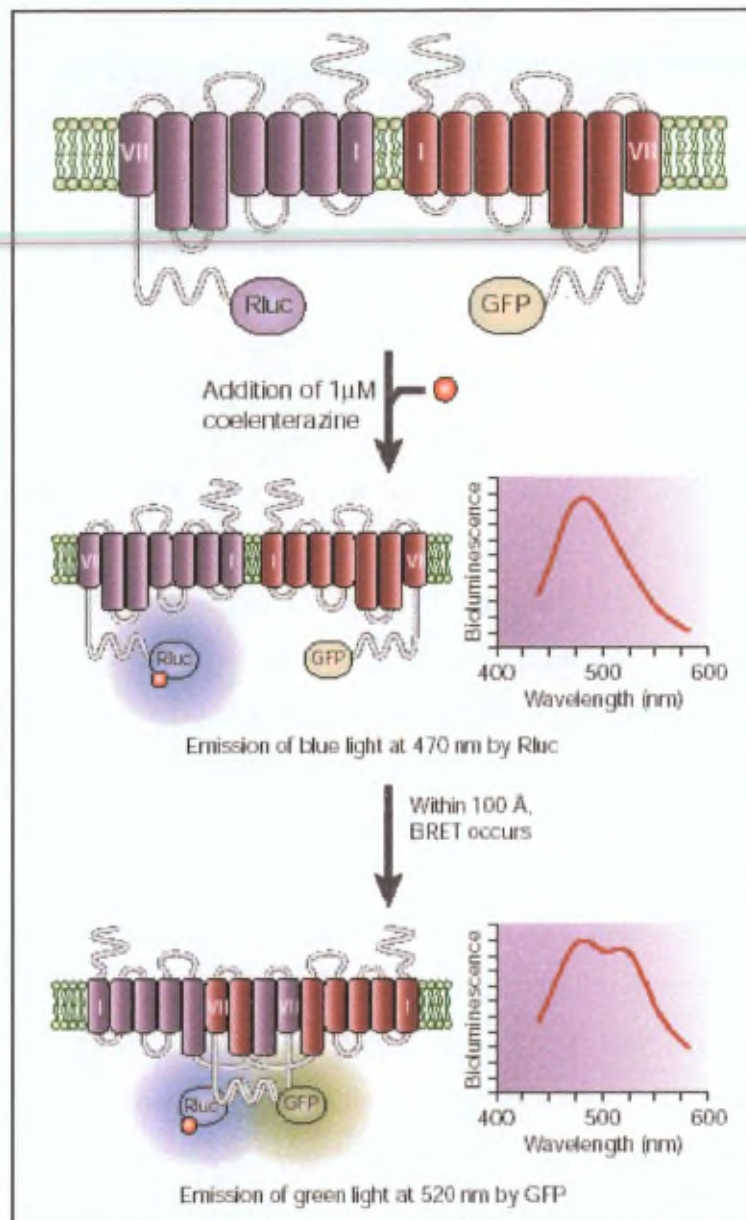
manière similaire et confirme la tendance de C25-12 à exprimer moins de CCR2b que C2 et C25-15. De plus, ce clone C25-12 exprimerait approximativement cinq fois plus de récepteur CCR5 que de CCR2b, tandis que le C25-15 montre un nombre de sites spécifiques de liaison identique pour MIP-1 β et MCP-1. Les K_D estimés de CCR5 et CCR2b pour leur ligand respectif en test de liaison sont consistant avec des valeurs décrites précédemment (Table 8). Des tests réguliers ont confirmé que l'expression des récepteurs était stable au cours du temps, au sein des quatre lignées cellulaires caractérisées.

2.1.3. Co-Immunoprécipitation des dimères

Nous avons donc montré l'immunoprécipitation des oligomères de CCR5 par l'anticorps monoclonal 2D7 en absence de stimulation, démontrant ainsi l'existence de ces complexes de hauts poids moléculaires sans modification de l'état d'activation du récepteur. Dans le but de tester l'existence d'hétéro-oligomères CCR5/CCR2b et également d'homo-oligomères de CCR2b, des expériences similaires ont été réalisées. Deux anticorps monoclonaux murins Doc-2 et Doc-3, spécifiquement dirigés contre les boucles extracellulaires de CCR2b (Springael et al., 2004) ont permis l'immunoprécipitation des différentes formes glycosylées du monomère à 38, 40 et 43 kDa (Figure 20b) (Michael et al., 1997a), et également des formes dimériques à approximativement 90 et 100 kDa. Ces mêmes réactions immunodétectées par un anti-CCR5 ont mis en évidence trois bandes immunoréactives (Figure 20a), incluant la forme monomérique de CCR5 (43 kDa), ainsi que deux formes dimériques de CCR5/CCR2b (entre 80 et 90 kDa) présentant probablement des degrés de glycosylation différents du récepteur CCR2b. Des résultats similaires ont été obtenus avec Doc-3, le second anticorps monoclonal utilisé pour les immunoprécipitations (résultats non-montrés). De plus, la co-immunoprécipitation de CCR5 a également été observée lorsque l'anticorps monoclonal Doc-2 est ajouté avant la lyse des cellules (non-montré), démontrant l'association des récepteurs à la membrane. L'analyse du lysat cellulaire brut pour CCR5 démontre une intensité similaire du signal pour les 3 lignées cellulaires exprimant CCR5 (Figure 20c). Nous pouvons donc conclure à l'existence d'hétérodimères CCR5/CCR2b ainsi que d'homodimères CCR2b préexistant au sein des cellules, en l'absence d'une quelconque stimulation.

2.1.4. BRET

Nous avons voulu confirmer ces interactions par une nouvelle méthode d'analyse basée sur le transfert d'énergie entre une protéine fusionnée à la luciférase (*Rluc*), le donneur, et une protéine fusionnée à la EYFP (enhanced yellow fluorescent protein, dérivés de la GFP), l'accepteur



Bouvier M. (Nature Rev. Neurosci. 2001)

Figure 21. Représentation schématique de l'étude des interactions entre RCPCs par BRET. Le BRET (bioluminescence resonance energy transfer) est un phénomène qui se retrouve de manière naturelle dans de nombreux animaux marins tel que le corail *Renilla reniformis* et la méduse *Aequoria victoria*. Chez *R. reniformis*, la luminescence résultant de la dégradation catalytique de coelentérazine par la luciférase (*Rluc*) est transférée à la green fluorescent protein (*GFP*), qui émet à son tour la fluorescence à une longueur d'onde caractéristique suite à la dimérisation des deux protéines. La dépendance stricte de la proximité moléculaire entre les donneurs et les accepteurs pour le transfert d'énergie en fait un système de choix pour l'étude des interactions protéine-protéine *in vivo*. En l'absence de dimérisation, l'addition de coelentérazine H induit un signal de bioluminescence caractérisé par un pic d'émission à 470 nm propre aux propriétés spectrales de *Rluc*. Si la dimérisation a lieu, le transfert d'énergie entre *Rluc* et la *GFP* abouti à l'apparition d'un signal fluorescent supplémentaire caractérisé par un pic d'émission à 530 nm propre au variant de *GFP* utilisé (dans ce cas-ci, c'est la *YFP*)

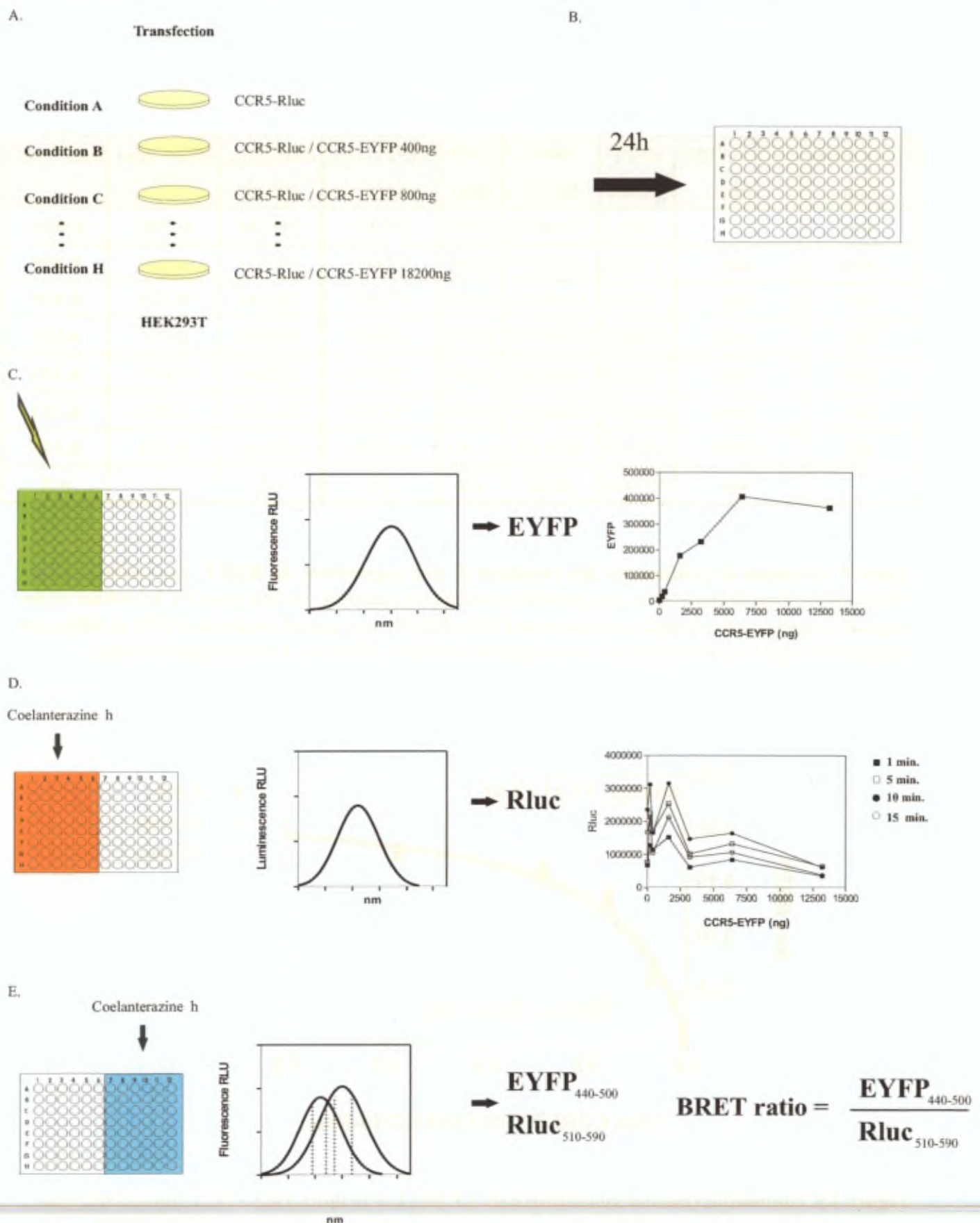


Figure 22. Représentation schématique d'une expérience de BRET. Des cellules HEK293T sont dans un premier temps transfectées par une quantité constante de vecteur CCR5-hRluc et une quantité croissante de CCR5-EYFP (a). 24 h après la transfections, les cellules sont détachées, comptées et réparties dans des plaques de 96 puits (b). Après 48 heures, chacune de ces conditions de transfection est analysée afin de déterminer la quantité totale de CCR5-EYFP et de CCR5-hRluc exprimés au sein des cellules et de mesurer le transfert d'énergie entre CCR5-hRluc et CCR5-EYFP (c, d, e).

CCR5-hR luc (ng)	CCR5-YEFP (ng)	EYFP (RLU)	hRluc (RLU)	EYFP/ hRluc	EYFP ₅₁₀₋₅₉₀ (RLU)	Rluc ₄₄₀₋₅₀₀ (RLU)	BRET ratio	BRET net
400	-	5690	1194263	0.005	297477	208242	0.700	0.000
400	400	19723	2203267	0.009	520055	368832	0.709	0.009
400	800	37358	1518123	0.025	321897	236788	0.736	0.036
400	1600	178055	25287778	0.070	530967	400992	0.755	0.055
400	3200	232397	1492910	0.156	272270	226290	0.831	0.131
400	6400	406410	14002232	0.290	312155	266120	0.853	0.153
400	12800	362165	623183	0.581	109230	95520	0.875	0.175
-	800	207400	8850	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Table 9. Exemple de traitement des résultats d'une expérience de BRET. Les cellules HEK-293T sont co-transfectées avec une quantité constante de plasmide codant pour CCR5-hRluc et des quantités variables de plasmide codant pour CCR5-EYFP. La quantité totale de EYFP et hRluc est mesurée 48 h après la transfection, et est exprimée en RLU (Relative Luminescence Units).

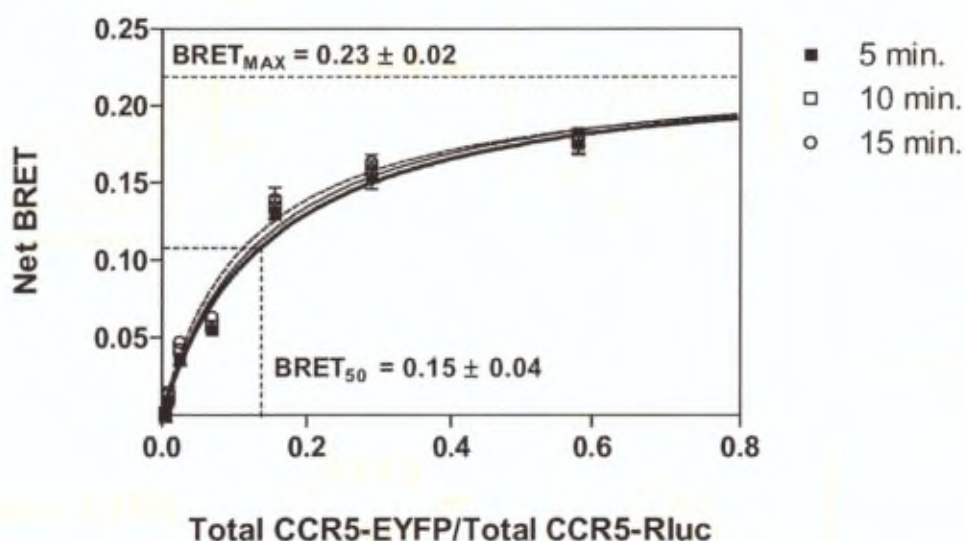


Figure 23. Homodimérisation constitutive de CCR5. Les cellules HEK-293T transfectées par une quantité constante de CCR5-hRluc et par une quantité croissante de CCR5-EYFP, sont incubées en présence de coelentérazine. Cette compilation montre la bonne reproductibilité de la méthode et permet de déterminer les paramètres $BRET_{50}$ 0.15 et $BRET_{MAX}$ 0.23.

(Figure 21). Pour que ce transfert d'énergie ait bien lieu, les spectres d'émission du donneur et d'excitation de l'accepteur doivent se chevaucher et les deux dipôles doivent se trouver à proximité immédiate l'un de l'autre (distance comprise entre 25 à 100 Å) (Xu et al., 1999).

2.1.5. CCR5 homodimérise en l'absence de ligands

Nous avons donc construit des récepteurs CCR5 fusionnés à la hRLuc (humanized *Renilla* luciferase) et à la EYFP, et testé le transfert d'énergie entre ces deux protéines. Afin de faciliter la compréhension des expériences qui vont suivre, nous décrirons une première fois de manière détaillée, en utilisant CCR5 comme exemple, les différentes étapes nécessaires à la mesure du transfert d'énergie entre deux récepteurs.

Des cellules HEK-293T sont dans un premier temps transfectées par une quantité constante de vecteur CCR5-hRLuc et une quantité croissante de CCR5-EYFP (Table 9 ; Figure 22 A.). Après 48 heures, chacune de ces conditions de transfection est analysée afin de déterminer la quantité totale de CCR5-EYFP et de CCR5-hRLuc exprimés au sein des cellules et de mesurer le transfert d'énergie entre CCR5-hRLuc et CCR5-EYFP. Concrètement, la mesure de la quantité totale de CCR5-EYFP est effectuée sur une fraction des cellules à l'aide d'un fluorimètre (Figure 22 C). L'intégration du spectre de fluorescence reflète la quantité réelle de protéine CCR5-EYFP exprimée au sein des cellules. La figure 22 C montre en effet clairement que cette mesure augmente progressivement avec la quantité de plasmide CCR5-EYFP engagé dans les transfections (Table 9). Une diminution de la fluorescence est cependant observée lorsque les cellules sont transfectées avec des quantités d'ADN élevée. La mesure de la quantité totale de CCR5-hRLuc est ensuite analysée sur cette même population de cellules en mesurant la luminescence émise par les cellules suite à l'addition de coelenterazine h (Figure 22 D). L'intégration du spectre de luminescence montre que cette valeur varie néanmoins selon les conditions de transfection malgré que la quantité de plasmide CCR5- hRLuc engagé est constante (Table 9). On remarque également que cette luminescence augmente rapidement après l'addition de coelenterazine h pour atteindre un maximum de luminescence aux environs de 5-10 min. suivi d'une décroissance progressive probablement due à une désensibilisation de l'enzyme. Cette mesure nous permet donc de connaître la fenêtre de temps pendant laquelle l'émission de luminescence est stable au cours de l'expérience. Ces deux mesures, EYFP et hRLuc, sont effectuées systématiquement pour chacune de nos expériences.

La mesure du transfert d'énergie entre CCR5-hRLuc et CCR5-EYFP s'effectue sur une autre fraction des cellules (Figure 22 E). Dans ce cas précis, l'addition de coelenterazine h induit une excitation de la luciférase qui peut transférer une partie de son énergie d'excitation à la protéine EYFP. Il est généralement admis que ce transfert d'énergie ne peut se faire que si le donneur

d'énergie, la luciférase (hRluc) et l'accepteur d'énergie (EYFP) sont distants d'environ 25-100 Å. Par définition, le transfert d'énergie ou « BRET ratio » est défini comme le rapport de l'énergie émise par la EYFP en fonction de l'énergie produite par la luciférase hRluc (BRET ratio = Emission [510nm-590nm] / Emission [440nm-500nm] (Figure 22 E, Table 9). La mesure du ratio BRET est effectuée à différents temps après addition de coelantérazine h. Comme la protéine CCR5- hRluc seule peut de manière naturelle émettre une certaine quantité d'énergie entre 510 nm et 590 nm (Figure 22 E), nous utiliserons dans la suite du travail la notion de « BRET net » qui correspond donc au « ratio BRET » mesuré pour les différentes conditions de transfection moins le « ratio BRET » des cellules n'exprimant que la CCR5-hRluc seule.

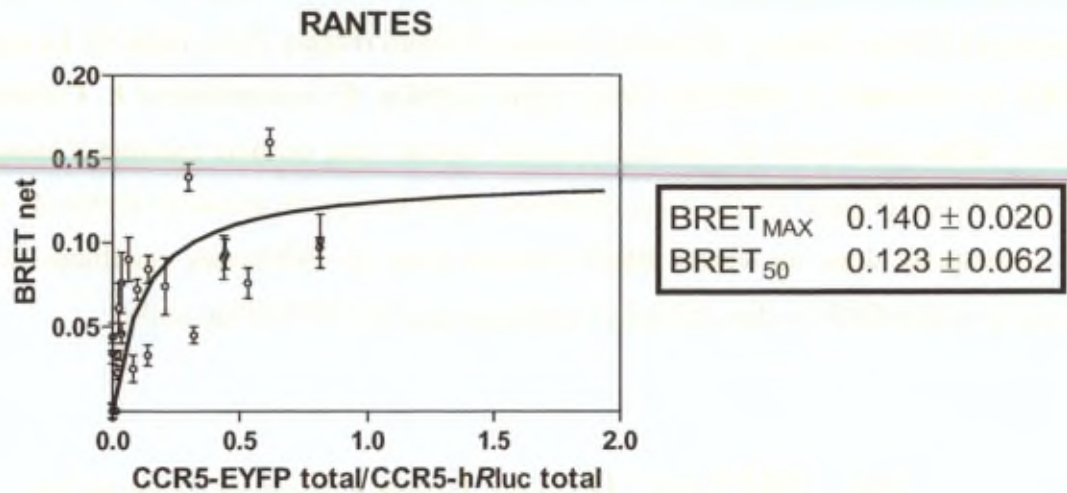
$$\text{Soit : BRET net} = (E_{510-590} / E_{440-500}) - (E_{510-590} / E_{440-500})_{\text{Rluc}}$$

Dans la suite de ce travail, le transfert d'énergie se référera donc au BRET net. La manière graphique classique pour représenter ce type d'expérience est de montrer l'évolution du BRET net en fonction du rapport EYFP/hRluc mesuré. Le choix d'utiliser en abscisse le rapport des valeurs mesurées plutôt que la quantité d'ADN utilisée pour la transfection est due à la variation de l'efficacité de transfection d'une expérience à l'autre. On comprend donc aisément que si l'on transfecte des cellules avec la même quantité d'ADN dans deux expériences différentes, on n'obtiendra pas la même quantité de protéines exprimées au sein des cellules. Les mesures de la quantité de CCR5-hRluc et de CCR5-EYFP que nous effectuons pour chacune de nos expériences nous permet donc de mesurer l'évolution du transfert d'énergie en fonction de la quantité réelle de protéines hRluc et EYFP.

L'analyse des données montre un transfert d'énergie uniquement lorsque CCR5-EYFP est co-exprimé avec CCR5- hRluc (Table 9). Ce transfert d'énergie augmente progressivement avec la quantité de CCR5-EYFP présent au sein des cellules et atteint une valeur plateau représentant la quantité maximale d'énergie transférée aux protéines CCR5-EYFP pour une certaine quantité de CCR5-hRluc. La valeur du BRET_{MAX} serait donc le reflet de la quantité relative maximale de récepteurs participant au transfert d'énergie. La valeur du BRET₅₀ c.-à-d. la quantité de protéines CCR5-EYFP qu'il faut pour avoir la moitié de ce transfert maximal serait dès lors le reflet de l'affinité du récepteur CCR5-EYFP pour le récepteur CCR5- hRluc.

Nos premières expériences montrent qu'il existerait bien un transfert d'énergie, et une interaction entre CCR5-hRluc et CCR5-EYFP en absence de stimuli. Cette expérience a été répétée minimum 4 fois et l'ensemble des résultats est représenté à la figure 23. Cette

a.



b.

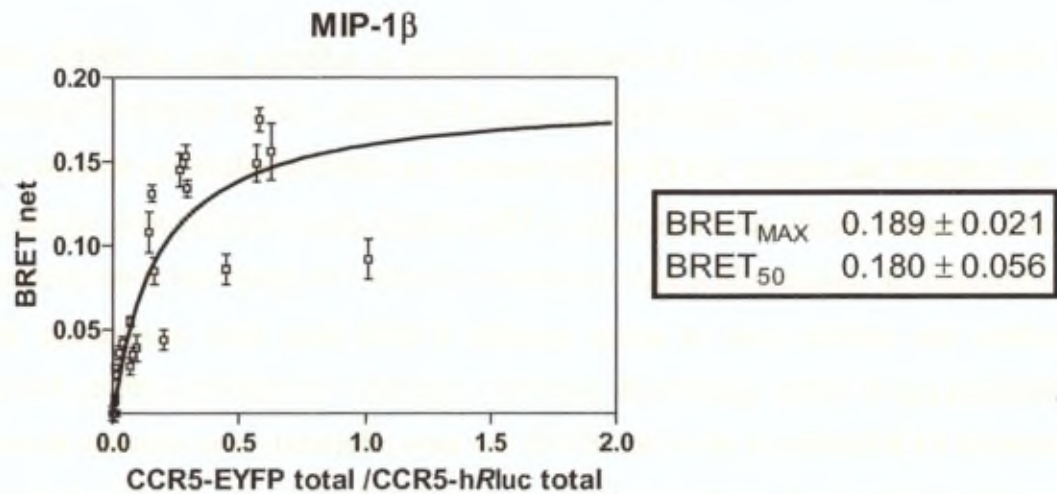


Figure 24. CCR5 homodimérise en l'absence de stimulation par les chimiokines. Les cellules HEK-293T transfectées par une quantité constante de CCR5-hRluc et par une quantité croissante de CCR5-EYFP, sont incubées en présence de coelentérazine. Le transfert d'énergie entre les deux partenaires est mesuré lorsque les cellules sont stimulées par RANTES (a) ou MIP-1 β (b). Les données représentées regroupent les résultats de minimum 4 manipulations ($n \geq 4$) indépendantes. Les valeurs de $BRET_{50}$ (K_D) et de $BRET_{MAX}$ (B_{MAX}), ainsi que l'erreur standard sur ces valeurs sont également présentées.

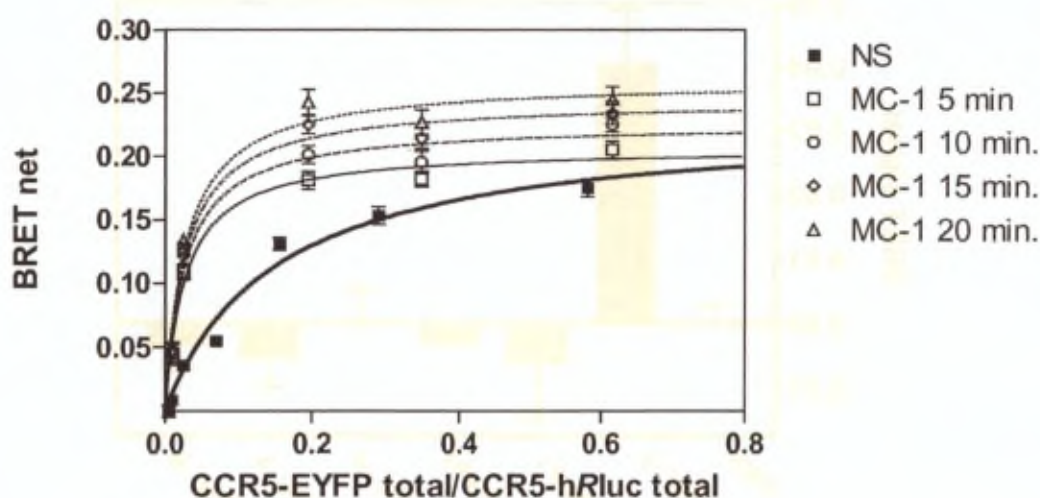


Figure 25. MC-1 induit une augmentation du signal BRET. L'anticorps MC-1 est ajouté juste avant la coelentérazine sur les cellules HEK-293T exprimant CCR5-hRluc et CCR5-EYFP. Le signal BRET a été mesuré toutes les 5 minutes pendant 20 minutes ($n \geq 4$). Le signal BRET obtenu pour les cellules non-stimulées (NS) est également représenté (ligne continue épaisse, carrés noirs) et n'évolue pas en fonction du temps.

	BRET _{MAX}	BRET ₅₀
NS 5'	0,228	0,152
NS 10'	0,229	0,142
NS 15'	0,223	0,121
NS 20'	0,225	0,131
MC-1 5'	0,206	0,027
MC-1 10'	0,226	0,027
MC-1 15'	0,244	0,028
MC-1 20'	0,260	0,028

Table 10. Valeurs des BRET_{MAX} et des BRET₅₀ pour les homodimères de CCR5. Les valeurs des réponses BRET ont été déterminées par régression non linéaire via le programme Graphpad Prism, via l'équation $Y = \text{BRET}_{\text{MAX}} * X / (\text{BRET}_{50} + X)$. Les données reprises dans ce tableau sont représentatives d'au moins quatre expériences indépendantes

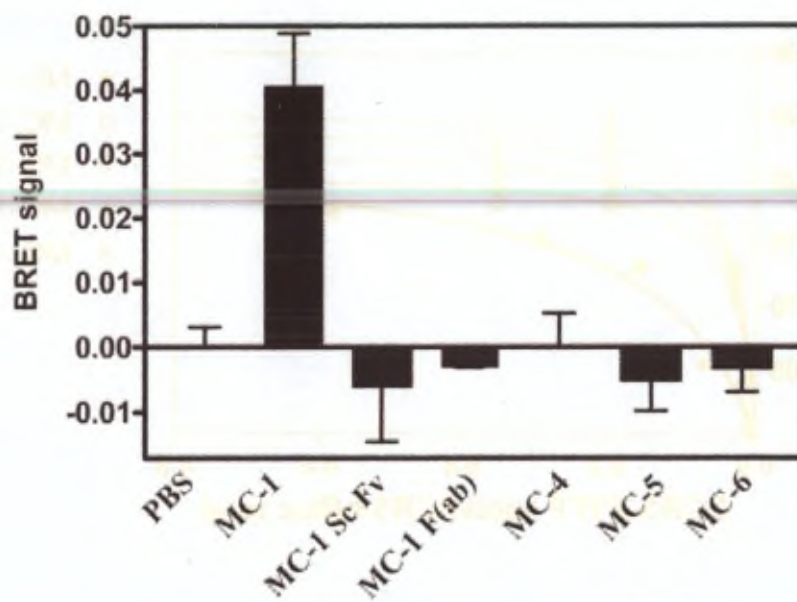


Figure 26. MC-1 sous sa forme bivalente induit une augmentation du signal BRET. Les cellules HEK-293T exprimant CCR5-hRluc et CCR5-EYFP ont été incubées avec la coelentérazine, et les signaux de luminescence et de fluorescence ont été quantifiés avant et après l'addition des anticorps monoclonaux utilisés. Les données représentées correspondent à la variation du signal BRET comparé à la ligne de base (correspondant à l'addition du tampon PBS seul) après 10 minutes d'incubation avec les anticorps. Seul la forme bivalente de MC-1 induit une augmentation du signal BRET. Les deux formes monovalentes (MC-1 ScFv et MC-1 F(ab)) sont par contre sans effet.

compilation montre la bonne reproductibilité de la méthode et permet de déterminer les paramètres $BRET_{50}$ 0.15 et $BRET_{MAX}$ 0.23.

2.1.6. Effets des ligands de CCR5 sur la dimérisation du récepteur

La stimulation des cellules par RANTES (Figure 24a) et MIP-1 β (Figure 24b) n'augmente pas le signal BRET obtenu, en comparaison du signal observé pour les cellules non-stimulées (Figure 23). En effet, les $BRET_{50}$ calculés sont comparables : 0.15 ± 0.04 lorsque les cellules ne sont pas stimulées et respectivement 0.12 ± 0.06 et 0.18 ± 0.06 lorsque les cellules sont stimulées par RANTES et MIP-1 β . Ces résultats démontrent donc que CCR5 forme bien des homodimères de manière constitutive au sein des cellules HEK-293T, et que l'état d'activation du récepteur ne semble pas modifier l'intensité du profil du signal BRET obtenu.

2.1.7. Effet de MC-1 sur la dimérisation du récepteur

L'addition de l'anticorps monoclonal MC-1, dirigé contre la seconde boucle extracellulaire de CCR5, induit une augmentation significative du transfert d'énergie (Figure 25). Cet effet, suite à l'ajout de cet anticorps, la valeur du $BRET_{50}$ diminue d'un facteur 5 ($BRET_{50}$ d'une valeur égale à 0.03). Ce résultat indique qu'il faut donc moins de récepteur CCR5-EYFP pour accepter l'énergie émise par le récepteur CCR5-hRluc. Ce résultat est en accord avec ce que nous avons montré précédemment (Issafras et al., 2002; Blanpain et al., 2002). Comme les isoformes monovalentes de cet anticorps (ScFv-MC-1, fragment correspondant à une seule chaîne de MC-1 et MC-1 F(ab)) n'induisent pas d'augmentation du transfert d'énergie (Figure 26), il a été proposé l'hypothèse que MC-1 était capable de recruter de nouveaux récepteurs aptes à participer au transfert d'énergie. Etant donné que MC-1 ne pénètre pas dans les cellules, ce résultat a comme conséquence de prouver qu'une portion significative du transfert d'énergie que nous observons est due à des interactions de récepteurs en surface.

Nous avons observé une augmentation progressive du signal en fonction du temps, sans que celui-ci ne se stabilise, même après 30 minutes de stimulation par l'anticorps (Figure 25, table 10). Cet effet progressif pourrait être dû au rapprochement de dimères ou d'oligomères supplémentaires, recrutés par l'effet de pontage de MC-1.

2.1.8. CCR2b homodimérise en l'absence de ligands

Le récepteur CCR2b partage 75 % d'identité avec CCR5 (Samson et al., 1996a; Samson et al., 1996c). Même si la pharmacologie des deux récepteurs diffère, CCR2b reste néanmoins le

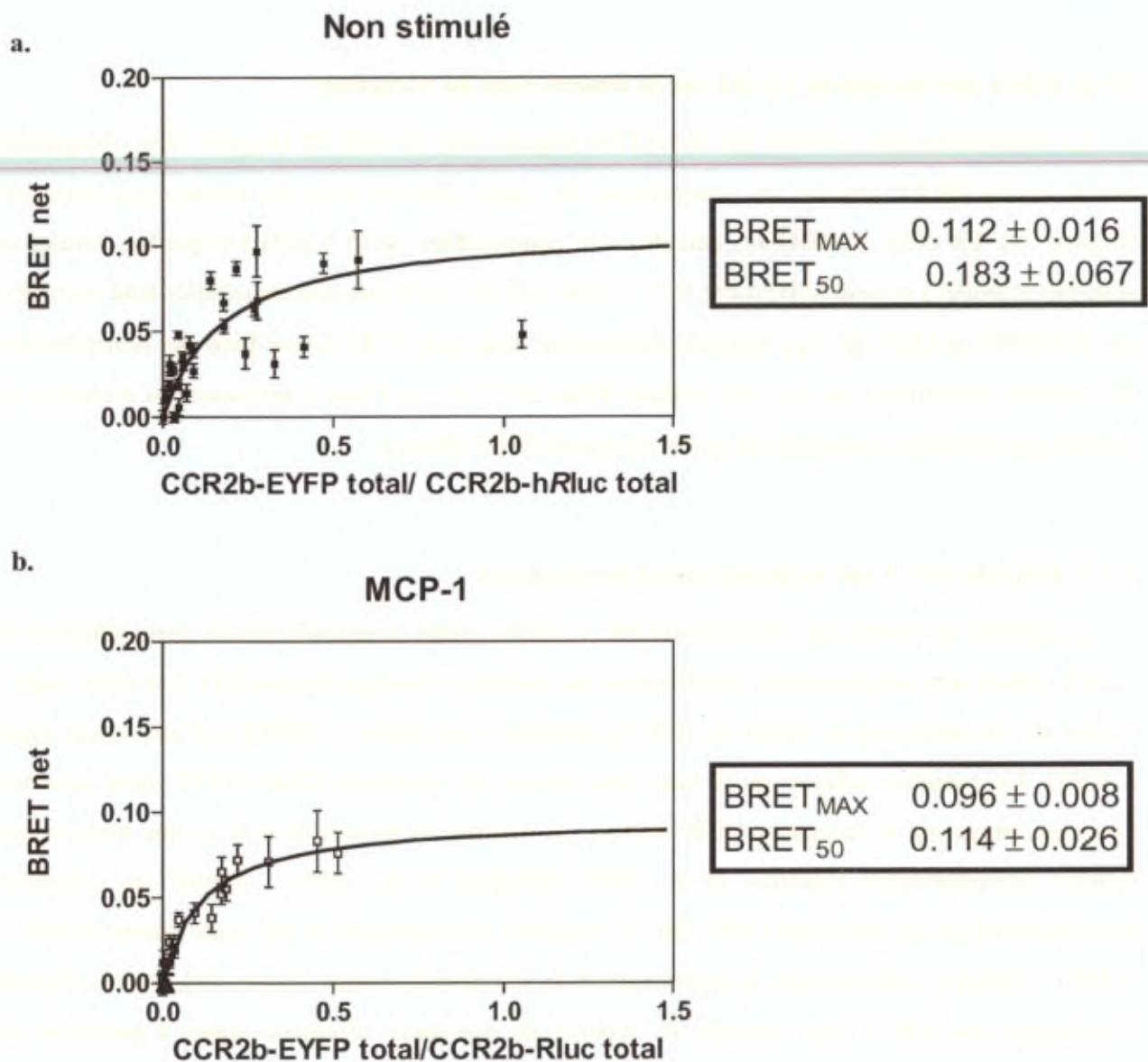


Figure 27. CCR2b homodimérise en l'absence de stimulation par les chimiokines. Les cellules HEK-293T transfectées par une quantité constante de CCR2b-hRluc et par une quantité croissante de CCR2b-EYFP, sont incubées en présence de coelentérazine. Le transfert d'énergie entre les deux partenaires est mesuré lorsque les cellules sont stimulées par MCP-1 (b), et comparé au signal obtenu pour les cellules non stimulées (a). Les données représentées regroupent les résultats de minimum 4 manipulations ($n \geq 4$) indépendantes. Les valeurs de $BRET_{50}$ (K_D) et de $BRET_{MAX}$ (B_{MAX}), ainsi que l'erreur standard sur ces valeurs sont également présentées.

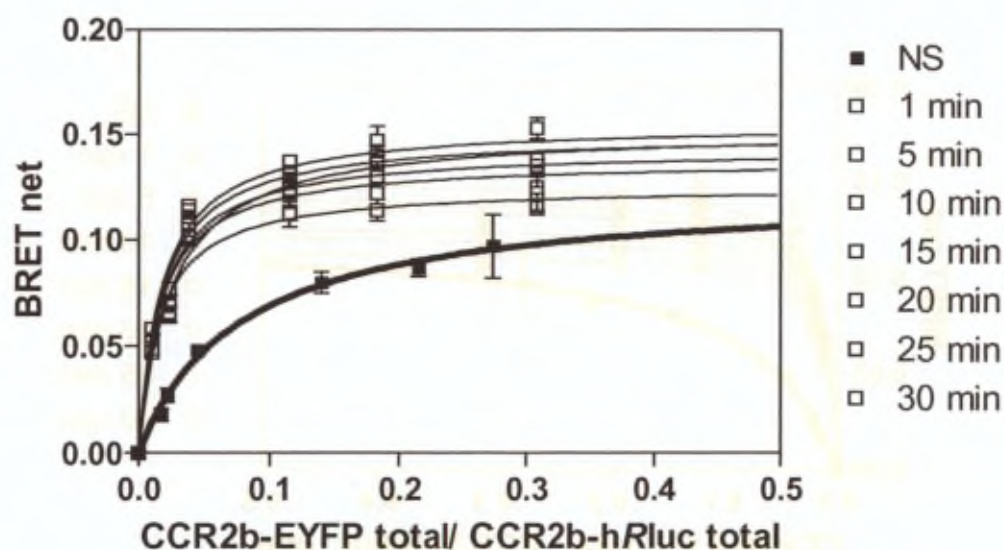


Figure 28. Doc-1 induit une augmentation du signal BRET. L'anticorps Doc-1 est ajouté juste avant la coelentérazine sur les cellules HEK-293T exprimant CCR2b-hRluc et CCR2b-EYFP. Le signal BRET a été mesuré toutes les 5 minutes pendant 30 minutes ($n = 2$). Le signal BRET obtenu pour les cellules non-stimulées (NS) est également représenté (ligne épaisse) et n'évolue pas en fonction du temps.

