HAL
open science

Oligomérisation des récepteurs couplés aux protéines G : deux ou plus ? Application des technologies de FRET en temps résolu au cas du récepteur GABAB

Damien Maurel

To cite this version:

Damien Maurel. Oligomérisation des récepteurs couplés aux protéines G : deux ou plus ? Application des technologies de FRET en temps résolu au cas du récepteur GABAB. Biologie cellulaire. Université Montpellier I, 2006. Français. NNT : . tel-00165100

HAL Id: tel-00165100

https://theses.hal.science/tel-00165100

Submitted on 24 Jul 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Montpellier 1

Doctorat Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé (CBS2)
Discipline Biologie Santé

MAUREL DAMIEN

OLIGOMERISATION DES RECEPTEURS COUPLES AUX PROTEINES G : DEUX OU PLUS ?

APPLICATION DES TECHNOLOGIES DE FRET EN TEMPS RESOLU AU CAS DU RECEPTEUR $GABA_B$

DIRECTEUR DE THESE : JEAN-PHILIPPE PIN

Soutenue le 18 décembre 2006

Jury :

Prof. Simon GALAS	*Président*
Dr André LOPEZ	*Rapporteur externe*
Dr Ralf JOCKERS	*Rapporteur externe*
Dr Hervé ANSANAY	*Examinateur*
Eric TRINQUET	*Examinateur*

Ce travail de thèse a été réalisé dans le cadre d'un contrat CIFRE (Convention Industrielle de Formation par la Recherche) établi entre la société CIS Bio International et le département de Pharmacologie Moléculaire de l'Institut de Génomique Fonctionnelle (IGF) de Montpellier.

CIS BIO INTERNATIONAL

BP 84175

30204 Bagnols-sur-Cèze

Sous la supervision du **Dr Hervé Ansanay** (Chercheur R&D) et du **Dr Michel Fink** (Chef du groupe IMI, "Intracellular Molecular Imaging").

Département de Pharmacologie Moléculaire

IGF – Institut de Génomique Fonctionnelle

UMR5203 CNRS – U661 INSERM – Univ. Montpellier 1 et Montpellier 2

141, rue de la Cardonille

34094 Montpellier Cedex 05

Sous la supervision du **Dr Jean-Philippe Pin** (Directeur du Département de Pharmacologie Moléculaire).

RESUME

Oligomérisation des récepteurs couplés aux protéines G : deux ou plus ?
Application des technologies de FRET en temps résolu au cas du récepteur $GABA_B$

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) sont les cibles de 50% des médicaments actuellement sur le marché pharmaceutique. La compréhension de leur mode de fonctionnement est donc essentielle au développement de nouvelles molécules capables de cibler spécifiquement ces récepteurs. Ces dix dernières années, les technologies de transfert d'énergie ont permis de révéler la capacité des RCPG, longtemps considérés comme monomériques, à s'organiser en dimères voire en structures oligomériques plus grandes. Toutefois, la caractérisation précise de cette stœchiométrie d'assemblage implique la mise au point de méthodes adaptées.

Au cours de ce travail de thèse nous avons développé une approche de FRET en temps résolu permettant de mettre en évidence, à l'aide d'anticorps marqués, des interactions de sous-unités de RCPG à la surface de cellules vivantes. En choisissant le récepteur $GABA_B$ comme modèle d'étude, cette approche a permis de révéler l'homo- et l'hétérodimérisation de ce récepteur à la surface cellulaire. De plus, en condition de perméabilisation des cellules, l'oligomérisation de la sous-unité $GABA_{B1}$ retenue dans les compartiments intracellulaires a pu être caractérisée par cette même approche.