	$BRET_{MAX}$	$BRET_{50}$
NS 5'	0,123	0,078
Doc-1 5'	0,125	0,016
Doc-1 10'	0,152	0,025
Doc-1 15'	0,138	0,016
Doc-1 20'	0,143	0,018
Doc-1 25'	0,150	0,018
Doc-1 30'	0,155	0,018

Table 11. Valeurs des $BRET_{MAX}$ et des $BRET_{50}$ pour les homodimères de CCR2b en présence de Doc-1. Les valeurs des réponses BRET ont été déterminées par régression non linéaire en utilisant le programme Graphpad Prism, via l'équation $Y = BRET_{MAX} * X / (BRET_{50} + X)$. Les données reprises dans ce tableau sont représentatives de deux expériences indépendantes

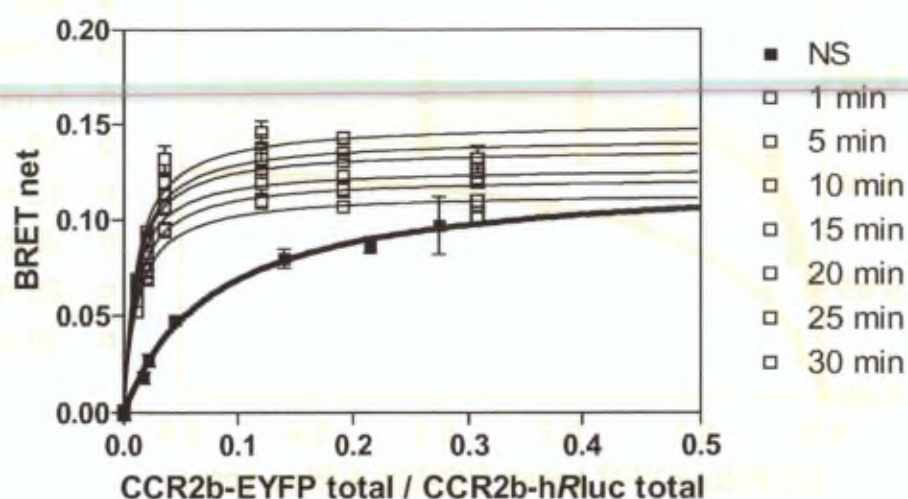
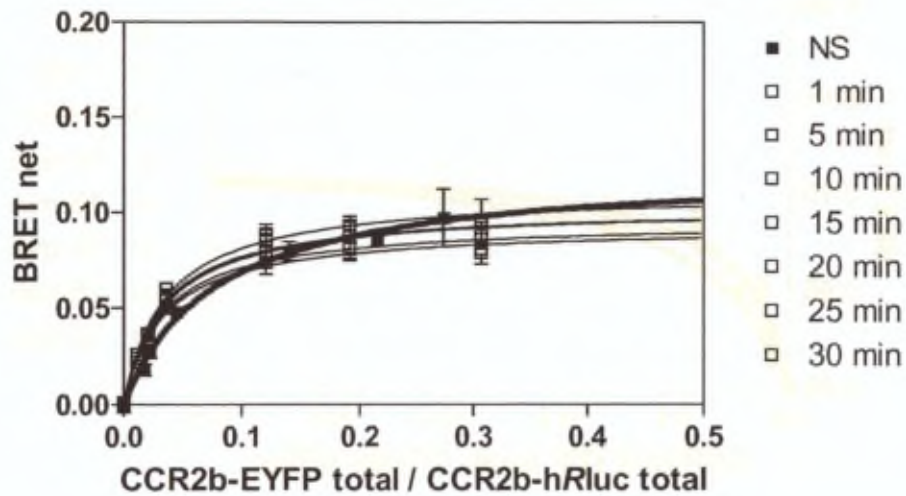


Figure 29. Doc-2 induit une augmentation du signal BRET. L'anticorps Doc-2 est ajouté juste avant la coelentérazine sur les cellules HEK-293T exprimant CCR2b-hRluc et CCR2b-EYFP. Le signal BRET a été mesuré toutes les 5 minutes pendant 30 minutes ($n = 2$). Le signal BRET obtenu pour les cellules non-stimulées (NS) est également représenté (ligne épaisse) et n'évolue pas en fonction du temps.

	BRET _{MAX}	BRET ₅₀
NS 5'	0,123	0,078
Doc-2 5'	0,114	0,012
Doc-2 10'	0,122	0,011
Doc-2 15'	0,127	0,010
Doc-2 20'	0,137	0,010
Doc-2 25'	0,143	0,011
Doc-2 30'	0,151	0,011

Table 12. Valeurs des BRET_{MAX} et des BRET₅₀ pour les homodimères de CCR2b en présence de Doc-2. Les valeurs des réponses BRET ont été déterminées par régression non linéaire en utilisant le programme Graphpad Prism, via l'équation $Y = \text{BRET}_{\text{MAX}} * X / (\text{BRET}_{50} + X)$. Les données reprises dans ce tableau sont représentatives de deux expériences indépendantes

a.



b.

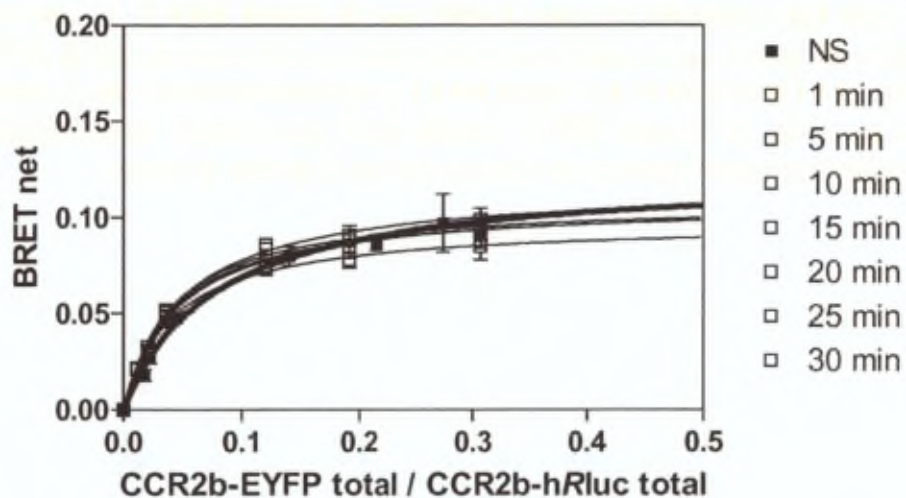


Figure 30. Doc-3 et Doc-4 ne modulent pas les homodimères CCR2b. Les anticorps Doc-3 (a) et Doc-4 (b) sont ajoutés juste avant la coelentérazine sur les cellules HEK-293T exprimant CCR2b-hRluc et CCR2b-EYFP. Le signal BRET a été mesuré toutes les 5 minutes pendant de 30 minutes ($n = 2$). Le signal BRET obtenu pour les cellules non-stimulées (NS) est également représenté (ligne épaisse) et n'évolue pas en fonction du temps.

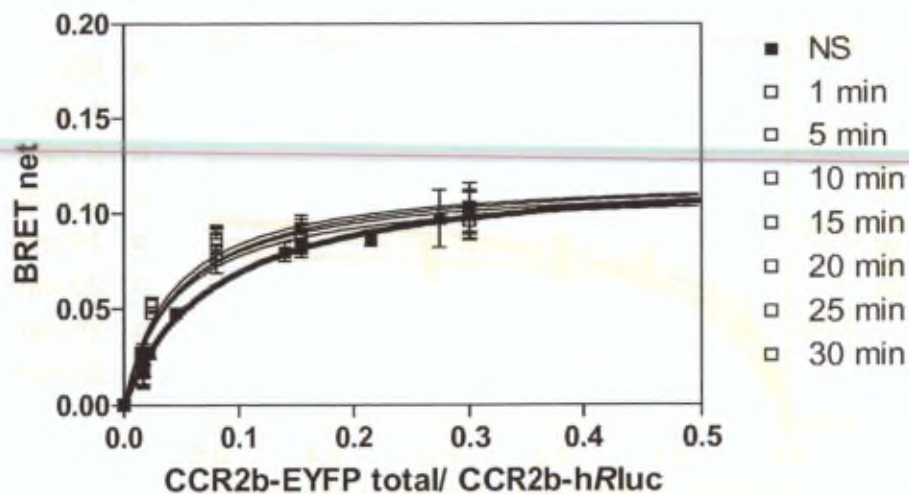


Figure 31. Une IgG contrôle n'a pas d'effet sur le signal BRET. L' anticorps contrôle d'isotype IgG₁ est ajouté juste avant la coelentérazine sur les cellules HEK-293T exprimant CCR2b-hRluc et CCR2b-EYFP. Le signal BRET a été mesuré toutes les 5 minutes pendant 30 minutes (n = 2). Le signal BRET obtenu pour les cellules non-stimulées (NS) est également représenté (ligne épaisse) et n'évolue pas en fonction du temps.

récepteur au chimiokine le plus proche de CCR5. Dès lors, il n'était donc pas exclu que cette protéine existe également sous la forme d'homo-oligomères constitutifs.

Nous avons mesuré le signal BRET obtenu lors de la co-expression de CCR2b-hRluc et CCR2b-EYFP au sein des cellules HEK-293T. Les résultats montrent clairement un transfert d'énergie entre CCR2b-hRluc et CCR2b-EYFP (Figure 27a). Tout comme pour CCR5, il y a bien une interaction par homodimérisation de CCR2b en l'absence de ligand. La stimulation des cellules par MCP-1, un agoniste spécifique de CCR2b (Figure 27b) ne modifie pas le signal BRET. Les valeurs de $BRET_{50}$ sont en effet comparables à celles obtenues pour des cellules non-stimulées : 0.11 ± 0.06 versus 0.18 ± 0.06 pour les cellules non-stimulées.

2.1.9. Modulation de l'homodimérisation de CCR2b par des anticorps monoclonaux

Plusieurs anticorps monoclonaux spécifiques de CCR2b et développés par Mathias Mack (Munich) ont été caractérisés dans notre laboratoire. Les anticorps Doc-1, Doc-2 et Doc-3 reconnaissent les boucles extracellulaires du récepteur, tandis que Doc-4 reconnaît spécifiquement le domaine N-terminal (Springael et al., 2004). Sur base des observations faites sur MC-1 et son effet sur la dimérisation de CCR5, nous avons testé l'influence de ces anticorps anti-CCR2b sur le transfert d'énergie. La mesure du signal BRET a été effectuée sur des cellules HEK transfectées par CCR2b-hRluc et CCR2b-EYFP avant et après addition des différents anticorps Doc. Nous avons observé que les anticorps Doc-1 et Doc-2 augmentent de manière significative le signal BRET (Figures 28 et 29). Les valeurs de $BRET_{50}$ obtenues diminuent de 2 à 6 fois, et sont de l'ordre de 0.016 ± 0.003 et 0.011 ± 0.002 respectivement, comparé à 0.078 ± 0.009 lorsque les cellules ne sont pas incubées en présence de l'anticorps (Tables 11 et 12).

Les anticorps Doc-3 et Doc-4, ainsi qu'une immunoglobuline contrôle de même isotype que les anticorps Doc (IgG_1) n'ont par contre pas d'effet significatif sur la mesure du BRET (Figures 30 et 31). Le signal obtenu reste relativement stable au cours du temps, et les valeurs de $BRET_{50}$ sont comparables aux résultats obtenus pour les cellules non traitées (0.0041 ± 0.004 pour Doc-3 et 0.043 ± 0.003 pour Doc-4).

Tous les anticorps Doc testés inhibent à des degrés divers la liaison de MCP-1 sur le récepteur CCR2b. Doc-1, -2, et -3 bloquent la migration cellulaire en présence de gradients de MCP-1 et MCP-3. Des mesures d'expression de surface par FACS sur des PBMC ont montré que Doc-2 et Doc-3 induisent l'internalisation de CCR2b, tandis que Doc-1 inhibe l'endocytose induite par MCP-1. Les deux anticorps Doc-2 et Doc-3 induisent donc l'internalisation de CCR2b, mais ne modulent pas l'oligomérisation de la même manière. De plus, l'anticorps Doc-1 qui augmente le transfert d'énergie, bloque l'endocytose induite par MCP-1. Il ne semble donc

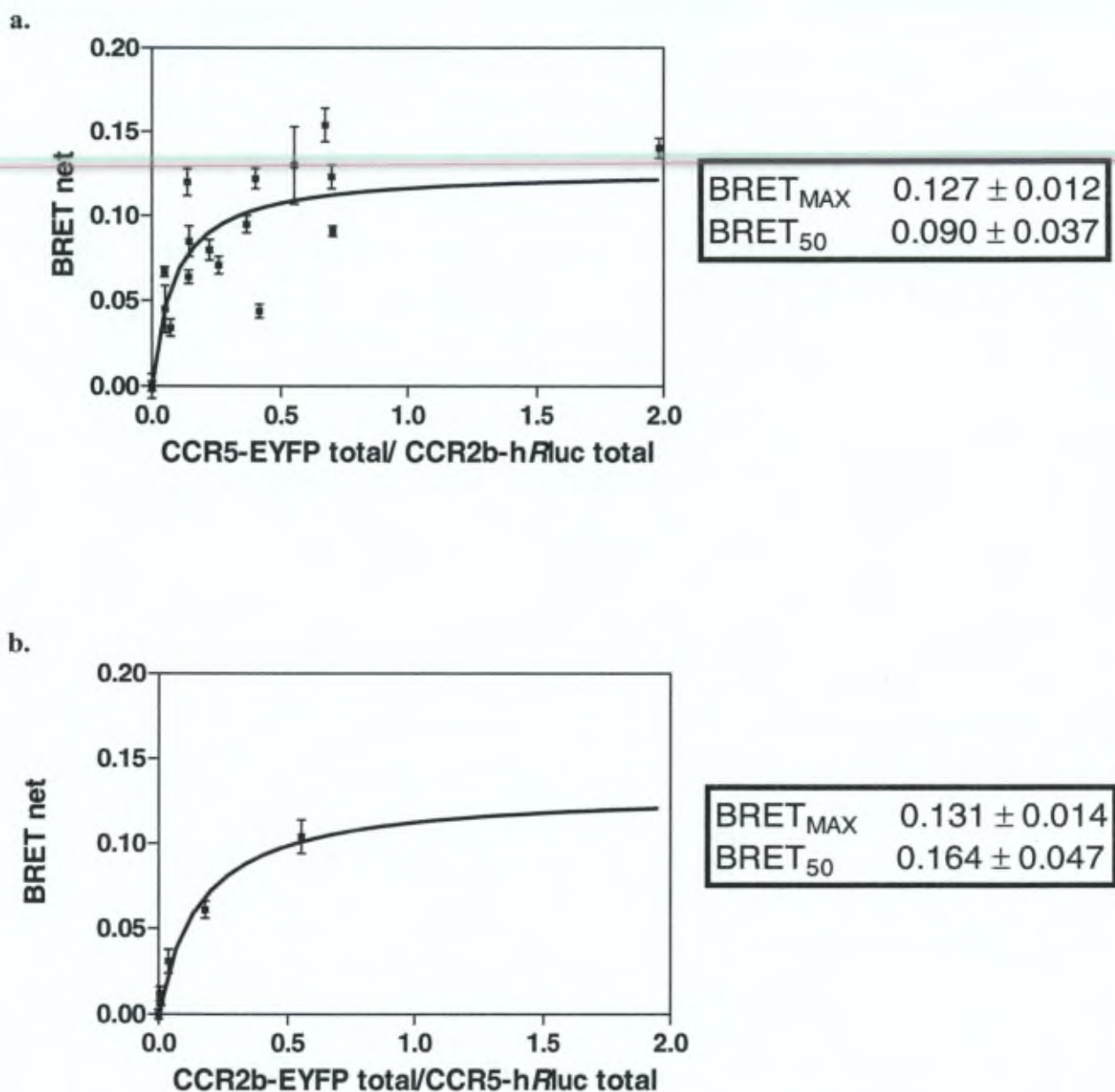


Figure 32. Les hétérodimères CCR5/CCR2b se forment en l'absence de stimulation. Les cellules HEK293T ont été transfectées par (a) CCR2b-hRluc et CCR5-EYFP ($n = 3$) ou (b) CCR5-hRluc et CCR2b-EYFP ($n = 2$) et analysées pour l'intensité du transfert d'énergie entre les partenaires. Les valeurs de $BRET_{50}$ et de $BRET_{MAX}$, ainsi que l'erreur standard sont présentées dans les tables annexes.

pas avoir de relation directe entre la capacité des anticorps à induire l'endocytose et leur aptitude à favoriser l'oligomérisation de CCR2b.

Nous ne savons en fait pas actuellement si les anticorps Doc-1 et Doc-2 induisent un changement conformationnel qui favorise le transfert d'énergie au sein de dimères ou s'ils rapprochent des dimères préexistants, comme semble le faire le monoclonal MC-1 vis à vis de CCR5. Des expériences sont actuellement en cours dans notre laboratoire afin d'isoler des isoformes monovalentes de ces anticorps, et de déterminer leur effet sur l'internalisation et le transfert d'énergie.

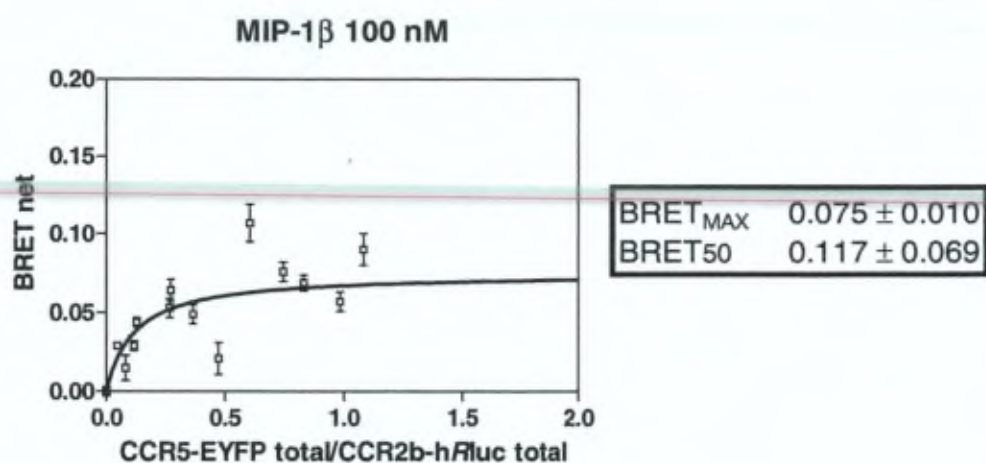
2.1.10. CCR5 et CCR2b hétérodimérisent en l'absence de ligands

CCR5 et CCR2b partagent 75 % d'identité, et les différences majeures résident essentiellement au niveau des domaines extracellulaires et de l'extrémité C-terminale intracellulaire. Au sein de leurs segments transmembranaires, ils partagent 91 % d'identité (Samson et al., 1996c; Samson et al., 1996a). Etant donné cette forte similarité, particulièrement au niveau des domaines transmembranaires, il apparaissait probable que ces deux récepteurs puissent également interagir d'autant plus qu'une telle interaction a été proposée sur base d'autres techniques (Mellado et al., 2001). Nous avons donc testé cette hypothèse en mesurant le signal BRET obtenu lorsque les cellules sont transfectées par CCR2b-hRluc et CCR5-EYFP. Le signal mesuré met en évidence l'association des deux récepteurs, indépendamment de la présence de ligands (Figure 32a). L'expérience a été renouvelée sur des cellules HEK-293T transfectées par CCR5-hRluc et CCR2b-EYFP, et les résultats confirment bien l'existence d'une hétérodimérisation des récepteurs, en l'absence de stimulation par les chimiokines (Figure 32b). Les valeurs de BRET50 sont similaires, de l'ordre de 0.09 ± 0.04 pour le premier couplage et 0.16 ± 0.05 pour le second. L'importance du transfert d'énergie entre CCR5 et CCR2b n'apparaît donc pas comme dépendante de la nature du récepteur qui porte hRluc ou EYFP. Les paramètres des courbes de BRET observées pour les hétérodimères CCR5/CCR2b sont très comparables à ceux dérivés des expériences analysant les homodimères CCR5 ou CCR2b. Ceci suggère que « l'affinité » de CCR5 pour CCR5 ou CCR2b est comparable, et que la formation d'homo- ou d'hétérodimères au sein de cellules exprimant les deux récepteurs est simplement régie par l'expression relative de chacun d'entre eux.

2.1.11. Modulation de l'hétérodimérisation par les chimiokines

Lorsque les cellules exprimant la combinaison CCR2b-hRluc/CCR5-EYFP sont stimulées par MIP-1 β , un agoniste de CCR5 ou par MCP-1, le ligand de CCR2b, une légère diminution du

a.



b.

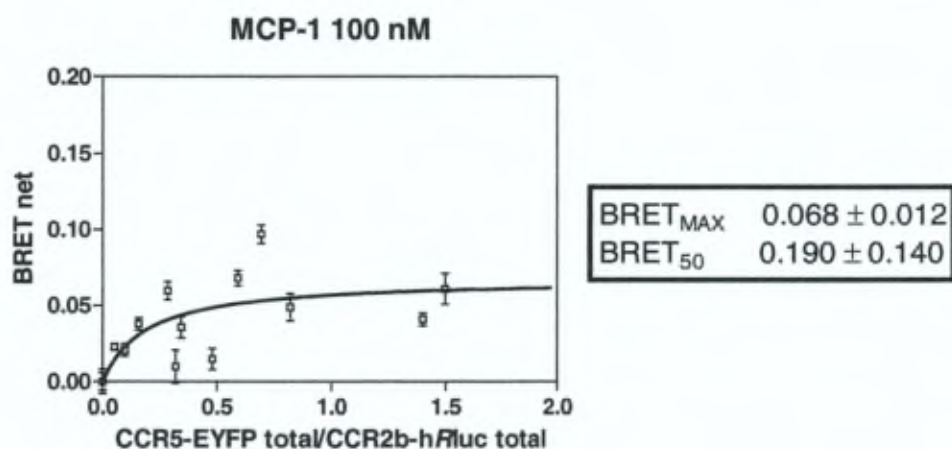


Figure 33. Les chimiokines modulent de manière négative le signal BRET. Le transfert d'énergie entre les deux partenaires est mesuré lorsque les cellules HEK-293T transfectées par la combinaison CCR2b-hRluc/CCR5-EYFP sont stimulées par MIP-1 β (a) ou par MCP-1 (b). Les données représentées regroupent les résultats de 3 expériences indépendantes. Les valeurs de BRET₅₀ et de BRET_{MAX}, ainsi que l'erreur standard sont présentées dans les tables annexées aux graphes.

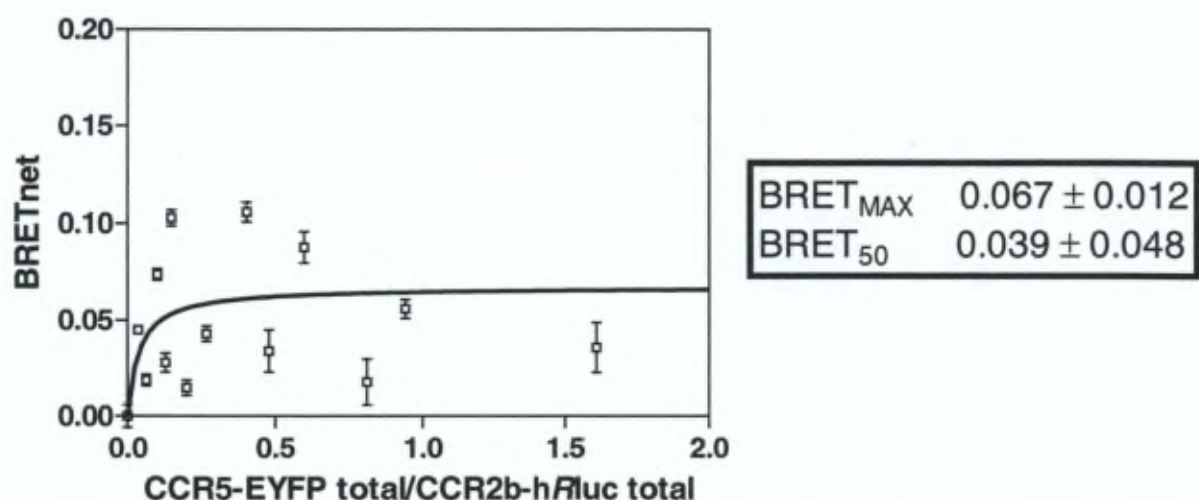
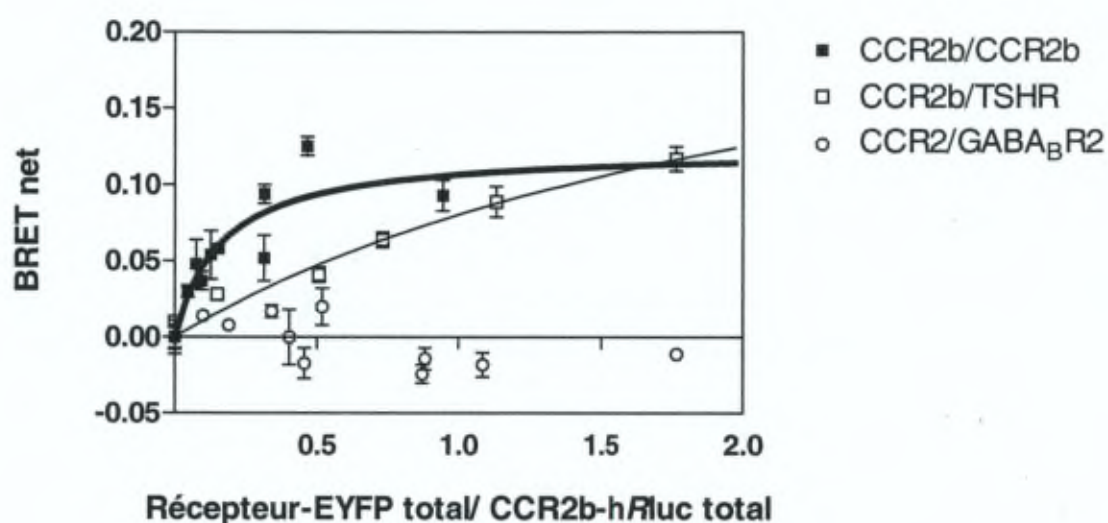


Figure 34. L'anticorps MC-1 module de manière négative le signal BRET. Le transfert d'énergie entre les deux partenaires est mesuré lorsque les cellules HEK-293T transfectées par la combinaison CCR2b-hRluc/CCR5-EYFP sont traitées par MC-1. Les données représentées regroupent les résultats de 2 expériences indépendantes. Les valeurs de BRET₅₀ (K_D) et de BRET_{MAX} (B_{MAX}), ainsi que l'erreur standard sur ces valeurs sont présentées dans les tables annexées aux graphes.



	CCR2b/CCR2b	CCR2b/TSHR
BRET _{MAX} ± S.E.	0.124 ± 0.022	0.277 ± 0.105
BRET ₅₀ ± S.E	0.159 ± 0.075	2.43 ± 1.38

Figure 35. CCR2b ne dimérise pas avec des récepteurs non-apparentés. Les cellules HEK293 transfectées par une quantité constante de CCR2b-hRluc et par une quantité croissante des récepteurs TSHR et GABA_BR2 fusionnés à la EYFP, sont incubées en présence de coelentérazine. Les données représentées regroupent les résultats de 2 manipulations indépendantes. Les valeurs de BRET₅₀ et de BRET_{MAX} pour les homodimères (CCR2b/CCR2b) et pour le couple CCR2b-hRluc et RTSH-EYFP (CCR2b/TSHR) sont représentés dans le tableau.

signal BRET est observée (Figure 33a et b). En effet, les valeurs de $BRET_{MAX}$ obtenues sont de l'ordre de 0.07 ± 0.01 pour chacune des stimulations, comparées à 0.13 ± 0.01 pour les cellules non stimulées. Les valeurs de $BRET_{50}$ ne semblent cependant pas modifiées. L'activation d'un des récepteurs du complexe hétérodimérique semble donc modifier l'interaction de manière à ce que la proportion de complexes CCR5/CCR2b diminue. Une interprétation de ces résultats pourrait être que la stimulation d'un récepteur par son ligand entraîne la dissociation du dimère avant son internalisation.

2.1.12. MC-1 module négativement la formation des hétérodimères CCR5/CCR2b

La stimulation des cellules par MC-1 entraîne également une diminution du signal BRET qui se traduit par une diminution du $BRET_{MAX}$ atteint (Figure 34). Les valeurs de $BRET_{50}$ ne semblent cependant pas modifiées (0.04 ± 0.05). L'effet observé sur les hétérodimères est donc à l'opposé de ce que nous avons obtenu pour l'effet de MC-1 sur les homodimères de CCR5. L'ensemble de ces observations suggère que l'anticorps MC-1 est capable de provoquer l'oligomérisation de CCR5, tout en dissociant les hétérodimères CCR5-CCR2b préexistants. CCR5 serait ensuite internalisé, ce qui empêcherait de manière plus durable l'interaction avec CCR2b.

2.1.13. CCR2b et CCR5 n'interagissent pas avec des récepteurs non-apparentés

Afin de tester la spécificité du signal BRET observé, nous avons utilisé comme contrôles deux récepteurs non apparentés à CCR5 et CCR2b, le récepteur $GABA_{B2}$ d'une part, et le récepteur de la thyrotropine (TSHR) d'autre part. Ces deux récepteurs ont été fusionnés à la EYFP, et utilisés dans des expériences de co-transfections avec les plasmides codant pour CCR5-hRluc et CCR2b-hRluc. Ces expériences n'ont pas donné de signal BRET significatif (Figure 35), témoignant bien de l'effet spécifique de l'interaction observée entre homo- ou hétérodimères de CCR5 et CCR2b.

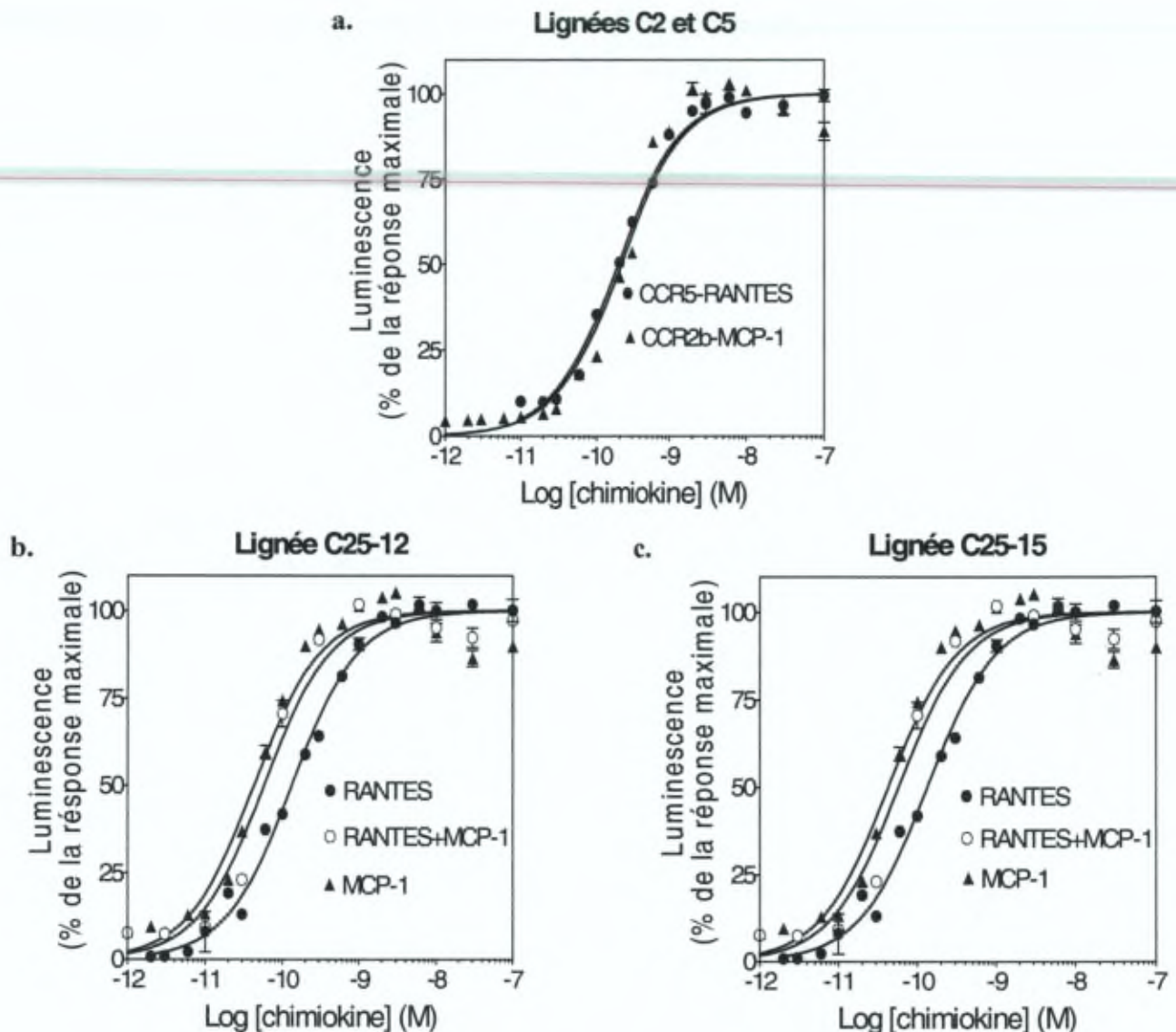


Figure 37. Réponses fonctionnelles des hétérodimères CCR5/CCR2b. Les réponses fonctionnelles des cellules co-exprimant CCR5 et CCR2b (b, c) ou chaque récepteur individuellement (a) ont été mesurées par le système aequorine. Les clones C25-12 (b) et C25-15 (c) ont été incubés avec un large éventail de concentrations de RANTES, MCP-1 ou un mélange équimolaire des deux chimiokines, et la luminescence a été mesurée pendant 30 secondes. Les cellules CHO-K1 exprimant CCR5 (C5) ou CCR2b (C2) ont été incubées avec leurs ligands respectifs et utilisés comme contrôles positifs (a). Les résultats ont été normalisés par rapport à la luminescence basale des cellules en l'absence d'agoniste (0 %) et par rapport à la réponse maximale obtenue pour chaque récepteur avec la chimiokine considérée (100 %).

EC50 (moyenne $\pm$ S.E.M)	C5	C2	C25-12	C25-15
RANTES	0.19 $\pm$ 0.04	-	0.17 $\pm$ 0.02	0.13 $\pm$ 0.03
MCP-1	-	0.21 $\pm$ 0.06	0.07 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.006
RANTES + MCP-1	-	-	0.06 $\pm$ 0.01	0.65 $\pm$ 0.01

Table 13. Comparaison des EC50 déterminées pour les réponses fonctionnelles des différentes lignées. La mobilisation de Ca^{2+} a été induite par stimulation des différentes lignées clonales par des concentrations croissantes de RANTES, MCP-1, ou un mélange des deux chimiokines. Le flux calcique a été mesuré par la luminescence de l'aequorine. Les EC_{50} des réponses fonctionnelles ont été déterminés par régression non linéaire en utilisant le programme Graphpad Prism et un modèle de dose-réponse sigmoïdal. Les données reprises dans ce tableau représentent la moyenne et l'erreur standard sur la moyenne pour au moins trois expériences indépendantes.

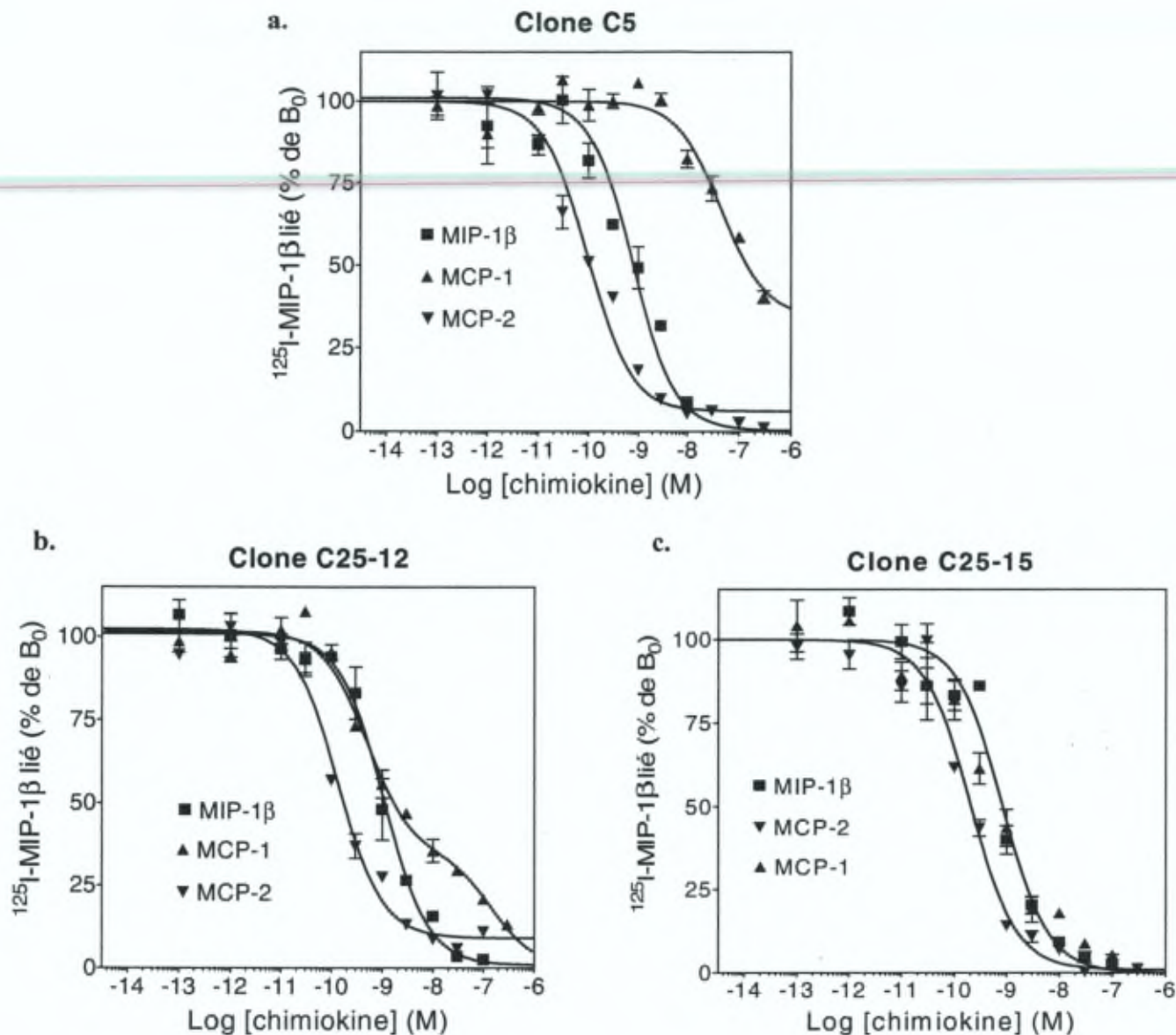


Figure 38. MCP-1 déplace la liaison de ^{125}I -MIP-1 β sur les hétérodimères CCR5/CCR2b.