Afin d'analyser plus précisément l'organisation du récepteur $GABA_B$, nous avons mis au point une deuxième méthode permettant de marquer irréversiblement à l'aide de fluorophores les sous-unités $GABA_{B1}$ et $GABA_{B2}$ présentes à la surface cellulaire. La combinaison de cette méthode de marquage (SNAP-tag) avec une analyse de FRET en temps résolu a permis de caractériser l'organisation oligomérique de ce récepteur. Ainsi, le récepteur $GABA_B$, connu pour être un hétérodimère obligatoire, semble capable de former des oligomères via la sous-unité $GABA_{B1}$ qui représente un point de contact entre deux hétérodimères. Le rôle d'une telle organisation sur la fonction de ce récepteur reste toutefois indéterminé.

Mots-clés : récepteurs couplés aux protéines G, récepteur $GABA_B$, oligomérisation, FRET en temps résolu.

SUMMARY

Oligomerization of G protein-coupled receptors: two or more?
Application of time-resolved FRET technologies to the case of the $GABA_B$ receptor

G protein-coupled receptors (GPCR) are the target of 50% of the drugs on the pharmaceutical market at present. Therefore, understanding their function is essential for the development of new molecules capable of targeting these receptors. This last decade, FRET technologies have enabled the understanding of how GPCR, considered as monomers for a long time, gather together into dimers or larger oligomeric structures.

However, the precise characterization of this stœchiometry entails the development of adapted methods. During this work, we developed a time-resolved FRET approach allowing to observe, by using labeled antibodies, GPCR subunit interactions on the surface of living cells. This approach enabled us to reveal the homo- and heterodimerization of this receptor at the cell surface. As cells were permeabilized, oligomerization of $GABA_{B1}$ subunits retained in the intracellular compartments could be characterized by the same approach.

In order to analyse more precisely the organization of the $GABA_B$ receptor, we developed a second method to irreversibly label with fluorophores the $GABA_{B1}$ and $GABA_{B2}$ subunits present at the cell surface. The combination of this labeling method with a time-resolved FRET analysis allowed the characterization of the oligomeric organization of this receptor. Thus, the $GABA_B$ receptor, known as an obligatory heterodimer, seems to be able to form oligomers through the $GABA_{B1}$ subunit which represents a point of contact between two heterodimers. The impact of such an organization on the function of this receptor remains to be determined.

Key-words : G protein-coupled receptor, $GABA_B$ receptor, oligomerization, time-resolved FRET.

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je souhaite remercier Simon Galas de me faire l'honneur de présider mon jury de thèse. Un grand merci à André Lopez et Ralf Jockers qui ont aimablement accepté d'être les rapporteurs de mon mémoire de thèse.

Je tiens également à remercier toutes les personnes, rencontrées au cours de ces trois années de thèse, qui ont permis que cette aventure scientifique soit aussi une véritable aventure humaine.

Merci à Gérard Mathis de m'avoir permis de travailler à CisBio en m'accueillant tout d'abord pour mon stage de DESS puis pour ces trois années de thèse riches d'enseignement et de rencontres inoubliables.

Mes remerciements s'adressent aussi à Jean-Philippe qui m'a offert la grande opportunité de rejoindre son équipe. « Impressionnant » est le mot qui me vient naturellement lorsque l'on me demande au détour d'une conversation : « Il est comment ton chef ? » A cet adjectif je ne pourrais m'empêcher d'ajouter « à l'écoute et proche des gens ». J'ai gardé par exemple de nombreux souvenirs quand un peu déçu de devoir présenter des résultats « pas à la hauteur de mes espérances », tu as vu bien plus loin en décelant le « truc » qui fait que tel un magicien, la triste manipe entrant dans ton bureau ne sortait qu'après avoir révélé des secrets que je n'avais pas soupçonnés. Je dirai encore que l'accueil autour d'un thé ou d'un café PIN en guise d'ouverture des discussions est fort agréable pour les papilles !