Des expériences de liaison ^{125}I -MIP-1 β sur des préparations de membranes des clones C5 (a), C25-12 (b) et C25-15 (c) ont été réalisées en utilisant les compétiteurs MIP-1 β , MCP-1 et MCP-2. Les membranes cellulaires ont été incubées avec diverses concentrations de compétiteurs, et le déplacement de la liaison a été mesuré dans un compteur à scintillation. MIP-1 β et MCP-2 déplacent la liaison de manière similaire pour les trois clones étudiés. Comme décrit précédemment, MCP-1 apparaît comme un ligand de faible affinité pour CCR5 (a), mais déplace de manière beaucoup plus efficace la liaison de ^{125}I -MIP-1 β sur les membranes exprimant les hétérodimères CCR5/CCR2b (b, c). Les résultats ont été normalisés pour la liaison non-spécifique déterminée en présence de 300 nM de MIP-1 β (0%) et la liaison spécifique en l'absence de compétiteur (100%). Les données présentées sont représentatives d'au moins trois expériences indépendantes. Tous les points ont été réalisés en triplicats (barres d'erreurs : s.e.m). Des déplacements similaires par MIP-1 α et RANTES ont également été réalisés avec des résultats comparables à ceux présentés pour MIP-1 β et MCP-2.

2.2. Etudes des implications fonctionnelles de la co-expression des récepteurs CCR5 et CCR2b

2.2.1. La co-stimulation de CCR5 et CCR2b ne démontre pas de coopérativité dans l'activation des cascades intracellulaires

CCR5 et CCR2b ont été précédemment décrits comme agissant de manière synergique, induisant des réponses calciques pour des concentrations de chimiokines 10- à 100-fois plus basses, lorsque les deux récepteurs co-exprimés sont stimulés simultanément par leurs agonistes respectifs (Mellado et al., 2001) (Figure 36). Nous avons donc répété ces expériences dans nos lignées clonales, en établissant des courbes dose-réponse détaillées, à l'aide du test aequorine permettant de mesurer la mobilisation de calcium intracellulaire. MCP-1 et RANTES induisent chacun la mobilisation de calcium avec des valeurs d' EC_{50} en accord avec ce qui a été observé précédemment pour les lignées C5 et C2 (Table 13). La stimulation simultanée par MCP-1 et RANTES en quantités équimolaires ne modifie pas de manière significative les réponses obtenues, quelles que soient les concentrations testées (Figure 37b et c). Nous observons une très légère augmentation des réponses aux basses concentrations de chimiokines, lorsqu'elles sont appliquées simultanément. Cette augmentation ne reflète cependant qu'un effet additif dû à la stimulation des deux récepteurs à la fois. Les hétérodimères CCR5/CCR2b semblent donc induire une réponse fonctionnelle calcique similaire à celle des cellules de référence C5 et C2 exprimant un des deux récepteurs seulement. Ces résultats semblent dès lors indiquer un comportement indépendant des deux récepteurs en termes de stimulation fonctionnelle des cascades intracellulaires.

2.2.2. MCP-1 inhibe la liaison de MIP-1 β sur les membranes des cellules co-exprimant CCR5 et CCR2b

Afin de déterminer si l'hétérodimérisation affecte les propriétés de liaison des récepteurs, nous avons examiné la capacité des agonistes de CCR2b à moduler la liaison d'un ligand de CCR5, 125 I-MIP-1 β (Figure 38). MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES et MCP-2 inhibent la liaison de 125 I-MIP-1 β sur les membranes exprimant CCR5 seul (Figure 38a), tandis que MCP-1 déplace faiblement cette liaison ($IC_{50} = 212$ nM), en accord avec la pharmacologie décrite auparavant (Blanpain et al., 1999b). Dans le cas des membranes préparées à partir de cellules co-exprimant les deux récepteurs (C25-12), MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES et MCP-2 se comportent d'une manière similaire, tandis que l'affinité apparente de MCP-1 se trouve fortement augmentée (Figure 38b). Le profil de la courbe suggère de plus la présence de deux sites de liaisons, l'un de

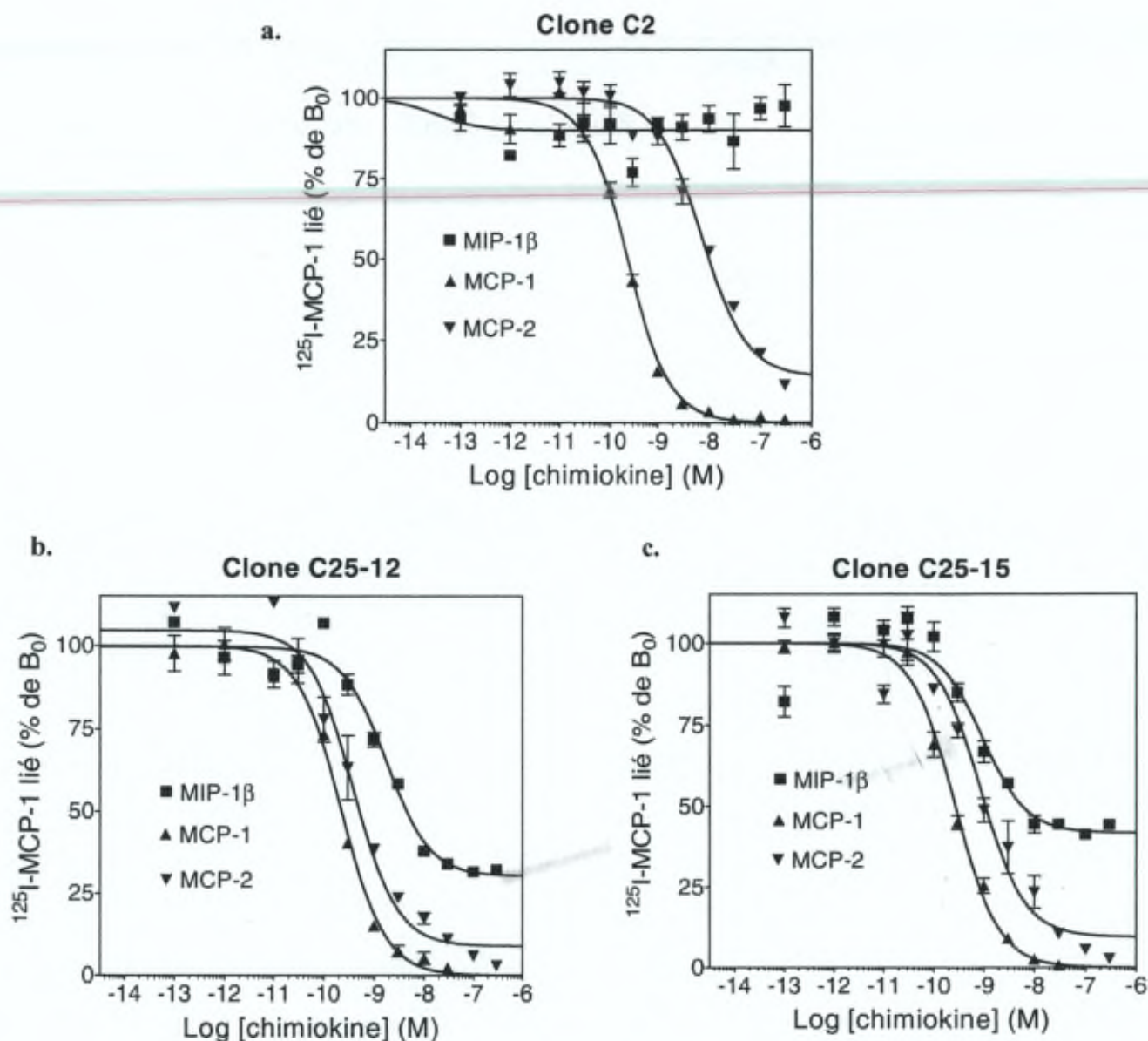


Figure 39. MIP-1 β déplace la liaison de ^{125}I -MCP-1 sur les hétérodimères CCR5/CCR2b. Des expériences de liaison de ^{125}I -MCP-1 sur des préparations de membranes des clones C2 (a), C25-12 (b) et C25-15 (c) ont été réalisées en utilisant les compétiteurs MIP-1 β , MCP-1 et MCP-2. Les membranes cellulaires ont été incubées avec diverses concentrations de compétiteurs, et le déplacement de la liaison a été mesuré dans un compteur à scintillation. MCP-1 et MCP-2 déplacent la liaison de manière similaire pour les trois clones étudiés. Comme décrit précédemment, MIP-1 β ne se lie pas à CCR2b (a), mais déplace efficacement la liaison de ^{125}I -MCP-1 sur les membranes exprimant les hétérodimères CCR5/CCR2b (b, c). Les résultats ont été normalisés pour la liaison non-spécifique déterminée en présence de 300 nM de MCP-1 (0%) et la liaison spécifique en l'absence de compétiteur (100%). Les données présentées sont représentatives d'au moins trois expériences indépendantes. Tous les points ont été réalisés en triplicats (barres d'erreurs : s.e.m). Des déplacements similaires par MIP-1 α et RANTES ont également été réalisés avec des résultats comparables à ceux présentés pour MIP-1 β .

haute affinité (IC_{50} de 0.5 mM), l'autre de basse affinité (IC_{50} de 150 nM). Les paramètres de ces sites de haute et basse affinités pourraient correspondre aux affinités de MCP-1 pour respectivement CCR2b et CCR5. Lorsque des membranes de cellules exprimant une plus grande quantité relative de CCR2b sont utilisées (clone 25-15), l'activité compétitive de MCP-1 est encore augmentée, et un seul site de liaison de haute affinité est observable (Figure 38c). La co-expression de CCR5 et CCR2b semble donc entraîner une coopérativité négative en termes de liaison de chimiokines : la chimiokine spécifique de CCR2b devient dans ces conditions capable d'inhiber très efficacement la liaison de ligands spécifiques de CCR5.

2.2.3. MIP-1 β inhibe la liaison de MCP-1 sur les membranes des cellules co-exprimant CCR5 et CCR2b

Afin de tester l'interaction fonctionnelle en sens inverse, nous avons mesuré la capacité des ligands de CCR5 à inhiber la liaison de MCP-1 sur CCR2b, en utilisant la lignée exprimant seulement CCR2b comme contrôle. MCP-1 et MCP-2 déplacent la liaison de 125 I-MCP-1 sur des membranes exprimant CCR2b seul, tandis que les ligands spécifiques de CCR5 (MIP-1 α , MIP-1 β et RANTES) n'affectent pas cette liaison (Figure 39a), en accord avec la pharmacologie du récepteur (Charo et al., 1994). Par contre, des modifications importantes de liaison ont été observées sur les membranes préparées à partir des lignées cellulaires co-exprimant les 2 récepteurs. Les courbes de déplacement du traceur 125 I-MCP-1 par la liaison de MCP-1 et MCP-2 restent inchangées (Figure 39b et c), tandis qu'un déplacement important par MIP-1 α , MIP-1 β et RANTES est maintenant observé. Les IC_{50} calculés pour les clones C25-12 et C25-15 sont similaires à ceux obtenus pour chacune de ces chimiokines lors d'une compétition pour la liaison de 125 I-MIP-1 β sur CCR5. Cependant, le déplacement observé est incomplet, vu qu'il représente seulement 55 % de la liaison spécifique pour le clone C25-15 qui exprime un taux élevé de CCR2b, et de 70 % pour le clone C25-12, qui exprime un taux plus faible de ce récepteur. Dans leur ensemble, ces résultats suggèrent dès lors que les ligands d'un récepteur sont capables d'entrer en compétition pour la liaison du traceur à l'autre récepteur, d'une manière qui semble corrélée à la proportion attendue d'hétérodimères.

2.2.4. Les anticorps monoclonaux ne déplacent pas la liaison des ligands

Dans le but de mieux comprendre le mécanisme expliquant la compétition pour la liaison au sein des hétérodimères, nous avons testé la capacité d'anticorps monoclonaux dirigés contre chacun des récepteurs à antagoniser la liaison du traceur sur l'autre partenaire du dimère. L'anticorps monoclonal 2D7, dirigé contre la deuxième boucle extracellulaire de CCR5, est

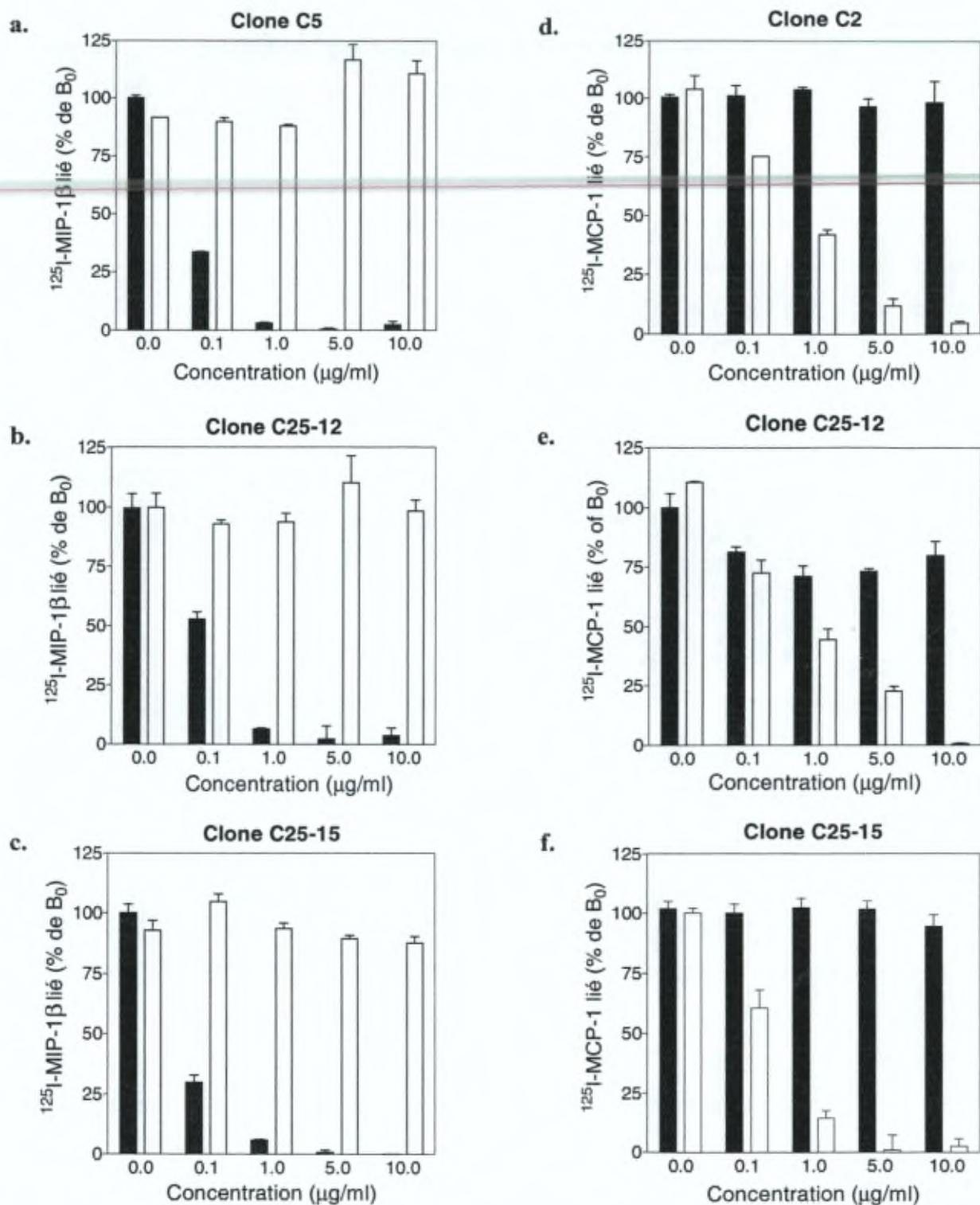


Figure 40. Effet des anticorps monoclonaux sur la liaison des chimiokines. Différentes concentrations de l'anticorps anti-CCR5 2D7 (■) et l'anticorps anti-CCR2b Doc-4 (□) ont été testées pour leur capacité à entrer en compétition avec la liaison de ^{125}I -MIP-1 β (a, b, c) ou ^{125}I -MCP-1 (d, e, f) sur les clones C25-12 (b, e) et C25-15 (c, f), ainsi que les cellules CHO-K1 exprimant CCR5 (a) ou CCR2b (d) seul. Les résultats ont été normalisés pour la liaison non-spécifique déterminée en présence de 300 nM de MIP-1 β ou MCP-1 (0%) et la liaison spécifique en l'absence de compétiteur (100%). Les données présentées sont représentatives d'au moins trois expériences indépendantes. Tous les points ont été réalisés en triplicats (barres d'erreurs : s.e.m)

connu pour antagoniser la liaison de chimiokines sans induire de signalisation (Lee et al., 1999). Comme attendu, 2D7 s'est montré capable d'inhiber la liaison de ^{125}I -MIP-1 β , mais n'a par contre pas affecté la liaison de ^{125}I -MCP-1 sur les membranes des clones C25-12 et C25-15 co-exprimant CCR5 et CCR2b (Figure 40). A l'inverse, l'anticorps Doc-4, qui reconnaît l'extrémité N-terminale de CCR2b, a inhibé la liaison de ^{125}I -MCP-1 sans affecter celle de ^{125}I -MIP-1 β (Figure 40). Ces résultats démontrent que les traceurs continuent à se lier spécifiquement à leurs récepteurs. D'autre part, ils plaident aussi contre un encombrement purement stérique, les immunoglobulines étant plus volumineuses que les chimiokines.

2.2.5. Mesure de la co-endocytose de CCR5 et de CCR2b au sein des cellules CHO-K1

La co-endocytose de récepteurs impliqués dans des phénomènes d'hétérodimérisation a été décrite dans la littérature (Jordan and Devi, 1999). Nous avons dès lors évalué dans quelle mesure la stimulation de CCR5 ou CCR2b par leurs agonistes respectifs était susceptible de provoquer l'internalisation de l'autre partenaire d'un hétérodimère. Pour ce faire, l'expression des récepteurs à la surface cellulaire a été évaluée par FACS. La stimulation par une concentration croissante de MCP-1 induit une diminution de l'expression de surface de CCR2b au sein des trois lignées cellulaires exprimant le récepteur, avec une tendance plus appuyée pour le clone C25-12, qui exprime moins de CCR2b (Figure 41a). De la même manière, RANTES stimule l'internalisation de CCR5, que CCR2b soit co-exprimé ou non (Figure 41d). La stimulation par MCP-1 n'induit par contre pas l'internalisation de CCR5 (Figure 41b), et RANTES ne modifie pas l'immunoréactivité de CCR2b à la surface des cellules exprimant les deux récepteurs (Figure 41d). La stimulation simultanée de CCR5 et CCR2b par RANTES et MCP-1 n'aboutit pas non plus à une potentialisation ou à une diminution du processus d'internalisation pour l'un ou l'autre des récepteurs (résultats non-montrés).

Ces résultats suggèrent donc que l'internalisation de CCR5 ou de CCR2b n'induit pas la co-internalisation de l'autre récepteur suite à leur présence au sein d'hétérodimères. Il semble donc que les dimères ne soient pas stables au cours du temps, et qu'ils peuvent se dissocier pour permettre l'internalisation d'un seul des récepteurs suite à son activation. Cependant, il n'est pas exclu que les mesures effectives par cytométrie de flux ne soient pas assez sensibles pour permettre la mise en évidence de modifications subtiles de la quantité de récepteurs présents à la surface cellulaire.

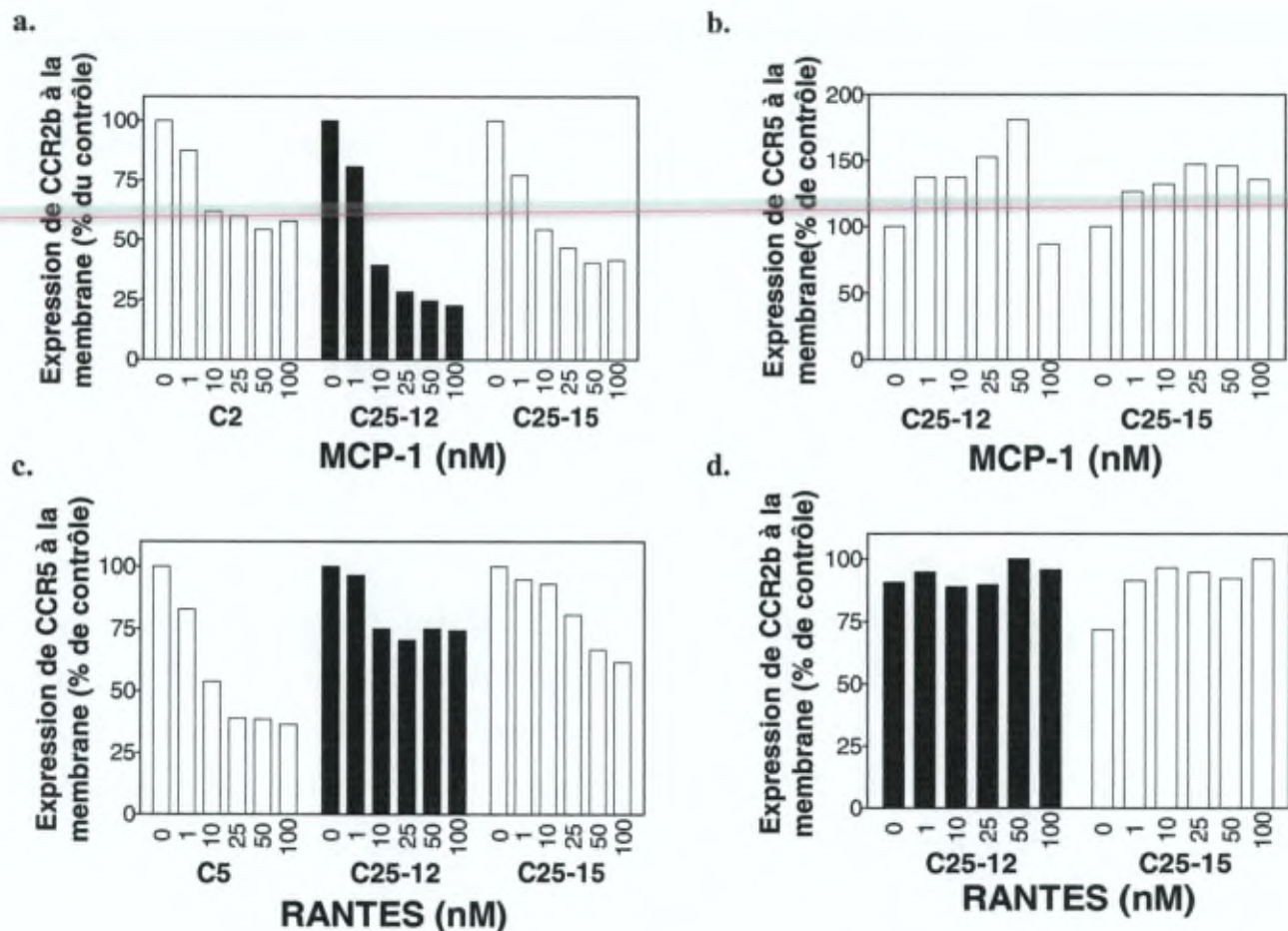


Figure 41. Absence de co-internalisation de CCR5 et CCR2b dans les cellules CHO-K1. Différentes concentrations de MCP-1 (a, b) et de RANTES (c, d) (0, 1, 10, 25, 50 et 100 nM) ont été testées pour leur capacité à induire l'internalisation de CCR2b (a, d) et CCR5 (b, c) au sein des clones C25-12 et C25-15. Les cellules CHO-K1 exprimant CCR2b (a) ou CCR5 (d) seuls ont été utilisées comme contrôles positifs pour l'internalisation de CCR2b et CCR5 respectivement. L'expression de surface de CCR2b a été détectée en cytométrie de flux par l'anticorps monoclonal N20 conjugué à la phycoérythrine (N20-PE), tandis que CCR5 a été détecté par l'anticorps 2D7-PE. Les résultats ont été normalisés pour la fluorescence des cellules non-stimulées (100 %) et pour la fluorescence intrinsèque des cellules (0 %). Toutes les expériences ont été répétées au minimum deux fois avec des résultats similaires.

2.3. Discussion

Nous avons donc analysé les propriétés de dimérisation de CCR5 et CCR2b ainsi que les conséquences fonctionnelles de ce phénomène, dans un système hétérologue où les deux récepteurs sont co-exprimés. Les clones sélectionnés expriment des taux de récepteurs permettant des études de compétition de liaison, des études fonctionnelles et biochimiques. Ces taux d'expression sont approximativement dix fois plus élevés que ceux observés au sein des cellules primaires comme les macrophages et les cellules T. Le niveau d'expression de CCR5 est similaire dans les trois lignées exprimant le récepteur. Le clone C25-15 exprime des quantités approximativement égales de CCR5 et CCR2b, tandis que le clone C25-12 exprime plus ou moins 5 fois plus de CCR5 que de CCR2b.

Comme démontré précédemment par différents groupes, nous avons montré dans ce travail que CCR5 est capable de former des homodimères, par des techniques d'immunoprecipitation et de BRET. CCR5 est également capable d'hétérodimériser avec CCR2b. Ceci n'est pas inattendu, compte tenu de la similarité importante entre les deux récepteurs, et ce particulièrement au sein des segments transmembranaires, domaines connus pour leur implication dans ces interactions inter-récepteurs. L'affinité apparente de CCR5 pour lui-même ou pour CCR2b semble être similaire, comme le reflète les valeurs de BRET₅₀ obtenues dans ces deux cas. Par conséquent, il est attendu que la formation d'homo- ou d'hétérodimères soit strictement régulée par la loi d'action de masse et par le niveau d'expression des deux récepteurs dans les cellules.

D'autre part, les valeurs de BRET₅₀ suggèrent que l'homo- et l'hétérodimérisation s'effectuent pour des niveaux d'expression de récepteurs similaires à ceux observés au sein des leucocytes. Les phénomènes d'homodimérisation sont indépendants de la présence des ligands. En effet, la modification de l'état d'activation des récepteurs par leurs agonistes n'influe en rien sur l'intensité du signal BRET observé. La similitude entre les valeurs de BRET₅₀ obtenues ne soutient donc pas l'hypothèse proposée dans la littérature, selon laquelle la stimulation par les chimiokines induit une stabilisation de formes oligomériques plus complexes (Hernanz-Falcon et al., 2004). L'observation d'une augmentation du signal BRET lors de la stimulation des cellules exprimant CCR5 ou CCR2b par des anticorps spécifiques des récepteurs suggère que ces homo-oligomères pourraient s'assembler pour former des agrégats plus importants au sein des membranes. L'utilisation d'anticorps est connue pour pouvoir ponter des molécules adjacentes. Dans notre cas cependant, le mécanisme précis par lequel l'exposition à l'anticorps induit une augmentation du signal BRET n'est pas déterminé. Les données obtenues ne permettent pas de discriminer une agrégation des dimères des récepteurs d'une réorganisation structurale de ces dimères constitutifs permettant un échange d'énergie plus efficace (Figure 42). Le rapprochement d'oligomères préconstitués pouvant d'ailleurs à la fois augmenter la concentration locale

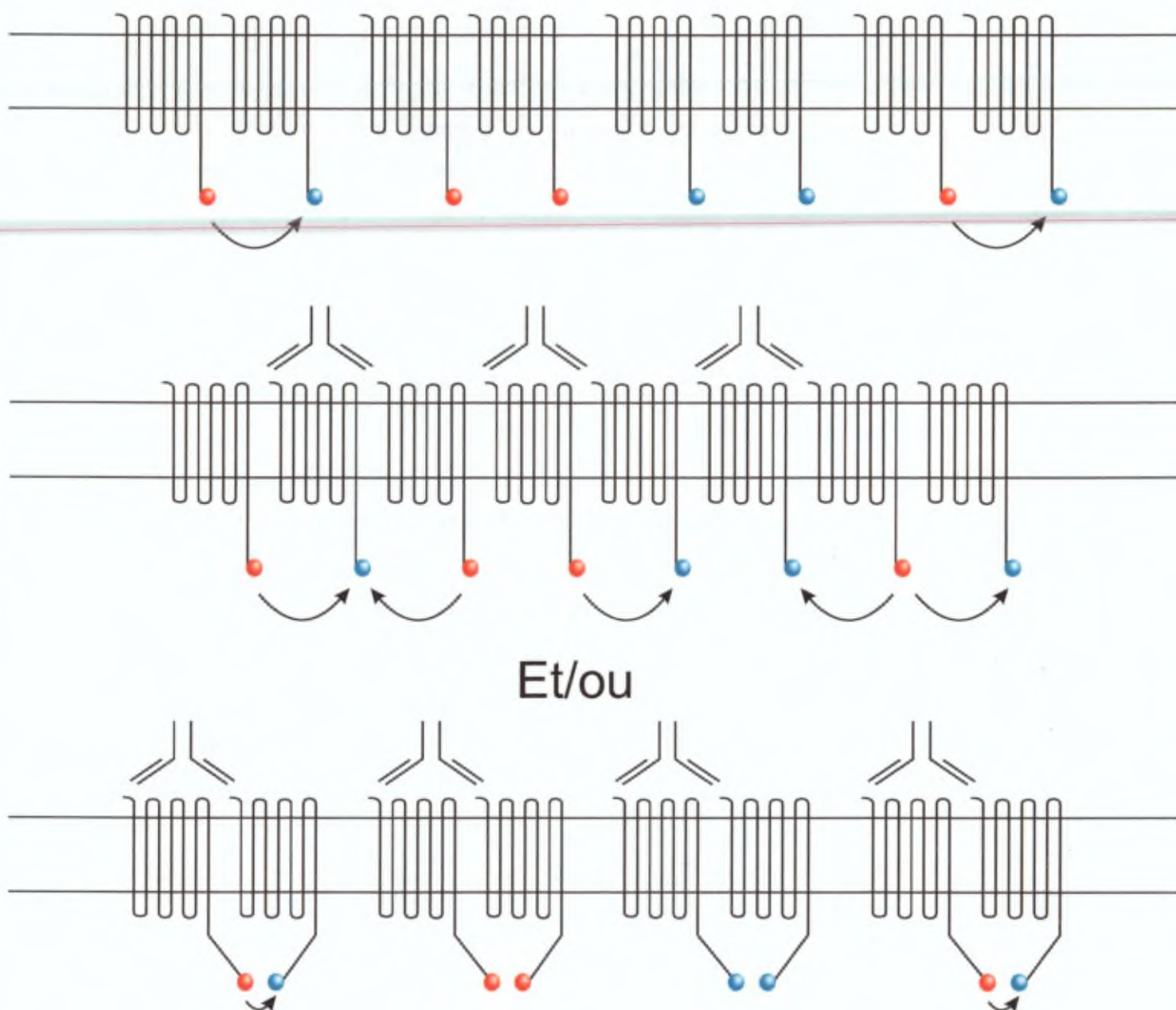


Figure 42 . Représentation schématique de l'effet des anticorps MC-1 ou Doc-1 et -2 sur les homodimères de CCR5 et de CCR2b. L'interaction de l'anticorps MC-1 avec la deuxième boucle extracellulaire de CCR5, ainsi que celle des anticorps Doc-1 et Doc-2 avec les boucles extracellulaires de CCR2b, induit une augmentation du signal BRET obtenu. Nous avons envisagé deux modèles afin d'expliquer cette observation. Les anticorps induiraient l'agrégation des récepteurs et le recrutement des « donneurs » d'énergie liés à hRluc (●) à proximité « d'accepteurs » d'énergie EYFP (●) (et inversement). Cette agrégation se traduirait par une augmentation de l'énergie échangée. Notre second modèle impliquerait un changement conformationnel au niveau de dimères préformés, changement qui permettrait un rapprochement local du donneur et de l'accepteur, et une optimisation du transfert d'énergie. Il est également envisageable que ces deux processus agissent de concert pour augmenter le signal BRET obtenu.

d'accepteurs à proximité des donneurs et favoriser une orientation optimale entre les accepteurs et les donneurs.

Des modifications du signal BRET ont déjà été mises en évidence pour d'autres récepteurs, suite à l'addition d'agonistes et attribuées soit à un pontage entre dimères, soit à un changement de conformation du dimère. Ainsi, une agrégation d'homo-oligomères du récepteur du peptide GnRH en présence d'agonistes a été mise en évidence (Cornea et al., 2001). Une autre étude récente concernant le récepteur de la mélatonine montre qu'en présence d'un agoniste, le signal BRET augmente suite à des changements conformationnels au sein d'oligomères préexistants (Ayoub et al., 2002).

L'hétérodimérisation entre CCR5 et CCR2b a également été confirmée par co-immunoprécipitation, avec néanmoins un faible taux d'hétérodimères récupérés, contrastant avec le signal BRET élevé obtenu entre les deux récepteurs. Cela suggère que la plupart des dimères se dissocient pendant la procédure d'immunoprécipitation. L'influence sur ces structures hétérodimériques de l'activation des récepteurs par les chimiokines a également été analysée. Lors de la stimulation des hétérodimères par l'un ou l'autre des ligands, une légère diminution des valeurs de $BRET_{50}$ est observée. Par contre, la valeur du $BRET_{MAX}$, qui est une mesure de l'efficacité globale du transfert d'énergie, et est donc influencée par la proportion de récepteurs participant à cet échange, est significativement plus basse. Ces résultats suggèrent dès lors une diminution du nombre de récepteurs impliqués dans la formation d'hétérodimères, et pourraient refléter un phénomène d'endocytose du récepteur stimulé, après dissociation des hétérodimères. Il est par ailleurs intéressant de constater que l'anticorps MC-1, stimulant l'endocytose du récepteur CCR5, diminue également de manière significative le signal BRET. L'effet de pontage de l'anticorps sur les homodimères de CCR5 n'est donc pas conservé. La diminution du signal BRET pourrait s'expliquer également par la dissociation des hétérodimères CCR5/CCR2b et l'internalisation d'oligomères constitués essentiellement de CCR5.

Plusieurs travaux de la littérature ont déjà exploré les conséquences de l'hétéro-oligomérisation des récepteurs sur la régulation de leur fonction par internalisation. Dans certains cas, la stimulation par un agoniste d'un des partenaires d'un hétérodimère entraîne la co-internalisation du récepteur non-activé. Dans d'autres cas, c'est au contraire une inhibition de l'internalisation du récepteur stimulé qui est observé (Lavoie et al., 2002).

Dans notre cas, les expériences de cytométrie de flux n'ont pas mis en évidence de phénomènes de co-internalisation. Malgré la présence d'hétérodimères, la stimulation d'un des récepteurs aboutit à son endocytose individuelle et laisse à la surface cellulaire le récepteur non-activé. Cette endocytose ne se distingue pas de l'internalisation observée pour les cellules exprimant un seul récepteur. Ces observations supportent donc elles aussi la théorie que les hétérodimères ne sont pas des structures stables et peuvent se dissocier relativement rapidement.

Des travaux antérieurs ont proposé que la formation d'hétérodimères entre CCR5 et CCR2b étaient responsables d'un effet synergique lorsque les deux récepteurs sont stimulés simultanément par leurs agonistes respectifs. Il a aussi été rapporté que des concentrations 10 à 100 fois moins importantes de RANTES et MCP-1 appliquées simultanément sont requises pour générer une réponse fonctionnelle, en comparaison de la stimulation de chaque récepteur de manière indépendante (Mellado et al., 2001). Nous n'avons cependant pas observé un tel effet synergique. En effet, les réponses fonctionnelles obtenues pour des concentrations faibles de ligands de CCR5 et CCR2b appliquées simultanément étaient comparables aux réponses obtenues pour chacune des chimiokines utilisée seule à la même concentration, que ce soit pour des cellules exprimant un seul récepteur, ou co-exprimant les deux récepteurs. La faible augmentation du signal observé dans certains cas est attribuable à l'effet purement additif de l'activation des deux populations de récepteurs convergeant vers la même cascade de transduction intracellulaire. Ces résultats qui sont en opposition avec les données de la littérature (Mellado et al., 2001) ne sont cependant pas étonnants. En effet, les récepteurs CCR5 et CCR2b sont vraisemblablement tous impliqués dans la formation d'homodimères ou d'hétérodimères, en fonction de leurs concentrations respectives. Dès lors, si un effet coopératif existait entre les partenaires d'un hétérodimère quant à l'amplitude des réponses fonctionnelles, une coopérativité similaire serait également attendue au sein d'homodimères de CCR5 ou de CCR2b. La co-activation des deux partenaires d'un hétérodimère par différentes chimiokines, ou la co-activation des deux partenaires d'un homodimère par une seule chemokine, devrait donc aboutir à une réponse fonctionnelle similaire.

L'hypothèse d'un effet de coopérativité positive entre partenaires d'un hétérodimère est de plus rendu caduque par nos résultats d'expériences de liaison qui mettent au contraire en évidence une claire coopérativité négative au niveau de la liaison des agonistes. Les expériences de liaison ont en effet abouti à des observations originales, non rapportées dans la littérature précédemment. Une inhibition croisée de la liaison de ligands a été mise en évidence entre CCR5 et CCR2b co-exprimés au sein de la même lignée cellulaire. Comme cette observation a été effectuée sur des préparations de membranes, l'implication de cascades de signalisation intracellulaire peut être exclue. Nous avons donc attribué ces observations à la formation des hétérodimères entre CCR5 et CCR2b. La compétition partielle observée lors des tests de liaison de ¹²⁵I-MCP-1 pour MIP-1 α , MIP-1 β et RANTES a été montrée comme étant corrélée à la proportion attendue d'hétérodimères CCR5/CCR2b. En effet, sur les membranes du clone C25-15, exprimant des quantités similaires de CCR5 et CCR2b, la proportion attendue de molécules de CCR2b engagées dans la formation d'hétérodimères est de 50%, en considérant qu'aucune

Clone C25-15

Clone C25-12

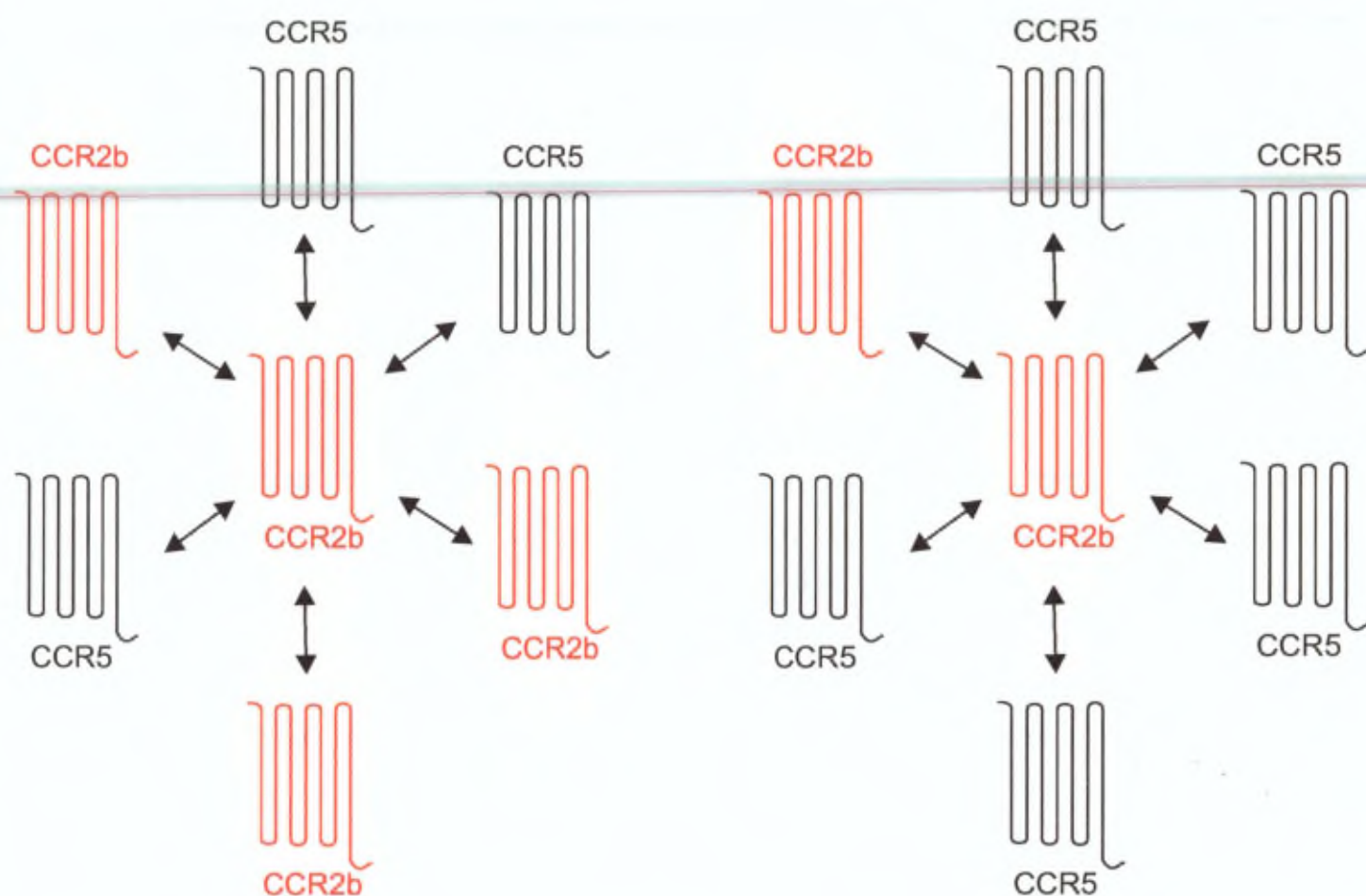


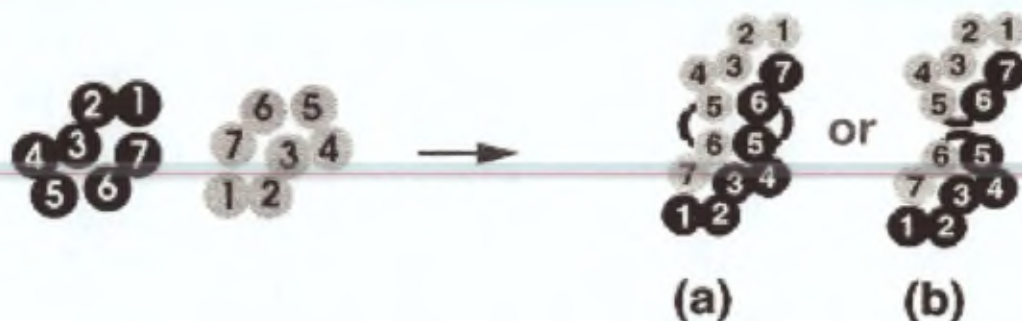
Figure 42. Représentation schématique des proportions de chaque récepteur engagé dans la formation d'homo- ou d'hétérodimères. En considérant qu'aucune préférence n'existe en faveur de la formation d'homodimères, le récepteur CCR2b, exprimé à la surface du clone C25-15, a autant de chance d'être recruté au sein d'un complexe homodimérique, qu'au sein d'une structure hétérodimérique avec CCR5. La proportion attendue de molécules de CCR2b engagées dans la formation d'hétérodimères est donc de 50% pour le clone C25-15. Le clone C25-12, quant à lui, exprime CCR5 à un niveau approximativement 5 fois plus élevé que celui de CCR2b. La proportion attendue de molécules de CCR2b impliquées dans des hétérodimères est donc de l'ordre de 80 %.

préférence n'existe en faveur de la formation d'homodimères (Figure 43). Sur ce clone, les ligands spécifiques de CCR5 déplacent 55 % de la liaison spécifique de MCP-1. Le clone C25-12, quant à lui, exprime CCR5 à un niveau approximativement 5 fois plus élevé que celui de CCR2b. La proportion attendue de molécules de CCR2b impliquées dans des hétérodimères est de l'ordre de 80 %, en accord avec le plus haut niveau de compétition observé dans cette situation (environ 70 % de la liaison spécifique) (Figure 43). La situation est similaire pour les tests de liaison de 125 I-MIP-1 β , en prenant en compte que MCP-1 se lie à CCR5 avec faible affinité. Par conséquent, dans les conditions de co-expression, une compétition complète est observée pour MCP-1, avec un site de haute affinité correspondant à la compétition indirecte via le dimère, et un site de basse affinité correspondant à la compétition directe par liaison à CCR5.

Plusieurs études antérieures ont rapporté des modifications du profil pharmacologique de récepteurs suite à leur co-expression avec d'autres récepteurs et ont attribué ces observations à la formation d'hétérodimères. Des changements dans les propriétés de liaison du récepteur à l'adenosine A1 (A1) et du récepteur purinergique P2Y₁ ont aussi été décrits (Yoshioka et al., 2001). Les études de liaison de ligand ont mis en évidence une réduction significative de l'affinité pour les agonistes et les antagonistes du récepteur A1 sur les membranes de cellules co-transfectées, ainsi qu'une augmentation d'un facteur 400 de l'affinité pour l'ADP β S, un agoniste de P2Y₁. Des modifications des réponses fonctionnelles aux agonistes ont également été observées par des mesures de l'activité de l'adénylate cyclase. De manière similaire, les récepteurs opioïdes κ et δ ont été décrits comme capables d'hétérodimériser, créant de cette façon un site de liaison caractérisé par un profil pharmacologique original, à la fois en termes de liaisons et de réponses fonctionnelles. Ce nouveau site de liaison pouvait être activé d'une manière synergique par les ligands sélectifs des deux récepteurs (Jordan and Devi, 1999). Ces situations sont pourtant qualitativement différentes des observations rapportées ici.

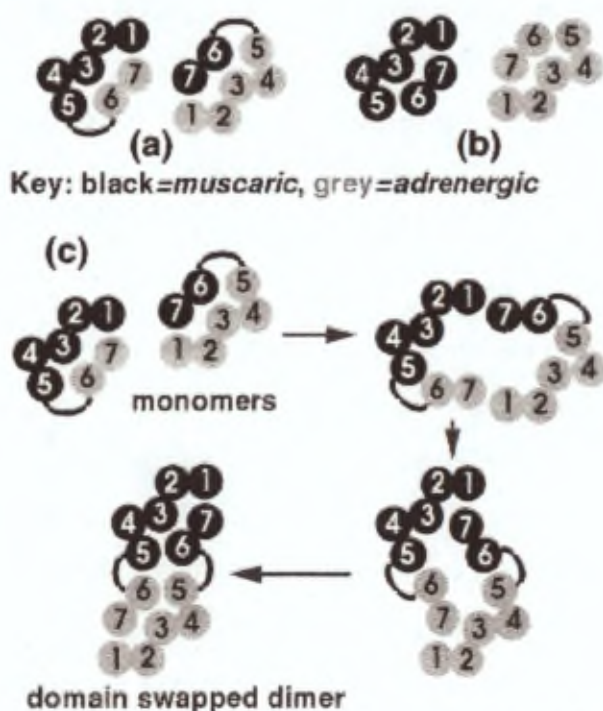
D'abord, nous n'avons pas détecté d'altérations des réponses fonctionnelles des récepteurs co-exprimés. Ensuite, aucune évidence de compétition de liaison sur un récepteur par les ligands spécifiques de l'autre récepteur n'a été rapportée. Bien que la dimérisation semble mener à des modifications des propriétés pharmacologiques des récepteurs dans ces trois situations, les mécanismes impliqués dans chaque cas semblent être différents.

Les déterminants structuraux impliqués dans la formation des homodimères de CCR5 ou de CCR2b, ou des hétérodimères CCR5/CCR2b ne sont actuellement pas encore connus. La forte similarité entre les deux récepteurs rend probable la possibilité qu'une interface similaire soit formée dans ces trois situations. Tout récemment, Hernanz-Falcon et al. a proposé l'implication des domaines transmembranaires TM1 et TM4, comme interface potentielle entre les deux



Gouldson et al. (Neuropsychopharmacology 2000)

Figure 44. Représentation schématique des modèles d'interaction des dimères. Les RCPGs sous formes monomériques sont représentés en noir et en gris. Lors de la formation du dimère, soit chaque entité échange des domaines transmembranaires (a), soit elles s'associent latéralement via une interface pouvant varier d'un dimère à l'autre (b).



Gouldson et al. (Neuropsychopharmacology 2000)

Figure 45. Modèle de l'échange de domaine dans les RCPGs. (a) les récepteurs chimériques α_2 -adrénergique-muscarinique (M3- α_2 R à gauche ou α_2 -M3R à droite) utilisé par Maggio et al. dans des études de co-expression, avec représenté en noir, le récepteur muscarinique, et en gris, le récepteur α_2 -adrénergique; (b) les récepteurs sauvages; (c) le processus d'échange de domaine proposé par Gouldson et al. pour expliquer les phénomènes de complémentation fonctionnelle dans les études de co-expression de Maggio et al. Les récepteurs chimériques M3- α_2 R et α_2 -M3R étaient naturellement inactifs, ne liaient pas leurs ligands, et n'activaient pas les protéines G. Par contre, lorsque les deux chimères étaient exprimées, l'activité en terme de liaison de ligand et d'activité était quasi identique à celle des deux récepteurs sauvages.

récepteurs (Hernanz-Falcon et al., 2004). Cette proposition est cependant peu étayée par les résultats expérimentaux et laisse la porte ouverte à d'autres hypothèses. L'identification du domaine d'interaction précis entre les homodimères de CCR5 est actuellement en cours d'investigation au sein de notre laboratoire.

D'autres domaines des RCPGs ont en effet été impliqués dans la stabilisation des états dimériques ou multimériques. Un des dimères les mieux caractérisés est formé par deux sous-types du récepteur GABA_B (γ -aminobutyric acid type B receptors). Les récepteurs GABA_{B1} et GABA_{B2} interagissent via leur domaine C-terminal cytosolique, selon un processus d'hétérodimerisation indispensable au trafic intracellulaire des récepteurs du réticulum endoplasmique à la membrane plasmique, et à leur réponse fonctionnelle aux agonistes (Kuner et al., 1999). Les récepteurs de B₂ bradykinine (B₂R) ont été rapportés comme dimérisant via leur domaine extracellulaire amino-terminal (AbdAlla et al., 1999), tandis que les segments transmembranaires VI et/ou VII ont été proposés comme interface de dimérisation pour le récepteur β_2 -adrénergique (Hebert et al., 1996) et pour le récepteur D₂ de la dopamine (Ng et al., 1996).

L'existence de dimères de protéines composées de sept domaines transmembranaires soulève la question de leur organisation tridimensionnelle. En effet, deux modèles très différents de dimères ont été proposés (Figure 44) (Gouldson et al., 2000). Selon un de ces modèles, chaque polypeptide forme une entité fonctionnelle indépendante, et ces deux entités s'associent latéralement par l'intermédiaire d'une interface qui pourrait varier d'un type de dimère à l'autre (Figure 44b). Un deuxième modèle de dimères fait appel à l'échange de domaines transmembranaires entre partenaires (Figure 44a). Dans ce modèle, les récepteurs apparaissent comme deux polypeptides antiparallèles au sein desquels les deux poches de liaison seraient formées par les cinq premiers domaines transmembranaires d'un polypeptide et les deux derniers domaines transmembranaires de l'autre polypeptide. Dans ce type de dimères, les ponts disulfures qui stabilisent la structure des récepteurs impliquent les deux chaînes polypeptidiques, et la possibilité de dissociation de ces dimères est donc en conséquence fort réduite. Ce modèle est supporté par des expériences de transcomplémentation où deux récepteurs mutés et non fonctionnels sont capable de reformer, suite à leur co-expression, un site de liaison fonctionnel (Figure 45). Il apparaît donc que ce type de dimère peut exister. Il n'est cependant pas établi si ce modèle est applicable à une partie significative des dimères de RCPGs décrits jusqu'à présent.

Dans les récepteurs aux chimiokines, et notamment dans CCR5 et CCR2b, le domaine N-terminal et les boucles extracellulaires sont impliqués dans la formation d'un complexe de haute affinité avec le domaine structuré des chimiokines. L'extrémité N-terminale non-structurée des chimiokines est par contre impliquée dans l'activation des récepteurs, probablement via une interaction directe avec le complexe d'hélices transmembranaires, stimulant de cette façon des

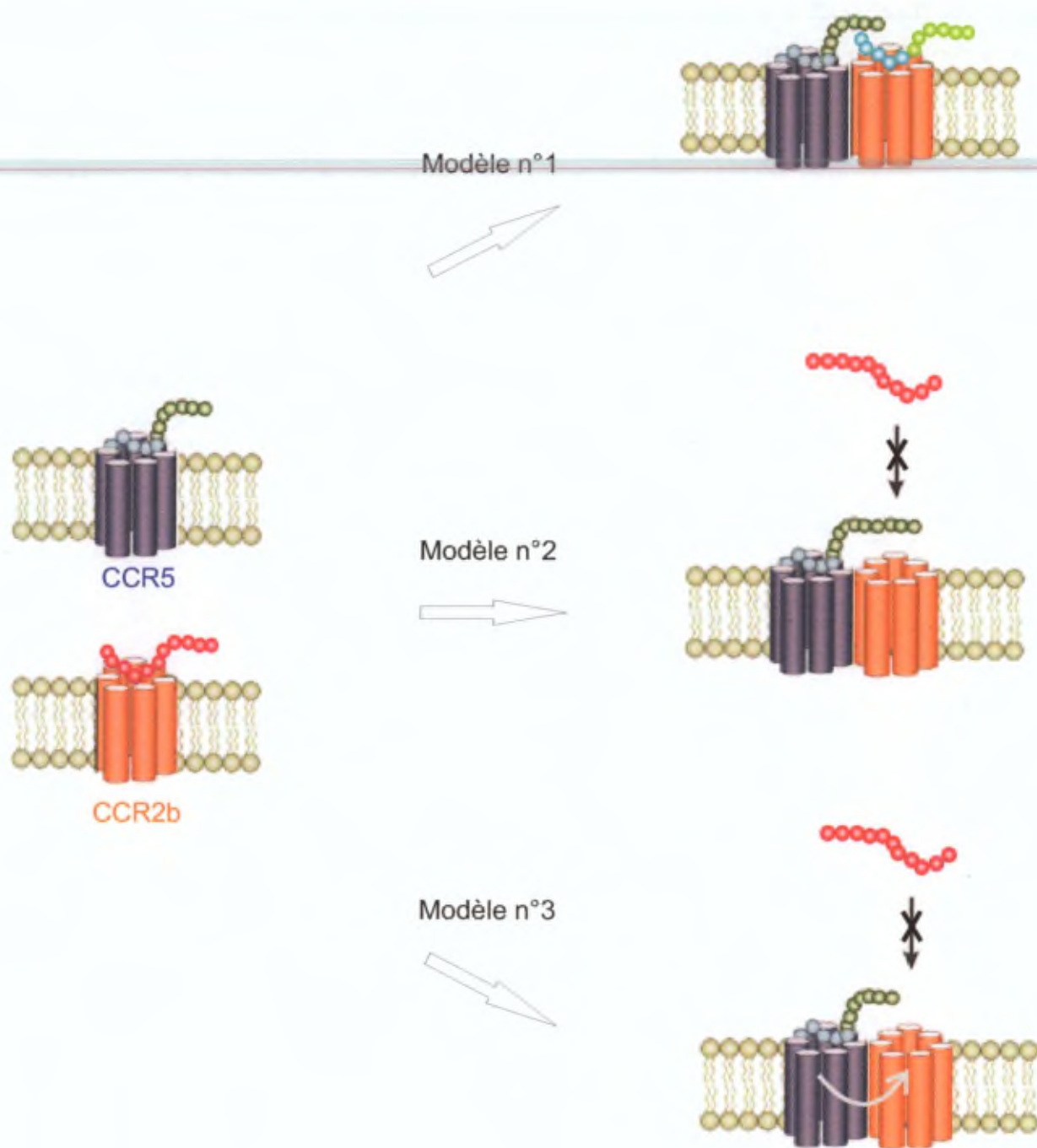


Figure 46. Représentation schématique des modèles représentatifs des mécanismes sous-tendant la compétition de liaison en trans au sein des hétérodimères CCR5/CCR2b.

changements conformationnels au sein du récepteur (Samson et al., 1997; Blanpain et al., 2003; Blanpain et al., 1999a). Les mécanismes sous-tendant la compétition de liaison en trans au sein des hétérodimères CCR5/CCR2b ne sont pas déterminés précisément. En théorie, cette compétition pourrait résulter d'une variété d'interactions au sein des membres du dimère (Figure 46). Premièrement, la formation des hétérodimères pourrait modifier la structure des sites de liaison individuels, de manière à ce que le site de CCR2b qui lierait MCP-1 dans les états monomériques et homodimériques s'accommoderait dès lors des ligands spécifiques de CCR5 (Figure 46, modèle n°1). Cependant, cette hypothèse paraît peu probable, étant donné que les propriétés de liaison des ligands propres de chaque récepteur apparaissent inchangées suite à la co-expression. Afin d'illustrer cette constatation, dans les tests de liaison de ^{125}I -MIP-1 β , les IC_{50} mesurés pour MIP-1 α , MIP-1 β et RANTES sont inchangés, que ces tests soient effectués sur des cellules exprimant CCR5 seul, ou sur des cellules co-exprimant CCR5 et CCR2b. De plus, dans les tests de liaison de ^{125}I -MCP-1 sur des membranes de cellules co-exprimant CCR5 et CCR2b, ces trois chimiokines montrent des affinités similaires à celles dérivées des tests de liaison de MIP-1 β sur CCR5. Finalement, aucune compétition pour ^{125}I -MIP-1 β n'a été observée lors de l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-CCR2b, ou pour la liaison de ^{125}I -MCP-1 lors de l'utilisation d'un anticorps anti-CCR5, démontrant ainsi que chaque traceur iodé continue de se lier à son récepteur spécifique au sein du dimère. Une seconde hypothèse pourrait être qu'une chimiokine liée à un des récepteurs empiète sur le site de liaison de l'autre récepteur du dimère, empêchant de cette manière la liaison simultanée d'une seconde chimiokine sur le complexe dimérique (Modèle n°2). L'observation que les anticorps monoclonaux se liant à l'un des récepteurs n'empêchent pas la liaison de la chimiokine sur l'autre partenaire du dimère malgré une taille plus grande que celle des chimiokines, pourrait être pris pour un argument en défaveur de cette hypothèse. Une troisième hypothèse pourrait être que la liaison d'un agoniste à l'un des récepteurs induirait un changement conformationnel au sein de chaque membre du dimère, modifiant de cette façon le site de liaison de l'autre récepteur (Modèle n°3). Une dernière hypothèse, qui impliquerait une voie de signalisation post-récepteur, peut être abandonnée, étant donné que nos observations ont été réalisées sur membranes au sein desquelles seuls des événements de signalisation très limités sont possibles. Par conséquent, les deux hypothèses que nous privilégions actuellement sont d'une part l'encombrement stérique et d'autre part, l'introduction d'un changement conformationnel entre les partenaires du dimère de récepteur.

La signification fonctionnelle de l'homo-et l'hétérodimérisation de CCR5 et CCR2b doit encore être déterminée. Il semble que, comme déjà décrit pour le récepteur β 2-adrénérique, la majeure partie des récepteurs dans la cellule se trouve sous forme dimérique (Angers et al., 2000; Salahpour et al., 2000). Nos observations concernant les propriétés de liaison des hétérodimères

CCR5/CCR2b suggèrent que les hétérodimères et probablement les homodimères sont capables de lier une seule chimiokine. Nous pouvons noter que le $B_{\max}$ apparent calculé à partir des tests de saturation utilisant MIP-1 β comme traceur est de 2.7 pmoles/mg de protéines pour la lignée cellulaire CHO-K1 parentale exprimant CCR5 seul, et de 2.9 et 3.5 pmoles/mg de protéines pour les clones C25-12 et C25-15 qui en sont dérivés. Nous attribuons cette légère mais reproductible élévation du $B_{\max}$ au fait que plus de molécules de CCR5 sont capable de lier le traceur, comme conséquence de la dimérisation avec CCR2b qui n'est pas occupé par son ligand. Cette observation tend à soutenir l'hypothèse que seulement la moitié des molécules de CCR5 sont en fait disponible pour la liaison dans les cellules recombinantes.

L'hétérodimérisation ne semble pas modifier l'efficacité de la signalisation induite par les récepteurs aux chimiokines au sein des cellules CHO-K1, du moins en ce qui concerne la voie de libération du calcium intracellulaire. Les expériences présentées ici ne permettent pas d'exclure que l'état de dimérisation (homo- or hétéro-) puisse être requis pour assurer une signalisation efficace. Des récepteurs mutants dépourvus de leur potentiel de dimérisation devraient être élaborés afin de tester cette possibilité. Il n'est pas non plus exclu que l'hétérodimérisation de CCR5 et CCR2b pourrait modifier le choix et/ou l'efficacité des cascades de signalisation différentes de la libération de calcium intracellulaire induite via les protéines G_i . Des conséquences fonctionnelles variées de la dimérisation des récepteurs ont été rapportées dans la littérature. Hebert et al. ont montré que la stimulation par un agoniste du récepteur β_2 -adrénergique stabilise l'état dimérique du récepteur, et que le processus de dimérisation est important pour la stimulation des voies de transduction de signaux (Hebert et al., 1996).

Les conséquences fonctionnelles de la dimérisation des récepteurs aux chimiokines devront donc être étudié de manière plus approfondie. En effet, la majorité de nos connaissances sur la pharmacologie des récepteurs aux chimiokines est basée sur l'étude de récepteurs exprimés dans des systèmes hétérologues, au sein desquels ils semblent donc former des homodimères. La conception de mutants monomériques obligatoires, et l'utilisation de récepteurs mutants déficients dans l'une de ses propriétés naturelles (liaison, activation, désensibilisation,...) sera nécessaire pour une évaluation approfondie de la pertinence du processus de dimérisation.

V. CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

Au cours de ce travail, nous avons cherché à compléter nos connaissances quant aux fonctions cellulaires de CCR5, en recherchant ou caractérisant les interactions que ce récepteur est susceptible d'avoir, soit sous la forme d'homo ou d'hétérodimères, soit avec des protéines intracellulaires.

Des interactions avec de nouveaux partenaires intracellulaires ont été recherchées par la technique du double hybride en levure, ainsi que par une approche biochimique basée sur la purification par affinité (« GST-pulldown »). Ces deux approches complémentaires ne nous ont cependant pas permis d'identifier de nouveaux partenaires. Dans le même temps, nombre d'interactions ont été décrites pour d'autres récepteurs couplés aux protéines G, suite à l'utilisation des mêmes approches expérimentales. Nous considérons donc que notre approche reste valide et aurait pu mener à des résultats plus tangibles. En effet, l'identification d'un nombre croissant de protéines liant des domaines PDZ par leur extrémité C-terminale a permis d'affiner progressivement la structure requise pour ces interactions, et d'en distinguer différentes classes. Ces données récentes confortent l'hypothèse suivant laquelle l'extrémité C-terminale conservée entre CCR5 et CCR2b représente un élément crédible d'interaction avec des domaines PDZ, et justifie *a posteriori* le choix initial. Les raisons qui peuvent être invoquées pour expliquer notre échec dans cette partie du travail sont bien sûr multiples. Les interactions pourraient être trop faibles pour être mises en évidence par les techniques utilisées, ou pourraient nécessiter des conformations du domaine C-terminal, ou des modifications post-traductionnelles, qui ne sont pas présentes dans les protéines de fusion et les systèmes d'expression utilisés. Enfin, les banques et extraits utilisés dans ce travail pourraient ne pas contenir les clones d'intérêt, ou les protéines adéquates en quantités suffisantes. Il faut également remarquer que de nombreux groupes dans le monde ont suivi au cours des dernières années des approches similaires dans le but d'identifier des partenaires des deux co-récepteurs principaux du VIH, CCR5 ou CXCR4. En dépit de ces efforts multiples, une seule interaction crédible a été rapportée, entre CCR5 et la sous-unité ζ du protéasome, et la signification fonctionnelle de cette interaction reste encore à déterminer.

L'étude des mécanismes de dimérisation s'est révélée plus fructueuse. Il était connu que CCR5 était capable de former des homodimères, et l'hétérodimérisation avec CCR2b avait été décrite sans que la démonstration en soit réellement convaincante. Il existait cependant une grande confusion dans la littérature quant aux conséquences fonctionnelles, avérées ou postulées, de ces dimérisations. Nous avons donc commencé par reproduire certaines données de la littérature concernant CCR5, par des techniques de co-immunoprécipitation et de BRET, en les étendant à l'étude des homodimères CCR2b et des hétérodimères CCR5-CCR2b. La technique

d'immunoprécipitation démontre l'existence d'hétérodimères, mais cette approche s'est révélée peu sensible, suggérant une dissociation de la majorité des interactions pendant les étapes de purification. La technique de BRET démontre par ailleurs que CCR5 et CCR2b forment des hétérodimères avec autant d'efficacité que des homodimères. Contrairement aux données de la littérature, nous n'avons pas observé de coopérativité positive en termes de signalisation, lorsque les deux récepteurs d'un hétérodimère sont stimulés simultanément par leurs agonistes respectifs. Par contre, une coopérativité négative a été mise en évidence quant à la capacité des récepteurs d'un hétérodimère à lier leurs ligands respectifs. Cette observation, qui démontre qu'un dimère de récepteur ne peut lier qu'une seule chimiokine, est un concept nouveau dans le domaine des récepteurs couplés aux protéines G. Les conséquences fonctionnelles de cette observation sur la signalisation des récepteurs *in vivo* n'est pas claire à ce stade. Cependant, cette notion est importante pour l'interprétation de la pharmacologie de récepteurs dans leur environnement naturel, et est susceptible de développements importants permettant d'appréhender mieux la structure des dimères, la dynamique de leur association, et les mécanismes d'activation des récepteurs en général au sein de leur structure dimérique.

Ce travail ouvre dès lors de nombreuses perspectives. Il est probable que les caractéristiques de liaison aux hétérodimères CCR5-CCR2b sont représentatives de la situation prévalant pour tous les homodimères de récepteurs de chimiokines. Ceci devra cependant être démontré. Il n'est par contre pas connu dans quelle mesure des hétérodimères entre récepteurs structurellement plus éloignés que CCR5 et CCR2b peuvent se former avec une efficacité significative. La technique du BRET et l'interférence de liaison devrait permettre de répondre à cette question. Il n'est pas non plus évident si le concept de liaison d'un seul ligand sur un dimère de récepteurs sera applicable à d'autres classes de récepteurs aux protéines G dont les ligands sont des molécules plus petites que les chimiokines, comme des peptides ou des amines biogéniques. Ceci dépend notamment du mécanisme sous-tendant la coopérativité négative de liaison observée. On ne peut conclure à ce stade s'il s'agit d'un encombrement stérique au niveau des sites de liaison respectifs des deux membres du dimère, ou s'il s'agit d'un changement de conformation concerté entre le récepteur occupé et le récepteur libre, qui modifie la structure du site de liaison au sein de ce dernier. L'utilisation de mutants de récepteurs invalidés pour une de leurs fonctions (liaison ou activation) devrait permettre de répondre à cette question. Une approche de mutagenèse devrait également permettre de déterminer la ou les surface(s) d'interaction entre les partenaires de dimérisation.

Enfin, nos résultats suggèrent que les dimères ne sont pas stables au cours du temps, mais au contraire relativement vite échangeables. Ceci paraît contradictoire avec l'hypothèse prévalant actuellement, selon laquelle la majorité des récepteurs "naissent, vivent et meurent" sous la forme de dimères. L'étude de la dynamique de formation et dissociation de dimères, suite à l'interaction

V. CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

avec des agonistes et des anticorps devrait apporter plus de réponses à ces questions. De même, l'apparition d'un signal BRET, suite à la fusion de deux populations de cellules dont les membranes comportent respectivement l'un et l'autre des partenaires de dimérisation devrait également apporter des éléments déterminants à la résolution de ce problème. Les récepteurs CCR5 et CCR2b, avec leurs pharmacologies bien distinctes, constituent des modèles particulièrement bien adaptés pour répondre à ces différentes questions.

VI. MATERIEL ET METHODES

VI. MATERIEL ET METHODES

1. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Cette réaction permet d'amplifier de manière spécifique un fragment d'ADN d'intérêt à l'aide d'un couple d'amorces oligonucléotidiques complémentaires de brins opposés. Pour la réaction, 50 ng d'ADN plasmidique ont été mis en présence de 500 ng de chaque amorce, 0.2 mM de dNTP (N = A, C, G, T), 1.5 U de *Taq* polymérase de haute fidélité (*Pfu*), 2 mM de $MgCl_2$, 50 mM de KCl, 20 mM $(NH_4)_2SO_4$ et 75 mM de Tris-HCl (pH 9) dans un volume final de 100 μ l recouvert par 100 μ l d'huile minérale pour éviter l'évaporation. L'ADN est dénaturé à 94°C durant 2.5 minutes, et subit de 30 à 35 cycles successifs de dénaturation, d'hybridation et d'élongation. Ces cycles commencent par 1 minute de dénaturation de l'ADN à 94°C, suivie d'une période d'hybridation des amorces de 2 minutes à une température de 55°C et se terminent par 3 minutes d'élongation par l'enzyme à 72°C. Une PCR s'accompagne de contrôles adéquats, à savoir le blanc PCR (mélange réactionnel d'une PCR sans ADN cible). L'ADN amplifié est ensuite analysé par électrophorèse sur gel d'agarose.

2. Construction des plasmides

Les extrémités C-terminales cytosoliques des récepteurs CCR5 (53 résidus), CCR2b (53 résidus), ORL1 (50 résidus) et RTSH (84 résidus) ont été amplifiées par PCR en utilisant des amorces comprenant les sites de restrictions *Bam*HI, *Eco*RI et *Sal*I (voir Table 14). Les fragments PCR obtenus ont été ligués aux sites *Bam*HI (à l'extrémité 5') et *Sal*I (à l'extrémité 3') des plasmides pAS2 $\Delta\Delta$ et pGBT9 (Clontech), et aux sites *Eco*RI (à l'extrémité 5') et *Sal*I (à l'extrémité 3') du vecteur pGEX4T-2.

La séquence codant pour le récepteur CCR2b a été extraite du vecteur pEFIN3-CCR2b utilisé précédemment dans notre laboratoire (Blanpain et al., 1999b) et a été sous-clonée dans le vecteur pEFIB3, entre les sites de restriction *Bam*HI (à l'extrémité 5') et *Xba*I (à l'extrémité 3').

La séquence codant pour le récepteur CCR2b fusionné à la GFP en C-terminal a été extraite du vecteur pEFIN3-CCR2b utilisé précédemment dans notre laboratoire (Godart et al., non publié) et sous-cloné dans le vecteur pCDNA3 entre les sites *Bam*HI (à l'extrémité 5') et *Xho*I (à l'extrémité 3').

Après digestion et séparation sur gel d'agarose par électrophorèse, les fragments d'ADN ont été visualisés sous illumination U.V. du gel, préalablement coloré au bromure d'éthidium. Les ADN d'intérêt ont été extraits par cryoélution à l'aide du kit Qiaex II (Qiagen) et ligués en

Amorces	Séquences
F-DBD-CCR5 C-ter	5' CGGGATCCCTGGAGTCGGGGAGAAGTTCAGA 3'
R-DBD-CCR5 C-ter	5' ACGCGTCGACGTCACAAGCCCACAGATAT 3'
F-GST-CCR5 C-ter	5' CCGGAATTCCTGGAGTCGGGGAGAAGTTCAGA 3'
R-GST-CCR5 C-ter	5' ACGCGTCGACGTCACAAGCCCACAGATAT 3'
F-DBD-CCR2b C-ter	5' CGGGATCCCTGGAGTCGGGGAGAAGTTCAGA 3'
R-DBD-CCR2b C-ter	5' ACGCGTCGACATTATAAACCAGCCGAGAC 3'
F-GST-CCR2b C-ter	5' CCGGAATTCCTGGAGTCGGGGAGAAGTTCAGA 3'
R-GST-CCR2b C-ter	5' ACGCGTCGACGTCACAAGCCCACAGATAT 3'
F-DBD-ORL1 C-ter	5' CGGGATCCCTGGATTCTTGGATGAGAACTTC 3'
R-DBD-ORL1 C-ter	5' ACGCGTCGACGTCATGCGGGCCGCGGTAC 3'
F-GST-ORL1 C-ter	5' CCGGAATTCCTGGATTCTTGGATGAGAACTTC 3'
R-GST-ORL1 C-ter	5' ACGCGTCGACGTCATGCGGGCCGCGGTAC 3'
F-DBD-RTSH C-ter	5' CGGGATCCCTGGATTACCAAGGCCTTCCAG 3'
R-DBD-RTSH C-ter	5' ACGCGTCGACGTTACAAAACCGTTTGCAT 3'
F-GST-RTSH C-ter	5' CCGGAATTCCTGGATTACCAAGGCCTTCCAG 3'
R-GST-RTSH C-ter	5' ACGCGTCGACGTTACAAAACCGTTTGCAT 3'

Table 14. Tableau des amorces utilisées lors des amplifications par PCR. F- et R- DBD-CCR5 C-ter correspondent aux oligonucléotides sens et antisens de l'extrémité C-terminale de CCR5 flanquée des sites de restrictions *Bam*HI et *Sal*I pour le clonage au sein du vecteur double-hybride permettant l'expression du peptide fusionné au domaine de liaison à l'ADN de GAL4 (DBD). F- et R- GST-CCR5 C-ter correspondent aux oligonucléotides sens et antisens de l'extrémité C-terminale de CCR5 flanquée des sites de restrictions *Eco*RI et *Sal*I pour le clonage au sein du vecteur pGEX4T-2 permettant l'expression du peptide fusionné à la GST. Les abréviations sont similaires pour les autres récepteurs utilisés lors de ces expériences.

présence d'1 U de T4 DNA ligase. Ces produits de ligation ont ensuite été utilisés pour transformer des bactéries électrocompétentes DH₁₀B par électroporation. Les bactéries transformées ont été sélectionnées sur un milieu avec ampicilline (50 µg/ml), la résistance étant conférée par le plasmide. Les bactéries résistantes ont été repiquées, amplifiées et leur ADN plasmidique a été extrait. L'insert contenu dans le vecteur a été caractérisé par carte de restriction et séquençage par la méthode de Sanger (Sanger et al., 1977) adaptée à l'utilisation de ddNTP fluorescents. Les échantillons ont été déposés sur un gel de polyacrylamide et les séquences ont été lues à l'aide d'un séquenceur automatique (Applied Biosystems). L'ensemble des séquences d'ADN a été comparé aux séquences nucléotidiques codantes au moyen du programme Compare de GCG Package.

Trois vecteurs d'expression eucaryotes ont principalement été utilisés au cours de notre doctorat, les vecteurs pcDNA3.1 (Invitrogen), pEFIN3 et pEFIB3 (Euroscreen). Le vecteur pcDNA3.1 contient le gène de résistance au G418 et le promoteur du cytomégalo virus. Les vecteurs bicistroniques pEFIN3 et pEFIB3 contiennent respectivement le gène de résistance au G418 et à la blasticidine sous le contrôle du facteur d'élongation EF-1 α (Uetsuki et al., 1989).

3. Cellules et milieux de culture

Les souches de levures utilisées pour les criblages double-hybride sont :

Y190 (MATa, ura3-52, his3-200, lys2-801, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4 Δ , gal80 Δ , cyh^r2, LYS2 :: GAL1_{UAS}-HIS3_{TATA}-HIS3, URA3 :: GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ) (Flick and Johnston, 1990) ;

PJ69-4A (MATa, trp1-901, leu2 3,112, ura3-52, his3-200, gal4 Δ , gal80 Δ , GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, LYS2::GAL1_{UAS}-HIS3_{TATA}-HIS3, met2::GAL7-LacZ) (James et al., 1996).