Je tiens aussi à adresser mes remerciements à Thierry qui fut le premier habitant du CCIPE (de l'époque) avec qui j'ai pu partager le bureau le plus enfoui du bâtiment. J'ai cru dans un premier temps que les primo arrivants devaient nécessairement passer par là pour qu'on puisse juger de leurs motivations. Toutefois, la présence de Thierry, retenu depuis de longues années en ce lieu, me surprit. N'était-il pas suffisamment motivé pour être contraint à séjourner dans cet antre ? Je compris rapidement que le manque de place en était la cause. Ainsi, après m'avoir expliqué comment passer la porte sans risquer de prendre un mauvais coup, nous partageâmes en ce lieu des discussions très enrichissantes sur des sujets si divers qu'il me serait impossible d'en faire ici l'inventaire. Je retiendrai de ces conversations « la curiosité » que tu n'as de cesse d'éveiller en tous ceux qui t'entourent. Merci aussi pour avoir toujours été disponible même lorsque le moment n'était pas nécessairement opportun.

Hervé, premier homme de CisBio rencontré à l'occasion du dur entretien d'embauche dont j'étais le seul candidat ! Je crois que la fluorescence faisait un peu peur à mes concurrents potentiels… Après avoir passé quelques temps en la présence de Monsieur Hansanay (telle était l'orthographe de son nom pour moi à l'époque), je compris à mes dépens qu'il était essentiel de bannir en sa présence le mot lapin. Toutefois, excepté le nom de ce petit animal à longues oreilles il me parut évident que tout pouvait être discuté dans la spontanéité et la bonne humeur qui sont pour moi les deux termes définissant Hervé. Merci Hervé d'avoir souvent opposé à mes doutes chagrins ton enthousiasme rayonnant et communicatif, véritable antidote à la morosité. Au fait, je ne crois pas t'avoir remercié (c'est la rubrique mercantile) d'avoir assuré la promo de mon CD. Je dois dire d'ailleurs que s'il ne s'est pas appelé « Obscure side » (ouf !!!) c'est grâce à toi. Je promets que si le prochain album rapporte plus tu auras un pourcentage !

Eric, la réincarnation de la fluorescence. Je crois qu'un tableau de données de FRET lui parle autant qu'une liste de courses de la semaine pour le commun des mortels. Difficile de trouver son point faible. Je me suis dit un jour : « Eric, il est fort en fluorescence… mais en ski je vais tenter de rivaliser ». Hélas ! Quand je l'entendis dans le car qui nous menait à la station, parler de matériel de ski dans un vocabulaire aussi pointu que lorsqu'il vous parle du setup d'un Rubystar je compris que ça n'était pas gagné d'avance. Et ce fut bien le cas. Alors que je souffrais du poids de la poudreuse sur mes faibles jambes, Eric en pleine forme me sensibilisait à la chance que nous avions de skier dans une neige de qualité qui semblait pour moi une éternité… Alors merci Eric pour m'avoir quand même attendu en bas des pistes !

Michel, ce congrès aux Pays Bas m'a laissé un souvenir impérissable. Je dois d'abord te remercier pour m'avoir confronté à mes responsabilités car je n'aurais peut être pas sauté certaines barrières si tu ne m'y avais pas poussé. J'en suis sorti grandi et tu y es certainement pour beaucoup. J'ai aussi enrichi grâce à toi mon vocabulaire anglophone après que tu m'aies donné dans un restaurant (pas un coffee shop…) la signification du mot « prawn ». Je ne sais pas si ça me servira beaucoup en pays étranger mais sait on jamais !

Pour mes premiers pas expérimentaux en ces murs je ne peux que remercier Julie qui m'a encadré avec patience et pédagogie lors de mon arrivée au laboratoire. Tu m'as initié à de multiples techniques et je dois dire que les bons réflexes appris au cours de ma formation de jeune Padawan me servent encore aujourd'hui. Le bénéfice de cet apprentissage est que je suis maintenant aussi à l'aise sous une hotte avec une pipette que derrière un piano ! Alors merci pour tout.