La composition des milieux de croissance et de sélection des levures provient de Gietz R.D. (Gietz and Woods, 1994a; Gietz and Woods, 1994b) :

Milieu YPAD : Bacto-yeast extract 1 g, Peptone Difco 2 g, Glucose 2 g, Adénine sulfate 4 ml d'une solution 0,4 g/100 ml (10 mM) (pour milieu solide : agar DIFCO 2 g) ;

Milieu SC (Synthetic Complete) (100 ml) : Bacto Yeast Nitrogen 0,67 g, Glucose 2 g, Drop Out Mix (mélange d'acides aminés) 0,2 g, (pour milieu solide : agar DIFCO 2 g) ;

« Drop Out Mix » 10x : Alanine 200 mg/l, Arginine 200 mg/l, Asparagine 200 mg/l, Acide aspartique 200 mg/l, Cystéine 200 mg/l, Glutamine 200 mg/l, Acide glutamique 200 mg/l, Glycine 200 mg/l, Inositol 200 mg/l, Isoleucine 200 mg/l, Méthionine 200 mg/l, Para-

aminobenzoic 20 mg/l, Phénylalanine 200 mg/l, Proline 200 mg/l, Sérine 200 mg/l, Thréonine 200 mg/l, Tyrosine 200 mg/l, Valine 200 mg/l,

pour Y190 :Adénine 50 mg/l, Lysine 200 mg/l

pour PJ69-4A : Uracile 200 mg/l

autoclaver 12 minutes, ajout des différents acides aminés pour la sélection (histidine (20 mg/l), tryptophane (20 mg/l), leucine (30 mg/l), adénine (40 mg/l)).

Les cellules CHO K1 sont des cellules d'ovaire d'hamster chinois et les cellules HEK-293T sont des cellules embryonnaires de rein humain. Les cellules CHO-K1 ont été cultivées dans du milieu Ham's F12 et les cellules HEK-293T dans du milieu DMEM (Dubelcco's Modified Eagle's Medium) (Invitrogen). Ces milieux de base ont été complétés par 10 % de fœtal calf serum (FCS) (Invitrogen), 100 U/ml de pénicilline (Invitrogen), 100 µg/ml de streptomycine (Invitrogen), et uniquement pour les CHO-K1, 250 µg/ml de zéocine (Invitrogen).

4. Transformation et transfection

Le protocole de préparation des bactéries DH₁₀B, HB101 et BL-21 est adapté de Zabarovsky (Zabarovsky and Winberg, 1990). L'ADN à électroporer et les bactéries électrocompétentes sont introduits dans une cuvette possédant une distance interélectrodes de 0,1 cm, préalablement refroidie sur glace. L'électroporation est effectuée selon les paramètres suivants : 1,7kV, 200Ω, 25µF. Les bactéries sont ensuite resuspendues rapidement dans du SOC (2% tryptone, 0,5% yeast extract, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glucose), incubées 1h à 37°C et étalées sur boîte LB-agar (1% tryptone, 0,5% yeast extract, 10 mM NaCl, 2 mM NaOH, 2% agar)/antibiotique (37°C O/N).

Afin d'établir des lignées CHO K1 exprimant de manière stable nos récepteurs d'intérêts, le vecteur d'expression eucaryote pEFIB3 recombinant a été transfecté dans les cellules CHO K1 à l'aide du kit FuGENE 6 (Boehringer). Deux jours après transfection, les cellules ont été sélectionnées au G418 400 µg/ml et à la blasticidine 10 µg/ml (Invitrogen), et ce durant 14 jours. Pendant ces 14 jours, des dilutions limites de la population mixte des cellules transfectées résistantes aux antibiotiques ont été effectuées afin d'isoler des lignées clonales. Les lignées clonales sont ensuite maintenues en présence de blasticidine 5 µg/ml.

Des lignées à expression transitoire ont été établies dans les cellules HEK-293T par la méthode de précipitation au phosphate de calcium (Velu et al., 1989; Jordan et al., 1996).

5. Criblage d'une banque d'ADNc par la technique du double-hybride

La banque de leucocytes humains a été amplifiée selon les instructions du fournisseur (Clontech). Brièvement, afin d'amplifier la totalité de la banque, celle-ci doit être étalée sur approximativement 300 boîtes de 150 mm. Plusieurs fractions de celle-ci ont été amplifiées par étalement sur milieu sélectif à raison d'un lot de 50 boîtes par amplification. Nous avons préparé l'ADN plasmidique à partir de 3 lots de 50 boîtes, soit l'équivalent de la moitié de la banque. La transformation des levures par de l'ADN plasmidique via la méthode à l'acétate de lithium (AcLi) est adaptée de Ito, Gietz R.D. et Yamada et al. (Ito et al., 1983; Gietz and Woods, 1994a; Yamada et al., 1998). Les levures à transformer sont inoculées dans du milieu YPAD (souches sauvages) ou dans du milieu SC (souches recombinantes) et incubées 12 h à 30°C. Les cellules sont ensuite diluées dans du milieu YPAD frais à une concentration de 2×10^6 cellules par ml et réincubées à 30°C pendant deux à quatre heures afin d'obtenir une concentration de 2×10^7 cellules par ml. Les cellules sont récupérées par centrifugation et lavées dans de l'eau stérile (20 ml). Après centrifugation, le culot de levure est rincé dans 1 ml d'acétate de lithium (AcLi) à 200 mM, recentrifugées, et finalement resuspendues dans 200 μ l d'AcLi 200 mM (à une concentration de 2×10^9 cell/ml). 50 μ l de cette suspension vont être incubés en présence des composés suivant : 240 μ l de PEG 4000 50 %, 36 μ l d' AcLi 2 M, 50 μ g d'ADN de sperme de hareng dénaturé 10 minutes à 100°C, 1 μ g de l'ADN à transformer.

Ce mélange est incubé 30 minutes à 30°C sous agitation douce. Un choc thermique de 25 minutes à 42°C permet l'entrée de l'ADN dans les levures, qui sont ensuite centrifugées 15 secondes à 6000 rpm et resuspendues dans 1 ml de milieu YPAD ou SC. On étale alors 100 μ l de cette suspension diluée 100 fois sur boîte de milieu sélectif SC/agar que l'on incube à 30°C jusqu'à l'apparition des transformants (3 jours). Les transformants sélectionnés sur un milieu carencé en histidine sont ensuite testés pour l'activité du second gène indicateur (LacZ ou Ade). Les plasmides des clones positifs LacZ⁺ ou Ade⁺ sont isolés en bactéries DH10B ou HB101 et sont d'une part engagés dans les tests de spécificités, et d'autre part séquencés. Lors des tests de spécificités, les plasmides des clones positifs sont soit transformés seuls au sein de la levure, soit co-transformés avec différents vecteurs, dont le plasmide portant l'extrémité C-terminale de CCR5 (pAS2 $\Delta\Delta$ - ou pGBT9-CCR5 C-ter), ce même plasmide vide (pAS2 $\Delta\Delta$ ou pGBT9), le plasmide portant l'extrémité C-terminale de CCR2b (pAS2 $\Delta\Delta$ - ou pGBT9-CCR2b C-ter), ainsi que l'un ou l'autre des plasmides portant les extrémités C-terminale des récepteurs RTSH et ORL1 ; et ces combinaisons sont testées pour l'activation des gènes indicateurs. Les séquences sont analysées par recherches d'homologies via l'algorithme BLAST.

6. Extraction et solubilisation des leucocytes mononucléés circulants (PBMC)

Les PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) sont issus à partir de poches de sang (Buffy Coat) fournies par le centre de prélèvement de l'hôpital Erasme, et extraits par centrifugation en présence de Lymphoprep (Gibco-BRL). Les PBMC extraits sont stockés sous forme de culots secs de 1×10^6 cellules (approximativement 5 mg de protéines), et repris dans 1 ml de tampon de solubilisation (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, cocktails d'inhibiteurs de protéases de Roche). Les protéines sont extraites par la méthode de gel dégel (cinq cycles de gel dans l'azote liquide, suivi de dégel à température ambiante), ou par la lyse des cellules pendant 1h à 4°C sous agitation moyenne (1400 rpm) en présence de 0.5 % de CHAPS (Fluka). Le lysat brut est ensuite homogénéisé à la seringue, centrifugé pour éliminer les débris cellulaires et soumis à une phase de « pré-clearing » en présence des billes de glutathion-agarose.

7. GST-pulldown

Des bactéries *E. Coli* BL-21 sont transformées par électroporation par le plasmide pGEX4T-2 contenant l'ADNc codant pour la protéine d'intérêt et étalées sur milieu LB agar/ampicilline pendant 16h à 37°C. Quelques colonies fraîches sont diluées dans 50 ml YTA (16 g/l Tryptone, 10 g/l yeast extract, 5 g/l NaCl) contenant l'antibiotique adéquat et incubées jusqu'à une DO_{600} de 0,5-0,6. La synthèse de la protéine de fusion est alors induite par 0,5 mM d'IPTG pendant 120 minutes à 37°C. Les bactéries centrifugées et aliquotées par 1,5 ml peuvent être conservées à -80°C. Les protéines sont extraites et purifiées par fixation sur billes de glutathion-agarose (Sigma) selon le protocole de Frangioni (Frangioni and Neel, 1993). L'intégrité et la pureté des protéines fusionnées à la GST sont vérifiées sur gel d'acrylamide 12 % et coloration au bleu de Coomassie (pour 100 ml : 50 ml méthanol, 2 ml acide acétique glacial, Bleu de Coomassie R-250 0,4 g).

La protéine DnaK observée lors de l'analyse de nos gels s'élimine normalement par chromatographie échangeuse d'ion sur une colonne de glutathione sépharose 4B (Saluta and Bell, 1998). Malheureusement, lors de nos nombreux tests de production des protéines de fusion en BL21, l'introduction de l'étape d'élution aboutissait à une perte importante des protéines de fusion. N'ayant pas constaté la présence d'une protéine de haut poids moléculaire (80 kDa) lors du contrôle des étapes de synthèse sur gel, nous avons donc jugé préférable de nous en passer, et d'introduire plutôt des lavages successifs à l'aide d'un tampon contenant à concentrations salines croissantes.

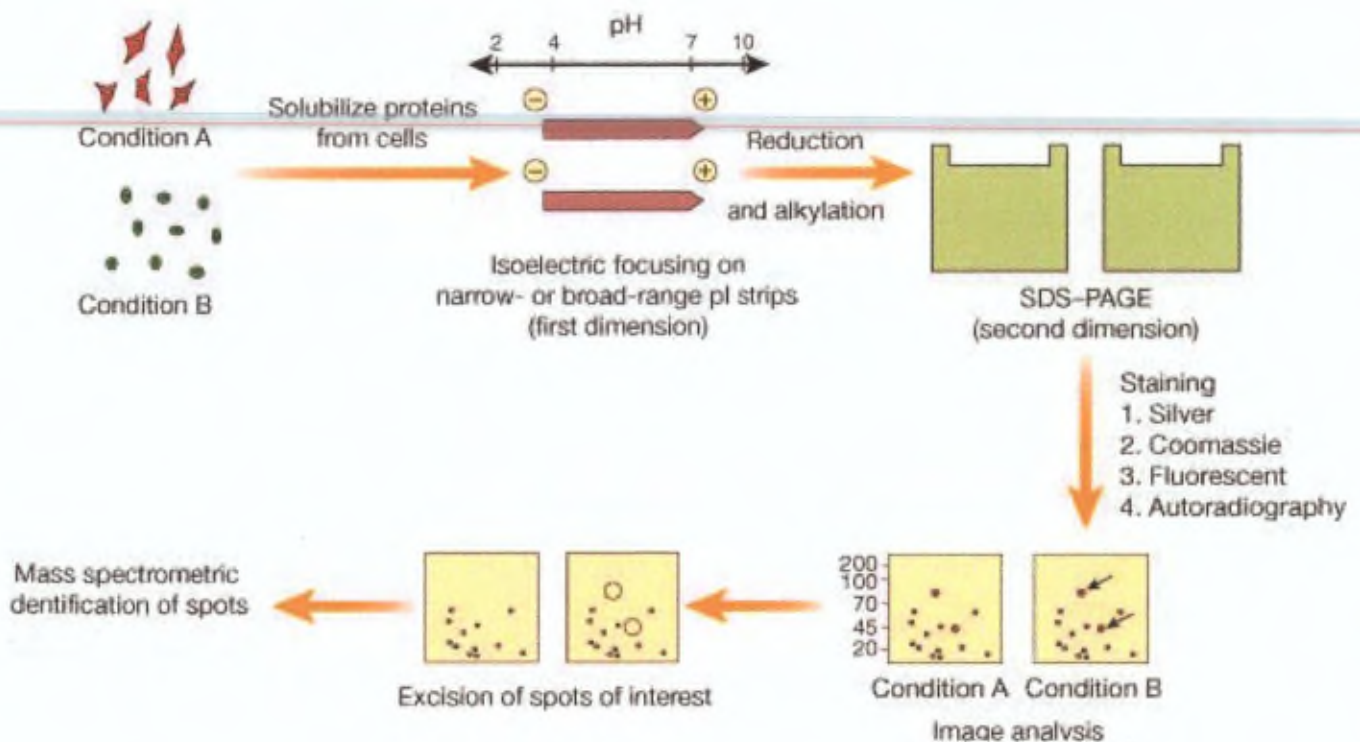


Figure 47. Représentation schématique d'une analyse par gels de polyacrylamide bidimensionnels. Les cellules dérivées de deux conditions différentes, A (par exemple les leucocytes mononucléés) et B (les BL21 exprimant les protéines de fusion GST-extrémité C-terminale du récepteur), sont récupérées et lysées afin de solubiliser les protéines. Le lysat brut de protéines est ensuite soumis à l'analyse de 1^{ère} dimension qui sépare les protéines en fonction de leur point isoélectrique sur un « strip ». Après cette étape, le « strip » est soumis à une étape de réduction et d'alkylation, et est ensuite analysé dans la 2^{nde} dimension, sur un gel de polyacrylamide classique où les protéines sont séparées selon la taille. Les gels sont ensuite colorés au bleu de Coomassie, et lavés à l'eau, étape permettant de se trouver d'emblée en condition non acide, en vue de l'excision des signaux et de leur analyse par spectrométrie de masse.

Les billes de glutathion-agarose couplées à la protéine de fusion sont incubées en présence des protéines extraites des PBMC pendant 16h à 4° C (25 µl de billes saturées par approximativement la protéine de fusion, et incubées en présence d'approximativement 1 mg de protéines).. Les billes ensuite récupérées, lavées, éluées dans du tampon Laemmli et analysées sur gel d'acrylamide mono- ou bidimensionnel. Les gels sont colorés au Bleu de Coomassie Colloïdal, en vue d'une identification par spectrométrie de masse.

8. Séparation des protéines par électrophorèse à une dimension

La méthode de séparation des protéines sur gel de polyacrylamide est celle décrite par Laemmli en 1970 (Laemmli, 1970). Son principe repose sur la solubilisation des protéines dans un tampon dénaturant contenant un détergent anionique puissant, le SDS. Les polypeptides dénaturés lient le SDS de manière proportionnelle à leur taille et deviennent ainsi uniformément chargés. L'application d'un champ électrique provoque la migration des complexes polypeptidique-SDS au travers des mailles d'un gel de polyacrylamide en fonction de leur masse. L'électrophorèse est réalisée dans un système discontinu de tampons : l'échantillon et le gel de concentration contiennent un tampon Tris-HCl (pH 6,8), les tampons des réservoirs supérieur et inférieur de la cuve d'électrophorèse contiennent un tampon Tris-glycine (pH 8,3), et le gel de résolution contient un tampon Tris-HCl (pH 8,8). Une fois l'électrophorèse terminée, les protéines du gel peuvent être soit colorées au bleu de Coomassie, soit transférées sur une membrane de nitrocellulose ou de PVDF.

9. Séparation des protéines par électrophorèse à deux dimension

La séparation des protéines se fait en deux étapes : une première séparation selon leur pH isoélectrique suivi d'une deuxième selon leur poids moléculaire (Figure 47).

La séparation des protéines selon leur pH isoélectrique est réalisée sur des gels de dimension 180 x 3 x 0,5 mm appelés « strips » (Pharmacia). Ceux-ci sont conservés déshydratés à -20°C. Il existe deux types d'appareil : le multiphor et l'IPGphor. Pour le multiphor, les gels sont préalablement réhydratés à l'aide d'une solution saturée en urée (Table 15), puis sont positionnés dans l'appareil servant à la migration. Les échantillons sont ensuite déposés sur ces gels. Par contre l'IPGphor permet de réhydrater les gels en présence de l'échantillon et sous un faible voltage. Les gels sont positionnés dans ces appareils de manière à ce que le côté le plus basique du gel se trouve du côté de l'électrode négative (cathode). Les conditions de migration dépendent

Constituants	Concentration
Urée	7 M
Thiourée	2 M
DTE	0.0648 M
CHAPS	0.065 M
Ampholytes 3-10	1 % (vol/vol)
Pefabloc	10 mM

Table 15. Composition de la solution saturée en urée pour la réhydratation des “strips”.

Etapes	Multiphor	IPGphor
réhydratation	0 V 14 h	30 V 7 h 60 V 7 h
migration	150 V 30 minutes 300 V 1 h 1500 V 1 h 3500 V jusqu'à:	100 V 30 minutes 200 V 1 h 500 V 1 h 1000 V 1 h 8000 V jusqu'à:
	18000 Vh (gel 3-10) 30000 Vh (gel 4-7) 42000 Vh (gel 4.2-5.2/ 4.5-5.5)	

Table 16. Conditions de migration des protéines selon leur pH isoélectrique (première dimension de séparation).

Constituants	Solution de réduction	Solution d'alkylation
Tris-HCL	50 mM	50 mM
Urée	6 M	6 M
Glycérol	30%	30%
SDS	1%	1%
DTT	1%	–
Iodoacétamide	–	5%

Table 17. Composition des solutions d'équilibration.

de la zone de pH créée dans le gel (Table 16). Plus l'intervalle est étroit, plus le temps de migration sera long. Une fois la migration des protéines selon leur pH isoélectrique finie, les gels sont équilibrés 15 minutes dans une solution de réduction puis 15 minutes supplémentaires dans une solution de blocage (alkylation) (Table 17).

Les gels sont ensuite rincés dans le tampon d'électrophorèse servant pour la seconde dimension. Ceux-ci sont ensuite déposés sur des gels de polyacrylamide 12,5 % qui nous permettent de séparer les protéines selon leur poids moléculaire. Une fois la migration terminée, soit les protéines sont transférées sur membrane de PVDF soit les gels sont colorés au nitrate d'argent, ou au bleu de Coomassie colloïdal puis sont séchés et autoradiographiés sur film MP ou β -max (Amersham, Biosciences).

10. Coloration des gels

Coloration des protéines du gel au nitrate d'argent : Les gels sont fixés 2 h dans une solution contenant 50 % de méthanol et 5 % d'acide acétique. Les gels sont ensuite lavés dans une solution de méthanol 50 % et conservés dans de l'eau bidistillée (H_2O) avant la coloration. L'étape de sensibilisation d'1 minute dans du thiosulfate de sodium 0.02 % est suivie par deux lavages d'1 minute à l' H_2O , et les gels sont ensuite colorés pendant 20 minutes en présence d'une solution de 0.1 % de nitrate d'argent. Deux lavages successifs à l' H_2O sont réalisés et l'étape de développement en présence de 0.04 % de formaline et 2 % de carbonate de sodium est effectuée sous agitation permanente. Lorsque le développement est terminé, les gels sont lavés dans une solution contenant 5 % d'acide acétique et séchés.

Coloration au bleu de Coomassie Colloïdal : La coloration au bleu de Coomassie Colloïdal des protéines du gel de polyacrylamide est basée sur la méthode de Blakesley (réf). Après l'électrophorèse bidimensionnelle, les gels sont rincés dans de l'eau ultra pure puis sont placés dans la solution de coloration contenant $9,37 \cdot 10^{-4}$ M de bleu de Coomassie G-250, 0,4 M d'acide sulphurique, 0,87 M d'hydroxyde de sodium et 13,2% d'acide trichloroacétique. La coloration s'effectue soit à 50°C pendant 3 heures, soit à température ambiante pendant toute une nuit. La décoloration du gel est réalisée par de multiples rinçages à l'eau.

11. Spectrométrie de masse

Après l'électrophorèse bidimensionnelle, les signaux d'intérêts sont excisées du gel et sont digérées par la trypsine, basé sur le protocole de Shevchenko et al. (Shevchenko et al., 1996). Les morceaux de gel sont traités avec 10 mM de DTT à 56°C pendant 30 minutes et ensuite avec 55 mM d'iodoacétamide pendant 30 minutes à température ambiante. Ces morceaux de gel sont lavés avec 100 mM de bicarbonate d'ammonium et d'acétonitrile 80% dans l'eau avant l'incorporation de la trypsine dans le gel. La digestion a lieu durant 16 heures à 37°C par addition de 0,6 µg de trypsine (2.500 U/mg) en solution dans 75 µl de tampon Tris-HCl pH 8,7. Les produits de digestions sont ensuite purifiés par une extraction en phase solide sur un Zip Tip C 18 (Millipore).

La purification sur Zip Tip C 18 est réalisé comme suit : après réhydratation de la phase solide avec 80% d'acétonitrile dans l'eau, la résine C 18 est équilibrée avec 5% d'acétonitrile dans l'eau contenant 0,2% de TFA et les peptides tryptique sont adsorbés par une vingtaine de pipetages répétitifs. Les peptides sont élués directement dans 1,5 µl d'acide 2,5-dihydroxybenzoïque en présence d'acétonitrile 70%. Après séchage complet de l'échantillon, ils sont analysés sur un spectromètre de masse Q-TOF Ultima Global (Micromass) équipé d'une source MALDI. L'ionisation est réalisée en utilisant un lazer (337 nm, 10 Hz). L'instrument est calibré en utilisant les masses monoisotopiques de peptides tryptique et chymotryptique de l'albumine de sérum bovin. Les acquisitions sont exécutées en position du réflectron en mode V. Le microséquençage est exécuté par fragmentation induit par l'argon après sélection de l'ion parent.

12. Immunoprécipitation

Afin de solubiliser les récepteurs au chimiokines CCR5 et CCR2b, nous avons utilisé le protocole développé par Mirzabekov et al. (Mirzabekov et al., 1999). Brièvement, les cellules (10×10^6) sont reprises dans 1 ml de tampon de solubilisation non-dénaturant contenant un cocktail d'inhibiteur de protéases (Roche), et incubées à 4°C pendant 30 minutes sur une Rocking Platform. Les débris cellulaires sont ensuite éliminés par centrifugation, et le surnageant est conservé. Dans le cas des expériences d'immunoprécipitation de CCR5 seul, une phase de « pré-clearing » avait été introduite. Les billes de G-sépharose servant à l'immunoprécipitation sont pré-incubées pendant 4 heures avec les anticorps anti-CCR5 ou anti-CCR2b (35 µl de billes + 3.5 µg d'anticorps). Les lysats cellulaires sont divisés en deux et incubés 12 h à 4°C en présence des

billes liant chacun des anticorps. Les billes sont ensuite lavées 3 fois avec le tampon de solubilisation et le culot est repris dans un volume égal de tampon Laemmli (0,2 % de SDS et 5 % de β -mercaptoéthanol, sauf précisions). Les réactions d'immunoprécipitations sont ensuite incubées pendant 1 h à 55°C sous agitation douce, avant d'être analysé sur gel d'acrylamide monodimensionnel. Ces gels ont été dans certains cas colorés à l'argent (immunoprécipitation de CCR5), et dans la plupart des cas, les protéines ont été transférées et immunodétectées sur une membrane de nitrocellulose.

13. Immunodétection

L'immunodétection ou Western blotting (Towbin et al., 1979; Burnette, 1981) combine la résolution de l'électrophorèse avec la spécificité de la détection immunochimique. Les protéines séparées sur gel sont électrotransférées sur une membrane de nitrocellulose en plaçant celle-ci en contact direct avec le gel dans un champ électrique. Celui-ci permet de déplacer les protéines du gel vers la membrane placée du côté de la cathode et les sites de liaison libres sont bloqués par incubation avec un tampon Tris-HCl salin contenant 0.1% Tween 20 et 5% lait en poudre. CCR5 et CCR2b ont été détecté par les anticorps monoclonaux MC5 (1/1000), 1D9 (1/1000) (Millenium Pharmaceuticals) ou par l'anticorps polyclonal SC20 (1/200) (Santa Cruz Biotechnology), suivi par la liaison des anticorps 2^{ndaires} de chèvre (HRP-conjugated goat anti-mouse IgG ; MC5 et 1D9) et d'âne (HRP-donkey anti-goat IgG ; SC-20) et visualisé par chemoluminescence (Lumilight+ Western blotting kit, Roche Molecular Biochemicals). Lors de la réaction, l'incubation de la membrane avec le substrat de la peroxydase va entraîner une réaction chimique avec émission de lumière à l'endroit où le complexe est fixé. La lumière émise interagit avec l'émulsion du film autoradiographique de manière à donner une image après développement.

14. Cytométrie de flux

Un système hydropneumatique injecte sous pression une suspension cellulaire au centre d'une veine liquide. Ce système de deux flux laminaires permet de réaliser un véritable capillaire liquide dont la section restreinte contraint les cellules à se présenter individuellement devant un faisceau lumineux d'excitation. Celui-ci provient généralement d'un laser, qui permet d'obtenir une lumière émise à une longueur d'onde de 488 nm. Des canaux de fluorescence permettent la mesure de la lumière émise par des fluorochromes, marqueurs de la membrane cellulaire (anticorps fluorescents, substrats enzymatiques, ...), le cytomètre nous renseigne alors sur la

densité du marqueur de surface. L'ensemble des paramètres analytiques est ensuite traité par l'informatique du système et exprimé sous forme de courbes ou d'histogrammes mono ou biparamétriques.

Les cellules sont collectées dans 4 mL de PBS-EDTA (NaCl 0.8%, KCl 0.02%, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.37%, pH 7.4 ; 5 mM EDTA), centrifugées à 500 x g pendant 3 minutes et resuspendues dans du PBS contenant 0.1% de BSA, 0.1% d'azide de sodium et les anticorps. L'anticorps 2D7 (10 $\mu\text{g/mL}$), couplé à la phycoérythrine (2D7-PE), est un anticorps conformationnel spécifique de la deuxième boucle extracellulaire du récepteur CCR5 (BD Biosciences). L'anticorps N20 (50 $\mu\text{g/mL}$) couplé à la phycoérythrine (N20-PE), reconnaît spécifiquement de CCR2 (épitope non précisé) (R&D Systems). Après une incubation de 30 minutes à l'abri de la lumière, l'excédent d'anticorps est éliminé par lavage au moyen de 3 mL de tampon PBS-BSA-azide, les tubes sont centrifugés et décantés. Les cellules sont alors resuspendues dans 250 μL de tampon PBS-BSA-azide et conservées sur glace dans le noir jusqu'à l'analyse par cytométrie de flux. 10000 cellules par condition sont alors excitées à 488 nm et la fluorescence émise est analysée dans le canal FL-2 à 585 nm.

15. Endocytose des récepteurs

Trois jours avant le FACS, les cellules CHO-K1 exprimant le(s) récepteur(s) sont incubées dans des plaques à 6 puits à la concentration de 0.6×10^6 par puits. La veille de l'expérience, le milieu est aspiré, les cellules sont rincées deux fois avec du milieu Ham's F12 dépourvu de sérum et incubées 12 h dans ce milieu. Avant la stimulation des cellules, une boîte de 30 mm est déposée sur glace et permettra de déterminer la quantité de récepteurs présents au temps 0. Différentes concentrations des chimiokines MIP-1 β , RANTES et MCP-1 (1, 10, 25, 50, 100 nM) sont utilisées pour la stimulation des cellules, et seront ajoutées au milieu dépourvu de sérum contenu dans des plaques de culture. Les plaques sont ensuite incubées à 37°C pendant 20 minutes, lavées 2 x au PBS glacé après la stimulation, et détachées en présence de PBS-EDTA. Chaque réaction d'endocytose est répartie dans un ou deux tubes, dépendant du nombre de récepteurs à analyser (CCR5 et/ou CCR2b) et les cellules sont alors incubées en présence de 2D7-PE et/ou de N20-PE, en vue de l'analyse par cytométrie de flux.

16. Mesure de la mobilisation de calcium intracellulaire (test Aequorine)

Le système aequorine correspond à une méthode bioluminescente de mesure de Ca^{2+} intracellulaire basée sur l'activation de l'aequorine (Figure 48) (Milligan et al., 1996; Stables et

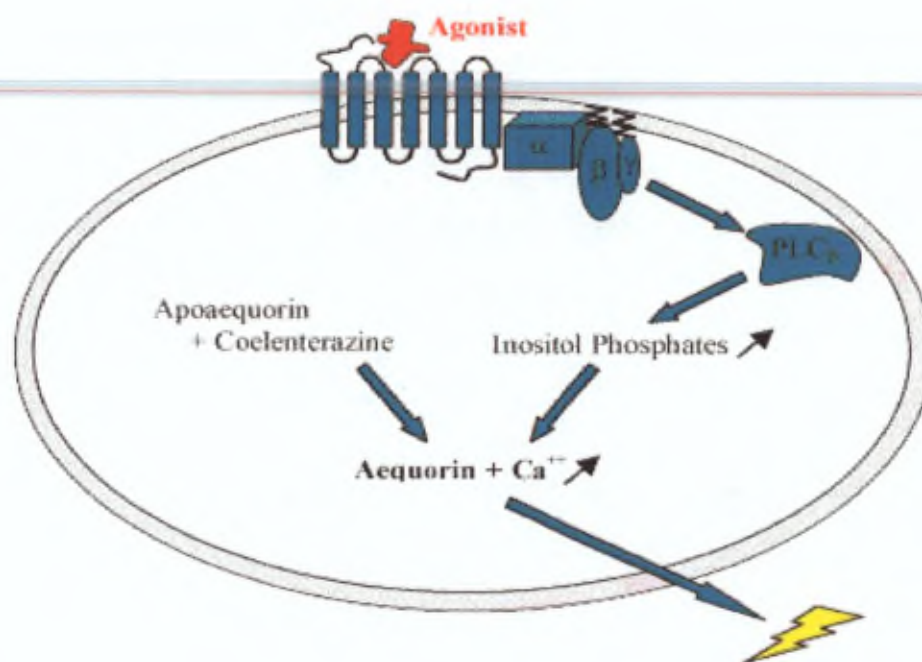


Figure 48. Représentation schématique du système aequorine. Génération de lumière suite à l'activation de l'aequorine par une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire.

al., 1997). Les cellules sont récoltées à l'aide de 4 ml de PBS contenant 5 mM d'EDTA. Après les avoir comptées, elles sont resuspendues à la densité de 5×10^6 cellules/ml dans du milieu DMEM-F12, 0.1 % BSA. Un ml de la suspension cellulaire est alors incubé à l'abri de la lumière en présence de coelentératine H à la concentration finale de 5 μ M, sous agitation lente. Après 4 heures, la suspension cellulaire est diluée 10 fois dans le milieu DMEM-F12, 0.1 % BSA et conservée à l'abri de la lumière et sous agitation lente pendant 30 minutes. Après une demie heure, 50 μ l de la suspension cellulaire (25000 cellules) sont ensuite injectés dans les puits d'une plaque de 96 puits contenant 50 μ l de solutions de différentes chimiokines. Nous avons utilisé les chimiokines RANTES et MCP-2 aux concentrations finales de 0.001, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100 et 300 nM. La luminescence a été mesurée pendant 30 secondes par un luminomètre EG&G Berthold (PerkinElmer Life Sciences). Les EC_{50} (moitié de la concentration effective maximale) ont été déterminées par le programme GraphPad Prism en utilisant la régression non-linéaire appliquée à un modèle de dose-réponse sigmoïdal.

17. Préparation des membranes et tests de liaisons

Les cellules de 10 boîtes de culture (90 mm de diamètre) sont collectées à l'aide de PBS contenant 5 mM d'EDTA, centrifugées 4 minutes à 1100 RPM et resuspendues dans 10 ml de solution A (15 mM Tris HCL pH 7.5, 2 mM $MgCl_2$, 1.4 mM EDTA, 1 mM EGTA ; pH 7.4). En chambre froide, les cellules sont ensuite lysées mécaniquement dans un homogénéisateur manuel téflon-verre. La suspension cellulaire est alors centrifugée à 22000 RPM, à 4°C pendant 30 minutes (rotor SW28). Le surnageant est éliminé et le culot resuspendu dans 30 ml de solution A. La suspension cellulaire est à nouveau centrifugée dans les mêmes conditions citées ci-dessus. Le surnageant éliminé, le culot est resuspendu cette fois dans 1100 μ l de solution B (75 mM Tris HCL pH 7.5, 12.5 mM $MgCl_2$, 1.3 mM EDTA, 1 mM EGTA, 250 mM de sucrose). 100 μ l de la solution sont gardés pour un dosage protéique en présence du réactif de Bradford (Pierce) tandis que le ml restant est conservé à -80°C.

Les tests de liaison sont effectués dans des tubes Minisorb (Nunc) dans un volume final de 0.1 ml de tampon de liaison (50 mM HEPES, 1 mM $CaCl_2$, 5 mM $MgCl_2$, 0.5 % BSA, pH 7.4), contenant 2 μ g de protéines membranaires et des concentrations croissantes de ^{125}I -MIP-1 β ou ^{125}I -MCP-1 (activité spécifique 2200 Ci/mmol, NEN). La mesure de la liaison totale est réalisée en absence de compétiteur, et la liaison non spécifique s'effectue en présence d'un excès de ligand non marqué (100 fois plus de ligand). Les échantillons sont ensuite incubés 90 minutes à 27°C, et le traceur lié est séparé du traceur libre par filtration à travers des filtres GF/B imprégnés préalablement dans une solution de polyéthylénimine 0.5 %. La radioactivité présente sur les

CCR _x -hRluc (ng)	CCR _x -YEFP (ng)	pCDNA3.1 (ng)
400	-	12800
400	400	12000
400	800	11600
400	1600	11000
400	3200	9600
400	6400	6400
400	12800	-
-	800	12000

Table 18. Tableau récapitulatif des quantités de vecteurs transfectées lors des expériences de BRET. Les cellules HEK-293T sont transfectées par des quantités constantes de pCDNA3.1-CCR5- ou pCDNA3.1-CCR2b-hRluc (symbolisés par x) et des quantités croissantes de pCDNA3.1-CCR5- ou pCDNA3.1-CCR2b-YEFP. La quantité totale de 13200 ng de plasmide est atteinte par addition de pCDNA3.1 sauvage.

filtres est alors mesurée par un compteur à scintillation β . Les paramètres de liaison sont déterminés par le software PRISM de GraphPad.

Pour les expériences de compétition, les échantillons de membrane sont incubés en présence du tampon de liaison contenant le traceur ^{125}I -MIP-1 β (0.2 nM) ou le traceur ^{125}I -MCP-1 (0.1 nM), ainsi que des concentrations variables de compétiteurs non-marqués MIP-1 β , MIP-1 α , RANTES, MCP-1, MCP-2, ou d'anticorps monoclonaux 2D7 ou Doc-4. Le reste de l'expérience s'effectue comme décrit pour les tests de liaison.

18. BRET

Huit boîtes de culture de 100 mm sontensemencées la veille de la transfection par 3×10^6 cellules, et les cellules sont transfectées le lendemain par une quantité totale de 13200 ng de plasmide selon les proportions reprises dans le tableau 18 (Table 18). Les cellules sont incubées 12 h à 37°C, détachées le lendemain au PBS-EDTA 5 mM, comptées et resuspendues dans du milieu DMEM complet sans phénol rouge de manière à obtenir une concentration cellulaire de 300000 cellules/ml par tubes. Les différentes suspensions cellulaires sont aliquotées dans des plaques de 96 puits à fond optique (Nunc), à raison d'une rangée par réaction de transfection. Les plaques sont ensuite incubées 12 h à 37°C et les mesures BRET sont effectuées 24 h post-transfection. Le milieu de chaque puit est aspiré et remplacé par 90 μl de tampon BRET (PBS sans calcium ni magnésium, CaCl_2 1mM, MgCl_2 1mM, glucose 1 %). Lorsque les cellules sont stimulées par les chimiokines ou les anticorps, 90 μl de tampon BRET sont ajoutés sur la 1^{ère} moitié de la plaque (colonnes de 1 à 6, sur les rangées 1 à 8) et 40 μl sur la 2^{nde} (colonnes de 7 à 12, sur les rangées 1 à 8), tandis que 50 μl d'une préparation contenant 100 nM de chimiokines ou 5 $\mu\text{g/ml}$ d'anticorps seront additionnés juste avant l'ajout de la coelentérazine. La mesure de la fluorescence est alors effectuée sur la moitié de la plaque de 96 puits (colonnes de 1 à 6, sur les rangées 1 à 8) (excitation à 485 nm, émission à 535 nm), par la machine Mithras LB 940 Multilabel Reader (Berthold). La coelentérazine (10 μl pour une concentration finale de 2.5 μM) est ensuite ajoutée sur la 1^{ère} moitié de la plaque, et la mesure de la luminescence est réalisée (émission à 485 nm). Une fois que cette mesure est terminée, la plaque est alors conditionnée pour l'analyse du signal BRET, qui s'effectue sur la 2^{nde} moitié de la plaque : soit les cellules ne sont pas stimulées, et la solution de coelentérazine est directement ajoutée, soit les cellules sont stimulées par une chimiokine ou un anticorps, qui est ajouté juste avant la coelentérazine. La plaque peut alors être analysée. Le lecteur de BRET enregistre la luminescence et la fluorescence et calcule le ratio BRET automatiquement.