Laurent, homme de lettres et de sciences, tes connaissances qui sont immenses ne sont elles pas un sixième sens ? Tel est la question que je me pose quand je t'entends parler littérature, sciences, filmographie Américaine ou encore pêche dans des lieux oubliés de l'homme mais habités par la nature. Je crois surtout, au-delà de ces qualités, que la plus grande richesse c'est de pouvoir partager son savoir et c'est exactement ce que tu fais.

Il m'est impossible de ne pas citer « Akli le sage ». Trésor de patience et de discrétion, membre actif de la confrérie des BRETeux, il est à l'image de son enzyme préférée en donnant beaucoup sans rien attendre, excepté peut être l'illumination de ceux qui l'entourent.

Comment ne pas citer aussi « Philippe le mime ». Alors que certains font des dessins ésotériques pour tenter d'expliquer le fonctionnement d'un RCPG, lui n'a comme arme que ses deux mains. Attention, si vous croisez Philippe un soir de pot, veillez à ne pas lui donner à boire après minuit car tel un Gremlins, il présente un fort risque de transformation en humoriste spécialiste du Stand-up. Ainsi, de mime du Flytrap il pourrait facilement basculer en mime d'un touriste en vacances sur les plages de Maguelonne… Un homme averti en vaut deux !

Merci à Laëtitia dit " Comps-Agrar " qui vient de prendre le flambeau du camp des FRETeux ascendant SNAP-tag en démontrant sa détermination sans limite et son enthousiasme. Pour l'avoir côtoyée il est recommandé de ne jamais lui parler de sa Fiat Punto qui possède un abonnement, formule hébergement compris, dans tous les relais garage de Montpellier et ses environs. Ceinture noire de karaté elle pourrait vous retourner en guise de réponse un coup de pied fouetté. A bon entendeur…

Cyril, notre première rencontre fut chaleureuse mais à haut risque. Après avoir un peu discuté avec toi sur notre " origine commune " je compris très vite que la Madame Maurel dont tu me parlais et qui était responsable de ta première heure de colle au collège de Margueritte (notre fief) n'était autre que ma mère. Tu ne m'en voudras donc certainement pas d'avoir pris quelque temps mes distances par peur de représailles… Depuis, nos discussions musicales et amicales ont prouvé qu'un rugbyman même s'il est musclé n'est pas rancunier !

Carsten, l'homme aux mille talents. Chanteur à voix (ses vocalises en témoignent) il participe activement aux refrains du groupe GABAboys and GABAgirls. Sportif bondissant et performant il court après les ballons tel un lièvre de compétition. Trilingue, il se joue des langues en corrigeant les fautes

d'orthographe glissées sournoisement entre les lignes de mes présentations. Scientifique accompli, il ne me reste qu'à te dire merci.

Claire, ou le souvenir de la grande maison dans la colline. Je n'ai hélas pas pu profiter, à l'instar de la gente féminine du labo, de ton lac artificiel mais j'espère que cela n'est que partie remise. Je souhaite plus sérieusement te remercier de tout le travail que tu fais car si j'ai pu évoluer pendant ces trois années dans un tel environnement c'est certainement parce qu'il y a des personnes comme toi qui font beaucoup (peut être trop…) de sacrifices pour que l'équipe ne manque de rien. Merci pour cela et bien sûr pour tous les bons moments de rires et de discussions passés ensemble (non Fabien, il n'y a aucun risque avec moi…).

Fanny, la joie et la bonne humeur du labo. Tes rires font l'illumination de tous ceux qui t'entourent. Tout comme Claire, je te remercie d'avoir tant fait pour l'équipe et donc aussi pour moi.

Norbert, dealer officiel des produits CisBio en poste sur l'aire de la sortie d'autoroute de Gallargues. Ta ponctualité a fait marcher mon business au sein de l'IGF et je t'en remercie.

Carine et Nadia, les deux drôles de dames de la salle de Fitness du CNRS. Fêtardes à leurs heures perdues, elles ne rateront pas une occasion pour se transformer (non ! pas comme « Philippe le mime ») en organisatrices de soirées ou de pots.