VII. BIBLIOGRAPHIE

VII. BIBLIOGRAPHIE

- AbdAlla,S., Zaki,E., Lothar,H., and Quitterer,U. (1999). Involvement of the amino terminus of the B(2) receptor in agonist-induced receptor dimerization. *J. Biol. Chem.* 274, 26079-26084.
- Alkhatib,G., Berger,E.A., Murphy,P.M., and Pease,J.E. (1997). Determinants of HIV-1 coreceptor function on CC chemokine receptor 3. Importance of both extracellular and transmembrane/cytoplasmic regions. *J. Biol. Chem.* 272, 20420-20426.
- Angers,S., Salahpour,A., Joly,E., Hilairet,S., Chelsky,D., Dennis,M., and Bouvier,M. (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, 3684-3689.
- Aramori,I., Ferguson,S.S., Bieniasz,P.D., Zhang,J., Cullen,B., and Cullen,M.G. (1997). Molecular mechanism of desensitization of the chemokine receptor CCR-5: receptor signaling and internalization are dissociable from its role as an HIV-1 co-receptor. *EMBO J.* 16, 4606-4616.
- Arthos,J., Rubbert,A., Rabin,R.L., Cicala,C., Machado,E., Wildt,K., Hanbach,M., Steenbeke,T.D., Swofford,R., Farber,J.M., and Fauci,A.S. (2000). CCR5 signal transduction in macrophages by human immunodeficiency virus and simian immunodeficiency virus envelopes. *J. Virol.* 74, 6418-6424.
- Atchison,R.E., Gosling,J., Monteclaro,F.S., Franci,C., Digilio,L., Charo,I.F., and Goldsmith,M.A. (1996). Multiple extracellular elements of CCR5 and HIV-1 entry: dissociation from response to chemokines. *Science* 274, 1924-1926.
- Ayoub,M.A., Couturier,C., Lucas-Meunier,E., Angers,S., Fossier,P., Bouvier,M., and Jockers,R. (2002). Monitoring of ligand-independent dimerization and ligand-induced conformational changes of melatonin receptors in living cells by bioluminescence resonance energy transfer. *J. Biol. Chem.* 277, 21522-21528.
- Bacon,K.B., Premack,B.A., Gardner,P., and Schall,T.J. (1995). Activation of dual T cell signaling pathways by the chemokine RANTES. *Science* 269, 1727-1730.
- Baggiolini,M. (1998). Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392, 565-568.
- Bai,M., Trivedi,S., Kifor,O., Quinn,S.J., and Brown,E.M. (1999). Intermolecular interactions between dimeric calcium-sensing receptor monomers are important for its normal function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 2834-2839.
- Benkirane,M., Jin,D.Y., Chun,R.F., Koup,R.A., and Jeang,K.T. (1997). Mechanism of transdominant inhibition of CCR5-mediated HIV-1 infection by ccr5delta32. *J. Biol. Chem.* 272, 30603-30606.
- Berger,E.A., Doms,R.W., Fenyo,E.M., Korber,B.T., Littman,D.R., Moore,J.P., Sattentau,Q.J., Schuitemaker,H., Sodroski,J., and Weiss,R.A. (1998). A new classification for HIV-1. *Nature* 391, 240.
- Berger,E.A., Murphy,P.M., and Farber,J.M. (1999). Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 657-700.
- Bieniasz,P.D., Fridell,R.A., Aramori,I., Ferguson,S.S., Caron,M.G., and Cullen,B.R. (1997). HIV-1-induced cell fusion is mediated by multiple regions within both the viral envelope and the CCR-5 co-receptor. *EMBO J.* 16, 2599-2609.
- Biti,R., Ffrench,R., Young,J., Bennetts,B., Stewart,G., and Liang,T. (1997). HIV-1 infection in an individual homozygous for the CCR5 deletion allele. *Nat. Med.* 3, 252-253.
- Blanpain,C., Doranz,B.J., Bondue,A., Govaerts,C., De Leener,A., Vassart,G., Doms,R.W., Proudfoot,A., and Parmentier,M. (2003). The core domain of chemokines binds CCR5 extracellular domains while their amino terminus interacts with the transmembrane helix bundle. *J. Biol. Chem.* 278, 5179-5187.
- Blanpain,C., Lee,B., Vakili,J., Doranz,B.J., Govaerts,C., Migeotte,I., Sharron,M., Dupriez,V., Vassart,G., Doms,R.W., and Parmentier,M. (1999a). Extracellular cysteines of CCR5 are required for chemokine binding, but dispensable for HIV-1 coreceptor activity. *J. Biol. Chem.* 274, 18902-18908.
- Blanpain,C., Migeotte,I., Lee,B., Vakili,J., Doranz,B.J., Govaerts,C., Vassart,G., Doms,R.W., and Parmentier,M. (1999b). CCR5 binds multiple CC-chemokines: MCP-3 acts as a natural antagonist. *Blood* 94, 1899-1905.

Blanpain, C. and Parmentier, M. CCR5. Cytokine Reference , 2067-2080. 2000. Academic Press.

Ref Type: Generic

Blanpain,C., Vanderwinden,J.M., Cihak,J., Wittamer,V., Le Poul,E., Issafras,H., Stangassinger,M., Vassart,G., Marullo,S., Schlendorff,D., Parmentier,M., and Mack,M. (2002). Multiple active states and oligomerization of CCR5 revealed by functional properties of monoclonal antibodies. *Mol. Biol. Cell* 13, 723-737.

Blanpain,C., Wittamer,V., Vanderwinden,J.M., Boom,A., Renneboog,B., Lee,B., Le Poul,E., El Asmar,L., Govaerts,C., Vassart,G., Doms,R.W., and Parmentier,M. (2001). Palmitoylation of CCR5 is critical for receptor trafficking and efficient activation of intracellular signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 276, 23795-23804.

Bokoch,G.M. (2000). Regulation of cell function by Rho family GTPases. *Immunol. Res.* 21, 139-148.

Burnette,W.N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 112, 195-203.

Cao,T.T., Deacon,H.W., Reczek,D., Bretscher,A., and von Zastrow,M. (1999). A kinase-regulated PDZ-domain interaction controls endocytic sorting of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* 401, 286-290.

Charo,I.F., Myers,S.J., Herman,A., Franci,C., Connolly,A.J., and Coughlin,S.R. (1994). Molecular cloning and functional expression of two monocyte chemoattractant protein 1 receptors reveals alternative splicing of the carboxyl-terminal tails. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 2752-2756.

Chung,C.Y., Funamoto,S., and Firtel,R.A. (2001). Signaling pathways controlling cell polarity and chemotaxis. *Trends Biochem. Sci.* 26, 557-566.

Cicala,C., Arthos,J., Ruiz,M., Vaccarezza,M., Rubbert,A., Riva,A., Wildt,K., Cohen,O., and Fauci,A.S. (1999). Induction of phosphorylation and intracellular association of CC chemokine receptor 5 and focal adhesion kinase in primary human CD4+ T cells by macrophage-tropic HIV envelope. *J. Immunol.* 163, 420-426.

Connor,R.I., Sheridan,K.E., Ceradini,D., Choe,S., and Landau,N.R. (1997). Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1--infected individuals. *J. Exp. Med.* 185, 621-628.

Cornea,A., Janovick,J.A., Maya-Nunez,G., and Conn,P.M. (2001). Gonadotropin-releasing hormone receptor microaggregation. Rate monitored by fluorescence resonance energy transfer. *J. Biol. Chem.* 276, 2153-2158.

Couve,A., Filippov,A.K., Connolly,C.N., Bettler,B., Brown,D.A., and Moss,S.J. (1998). Intracellular retention of recombinant GABAB receptors. *J. Biol. Chem.* 273, 26361-26367.

Dairaghi,D.J., Franz-Bacon,K., Callas,E., Cupp,J., Schall,T.J., Tamraz,S.A., Boehme,S.A., Taylor,N., and Bacon,K.B. (1998). Macrophage inflammatory protein-1beta induces migration and activation of human thymocytes. *Blood* 91, 2905-2913.

Daviet,L., Lehtonen,J.Y., Tamura,K., Griesse,D.P., Horiuchi,M., and Dzau,V.J. (1999). Cloning and characterization of ATRAP, a novel protein that interacts with the angiotensin II type 1 receptor. *J. Biol. Chem.* 274, 17058-17062.

Davis,C.B., Dikic,I., Unutmaz,D., Hill,C.M., Arthos,J., Siani,M.A., Thompson,D.A., Schlessinger,J., and Littman,D.R. (1997). Signal transduction due to HIV-1 envelope interactions with chemokine receptors CXCR4 or CCR5. *J. Exp. Med.* 186, 1793-1798.

Deng,X., Ueda,H., Su,S.B., Gong,W., Dunlop,N.M., Gao,J.L., Murphy,P.M., and Wang,J.M. (1999). A synthetic peptide derived from human immunodeficiency virus type 1 gp120 downregulates the expression and function of chemokine receptors CCR5 and CXCR4 in monocytes by activating the 7-transmembrane G-protein-coupled receptor FPRL1/LXA4R. *Blood* 94, 1165-1173.

Detheux,M., Standker,L., Vakili,J., Munch,J., Forssmann,U., Adermann,K., Pohlmann,S., Vassart,G., Kirchhoff,F., Parmentier,M., and Forssmann,W.G. (2000). Natural proteolytic processing of hemofiltrate CC chemokine 1 generates a potent CC chemokine receptor (CCR)1 and CCR5 agonist with anti-HIV properties. *J. Exp. Med.* 192, 1501-1508.

Dharmawardhane, S., Brownson, D., Lennartz, M., and Bokoch, G.M. (1999). Localization of p21-activated kinase 1 (PAK1) to pseudopodia, membrane ruffles, and phagocytic cups in activated human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 66, 521-527.

Edwards, D.C., Sanders, L.C., Bokoch, G.M., and Gill, G.N. (1999). Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nat. Cell Biol.* 1, 253-259.

Farzan, M., Choe, H., Martin, K.A., Sun, Y., Sidelko, M., Mackay, C.R., Gerard, N.P., Sodroski, J., and Gerard, C. (1997). HIV-1 entry and macrophage inflammatory protein-1 β -mediated signaling are independent functions of the chemokine receptor CCR5. *J. Biol. Chem.* 272, 6854-6857.

Farzan, M., Mirzabekov, T., Kolchinsky, P., Wyatt, R., Cayabyab, M., Gerard, N.P., Gerard, C., Sodroski, J., and Choe, H. (1999). Tyrosine sulfation of the amino terminus of CCR5 facilitates HIV-1 entry. *Cell* 96, 667-676.

Fernandis, A.Z., Cherla, R.P., Chernock, R.D., and Ganju, R.K. (2002). CXCR4/CCR5 down-modulation and chemotaxis are regulated by the proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* 277, 18111-18117.

Flick, J.S. and Johnston, M. (1990). Two systems of glucose repression of the GAL1 promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 10, 4757-4769.

Frangioni, J.V. and Neel, B.G. (1993). Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins. *Anal. Biochem.* 210, 179-187.

Ganju, R.K., Brubaker, S.A., Chernock, R.D., Avraham, S., and Groopman, J.E. (2000). Beta-chemokine receptor CCR5 signals through SHP1, SHP2, and Syk. *J. Biol. Chem.* 275, 17263-17268.

Ganju, R.K., Dutt, P., Wu, L., Newman, W., Avraham, H., Avraham, S., and Groopman, J.E. (1998). Beta-chemokine receptor CCR5 signals via the novel tyrosine kinase RAFTK. *Blood* 91, 791-797.

Gether, U. (2000). Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr. Rev.* 21, 90-113.

Gietz, R. D. and Woods, R. A. High efficiency transformation in yeast with lithium acetate. *Molecular Genetics of yeast: a practical approach.* 1994a. JR Johnston.

Ref Type: Generic

Gietz, R. D. and Woods, R. A. *Molecular Genetics of yeast: a practical approach.* 121-134. 1994b. Oxford, Oxford University Press.

Ref Type: Generic

Gong, W., Howard, O.M., Turpin, J.A., Grimm, M.C., Ueda, H., Gray, P.W., Raport, C.J., Oppenheim, J.J., and Wang, J.M. (1998). Monocyte chemotactic protein-2 activates CCR5 and blocks CD4/CCR5-mediated HIV-1 entry/replication. *J. Biol. Chem.* 273, 4289-4292.

Gosling, J., Monteclaro, F.S., Atchison, R.E., Arai, H., Tsou, C.L., Goldsmith, M.A., and Charo, I.F. (1997). Molecular uncoupling of C-C chemokine receptor 5-induced chemotaxis and signal transduction from HIV-1 coreceptor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 5061-5066.

Gouldson, P.R., Higgs, C., Smith, R.E., Dean, M.K., Gkoutos, G.V., and Reynolds, C.A. (2000). Dimerization and domain swapping in G-protein-coupled receptors: a computational study. *Neuropsychopharmacology* 23, S60-S77.

Hall, R.A., Ostedgaard, L.S., Premont, R.T., Blitzer, J.T., Rahman, N., Welsh, M.J., and Lefkowitz, R.J. (1998a). A C-terminal motif found in the beta2-adrenergic receptor, P2Y1 receptor and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator determines binding to the Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor family of PDZ proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 8496-8501.

Hall, R.A., Premont, R.T., Chow, C.W., Blitzer, J.T., Pitcher, J.A., Claing, A., Stoffel, R.H., Barak, L.S., Shenolikar, S., Weinman, E.J., Grinstein, S., and Lefkowitz, R.J. (1998b). The beta2-adrenergic receptor interacts with the Na⁺/H⁺-exchanger regulatory factor to control Na⁺/H⁺ exchange. *Nature* 392, 626-630.

Han, J., Luby-Phelps, K., Das, B., Shu, X., Xia, Y., Mosteller, R.D., Krishna, U.M., Falck, J.R., White, M.A., and Broek, D. (1998). Role of substrates and products of PI 3-kinase in regulating activation of Rac-related guanosine triphosphatases by Vav. *Science* 279, 558-560.

Harris,B.Z. and Lim,W.A. (2001). Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. *J. Cell Sci.* 114, 3219-3231.

Hebert,T.E., Moffett,S., Morello,J.P., Loisel,T.P., Bichet,D.G., Barret,C., and Bouvier,M. (1996). A peptide derived from a beta2-adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation. *J. Biol. Chem.* 271, 16384-16392.

Hernanz-Falcon,P., Rodriguez-Frade,J.M., Serrano,A., Juan,D., del Sol,A., Soriano,S.F., Roncal,F., Gomez,L., Valencia,A., Martinez,A., and Mellado,M. (2004). Identification of amino acid residues crucial for chemokine receptor dimerization. *Nat. Immunol.* 5, 216-223.

Herrmann,C., Horn,G., Spaargaren,M., and Wittinghofer,A. (1996). Differential interaction of the ras family GTP-binding proteins H-Ras, Rap1A, and R-Ras with the putative effector molecules Raf kinase and Ral-guanine nucleotide exchange factor. *J. Biol. Chem.* 271, 6794-6800.

Hirsch,E., Katanaev,V.L., Garlanda,C., Azzolino,O., Pirola,L., Silengo,L., Sozzani,S., Mantovani,A., Altruda,F., and Wymann,M.P. (2000). Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. *Science* 287, 1049-1053.

Hug,P., Lin,H.M., Korte,T., Xiao,X., Dimitrov,D.S., Wang,J.M., Puri,A., and Blumenthal,R. (2000). Glycosphingolipids promote entry of a broad range of human immunodeficiency virus type 1 isolates into cell lines expressing CD4, CXCR4, and/or CCR5. *J. Virol.* 74, 6377-6385.

Huttenrauch,F., Nitzki,A., Lin,F.T., Honing,S., and Oppermann,M. (2002). Beta-arrestin binding to CC chemokine receptor 5 requires multiple C-terminal receptor phosphorylation sites and involves a conserved Asp-Arg-Tyr sequence motif. *J. Biol. Chem.* 277, 30769-30777.

Ilangumaran,S. and Hoessli,D.C. (1998). Effects of cholesterol depletion by cyclodextrin on the sphingolipid microdomains of the plasma membrane. *Biochem. J.* 335 (Pt 2), 433-440.

Issafras,H., Angers,S., Bulenger,S., Blanpain,C., Parmentier,M., Labbe-Jullie,C., Bouvier,M., and Marullo,S. (2002). Constitutive agonist-independent CCR5 oligomerization and antibody-mediated clustering occurring at physiological levels of receptors. *J. Biol. Chem.* 277, 34666-34673.

Ito,H., Fukuda,Y., Murata,K., and Kimura,A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* 153, 163-168.

Iyengar,S., Schwartz,D.H., Clements,J.E., and Hildreth,J.E. (2000). CD4-independent, CCR5-dependent simian immunodeficiency virus infection and chemotaxis of human cells. *J. Virol.* 74, 6720-6724.

Iyengar,S., Schwartz,D.H., and Hildreth,J.E. (1999). T cell-tropic HIV gp120 mediates CD4 and CD8 cell chemotaxis through CXCR4 independent of CD4: implications for HIV pathogenesis. *J. Immunol.* 162, 6263-6267.

James,P., Halladay,J., and Craig,E.A. (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 144, 1425-1436.

Jin,T., Zhang,N., Long,Y., Parent,C.A., and Devreotes,P.N. (2000). Localization of the G protein betagamma complex in living cells during chemotaxis. *Science* 287, 1034-1036.

Jones,K.A., Borowsky,B., Tamm,J.A., Craig,D.A., Durkin,M.M., Dai,M., Yao,W.J., Johnson,M., Gunwaldsen,C., Huang,L.Y., Tang,C., Shen,Q., Salon,J.A., Morse,K., Laz,T., Smith,K.E., Nagarathnam,D., Noble,S.A., Branchek,T.A., and Gerald,C. (1998). GABA(B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA(B)R1 and GABA(B)R2. *Nature* 396, 674-679.

Jordan,B.A. and Devi,L.A. (1999). G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature* 399, 697-700.

Jordan,J.D., Landau,E.M., and Iyengar,R. (2000). Signaling networks: the origins of cellular multitasking. *Cell* 103, 193-200.

Jordan,M., Schallhorn,A., and Wurm,F.M. (1996). Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. *Nucleic Acids Res.* 24, 596-601.

Kaupmann,K., Malitschek,B., Schuler,V., Heid,J., Froestl,W., Beck,P., Mosbacher,J., Bischoff,S., Kulik,A., Shigemoto,R., Karschin,A., and Bettler,B. (1998). GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature* 396, 683-687.

- Kinter, A., Catanzaro, A., Monaco, J., Ruiz, M., Justement, J., Moir, S., Arthos, J., Oliva, A., Ehler, L., Mizell, S., Jackson, R., Ostrowski, M., Hoxie, J., Offord, R., and Fauci, A.S. (1998). CC-chemokines enhance the replication of T-tropic strains of HIV-1 in CD4(+) T cells: role of signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 11880-11885.
- Kiosses, W.B., Daniels, R.H., Otey, C., Bokoch, G.M., and Schwartz, M.A. (1999). A role for p21-activated kinase in endothelial cell migration. *J. Cell Biol.* 147, 831-844.
- Kraft, K., Olbrich, H., Majoul, I., Mack, M., Proudfoot, A., and Oppermann, M. (2001). Characterization of sequence determinants within the carboxyl-terminal domain of chemokine receptor CCR5 that regulate signaling and receptor internalization. *J. Biol. Chem.* 276, 34408-34418.
- Kuner, R., Kohr, G., Grunewald, S., Eisenhardt, G., Bach, A., and Kornau, H.C. (1999). Role of heteromer formation in GABAB receptor function. *Science* 283, 74-77.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lagane, B., Mazeres, S., Le Grimellec, C., Cezanne, L., and Lopez, A. (2002). Lateral distribution of cholesterol in membranes probed by means of a pyrene-labelled cholesterol: effects of acyl chain unsaturation. *Biophys. Chem.* 95, 7-22.
- Lauffenburger, D.A. and Horwitz, A.F. (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84, 359-369.
- Lavoie, C., Mercier, J.F., Salahpour, A., Umapathy, D., Breit, A., Villeneuve, L.R., Zhu, W.Z., Xiao, R.P., Lakatta, E.G., Bouvier, M., and Hebert, T.E. (2002). Beta 1/beta 2-adrenergic receptor heterodimerization regulates beta 2-adrenergic receptor internalization and ERK signaling efficacy. *J. Biol. Chem.* 277, 35402-35410.
- Lee, B., Sharron, M., Blanpain, C., Doranz, B.J., Vakili, J., Setoh, P., Berg, E., Liu, G., Guy, H.R., Durell, S.R., Parmentier, M., Chang, C.N., Price, K., Tsang, M., and Doms, R.W. (1999). Epitope mapping of CCR5 reveals multiple conformational states and distinct but overlapping structures involved in chemokine and coreceptor function. *J. Biol. Chem.* 274, 9617-9626.
- Lefkowitz, R.J. (1998). G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. *J. Biol. Chem.* 273, 18677-18680.
- Liao, Z., Cimasky, L.M., Hampton, R., Nguyen, D.H., and Hildreth, J.E. (2001). Lipid rafts and HIV pathogenesis: host membrane cholesterol is required for infection by HIV type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 17, 1009-1019.
- Littman, D.R. (1998). Chemokine receptors: keys to AIDS pathogenesis? *Cell* 93, 677-680.
- Liu, Q.H., Williams, D.A., McManus, C., Baribaud, F., Doms, R.W., Schols, D., De Clercq, E., Kotlikoff, M.I., Collman, R.G., and Freedman, B.D. (2000). HIV-1 gp120 and chemokines activate ion channels in primary macrophages through CCR5 and CXCR4 stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 4832-4837.
- Liu, R., Paxton, W.A., Choe, S., Ceradini, D., Martin, S.R., Horuk, R., MacDonald, M.E., Stuhlmann, H., Koup, R.A., and Landau, N.R. (1996). Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 86, 367-377.
- Luttrell, L.M., Ferguson, S.S., Daaka, Y., Miller, W.E., Maudsley, S., Della Rocca, G.J., Lin, F., Kawakatsu, H., Owada, K., Luttrell, D.K., Caron, M.G., and Lefkowitz, R.J. (1999). Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* 283, 655-661.
- Machesky, L.M. and Insall, R.H. (1998). Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr. Biol.* 8, 1347-1356.
- Maggio, R., Vogel, Z., and Wess, J. (1993). Coexpression studies with mutant muscarinic/adrenergic receptors provide evidence for intermolecular "cross-talk" between G-protein-linked receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 3103-3107.
- Maho, A., Bensimon, A., Vassart, G., and Parmentier, M. (1999). Mapping of the CCXCR1, CX3CR1, CCBP2 and CCR9 genes to the CCR cluster within the 3p21.3 region of the human genome. *Cytogenet. Cell Genet.* 87, 265-268.

- Manes, S., del Real, G., Lacalle, R.A., Lucas, P., Gomez-Mouton, C., Sanchez-Palomino, S., Delgado, R., Alcamí, J., Mira, E., and Martínez, A. (2000). Membrane raft microdomains mediate lateral assemblies required for HIV-1 infection. *EMBO Rep.* 1, 190-196.
- Manes, S., Mira, E., Gomez-Mouton, C., Lacalle, R.A., Keller, P., Labrador, J.P., and Martínez, A. (1999). Membrane raft microdomains mediate front-rear polarity in migrating cells. *EMBO J.* 18, 6211-6220.
- Marchese, A. and Benovic, J.L. (2001). Agonist-promoted ubiquitination of the G protein-coupled receptor CXCR4 mediates lysosomal sorting. *J. Biol. Chem.* 276, 45509-45512.
- Marinissen, M.J. and Gutkind, J.S. (2001). G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 368-376.
- Martin, M.P., Dean, M., Smith, M.W., Winkler, C., Gerrard, B., Michael, N.L., Lee, B., Doms, R.W., Margolick, J., Buchbinder, S., Goedert, J.J., O'Brien, T.R., Hilgartner, M.W., Vlahov, D., O'Brien, S.J., and Carrington, M. (1998). Genetic acceleration of AIDS progression by a promoter variant of CCR5. *Science* 282, 1907-1911.
- Mellado, M., Rodriguez-Frade, J.M., Vila-Coro, A.J., Fernandez, S., Martin, d.A., Jones, D.R., Toran, J.L., and Martínez, A. (2001). Chemokine receptor homo- or heterodimerization activates distinct signaling pathways. *EMBO J.* 20, 2497-2507.
- Michael, N.L., Louie, L.G., Rohrbaugh, A.L., Schultz, K.A., Dayhoff, D.E., Wang, C.E., and Sheppard, H.W. (1997a). The role of CCR5 and CCR2 polymorphisms in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat. Med.* 3, 1160-1162.
- Michael, N.L., Louie, L.G., and Sheppard, H.W. (1997b). CCR5-delta 32 gene deletion in HIV-1 infected patients. *Lancet* 350, 741-742.
- Milligan, G., Marshall, F., and Rees, S. (1996). G16 as a universal G protein adapter: implications for agonist screening strategies. *Trends Pharmacol. Sci.* 17, 235-237.
- Mirzabekov, T., Bannert, N., Farzan, M., Hofmann, W., Kolchinsky, P., Wu, L., Wyatt, R., and Sodroski, J. (1999). Enhanced expression, native purification, and characterization of CCR5, a principal HIV-1 coreceptor. *J. Biol. Chem.* 274, 28745-28750.
- Missy, K., Van, P., V, Raynal, P., Viala, C., Mauco, G., Plantavid, M., Chap, H., and Payraastre, B. (1998). Lipid products of phosphoinositide 3-kinase interact with Rac1 GTPase and stimulate GDP dissociation. *J. Biol. Chem.* 273, 30279-30286.
- Mitchell, R., McCulloch, D., Lutz, E., Johnson, M., MacKenzie, C., Fennell, M., Fink, G., Zhou, W., and Sealfon, S.C. (1998). Rhodopsin-family receptors associate with small G proteins to activate phospholipase D. *Nature* 392, 411-414.
- Monnot, C., Bihoreau, C., Conchon, S., Curnow, K.M., Corvol, P., and Clauser, E. (1996). Polar residues in the transmembrane domains of the type 1 angiotensin II receptor are required for binding and coupling. Reconstitution of the binding site by co-expression of two deficient mutants. *J. Biol. Chem.* 271, 1507-1513.
- Mueller, A., Kelly, E., and Strange, P.G. (2002). Pathways for internalization and recycling of the chemokine receptor CCR5. *Blood* 99, 785-791.
- Mullins, R.D., Heuser, J.A., and Pollard, T.D. (1998). The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 6181-6186.
- Murphy, P.M. (2002). International Union of Pharmacology. XXX. Update on chemokine receptor nomenclature. *Pharmacol. Rev.* 54, 227-229.
- Ng, G.Y., George, S.R., Zastawny, R.L., Caron, M., Bouvier, M., Dennis, M., and O'Dowd, B.F. (1993). Human serotonin 1B receptor expression in Sf9 cells: phosphorylation, palmitoylation, and adenylyl cyclase inhibition. *Biochemistry* 32, 11727-11733.
- Ng, G.Y., O'Dowd, B.F., Lee, S.P., Chung, H.T., Brann, M.R., Seeman, P., and George, S.R. (1996). Dopamine D2 receptor dimers and receptor-blocking peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 227, 200-204.

- Nguyen,D.H. and Taub,D. (2002). Cholesterol is essential for macrophage inflammatory protein 1 beta binding and conformational integrity of CC chemokine receptor 5. *Blood* 99, 4298-4306.
- Nibbs,R.J., Yang,J., Landau,N.R., Mao,J.H., and Graham,G.J. (1999). LD78beta, a non-allelic variant of human MIP-1alpha (LD78alpha), has enhanced receptor interactions and potent HIV suppressive activity. *J. Biol. Chem.* 274, 17478-17483.
- Nichols,B.J. and Lippincott-Schwartz,J. (2001). Endocytosis without clathrin coats. *Trends Cell Biol.* 11, 406-412.
- Nieto,M., Frade,J.M., Sancho,D., Mellado,M., Martinez,A., and Sanchez-Madrid,F. (1997). Polarization of chemokine receptors to the leading edge during lymphocyte chemotaxis. *J. Exp. Med.* 186, 153-158.
- O'Brien,T.R., Winkler,C., Dean,M., Nelson,J.A., Carrington,M., Michael,N.L., and White,G.C. (1997). HIV-1 infection in a man homozygous for CCR5 delta 32. *Lancet* 349, 1219.
- Oppermann,M., Mack,M., Proudfoot,A.E., and Olbrich,H. (1999). Differential effects of CC chemokines on CC chemokine receptor 5 (CCR5) phosphorylation and identification of phosphorylation sites on the CCR5 carboxyl terminus. *J. Biol. Chem.* 274, 8875-8885.
- Ostermeyer,A.G., Beckrich,B.T., Ivarson,K.A., Grove,K.E., and Brown,D.A. (1999). Glycosphingolipids are not essential for formation of detergent-resistant membrane rafts in melanoma cells. methyl-beta-cyclodextrin does not affect cell surface transport of a GPI-anchored protein. *J. Biol. Chem.* 274, 34459-34466.
- Palczewski,K. (1997). GTP-binding-protein-coupled receptor kinases--two mechanistic models. *Eur. J. Biochem.* 248, 261-269.
- Parent,C.A., Blacklock,B.J., Froehlich,W.M., Murphy,D.B., and Devreotes,P.N. (1998). G protein signaling events are activated at the leading edge of chemotactic cells. *Cell* 95, 81-91.
- Parent,C.A. and Devreotes,P.N. (1999). A cell's sense of direction. *Science* 284, 765-770.
- Percherancier,Y., Lagane,B., Planchenault,T., Staropoli,I., Altmeyer,R., Virelizier,J.L., Arenzana-Seisdedos,F., Hoessli,D.C., and Bachelier,F. (2003). HIV-1 entry into T-cells is not dependent on CD4 and CCR5 localization to sphingolipid-enriched, detergent-resistant, raft membrane domains. *J. Biol. Chem.* 278, 3153-3161.
- Pollok-Kopp,B., Schwarze,K., Baradari,V.K., and Oppermann,M. (2003). Analysis of ligand-stimulated CC chemokine receptor 5 (CCR5) phosphorylation in intact cells using phosphosite-specific antibodies. *J. Biol. Chem.* 278, 2190-2198.
- Puri,A., Hug,P., Jernigan,K., Barchi,J., Kim,H.Y., Hamilton,J., Wiels,J., Murray,G.J., Brady,R.O., and Blumenthal,R. (1998). The neutral glycosphingolipid globotriaosylceramide promotes fusion mediated by a CD4-dependent CXCR4-utilizing HIV type 1 envelope glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 14435-14440.
- Raport,C.J., Gosling,J., Schweickart,V.L., Gray,P.W., and Charo,I.F. (1996). Molecular cloning and functional characterization of a novel human CC chemokine receptor (CCR5) for RANTES, MIP-1beta, and MIP-1alpha. *J. Biol. Chem.* 271, 17161-17166.
- Rickert,P., Weiner,O.D., Wang,F., Bourne,H.R., and Servant,G. (2000). Leukocytes navigate by compass: roles of PI3Kgamma and its lipid products. *Trends Cell Biol.* 10, 466-473.
- Rodriguez-Frade,J.M., Vila-Coro,A.J., de Ana,A.M., Albar,J.P., Martinez,A., and Mellado,M. (1999a). The chemokine monocyte chemoattractant protein-1 induces functional responses through dimerization of its receptor CCR2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 3628-3633.
- Rodriguez-Frade,J.M., Vila-Coro,A.J., Martin,A., Nieto,M., Sanchez-Madrid,F., Proudfoot,A.E., Wells,T.N., Martinez,A., and Mellado,M. (1999b). Similarities and differences in RA. *J. Cell Biol.* 144, 755-765.
- Rucker,J., Samson,M., Doranz,B.J., Libert,F., Berson,J.F., Yi,Y., Smyth,R.J., Collman,R.G., Broder,C.C., Vassart,G., Doms,R.W., and Parmentier,M. (1996). Regions in beta-chemokine receptors CCR5 and CCR2b that determine HIV-1 cofactor specificity. *Cell* 87, 437-446.

- Ruffing,N., Sullivan,N., Sharmeen,L., Sodroski,J., and Wu,L. (1998). CCR5 has an expanded ligand-binding repertoire and is the primary receptor used by MCP-2 on activated T cells. *Cell Immunol.* 189, 160-168.
- Salahpour,A., Angers,S., and Bouvier,M. (2000). Functional significance of oligomerization of G-protein-coupled receptors. *Trends Endocrinol. Metab* 11, 163-168.
- Saluta, M. and Bell, P. A. Troubleshooting GST fusion protein expression in E. Coli. *Life Science News* 1. 1998. Amersham Pharmacia Biotech.
- Ref Type: Generic
- Samson,M., Labbe,O., Mollereau,C., Vassart,G., and Parmentier,M. (1996a). Molecular cloning and functional expression of a new human CC-chemokine receptor gene. *Biochemistry* 35, 3362-3367.
- Samson,M., LaRosa,G., Libert,F., Paindavoine,P., Detheux,M., Vassart,G., and Parmentier,M. (1997). The second extracellular loop of CCR5 is the major determinant of ligand specificity. *J. Biol. Chem.* 272, 24934-24941.
- Samson,M., Libert,F., Doranz,B.J., Rucker,J., Liesnard,C., Farber,C.M., Saragosti,S., Lapoumeroulie,C., Cognaux,J., Forceille,C., Muyldermans,G., Verhofstede,C., Burtonboy,G., Georges,M., Imai,T., Rana,S., Yi,Y., Smyth,R.J., Collman,R.G., Doms,R.W., Vassart,G., and Parmentier,M. (1996b). Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 382, 722-725.
- Samson,M., Soularue,P., Vassart,G., and Parmentier,M. (1996c). The genes encoding the human CC-chemokine receptors CC-CCR1 to CC-CCR5 (CMKBR1-CMKBR5) are clustered in the p21.3-p24 region of chromosome 3. *Genomics* 36, 522-526.
- Sanders,L.C., Matsumura,F., Bokoch,G.M., and de Lanerolle,P. (1999). Inhibition of myosin light chain kinase by p21-activated kinase. *Science* 283, 2083-2085.
- Sanger,F., Nicklen,S., and Coulson,A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 74, 5463-5467.
- Servant,G., Weiner,O.D., Herzmark,P., Balla,T., Sedat,J.W., and Bourne,H.R. (2000). Polarization of chemoattractant receptor signaling during neutrophil chemotaxis. *Science* 287, 1037-1040.
- Servant,G., Weiner,O.D., Neptune,E.R., Sedat,J.W., and Bourne,H.R. (1999). Dynamics of a chemoattractant receptor in living neutrophils during chemotaxis. *Mol. Biol. Cell* 10, 1163-1178.
- Shen,W., Li,B., Wetzel,M.A., Rogers,T.J., Henderson,E.E., Su,S.B., Gong,W., Le,Y., Sargeant,R., Dimitrov,D.S., Oppenheim,J.J., and Wang,J.M. (2000). Down-regulation of the chemokine receptor CCR5 by activation of chemotactic formyl peptide receptor in human monocytes. *Blood* 96, 2887-2894.
- Shevchenko,A., Wilm,M., Vorm,O., and Mann,M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68, 850-858.
- Siddiqui,R.A., Akard,L.P., Garcia,J.G., Cui,Y., and English,D. (1999). Chemotactic migration triggers IL-8 generation in neutrophilic leukocytes. *J. Immunol.* 162, 1077-1083.
- Smith,M.W., Carrington,M., Winkler,C., Lomb,D., Dean,M., Huttley,G., and O'Brien,S.J. (1997a). CCR2 chemokine receptor and AIDS progression. *Nat. Med.* 3, 1052-1053.
- Smith,M.W., Dean,M., Carrington,M., Winkler,C., Huttley,G.A., Lomb,D.A., Goedert,J.J., O'Brien,T.R., Jacobson,L.P., Kaslow,R., Buchbinder,S., Vittinghoff,E., Vlahov,D., Hoots,K., Hilgartner,M.W., and O'Brien,S.J. (1997b). Contrasting genetic influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV-1 infection and disease progression. Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC), ALIVE Study. *Science* 277, 959-965.
- Sodroski,J.G. (1999). HIV-1 entry inhibitors in the side pocket. *Cell* 99, 243-246.
- Songyang,Z., Fanning,A.S., Fu,C., Xu,J., Marfatia,S.M., Chishti,A.H., Crompton,A., Chan,A.C., Anderson,J.M., and Cantley,L.C. (1997). Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science* 275, 73-77.
- Springael, J. Y., Wagner, K., El-Asmar, L., Godard, M., Parmentier, M., and Mack, M. mAbs raised against human CCR2b reveals multiple conformational states involved in receptor function. 2004.

- Stables,J., Green,A., Marshall,F., Fraser,N., Knight,E., Sautel,M., Milligan,G., Lee,M., and Rees,S. (1997). A bioluminescent assay for agonist activity at potentially any G-protein-coupled receptor. *Anal. Biochem.* 252, 115-126.
- Tai,A.W., Chuang,J.Z., Bode,C., Wolfrum,U., and Sung,C.H. (1999). Rhodopsin's carboxy-terminal cytoplasmic tail acts as a membrane receptor for cytoplasmic dynein by binding to the dynein light chain Tctex-1. *Cell* 97, 877-887.
- Theodorou,I., Meyer,L., Magierowska,M., Katlama,C., and Rouzioux,C. (1997). HIV-1 infection in an individual homozygous for CCR5 delta 32. Seroco Study Group. *Lancet* 349, 1219-1220.
- Towbin,H., Staehelin,T., and Gordon,J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 76, 4350-4354.
- Uetsuki,T., Naito,A., Nagata,S., and Kaziro,Y. (1989). Isolation and characterization of the human chromosomal gene for polypeptide chain elongation factor-1 alpha. *J. Biol. Chem.* 264, 5791-5798.
- Vakili,J., Standker,L., Detheux,M., Vassart,G., Forssmann,W.G., and Parmentier,M. (2001). Urokinase plasminogen activator and plasmin efficiently convert hemofiltrate CC chemokine 1 into its active. *J. Immunol.* 167, 3406-3413.
- Velu,T.J., Beguinot,L., Vass,W.C., Zhang,K., Pastan,I., and Lowy,D.R. (1989). Retroviruses expressing different levels of the normal epidermal growth factor receptor: biological properties and new bioassay. *J. Cell Biochem.* 39, 153-166.
- Venkatesan,S., Petrovic,A., Locati,M., Kim,Y.O., Weissman,D., and Murphy,P.M. (2001). A membrane-proximal basic domain and cysteine cluster in the C-terminal tail of CCR5 constitute a bipartite motif critical for cell surface expression. *J. Biol. Chem.* 276, 40133-40145.
- Venkatesan,S., Petrovic,A., Van Ryk,D.I., Locati,M., Weissman,D., and Murphy,P.M. (2002). Reduced cell surface expression of CCR5 in CCR5Delta 32 heterozygotes is mediated by gene dosage, rather than by receptor sequestration. *J. Biol. Chem.* 277, 2287-2301.
- Venkatesan,S., Rose,J.J., Lodge,R., Murphy,P.M., and Foley,J.F. (2003). Distinct mechanisms of agonist-induced endocytosis for human chemokine receptors CCR5 and CXCR4. *Mol. Biol. Cell* 14, 3305-3324.
- Vicente-Manzanares,M., Montoya,M.C., Mellado,M., Frade,J.M., del Pozo,M.A., Nieto,M., de Landazuri,M.O., Martinez,A., and Sanchez-Madrid,F. (1998). The chemokine SDF-1alpha triggers a chemotactic response and induces cell polarization in human B lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 28, 2197-2207.
- Vila-Coro,A.J., Mellado,M., Martin,d.A., Lucas,P., del Real,G., Martinez,A., and Rodriguez-Frade,J.M. (2000). HIV-1 infection through the CCR5 receptor is blocked by receptor dimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 3388-3393.
- Weiner,O.D. (2002). Regulation of cell polarity during eukaryotic chemotaxis: the chemotactic compass. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 196-202.
- Weissman,D., Rabin,R.L., Arthos,J., Rubbert,A., Dybul,M., Swofford,R., Venkatesan,S., Farber,J.M., and Fauci,A.S. (1997). Macrophage-tropic HIV and SIV envelope proteins induce a signal through the CCR5 chemokine receptor. *Nature* 389, 981-985.
- White,J.H., Wise,A., Main,M.J., Green,A., Fraser,N.J., Disney,G.H., Barnes,A.A., Emson,P., Foord,S.M., and Marshall,F.H. (1998). Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor. *Nature* 396, 679-682.
- Wojcik,C. (1999). Proteasomes in apoptosis: villains or guardians? *Cell Mol. Life Sci.* 56, 908-917.
- Wong,M. and Fish,E.N. (1998). RANTES and MIP-1alpha activate stats in T cells. *J. Biol. Chem.* 273, 309-314.
- Wong,M., Uddin,S., Majchrzak,B., Huynh,T., Proudfoot,A.E., Plataniias,L.C., and Fish,E.N. (2001). Rantes activates Jak2 and Jak3 to regulate engagement of multiple signaling pathways in T cells. *J. Biol. Chem.* 276, 11427-11431.

- Wyatt,R. and Sodroski,J. (1998). The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science* 280, 1884-1888.
- Xiao,Z., Zhang,N., Murphy,D.B., and Devreotes,P.N. (1997). Dynamic distribution of chemoattractant receptors in living cells during chemotaxis and persistent stimulation. *J. Cell Biol.* 139, 365-374.
- Xu,Y., Piston,D.W., and Johnson,C.H. (1999). A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: application to interacting circadian clock proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 151-156.
- Yamada,K., Wang,J.C., Osawa,H., Scott,D.K., and Granner,D.K. (1998). Efficient large-scale transformation of yeast. *Biotechniques* 24, 596-8, 600.
- Yoshioka,K., Saitoh,O., and Nakata,H. (2001). Heteromeric association creates a P2Y-like adenosine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 7617-7622.
- Yu,A. and Malek,T.R. (2001). The proteasome regulates receptor-mediated endocytosis of interleukin-2. *J. Biol. Chem.* 276, 381-385.
- Zabarovsky,E.R. and Winberg,G. (1990). High efficiency electroporation of ligated DNA into bacteria. *Nucleic Acids Res.* 18, 5912.

VIII. PUBLICATIONS

Evidence for negative binding cooperativity within CCR5- CCR2b heterodimers

Laïla El-Asmar^{1,3}, Jean-Yves Springael^{1,3}, Sébastien Ballet¹, Eneko Urizar Andrieu^{1,2},
Gilbert Vassart¹ and Marc Parmentier¹.

¹Institut de Recherche Interdisciplinaire en Biologie Humaine et Moléculaire (IRIBHM),
ULB Campus Erasme, 808 Route de Lennik, B-1070 Brussels Belgium. ²Departamento de
Neurofarmacología, Facultad de Farmacia, Universidad del País Vasco, 1006 Vitoria-
Gasteiz, Spain.

³These authors contributed equally to this work

RunningTitle : Negative binding cooperativity between CCR5 and CCR2b

Corresponding author:

Marc Parmentier

IRIBHM, ULB campus Erasme

808 route de Lennik

B-1070 Brussels, Belgium

Phone : +32-2-555 41 71

Fax : +32-2-555 46 55

E-mail : mparment@ulb.ac.be

SUMMARY

It is well established that most G protein-coupled receptors are able to form homo- and heterodimers, although the functional consequences of this process often remain unclear. CCR5 is a chemokine receptor that plays an important role in inflammatory diseases, and acts as a major co-receptor for human immunodeficiency viruses (HIV). CCR5 was previously shown to homodimerize and heterodimerize with CCR2b, a closely related receptor. In the present study, we have analyzed the functional consequences of this dimerization process, in terms of ligand binding, stimulation of intracellular cascades and internalization. BRET and co-immunoprecipitation assays demonstrated that CCR5 and CCR2b heterodimerize with the same efficiency as they homodimerize. In contrast to what has been reported earlier, no cooperative signaling was observed following co-stimulation of the two receptors by their respective ligands. However, we observed that CCR5-specific ligands which are unable to compete for MCP-1 binding on cells expressing CCR2b alone, efficiently prevented MCP-1 binding when CCR5 and CCR2b were co-expressed. The extent of this cross-competition was correlated with the amount of CCR5 expressed in cells, as determined by FACS analysis. Similar observations were made for the CCR2b-selective ligand MCP-1, that competed efficiently for MIP-1 β binding on cells expressing both receptors. Internalization assays did not allow us to demonstrate co-internalization of the receptors in response to agonist stimulation. Taken together, our observations suggest that CCR5 and CCR2b form homo- and heterodimers with similar efficiencies, and that a receptor dimer can only bind a single chemokine.

INTRODUCTION

G protein-coupled receptors (GPCRs) were in the past considered as acting as monomers. However, dimerization has recently been described for a number of GPCRs, and it is presently well accepted that most, if not all GPCRs, are able to form homodimers. Heterodimers have been described as well for a growing number of receptors. In a few situations, dimerization was shown to be essential for receptor trafficking and functional response (1;2), or to generate a binding site with a distinct pharmacology, as compared to the monomeric (or homodimeric) receptors (3). In most other instances however, the significance of the hetero-dimerization process observed in artificial conditions of heterologous overexpression has not been established, and the functional consequences of this process remains obscure.

CCR5 is a member of the chemokine receptor family that binds MIP-1 α (CCL3), MIP-1 β (CCL4), RANTES (CCL5), MCP-2 (CCL8) and a truncated form of HCC-1 (CCL14) with high affinity (4, 5). CCR5 shares 75% identity with another chemokine receptor, CCR2b. Most of the amino-acid differences are located within the extracellular domains and in the C-terminal, intracellular, tail. Within their predicted transmembrane segments, CCR5 and CCR2b share 91% identity. The CCR5 and CCR2b genes are located as a head to tail array in the CC-chemokine receptor cluster, in the p21 region of the human genome, and result presumably from a relatively recent duplication (6). Yet, the pharmacology of the two receptors is clearly different, as CCR2b does not bind MIP-1 α , MIP-1 β , and RANTES, but binds MCP-1 (CCL2) with high affinity. MCP-2 is shared by the two receptors. The ligand binding specificity of these two receptors has been mapped to the extracellular domains, particularly the second extracellular loop (7), in agreement with the sequence variability found in these regions. In addition to its role as a chemokine receptor involved in the

recruitment of leukocytes in a number of pathological situations (rheumatoid arthritis, graft rejection, neurodegenerative diseases, ...), CCR5 also constitutes the major co-receptor for macrophage-tropic strains of human immunodeficiency virus (HIV), which allows, together with CD4, binding of the viral particles to the cell surface through its envelope protein gp120, triggering the membrane fusion process (8, 9). The presence in human populations of non-functional CCR5 genes, particularly the $\Delta 32$ allele, which encodes a truncated variant retained in the secretory pathway, and providing to its carriers an almost complete resistance to HIV, have highlighted the essential and non redundant role of this receptor in HIV entry (10-14). CCR2b and MCP-1 were shown to play a significant role in the development of atherosclerotic lesions (15). As other chemokine receptors, CCR5 and CCR2b are coupled to the G_i class of heterotrimeric G proteins, and they inhibit adenylyl cyclase, promote intracellular calcium mobilization, stimulate the MAP-kinase pathways, and promote actin cytoskeleton remodeling and chemotaxis.

As other receptors belonging to the same family, CCR5 and CCR2b were shown to homooligomerize (16-18, 21, 22), using a variety of techniques, including immunoprecipitation and fluorescence (FRET) or bioluminescence resonance energy transfer (BRET) techniques. CCR5 and CCR2b were also reported to form heterodimers (19, 20). However, there are conflicting reports regarding the influence of receptor activation on the dimerization process, and the functional consequences of receptor dimerization. Some studies have reported agonist-induced dimerization (18, 19), while no effects of ligands were observed in others (21, 22). A study suggested that CCR5-CCR2b heterodimerization increased the sensitivity and dynamic range of the chemokine response (19). No modification of the binding properties of CCR5 or CCR2b, as a consequence of the dimerization process, has however been described so far, nor for other chemokine receptors.

Both CCR2b and CCR5 are expressed on memory T lymphocytes and the monocyte-macrophage lineage (23-25). If heterodimerization between these receptors has functional consequences, either on the pharmacological binding profile, the signaling efficacy, or other aspects of receptor function, such as internalization or recycling, it might have important implications in the physiology of leukocyte recruitment, the development of a variety of human diseases, and the therapeutic approaches targeting these receptors. We have therefore investigated the homo- and hetero-dimerization properties of CCR5 and CCR2b, as well as its functional consequences, in order to clarify the conflicting reports in the recent literature.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Antibodies

The anti-CCR5 monoclonal antibodies 2D7 and 2D7-PE were obtained from Invitrogen, and MC-5 was kindly provided by Mathias Mack (Munich, Germany). The CCR2 antibodies Doc-2, Doc-3 and Doc-4 were provided by Mathias Mack, 1D9 was a gift from Millennium Pharmaceuticals, SC-20 was purchased from Santa Cruz Biotechnology, and N20-PE from R&D Systems.

Recombinant cell lines

CHO-K1 cells were cultured in Ham's F12 medium supplemented with 10% fetal calf serum (Invitrogen), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin (Invitrogen), 250 µg/ml zeocin (Invitrogen). The CCR2b coding sequence was cloned between the *Bam*HI and *Xba*I sites of the bicistronic expression vector pEFIB3, as described (6, 7). The pEFIB3-CCR2b construct was transfected by lipofection into a CHO-K1 cell line expressing apoaequorin and G_{α16}, or the same cell line expressing the wild-type CCR5 receptor (26). Cells expressing CCR2 were selected by 10 µg/ml blasticidine (Invitrogen) for 14 days and further maintained in the presence of 5 µg/ml blasticidine. Cells expressing CCR5 were maintained in the presence of 400 µg/ml G418 (Invitrogen). The population of CHO-K1 cells coexpressing CCR5 and CCR2b were cloned by limiting dilution and the resulting clones were characterized by flow cytometry analysis and ¹²⁵I-MIP-1β and ¹²⁵I-MCP-1 saturation binding assays. Clones expressing different levels of receptors were selected on this basis.

Immunoprecipitation assays

Cells expressing the receptor(s) were washed with ice-cold PBS, harvested and lysed in a solubilization buffer containing 1% Cymal-5 as described (27). G-Sepharose beads were preincubated for 4 hours at 4°C with the anti-CCR5 or anti-CCR2b antibodies, and the cell lysates were incubated overnight at 4°C with the beads. The beads were then washed three times in the solubilization medium, pelleted, resuspended in an equal volume of SDS-PAGE sample buffer and incubated for 1 h at 55°C under slow agitation, before being loaded on 10% SDS-polyacrylamide gels. Proteins were electrotransferred to nitrocellulose membranes, and free binding sites were blocked by incubation in Tris-HCl buffered saline containing 0.1% Tween 20 and 5% nonfat dry milk. CCR5 and CCR2b were detected by using MC5 (1/1000), SC20 (1/200) or 1D9 (1/1000) monoclonals, followed by horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse IgG (MC5 and 1D9) or donkey anti-goat IgG (SC-20) antibodies, and visualized by chemiluminescence (Lumilight+ Western blotting kit, Roche Molecular Biochemicals).

Binding assays

Cells expressing receptors were grown near to confluence, collected from plates in Ca^{2+} - and Mg^{2+} -free PBS, centrifuged for 5 min at 1500 g and washed with PBS. Cells resuspended in buffer A (15 mM Tris-HCl pH 7.5, 2 mM MgCl_2 , 0.3 mM EDTA, 1 mM EGTA) and homogenized in a glass homogenizer. The homogenates were first centrifuged for 5 min at 500 g and the resulting supernatants at 40,000 g for 30 min at 4°C. The cell membrane pellet was washed in buffer A, and resuspended in buffer B (75 mM Tris-HCl pH 7.5, 12.5 mM MgCl_2 , 0.3 mM EDTA, 1 mM EGTA, 250 mM sucrose) at a protein concentration of approximately 1 mg/mL. Protein content was assayed using the bicinchoninic acid reagent (Pierce) with bovine serum albumin as a standard. Crude membrane fractions were stored at -80°C before use.

Saturation binding experiments were carried out in Minisorb tubes (Nunc) in 0.1 ml final volume of assay buffer (50 mM Hepes pH 7.4, 1 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, 0.5% BSA), containing 2 µg membrane proteins and increasing concentrations of ¹²⁵I-MIP-1β or ¹²⁵I-MCP-1 (specific activity 2200 Ci/mmol, Amersham). Total binding was measured in the absence of competitor, and nonspecific binding was measured with a 100-fold excess of unlabeled ligand. For competition binding experiments, the assay buffer was supplemented with 0.2 nM of ¹²⁵I-MIP-1β or 0.1 nM of ¹²⁵I-MCP-1 as tracers and with variable concentrations of MIP-1β, MIP-1α, RANTES, MCP-1, MCP-2, or the 2D7 or Doc-4 monoclonal antibodies as unlabeled competitors. Samples were incubated for 90 min at 27 °C, and then bound tracer was separated by filtration through GF/B filters presoaked 0.5% polyethylenimine. Filters were counted in a β-scintillation counter. Binding parameters were determined with the PRISM software (Graphpad Softwares) using nonlinear regression applied to a single site, or two sites, binding model.

Intracellular calcium mobilization assay

The functional response to chemokines was analyzed with an aequorin-based assay as previously described (26). Briefly, cells were harvested from plates with Ca²⁺- and Mg²⁺-free DMEM supplemented with 5 mM EDTA and centrifuged for 2 min at 1000 g. The pellet was resuspended in DMEM at a density of 5 x 10⁶ cells/ml, and incubated for 4 h in the dark in the presence of 5 µM coelenterazine H (Promega Corporation). Cells were then diluted 5-fold before use. Variable concentrations of chemokines in a volume of 50 µl of DMEM were added to 50 µl of cell suspension (25,000 cells) per well. Luminescence was measured for 30 sec in an EG&G Berthold luminometer (PerkinElmer Life Sciences). Half-maximal effective concentrations (EC₅₀) were determined with the GraphPad Prism software using nonlinear regression applied to a sigmoidal dose-response model. The reported values are the mean ± S.E.M. of at least three independent experiments.

Receptor internalization assay

CHO-K1 cells expressing CCR5, CCR2b or both were cultured in 3-cm dishes until confluence. The day before the assay, the cells were serum-starved in DMEM containing 20 mM Hepes and 1% BSA. One dish of each cell type was set aside on ice for determination of the basal level of receptors at the cell surface. Agonists were added to the other dishes, which were incubated at 37°C for 30 min. Cells were then put on ice, washed twice with ice-cold PBS, and incubated for 30 min with saturating concentrations of 2D7-PE or N20-PE. Finally, cells were washed again and analyzed on a FACScan.

BRET assays

The cDNAs encoding EYFP and a humanized form of *Renilla* luciferase were fused in frame to the 3' end of CCR5 and CCR2b cDNAs in the pcDNA3.1 vector, as described previously (22). A BRET protocol adapted to cell monolayers was developed (Urizar Andrieu et al., will be described in details elsewhere). Briefly, human embryonic kidney (HEK-293) cells, maintained in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, were seeded at a density of 3×10^6 cells per 100-mm plates. The next day, the cells were transfected by the calcium phosphate precipitation method, using a constant amount of plasmid DNA but various ratios of plasmids encoding the fusion protein partners (28). The different combinations tested were CCR5-hRluc with CCR5-EYFP and CCR2b-hRluc with CCR2b-EYFP for homodimerization studies, and CCR5-hRluc with CCR2b-EYFP and CCR2b-hRluc with CCR5-EYFP for heterodimerization studies. The empty vector pcDNA3.1 was used as carrier when necessary. A control corresponding to mock-transfected cells was included in order to subtract the raw basal luminescence from the data. Twenty-four hours after transfection, the cells were collected, resuspended in the same medium without

phenol red at a density of 300,000 cells/ml and distributed in 96-well optical bottom plates (Nunc, 30.000 cells/well).

Forty-eight hours after transfection, the medium was replaced by BRET buffer (PBS containing 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 and 1% glucose). The expression of the EYFP fusion proteins was estimated by measuring the fluorescence of the cells at 535 nm following excitation at 485 nm, using a Mithras LB 940 Multilabel Reader (Berthold). Fluorescence was recorded as fold over background (mock-transfected cells). The cells were incubated for 15 min with 2.5 μM coelenterazine H (Promega), and luminescence of luciferase was recorded at 1, 5, 10, and 15 minutes. In parallel, BRET was measured as the fluorescence of the cells at 535 nm at the same time points. The BRET ratio is defined as $[(\text{emission at } 510\text{--}590)/(\text{emission at } 440\text{--}500)] - C_f$ where C_f corresponds to $(\text{emission at } 510\text{--}590)/(\text{emission at } 440\text{--}500)$ for the *-hRluc* construct expressed alone in the same experiment.

RESULTS

Characterization of cell lines expressing CCR5 and CCR2b

In order to characterize CCR5/CCR2b dimerization, CHO-K1 cell lines stably co-expressing CCR5 and/or CCR2b were isolated and analyzed for the level of expression of the two receptors at the cell surface by FACS, using receptor-specific monoclonal antibodies, and by saturation binding assays using respectively ^{125}I -MIP-1 β and ^{125}I -MCP-1 as tracers (data not shown). Four cell lines were selected for the different studies performed in the present work. A parental CCR5-expressing CHO-K1 cell line (C5) was previously characterized as expressing about 2.7 pmoles/mg membrane proteins in binding assays (26). This cell line was used as the recipient for CCR2b co-expression, and two clones (C25-12 and C25-15) expressing both receptors were selected on the basis of FACS and binding assays. FACS analysis did not discriminate between the parental line and the two daughter lines in terms of CCR5 expression. In a ^{125}I -MIP-1 β saturation binding assay, the B_{max} was estimated to 2.9 pmoles/mg proteins for clone C25-12 and 3.4 pmoles/mg proteins for clone C25-15. CCR2b expression was determined by ^{125}I -MCP-1 saturation binding assay to 0.62 pmoles/mg proteins for clone C25-12 and 2.4 pmoles/mg proteins for clone C25-15. As a control, a CCR2b-expressing CHO-K1 cell line (C2) established independently was characterized by a B_{max} of 0.51 pmoles/mg proteins, similar to that of clone C25-12. FACS analysis, using anti-CCR2b mAbs, confirmed the relative expression level of this receptor in the three lines. The estimated K_D of CCR5 and CCR2b for their respective ligands in binding assays (data not shown) was consistent with previously described values. The FACS analysis demonstrated that the clones were homogeneous in terms of receptor expression, and regular testing confirmed stable expression over time.

Co-immunoprecipitation of CCR5 and CCR2b

We next investigated whether CCR5 and CCR2b associate with each other by conducting co-immunoprecipitation experiments with specific mAbs on whole-cell lysates. CCR2b immunoprecipitation by the Doc-2 mAb, followed by CCR2b immunodetection by the SC-20 mAb confirmed binding and FACS data, by showing that clone C25-15 expresses more CCR2b than clone C25-12 (not shown). The various reactive bands (38, 40 and 43 kDa) were shown previously to correspond to different glycosylation states of CCR2b (29). Immunodetection of CCR5 following CCR2b immunoprecipitation indicated that CCR5 was successfully co-precipitated with CCR2b, with a single immunoreactive band detected at 45 kDa (Fig. 1a). A faint signal was also observed in cells expressing CCR5 only, suggesting mild cross-reactivity of the anti-CCR2b monoclonal used for immunoprecipitation, or contamination of the pellet by residual particular elements containing the receptor. Similar observations were made with another anti-CCR2 mAb, Doc-3 (data not shown). Co-immunoprecipitation of CCR5 was also observed when the Doc-2 monoclonal was added before lysis of the clone C25-12 cells (results not shown), demonstrating the association of CCR5 and CCR2b at the cell surface. The crude lysate was run in parallel on gels, and immunodetection of CCR5 by the MC5 monoclonal detected CCR5 monomers (45 kDa), as well as oligomers (approximately 70 kDa). The intensity of the signal was similar for the three cell lines expressing CCR5, demonstrating that equal numbers of cells were engaged in the experiments (Fig. 1c).

Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) assays

In order to study the homo and heterodimerization of CCR5 and CCR2b in living cells, we applied the BRET technique. CCR5 and CCR2b were fused at their C-terminus with either luciferase (hRluc) or EYFP, and the constructs were co-transfected to assess homo- or hetero-

dimerization. As described previously (22), energy transfer was observed between CCR5-hRluc and CCR5-EYFP, in a ligand-independent manner (Fig. 2a). A similar energy transfer was observed between CCR2b-hRluc and CCR2b-EYFP, as well as between CCR2b-hRluc and CCR5-EYFP (Fig. 2b and c). In these cases as well, addition of ligands did not affect the energy transfer either positively or negatively (data not shown). The BRET₅₀ value, which is considered to constitute a measure of the "affinity" between the two studied proteins, was found to be similar for CCR5-CCR5 (0.12 ± 0.04), CCR2b-CCR2b (0.26 ± 0.11) and CCR5-CCR2b (0.09 ± 0.04) interactions. As controls, the thyrotropin receptor (TSHR) and GABA_B2 receptor fused to EYFP were used in combination with CCR5-hRluc and CCR2b-hRluc. A much lower energy transfer was observed in these situations, with a slower saturation for which no reliable BRET₅₀ could be determined (data not shown).

Aequorin-based functional assay

CCR5 and CCR2b were previously described to act synergistically when co-expressed in the same cells. Indeed, it was reported that co-stimulation by ligands of both receptors (RANTES and MCP-1) resulted in the activation of the cells (calcium mobilization) for chemokine concentrations 10- to 100-fold lower than those necessary to activate cells expressing a single receptor (19). We therefore repeated these experiments in our cell lines expressing one or the two receptors, by establishing detailed concentration-action curves using the aequorin-based calcium mobilization assay. MCP-1 and RANTES alone induced calcium mobilization with EC₅₀ consistent with earlier reports (26). The values were not affected by the co-expression of the two receptors, as similar values were obtained for the lines expressing a single receptor or both (Fig. 3a, b, Table 1). Furthermore, the simultaneous stimulation by MCP-1 and RANTES did not modify significantly these values (Fig. 3a, b and c). Therefore, our data do not support the cooperativity hypothesis among CCR5/CCR2b

heterodimers, but rather an independent behavior of both receptors in terms of functional stimulation of intracellular cascades.

Binding assays

We next examined the ability of the ligands of each receptor to compete for ^{125}I -MIP-1 β and ^{125}I -MCP-1 binding to membranes of cells expressing CCR5 and/or CCR2b. As expected, MIP-1 α (not shown), MIP-1 β , RANTES (not shown) and MCP-2 inhibited the binding of ^{125}I -MIP-1 β on membranes containing CCR5 alone (Fig. 4a), while MCP-1 competed with a low affinity ($\text{IC}_{50} = 212 \text{ nM}$), as previously described (4). Similarly, MCP-1 and MCP-2 competed for the binding of ^{125}I -MCP-1 on membranes containing CCR2b alone (Fig. 5a), while MIP-1 α (not shown), MIP-1 β (Fig. 5a) and RANTES (not shown) were unable to compete, in agreement with the previously described pharmacology of the receptor (30). Unexpectedly however, modifications in the competition patterns were observed on membranes prepared from cell lines co-expressing CCR5 and CCR2b. In the ^{125}I -MIP-1 β binding assay, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES and MCP-2 behaved similarly, but the apparent affinity of MCP-1 was considerably increased (Fig. 4b and c), and the profile of the curve for the C25-12 clone (Fig. 4b) suggested two binding sites with high and low affinities (IC_{50} of 0.5 and 150 nM respectively). The parameters of these high and low affinity sites correspond to the affinities of MCP-1 for respectively CCR2b and CCR5. However, the existence of two sites was barely detectable for C25-15 clone that expresses more CCR2b. Conversely, in the ^{125}I -MCP-1 binding assay, competition by MCP-1 and MCP-2 was unaffected by CCR5 coexpression (Fig. 5b and c), while a significant competition by MIP-1 α (not shown), MIP-1 β (Fig. 5b and c) and RANTES (not shown) was now observed. The calculated IC_{50} obtained for clones c12 and c15 were similar to those obtained for these chemokines in the ^{125}I -MIP-1 β binding assay. However, the competition was incomplete, as it represented only

55% of the specific binding for clone c15 that expresses high levels of CCR2b, and 70% for clone c12 that expresses lower levels of this receptor. These results suggest therefore that ligands from one receptor are able to compete for the binding of the tracer on the other, in a manner that appears to correlate with the expected proportion of heterodimers. We also showed that a truncated variant of RANTES, [10-68]-RANTES, that acts as a very partial agonist on CCR5, while keeping its affinity for the receptor, is able to compete for MCP-1 binding as efficiently as RANTES itself on cells co-expressing CCR5 and CCR2b (data not shown).

In order to investigate whether steric hindrance at the surface of the receptor might explain this observation, we tested in both binding assays monoclonal antibodies that bind to CCR5 or CCR2b, and that were previously shown to prevent chemokine binding without activating the receptors (31, 32). The anti-CCR5 mAb 2D7, which is directed against the second extracellular loop of CCR5, prevented ^{125}I -MIP-1 β binding on membranes containing CCR5 or the two receptors, but did not affect binding of ^{125}I -MCP-1 (Fig. 6). Similarly, the anti-CCR2b mAb Doc-4, which recognizes a multi-domain epitope of CCR2b (32), prevented ^{125}I -MCP-1 binding but not ^{125}I -MIP-1 β binding (Fig. 6).

Co-internalization assays

Heterodimerization of G protein-coupled receptors has been reported to promote the co-internalization of a receptor upon stimulation of the other member of the dimer (33, 34), or to inhibit the internalization of the stimulated receptor in other cases (34). Internalization of CCR5 and CCR2b was therefore monitored by FACS analysis in cells expressing both receptors, following stimulation of CCR5 by RANTES, or CCR2b by MCP-1. The reduction of cell surface CCR2b, following stimulation by increasing amounts of MCP-1, was observed for the three lines expressing the receptor, although the process was more obvious for clone

C25-12, that expresses lower levels of CCR2b (Fig. 7a). Co-expression of CCR5 did not appear therefore to inhibit the internalization of CCR2b. MCP-1 stimulation did not trigger internalization of CCR5 (Fig. 7b). RANTES promoted internalization of CCR5, whether or not CCR2b was co-expressed (Fig. 7c), while it did not modify the CCR2b immunoreactivity in cells expressing both receptors (Fig. 7d). The simultaneous stimulation of CCR5 and CCR2b by RANTES and MCP-1 did not result in an enhancement of the internalization process for either receptor in cells expressing both (data not shown). Taken together, these results suggest that the internalization of CCR5 and CCR2b is not significantly affected by the formation of heterodimers. As our other data indicate that the number of CCR5/CCR2b heterodimers might be in equilibrium with homodimers, according to the level of expression of each receptor, it may suggest that receptor dimers are not stable over time, but might dissociate upon activation to allow internalization of one of the receptors only. It should be noted however that the sensitivity of flow cytometry to detect removal of receptors from the cell surface is limited, and that mild modifications might be overlooked in these experiments.

DISCUSSION

We have analyzed in the present work the dimerization properties of CCR5 and CCR2b and their functional consequences, following co-expression of the two receptors in a heterologous system. The selected clones express levels of receptors that allow binding, functional and biochemical studies. These levels are about ten fold higher than those observed in primary cells such as macrophages and T cells. CCR5 levels are similar in the three lines expressing the receptor. Clone C25-15 expresses about equal amounts of CCR5 and CCR2b, while clone C25-12 expresses about 5-fold higher amounts of CCR5 as compared to CCR2b.

As previously reported by different groups, CCR5 is able to form homodimers, as determined by immunoprecipitation and BRET assays. CCR5 is also able to heterodimerize with CCR2b, which is not unexpected, given the strong similarity between the two receptors, particularly within the transmembrane segments which are believed to mediate these inter-receptor interactions. The apparent affinity of CCR5 for itself or for CCR2b appears to be in the same range, as suggested by the determination of BRET₅₀ in both cases. As a consequence, the formation of homo- or heterodimers is expected to be strictly regulated by mass action, and by the level of expression of the two receptors in the cells. The derived BRET₅₀ values suggest that homo- and heterodimerization would occur for levels of expression found in leukocytes. Heterodimerization between CCR5 and CCR2b was also confirmed by co-immunoprecipitation, although the low recovery of immunoprecipitated heterodimers, contrasting with the high BRET signal observed between the two receptors, suggests that most dimers dissociate during the immunoprecipitation procedure.

In contrast to what was reported earlier (18, 19), the homo- and heterodimerization process was found to be independent from agonist-induced stimulation of the receptors.

While agonist-stimulation independent CCR5 homo-oligomerization has been demonstrated previously (21, 22), our experiments have shown that CCR2b homodimers can also form in the absence of stimulation by agonists. Synergistic effects have previously been suggested following co-stimulation of CCR5 and CCR2b expressed in the same cells. It was reported that 10- to 100-fold lower concentrations of RANTES and MCP-1 applied simultaneously were required for activation, as compared to the activation of each receptor independently (19). We did not observe such a synergistic effect, as the functional responses obtained for low concentrations of CCR5 and CCR2b ligands were strictly additive when applied together. This is actually not surprising to us. If positive cooperativity was occurring within an CCR5/CCR2b heterodimers, similar cooperativity would be expected as well within CCR5 and CCR2b homodimers. The coactivation of both partners of an heterodimer by different chemokines, or the coactivation of the two partners of an homodimer by a single chemokine, would indeed result in a similar functional response.

Binding assays led however to a previously unreported observation either in homo- or heterodimers. Cross inhibition of ligand binding was observed between CCR5 and CCR2b coexpressed in the same cell line. As this observation was made on membrane preparations, the involvement of intracellular cascades can be excluded. We therefore attribute these observations to the formation of heterodimers between CCR5 and CCR2b, as seen in BRET experiments. The partial competition observed in the ^{125}I -MCP-1 binding assay for MIP-1 α , MIP-1 β and RANTES was found to be correlated to the expected proportion of CCR5/CCR2b heterodimers. Indeed, on membranes from clone C25-15, that expresses equal amounts of CCR5 and CCR2b, the expected proportion of CCR2b molecules engaged in the formation of heterodimers is 50%, considering that no preference exists for the formation of homodimers. On this clone, CCR5-specific ligands competed for 55% of specific MCP-1 binding. Clone C25-12 expresses CCR5 at a level about 5-fold higher than CCR2b, and the

expected proportion of CCR2b molecules involved in heterodimers is in the range of 80%, in agreement with the higher level of competition observed in this situation (about 70 % of specific binding). The situation is similar in the ^{125}I -MIP-1 β binding assay, considering that MCP-1 is able to bind CCR5 with low affinity. Therefore, in co-expression conditions, full competition is observed for MCP-1, with a high affinity site corresponding to the indirect competition through the dimer, and a low affinity site corresponding to direct competition.

Previous studies have reported modifications of the pharmacological profile of receptors following their co-expression with other receptors and the formation of heterodimers. Changes in the ligand-binding properties of the adenosine A₁ and the purinergic P2Y₁ receptors have been described (35). Ligand-binding studies have revealed a significant reduction of affinity for A₁ agonists and antagonists on membranes of cotransfected cells, and a 400-fold increase in the affinity of ADP β S, a P2Y₁ agonist. Modifications of the functional responses to agonists were also reported, as measured in an adenylyl cyclase assay. Similarly, the κ and δ opioid receptors were shown to heterodimerize, thereby creating a binding site with an original pharmacological profile, distinct from individual receptors expressed independently, both in terms of binding and of functional responses. This new binding site could be activated synergistically by selective ligands of both receptors (3). These situations are however different from the observations reported here. First, we did not detect alterations of the functional responses of the co-expressed receptors; second, no evidence for binding competition on one receptor by the specific ligands of the other has been reported in these other studies. Although dimerization is likely driving the modifications of the pharmacological properties in these three situations, the mechanisms involved in each case is likely different.

The structural requirements for the formation of CCR5 or CCR2b homodimers, or of CCR5/CCR2b heterodimers are not known at this stage. The strong similarity among the two receptors makes likely that a similar interface is formed in the three situations. Recently, Hernanz-Falcon et al. have proposed the involvement of the transmembrane domains TM1 and TM4, as potential interface between the two receptors (20). The identification of the precise interaction domain will however require further investigation. Other domains of GPCRs have indeed been involved in the stabilization of dimeric or multimeric states. One of the well characterized dimers is that formed by the two subtypes of γ -aminobutyric acid type B receptors. The GABA_{B1} and GABA_{B2} receptors interact through their cytosolic C terminal domain, an heterodimerization process which is essential both for the trafficking of the receptors from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane, and for their functional response to agonists (36). Bradykinin B₂ receptors have been reported to dimerize through their extracellular amino-terminal domain (37), while transmembrane segments VI and/or VII were proposed as the dimer interface for the β -adrenergic receptor (38) and for the D₂ dopamine receptor respectively (39) *pas sure de cette ref.*

In chemokine receptors in general, and in CCR5 and CCR2b in particular, the extracellular N-terminal domain and loops have been shown to be involved in the formation of a high affinity complex with the core domain of chemokines. The unstructured N-terminal domain of chemokines is involved in the activation of the receptors, presumably through a direct interaction with the transmembrane helix bundle, thereby triggering conformational changes in the receptor (7, 26, 40).

The mechanisms by which trans-binding competition occurs within CCR5/CCR2b heterodimers is not determined precisely so far. In theory, it might result from a variety of interactions across the members of the dimer. First, the formation of heterodimers might

modify the structure of the individual binding sites, so that the CCR2b site that would bind MCP-1 in the monomeric and homodimeric states now accommodates the CCR5-specific ligands as well. This hypothesis appears however unlikely, as the binding properties of the bona-fide ligands of each receptor appear unchanged following co-expression. As an example, in ^{125}I -MIP-1 β binding assays, the IC_{50} measured for MIP-1 α , MIP-1 β and RANTES are unchanged whether performed on CCR5 expressing cells or cells co-expressing CCR5 and CCR2b. Also, no competition for ^{125}I -MIP-1 β was observed using an anti-CCR2b mAb, or for ^{125}I -MCP-1 using an anti-CCR5 mAb, demonstrating that each iodinated tracer continues to bind to its specific receptor within the dimer. A second hypothesis would be that a chemokine bound to one of the receptors overlaps onto the binding site of the other receptor of the dimer, thereby preventing the simultaneous binding of a second chemokine onto the dimer. The fact that mAbs bound to one receptor do not prevent binding of a chemokine onto the other, despite the larger size of immunoglobulins as compared to chemokines, might be taken as an argument against this hypothesis. A third hypothesis would be that the binding of an agonist to one of the receptors induces a conformational change in both members of the dimer, thereby modifying the binding site of the other receptor. The fact that [10-68]-RANTES, a CCR5 ligand with weak agonist properties, is as effective as RANTES in competing for MCP-1 binding suggests however that full activation of the receptor is not required. A last hypothesis, that would involve post-receptor signaling pathways, may be discarded, as our observations were made on membranes in which limited signaling events may occur. Our remaining working hypotheses are therefore steric hindrance and induced conformational change within receptor dimers.

The functional significance of the homo- and heterodimerization of CCR5 and CCR2b remains to be determined. It appears that, as described for the β 2-adrenergic receptor, the major part of the receptors in a cell is in a dimeric form (22, 41, 42). Our observations

regarding the binding properties of CCR5/CCR2b heterodimers suggest that heterodimers and presumable homodimers as well are able to bind a single chemokine. It should be noted that the apparent $B_{\max}$ calculated from saturation binding assays using MIP-1 β as tracer is 2.7 pmoles/mg proteins for the parental CHO-K1 cell line expressing CCR5 alone, and 2.9 and 3.5 pmoles/mg protein for the C25-12 and C25-15 clones derived from it. We attribute this mild but reproducible increase in $B_{\max}$ to the fact that more CCR5 molecules are able to bind the tracer, as a consequence of the dimerization with CCR2b which is not occupied by its ligand. This observation tends to support the hypothesis that only half of the actual CCR5 molecules are available for binding in recombinant cell lines. It has recently been described that dimers of the leukotriene LTB₄ receptor forms in vitro a complex with a single heterotrimeric G protein (43).

Heterodimerization does not appear to modify the efficiency of signaling of chemokine receptors in CHO-K1 cells through the calcium release pathway. However, our present experiments do not allow to exclude that the dimerization state (homo- or hetero-) might be required for efficient signaling. Receptors impaired in their dimerization potential should be designed to test this possibility. It is also not excluded that heterodimerization of CCR5 and CCR2b might modify the range and/or efficacy of signaling cascades, other than the intracellular calcium release mediated by G_i proteins.

Various functional consequences of receptor dimerization have been reported in the literature. Hebert et al. showed that agonist stimulation of the β 2-adrenergic receptor stabilizes the dimeric state of the receptor, and that the dimerization process is important for triggering the signaling transduction pathways. In the case of CCR5, it has been suggested that dimerization of the truncated Δ 32 variant with wild-type CCR5 would retain the functional receptor in the endoplasmic reticulum, thereby presenting dominant negative

properties (20). This observation has however not been confirmed, as other studies have clearly demonstrated the absence of dominant negative effects and that reduced cell surface expression of CCR5 in CCR5 Δ 32 heterozygotes is mediated by gene dosage only (44).

Finally, the functional consequences of the fact that a chemokine receptor dimer is able to bind a single chemokine will have to be studied further. Indeed, most of our knowledge related to chemokine receptor pharmacology and function has been derived from the study of receptors expressed in heterologous systems, in which they likely form homodimers. The design of a set of obligate receptor monomers, and the use of receptor mutants deficient in one of its natural properties (binding, activation, desensitization, ...) will be necessary for evaluating further the functional relevance of the dimerization process. Heterodimers between CCR5 and CCR2b, characterized by their different pharmacology, will be an ideal model to understand the mechanisms underlying the negative binding cooperativity. As such a mechanism might involve the induction of conformational changes between the dimer partners, these studies might also help to understand the conformational changes associated with receptor activation, with broad implications in the GPCR field in general.

Acknowledgements

We thank Audrey Durez and Xavier Vandevuer for expert technical assistance as well as Michel Bouvier and Stefano Marullo for supplying biological materials. This work was supported by the Belgian programme on Interuniversity Poles of Attraction initiated by the Belgian State, Prime Minister's Office, Science Policy Programming, the LifeSciHealth (grant LSHB-CT-2003-503337) programme of the European Community, the Fonds de la Recherche Scientifique Médicale of Belgium, Fortis, the French Agence Nationale de Recherche sur le SIDA, the Fondation Médicale Reine Elisabeth and the Actions de Recherche Concertées of the Communauté Française de Belgique to M.P. The scientific responsibility is assumed by the authors. L.E.A. was supported by fellowships from the Fonds pour la Recherche dans l'Industrie et l'Agriculture (FRIA), and the Van Buuren Foundation. E.U. A. is a predoctoral fellow from the Government of Basque Country.

REFERENCES

1. Kaupmann, K., Malitschek, B., Schuler, V., Heid, J., Froestl, W., Beck, P., Mosbacher, J., Bischoff, S., Kulik, A., Shigemoto, R., Karschin, A., and Bettler, B. (1998) *Nature* **396**, 683-687
2. White, J. H., Wise, A., Main, M. J., Green, A., Fraser, N. J., Disney, G. H., Barnes, A. A., Emson, P., Foord, S. M., and Marshall, F. H. (1998) *Nature* **396**, 679-682
3. Jordan, B. A. and Devi, L. A. (1999) *Nature* **399**, 697-700
4. Blanpain, C., Migeotte, I., Lee, B., Vakili, J., Doranz, B. J., Govaerts, C., Vassart, G., Doms, R. W., and Parmentier, M. (1999) *Blood* **94**, 1899-1905
5. Detheux M, Standker L, Vakili J, Munch J, Forssmann U, Adermann K, Pohlmann S, Vassart G, Kirchhoff F, Parmentier M, Forssmann WG. (2000) *J Exp Med*. **192**, 1501-1508.
6. Samson, M., Labbe, O., Mollereau, C., Vassart, G., and Parmentier, M. (1996) *Biochemistry* **35**, 3362-3367
7. Samson, M., LaRosa, G., Libert, F., Paindavoine, P., Detheux, M., Vassart, G., and Parmentier, M. (1997) *J Biol Chem* **272**, 24934-24941
8. Berger, E. A., Murphy, P. M., and Farber, J. M. (1999) *Annu.Rev.Immunol.* **17**, 657-700
9. Gerard, C. and Rollins, B. J. (2001) *Nat.Immunol.* **2**, 108-115
10. Samson, M., Libert, F., Doranz, B. J., Rucker, J., Liesnard, C., Farber, C. M., Saragosti, S., Lapoumeroulie, C., Cognaux, J., Forceille, C., Muyldermans, G., Verhofstede, C., Burtonboy, G., Georges, M., Imai, T., Rana, S., Yi, Y., Smyth, R. J., Collman, R. G., Doms, R. W., Vassart, G., and Parmentier, M. (1996) *Nature* **382**, 722-725
11. Liu, R., Paxton, W. A., Choe, S., Ceradini, D., Martin, S. R., Horuk, R., MacDonald, M. E., Stuhlmann, H., Koup, R. A., and Landau, N. R. (1996) *Cell* **86**, 367-377
12. Dean, M., Carrington, M., Winkler, C., Huttley, G. A., Smith, M. W., Allikmets, R., Goedert, J. J., Buchbinder, S. P., Vittinghoff, E., Gomperts, E., Donfield, S., Vlahov, D., Kaslow, R., Saah, A., Rinaldo, C., Detels, R., and O'Brien, S. J. (1996) *Science* **273**, 1856-1862
13. Smith, M. W., Dean, M., Carrington, M., Winkler, C., Huttley, G. A., Lomb, D. A., Goedert, J. J., O'Brien, T. R., Jacobson, L. P., Kaslow, R., Buchbinder, S., Vittinghoff, E., Vlahov, D., Hoots, K., Hilgartner, M. W., and O'Brien, S. J. (1997) *Science* **277**, 959-965

14. Michael, N. L., Louie, L. G., Rohrbaugh, A. L., Schultz, K. A., Dayhoff, D. E., Wang, C. E., and Sheppard, H. W. (1997) *Nat.Med.* **3**, 1160-1162
15. Boring, L., Gosling, J., Cleary, M., and Charo, I. F. (1998) *Nature* **394**, 894-897
16. Vila-Coro, A. J., Mellado, M., Martin, d. A., Lucas, P., del Real, G., Martinez, A., and Rodriguez-Frade, J. M. (2000) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**, 3388-3393
17. Blanpain, C., Vanderwinden, J. M., Cihak, J., Wittamer, V., Le Poul, E., Issafras, H., Stangassinger, M., Vassart, G., Marullo, S., Schlindorff, D., Parmentier, M., and Mack, M. (2002) *Mol.Biol Cell* **13**, 723-737
18. Rodriguez-Frade, J. M., Vila-Coro, A. J., de Ana, A. M., Albar, J. P., Martinez, A., and Mellado, M. (1999) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**, 3628-3633
19. Mellado, M., Rodriguez-Frade, J. M., Vila-Coro, A. J., Fernandez, S., Martin, d. A., Jones, D. R., Toran, J. L., and Martinez, A. (2001) *EMBO J* **20**, 2497-2507
20. Hernanz-Falcon, P., Rodriguez-Frade, J. M., Serrano, A., Juan, D., del Sol, A., Soriano, S. F., Roncal, F., Gomez, L., Valencia, A., Martinez, A., and Mellado, M. (2004) *Nat.Immunol.* **5**, 216-223
21. Benkirane, M., Jin, D. Y., Chun, R. F., Koup, R. A., and Jeang, K. T. (1997) *J Biol Chem* **272**, 30603-30606
22. Issafras, H., Angers, S., Bulenger, S., Blanpain, C., Parmentier, M., Labbe-Jullie, C., Bouvier, M., and Marullo, S. (2002) *J Biol Chem* **277**, 34666-34673
23. Murphy, P. M., Baggiolini, M., Charo, I. F., Hebert, C. A., Horuk, R., Matsushima, K., Miller, L. H., Oppenheim, J. J., and Power, C. A. (2000) *Pharmacol.Rev.* **52**, 145-176
24. Frade, J. M., Mellado, M., del Real, G., Gutierrez-Ramos, J. C., Lind, P., and Martinez, A. (1997) *J Immunol.* **159**, 5576-5584
25. Rabin, R. L., Park, M. K., Liao, F., Swofford, R., Stephany, D., and Farber, J. M. (1999) *J Immunol.* **162**, 3840-3850
26. Blanpain, C., Lee, B., Vakili, J., Doranz, B. J., Govaerts, C., Migeotte, I., Sharron, M., Dupriez, V., Vassart, G., Doms, R. W., and Parmentier, M. (1999) *J Biol Chem* **274**, 18902-18908
27. Mirzabekov, T., Bannert, N., Farzan, M., Hofmann, W., Kolchinsky, P., Wu, L., Wyatt, R., and Sodroski, J. (1999) *J Biol Chem* **274**, 28745-28750
28. Jordan, M., Schallhorn, A., and Wurm, F. M. (1996) *Nucleic Acids Res.* **24**, 596-601
29. Rucker, J., Samson, M., Doranz, B. J., Libert, F., Berson, J. F., Yi, Y., Smyth, R. J., Collman, R. G., Broder, C. C., Vassart, G., Doms, R. W., and Parmentier, M. (1996) *Cell* **87**, 437-446

30. Charo, I. F., Myers, S. J., Herman, A., Franci, C., Connolly, A. J., and Coughlin, S. R. (1994) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**, 2752-2756
31. Lee, B., Sharron, M., Blanpain, C., Doranz, B. J., Vakili, J., Setoh, P., Berg, E., Liu, G., Guy, H. R., Durell, S. R., Parmentier, M., Chang, C. N., Price, K., Tsang, M., and Doms, R. W. (1999) *J Biol Chem* **274**, 9617-9626
32. Springael JY, Wagner K, El-Asmar L, Godard M, Parmentier M, and Mack M. mAbs raised against human CCR2b reveals multiple conformational states involved in receptor function. *in preparation*
33. Xu, J., He, J., Castleberry, A. M., Balasubramanian, S., Lau, A. G., and Hall, R. A. (2003) *J Biol Chem* **278**, 10770-10777
34. Hillion, J., Canals, M., Torvinen, M., Casado, V., Scott, R., Terasmaa, A., Hansson, A., Watson, S., Olah, M. E., Mallol, J., Canela, E. I., Zoli, M., Agnati, L. F., Ibanez, C. F., Lluís, C., Franco, R., Ferre, S., and Fuxe, K. (2002) *J Biol Chem* **277**, 18091-18097
35. Yoshioka, K., Saitoh, O., and Nakata, H. (2001) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**, 7617-7622
36. Kuner, R., Kohr, G., Grunewald, S., Eisenhardt, G., Bach, A., and Kornau, H. C. (1999) *Science* **283**, 74-77
37. AbdAlla, S., Zaki, E., Lothar, H., and Quitterer, U. (1999) *J.Biol.Chem.* **274**, 26079-26084
38. Hebert, T. E., Moffett, S., Morello, J. P., Loisel, T. P., Bichet, D. G., Barret, C., and Bouvier, M. (1996) *J Biol Chem* **271**, 16384-16392
39. Ng, G. Y., George, S. R., Zastawny, R. L., Caron, M., Bouvier, M., Dennis, M., and O'Dowd, B. F. (1993) *Biochemistry* **32**, 11727-11733
40. Blanpain, C., Doranz, B. J., Bondue, A., Govaerts, C., De Leener, A., Vassart, G., Doms, R. W., Proudfoot, A., and Parmentier, M. (2003) *J Biol Chem* **278**, 5179-5187
41. Angers, S., Salahpour, A., Joly, E., Hilairet, S., Chelsky, D., Dennis, M., and Bouvier, M. (2000) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**, 3684-3689
42. Salahpour, A., Angers, S., and Bouvier, M. (2000) *Trends Endocrinol.Metab* **11**, 163-168
43. Baneres, J. L. and Parello, J. (2003) *J Mol.Biol* **329**, 815-829
44. Venkatesan, S., Petrovic, A., Van Ryk, D. I., Locati, M., Weissman, D., and Murphy, P. M. (2002) *J.Biol.Chem.* **277**, 2287-2301

Legends to figures

Table 1. Functional parameters of cell lines. The EC_{50} of the functional response of the cell lines was determined by non linear regression using the Graphpad Prism software and a sigmoidal dose-response model. The displayed data are representative of at least three independent experiments (mean $\pm$ s.e.m).

Figure 1. Co-immunoprecipitation of CCR5 and CCR2b. CHO-K1 cells, untransfected (WTA11), or expressing CCR5 (C5) , CCR2b (C2) or both receptors (clone C25-12) were lysed (2×10^6 cells per lane), and receptor complexes were immunoprecipitated using anti-CCR5 (2D7) or anti-CCR2b (Doc-2) monoclonals, separated on SDS-polyacrylamide gels, transferred to nitrocellulose membranes, and detected by anti-CCR5 (MC-5) or anti-CCR2b (SC-20) monoclonals. **(a)** Immunoprecipitation by Doc-2 and immunodetection by MC5. The band corresponding to the CCR5 monomer (plain arrowhead, 43 kDa) is indicated. **(b)** Immunoprecipitation by Doc-2 and immunodetection by SC-20. Plain arrowheads indicate the position of the different glycosylated forms of CCR2b (43, 40 and 38 kDa). **(c)** Immunodetection of CCR5 (MC5 mAb) in crude lysates from the same cell populations (3×10^5 cells per lane). Plain arrowheads indicate the position of the CCR5 monomers and dimers (43 and 70 kDa, respectively). The bands corresponding to the IgG heavy chain (IgG) is indicated as well as the position of the markers (45, 66 and 97 kDa).

Figure 2. BRET assays. HEK-293 cells were transfected with a constant amount of the hRluc fusion and increasing amounts of the EYFP fusion, and homo- and heterodimerization of CCR5 and CCR2b was investigated by measuring the energy transfer between the two partners. **(a)** CCR5-hRluc and CCR5-EYFP constructs. **(b)** CCR2b-hRluc and CCR2b-EYFP constructs. **(c)** CCR2b-hRluc and CCR5-EYFP constructs. The abscissa represents the measured expression of CCR5-EYFP or CCR2b-EYFP divided by the measured expression

of CCR5-hRLuc or CCRb hRLuc. The ordinate is a measure of the fraction of the hRLuc fusion partner involved in an interaction with the EYFP fusion partner, defined as the BRET ratio. The BRET₅₀ values were calculated by non linear regression using a single site saturation binding model.

Figure 3. Aequorin-based functional assays. Functional responses of receptors in cells co-expressing CCR5/CCR2b (clones C25-12 and C25-15) or each receptor alone were measured using the aequorin-based functional assay. Clones C25-12 (**b**) and C25-15 (**c**) were incubated with a range of concentrations of RANTES, MCP-1 or a mixture of both chemokines, and luminescence was recorded for 30 s. CHO-K1 cells expressing CCR5 or CCR2b alone were incubated with their respective ligands and used as positive controls (**a**). The results were normalized for the basal luminescence of the cells in absence of agonist (0 %) and the maximal response obtained for each receptor with the reference chemokine (100 %). The functional parameters (EC₅₀, E_{max}) were determined by non linear regression using the Graphpad Prism software and a sigmoidal dose-response model. The displayed data are representative of three independent experiments. All data points were performed in duplicates (error bars: s.e.m).

Figure 4. MIP-1 β competition binding assay. Competition binding assays was performed on clone C5 expressing CCR5 alone (**a**) or clones C25-12 (**b**) and C25-15 (**c**) co-expressing CCR5 and CCR2b, using ¹²⁵I-MIP-1 β as tracer, and MIP-1 β , MCP-1 and MCP-2 as competitors. The data were normalized for nonspecific binding determined in the presence of 300 nM MIP-1 β (0%), and specific binding in the absence of competitor (100%). The displayed data are representative of at least three independent experiments. All data points were performed in triplicates (error bars: s.e.m).

Figure 5. MCP-1 competition binding assay. Competition binding assays were performed, on clone C2 expressing CCR2b alone (a) or clones C25-12 (b) and C25-15 (c) co-expressing CCR5 and CCR2b, using ^{125}I -MCP-1 as tracer, and MIP-1 β , MCP-1 and MCP-2 as competitors. The data were normalized for nonspecific binding determined in the presence of 300 nM MCP-1 (0%), and specific binding in the absence of competitor (100%). The displayed data are representative of at least three independent experiments. All data points were performed in triplicates (error bars: s.e.m).

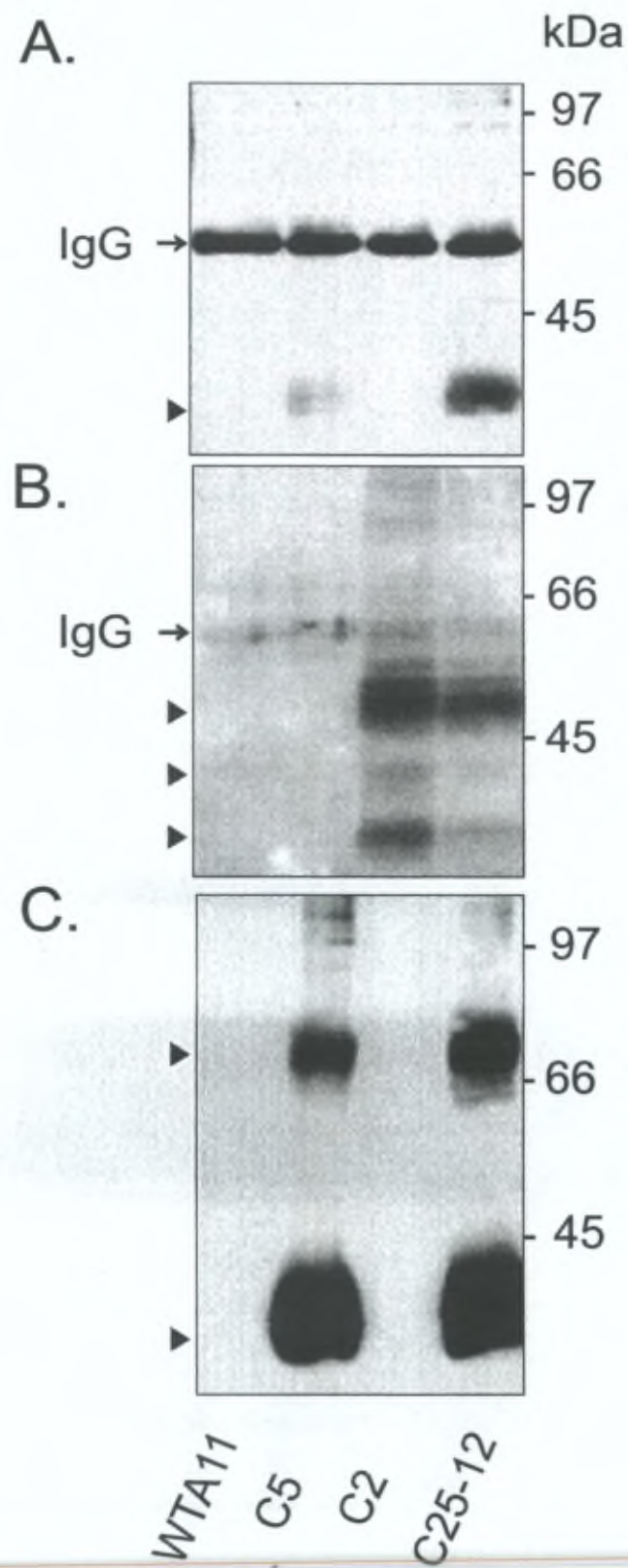
Figure 6. Competition binding assays using CCR5- and CCR2b-specific mAbs. Different concentrations of 2D7 and Doc-4 (0, 0.1, 1, 5 and 10 $\mu\text{g/ml}$) were tested for their ability to compete with the binding of ^{125}I -MIP-1 β (a) or ^{125}I -MCP-1 (b) to clones C12-25 and C15-25 and CHO-K1 cells expressing CCR5 or CCR2b alone. The data were normalized for nonspecific binding determined in the presence of 300 nM MIP-1 β or MCP-1 (0%), and specific binding in the absence of competitor (100%). The displayed data are representative of at least three independent experiments. All data points were performed in triplicates (error bars: s.e.m).

Figure 7. Co-internalization assays. Different concentrations of MCP-1 (0, 1, 10, 25, 50 and 100 nM) were tested for their ability to promote internalization of CCR2b (a) and CCR5 (b) in clones C25-12 and C25-15. Similarly, different concentrations of RANTES (0, 1, 10, 25, 50 and 100 nM) were tested for their ability to promote internalization of CCR5 (c) and CCR2b (d) in clones C25-12 and C25-15. CHO-K1 cells expressing CCR2b or CCR5 alone were used as positive controls for respectively CCR2b (a) and CCR5 (c) internalization. Cell surface CCR2b was detected by flow cytometry using the phycoerythrin (PE)-conjugated N20 mAb, while CCR5 was detected with 2D7-PE. Results were normalized for the

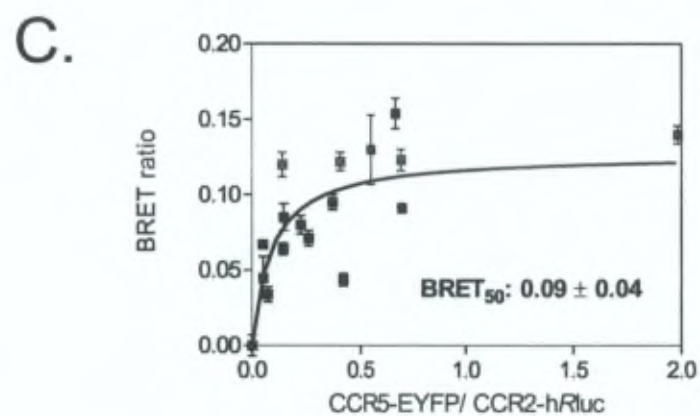
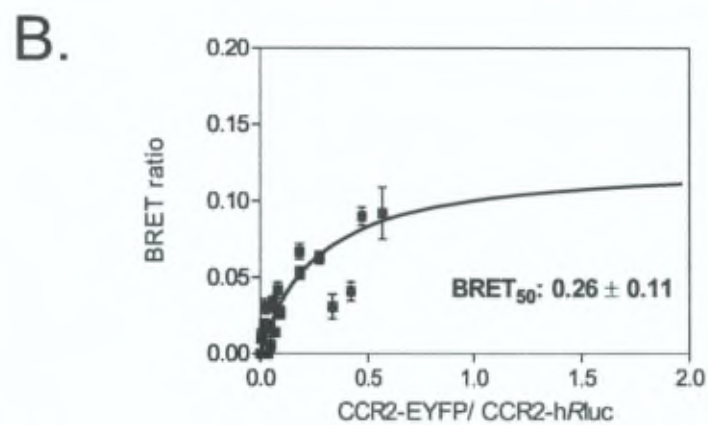
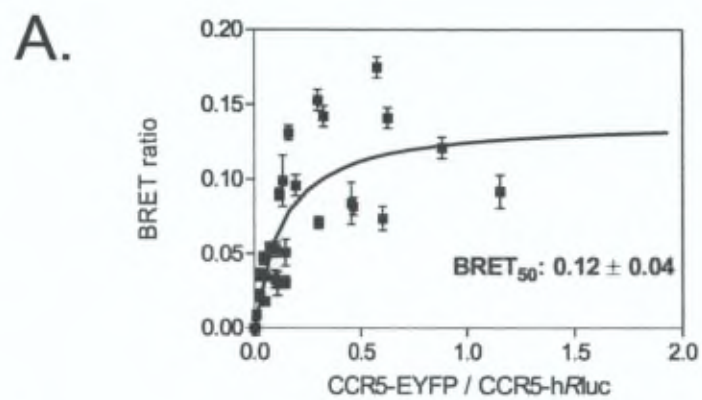
fluorescence of unstimulated cells (100%) and for the background fluorescence (0%). All experiments were repeated at least twice with similar results.

EC₅₀ (nM)	C5	C2	C25-12	C25-15
RANTES	0.19 ± 0.04	-	0.17 ± 0.02	0.13 ± 0.03
MCP-1	-	0.21 ± 0.06	0.07 ± 0.01	0.040 ± 0.006
RANTES+MCP-1	-	-	0.055 ± 0.005	0.065 ± 0.007

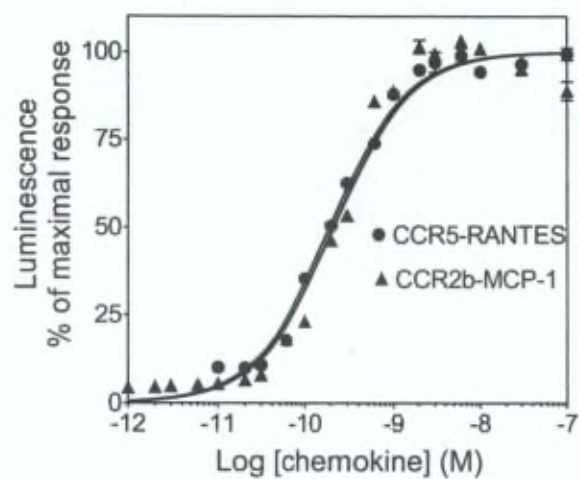
El-Asmar et al., Table 1



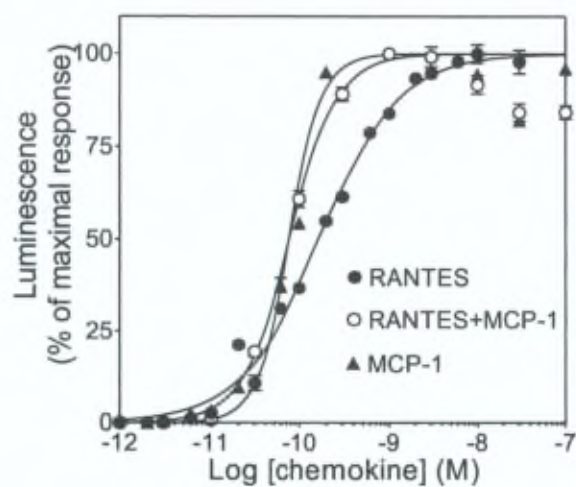
El-Asmar et al., Figure 1



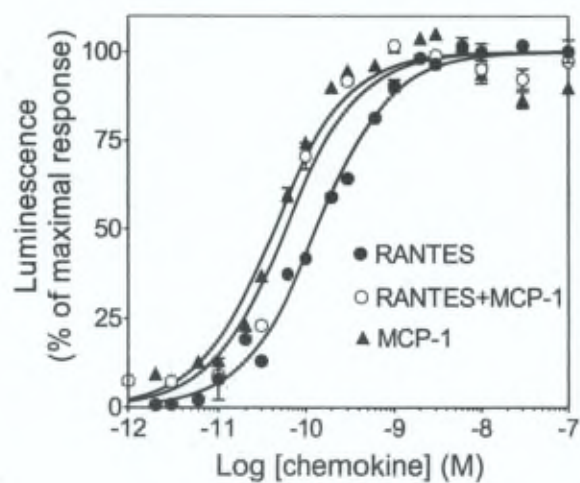
A.



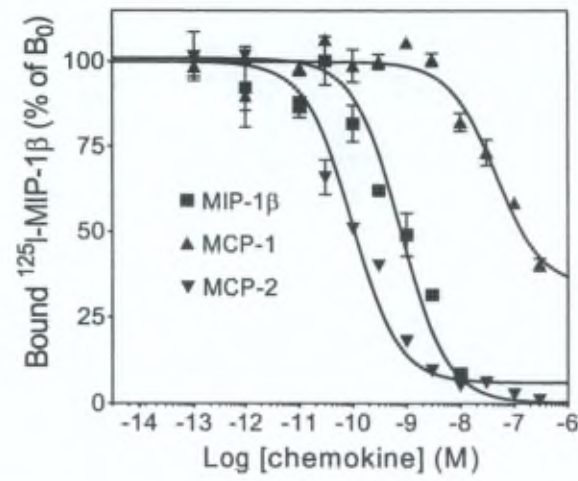
B.



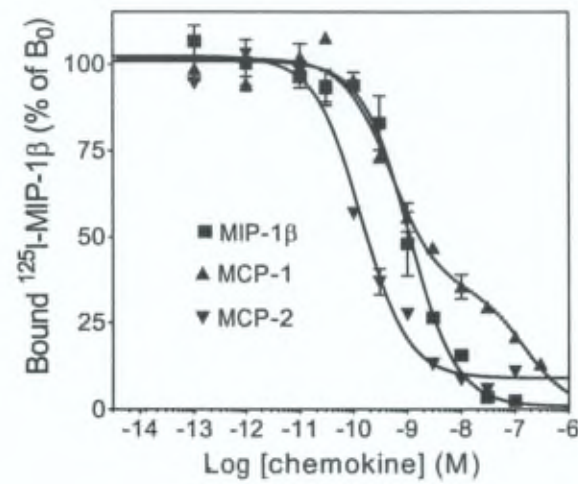
C.



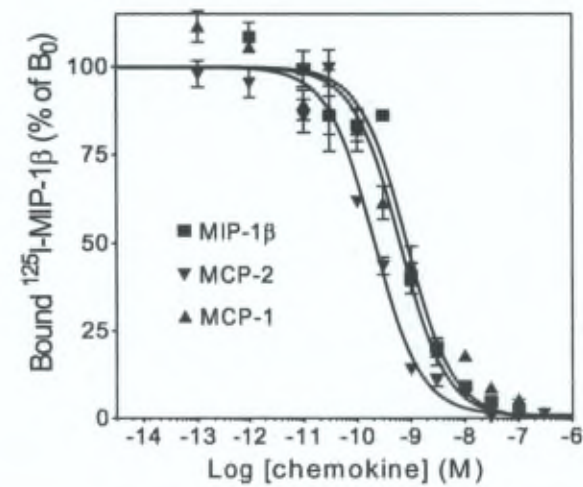
A.



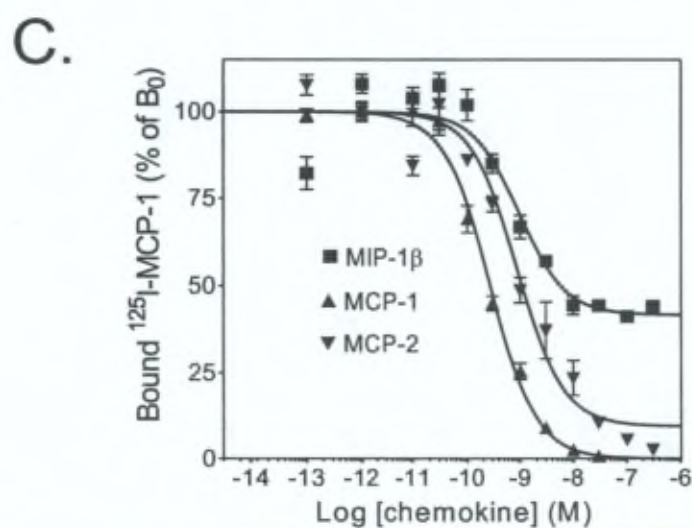
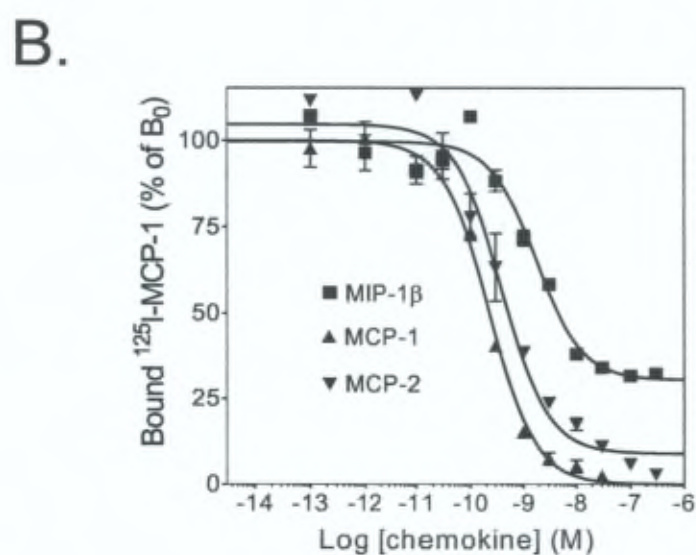
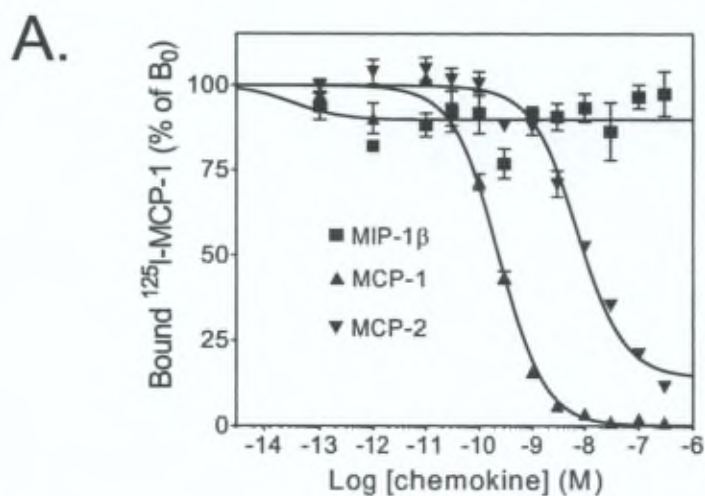
B.



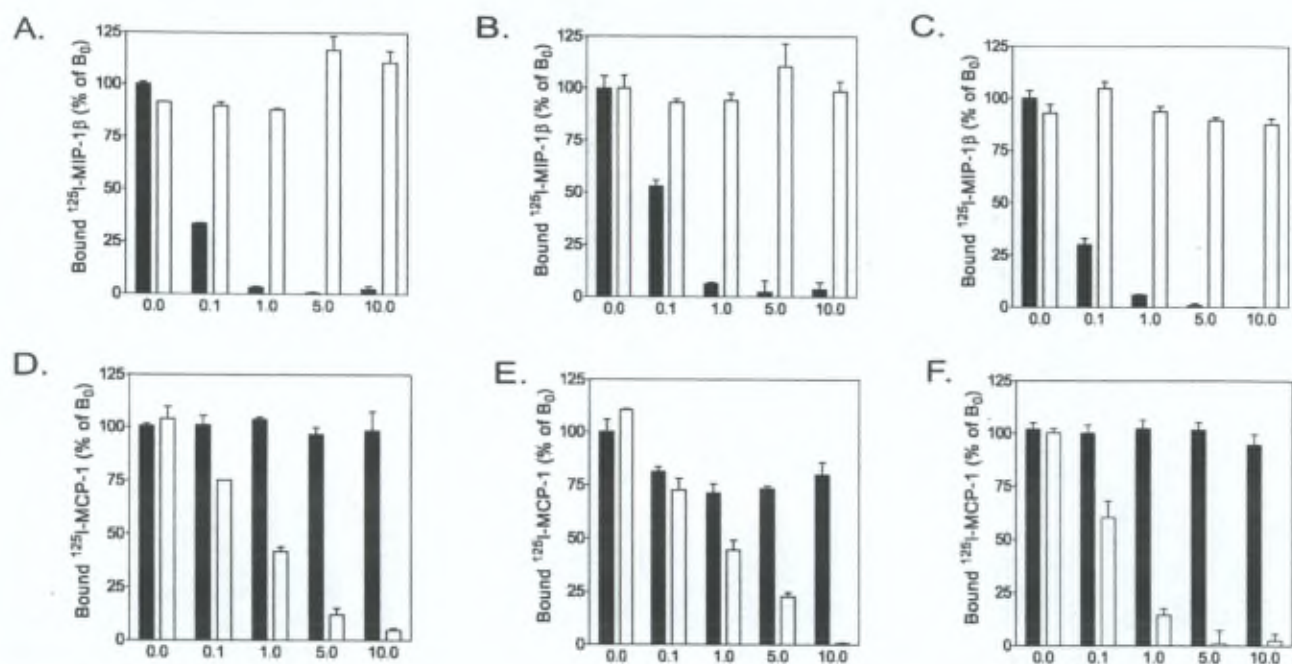
C.



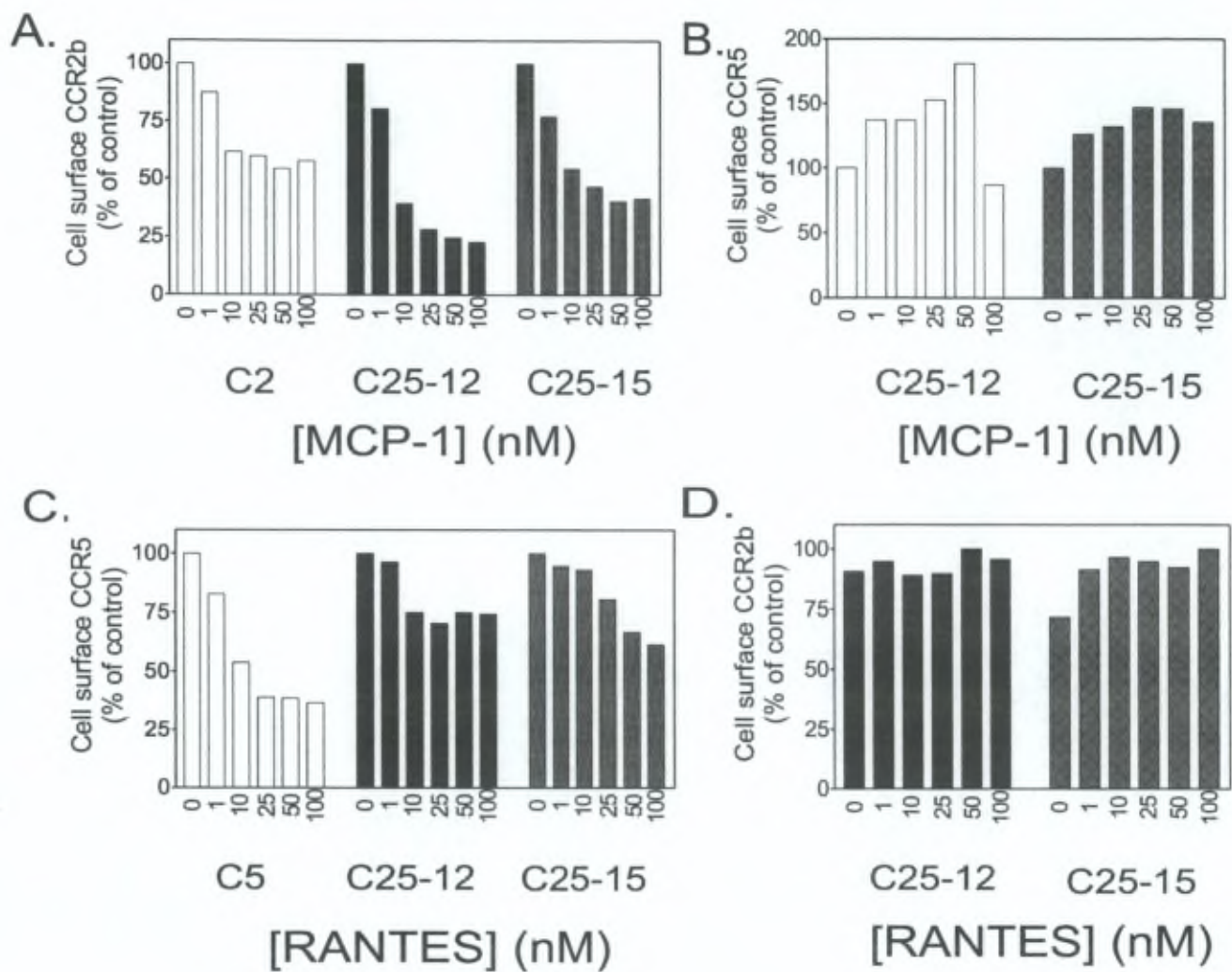
El-Asmar et al., Figure 4



El-Asmar et al., Figure 5



El-Asmar et al., Figure 6



El-Asmar et la., Figure 7