Isa, la seule personne à qui j'ai " tourné le dos " (si, si !!) pendant de longues journées passées dans le bureau 221 mais avec qui j'ai pu discuter de choses toutes aussi intéressantes les unes que les autres.

Merci à Laura, troisième membre de l'expédition « sous-sol », tu as permis que ces deux premières années de thèse dans l'antre, entre scolopendres, serpents occasionnels et surtout araignées soient vraiment sympathiques (bon courage pour ta thèse !), merci à Jean-Charles, le globe trotteur du labo, à Cécile, correctrice officielle de ma thèse, à Marie-Laure nouvelle adepte de la confrérie du SNAP-tag et à Sraboni pour son sourire et sa gentillesse. Merci Hélène pour avoir consacré de ton temps à la lecture et correction de ma thèse mais aussi pour les discussions que nous avons pu avoir, merci Audrey pour ton aide précieuse dans les différents projets et merci à Hervé Bazin pour m'avoir permis d'accéder à des molécules indispensables à l'avancée de mes thématiques.

Evidemment, je ne peux oublier de remercier mes parents ainsi que ma bien aimée Marion qui ont été témoins au quotidien de mes phases de déception (dimères ou oligomères ?) et de joie (ils oligomérisent !!!!).

Enfin, merci à tous ceux que je n'ai pas cités mais qui ont éclairé mon chemin contribuant à faire de ces trois années de labeur une formidable aventure…

SOMMAIRE

SOMMAIRE **1**

LISTE DES ABREVIATIONS **4**

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX **7**

AVANT - PROPOS **9**

CHAPITRE I : LES RECEPTEURS COUPLES AUX PROTEINES G **11**

I-A) INTRODUCTION 11
I-B) RCPG ET PROTEINES G HETEROTRIMERIQUES 12
I-B.1) Structure des RCPG *12*
I-B.2) Structure des protéines G *13*
I-C) MECANISMES D'ACTIVATION DES RCPG 14
I-C.1) Evolution des modèles *14*
I-C.2) Activation des protéines G *16*
I-C.3) Transduction du signal *18*
I-D) DESENSIBILISATION DES RCPG 19

CHAPITRE II : OLIGOMERISATION DES RECEPTEURS COUPLES AUX PROTEINES G **21**

II-A) INTRODUCTION 21
II-B) TECHNIQUES POUR METTRE EN EVIDENCE LA DIMERISATION DES RCPG 22
II-B.1) Les méthodes pharmacologiques *22*
II-B.2) Les méthodes biochimiques *23*
II-B.3) Les méthodes biophysiques *24*
II-B.4) Les méthodes structurales *26*
II-C) DOMAINES IMPLIQUES DANS LA DIMERISATION 28
II-C.1) Domaines extracellulaires et intracellulaires *28*
II-C.2) Domaines transmembranaires *29*
II-D) EQUILIBRE MONOMERE – DIMERE ? 30
II-E) CONSEQUENCES FONCTIONNELLES DE LA DIMERISATION 31
II-E.1) Effet de la dimérisation sur l'adressage à la surface cellulaire *31*
II-E.2) Effet de la dimérisation sur la liaison du ligand *32*
II-E.3) Effet de la dimérisation sur la signalisation *33*
II-E.4) Effet de la dimérisation sur l'endocytose *34*

CHAPITRE III : LES TECHNIQUES DE TRANSFERT D'ENERGIE **36**

III-A) INTRODUCTION 36
III-B) FLUORESCENCE ET FLUOROPHORE 36
III-C) TRANSFERT D'ENERGIE DE TYPE FÖRSTER (FRET) 38

III-C.1) Conditions du transfert d'énergie *38*
III-C.2) Influence du FRET sur la durée de vie *39*
III-C.3) Comment mettre en évidence le FRET ? *40*
II-D) FRET ET BRET : DES TECHNIQUES ADAPTEES A L'ETUDE DES PROTEINES 42
III-D.1) Utilisation de la GFP et de ses dérivés en FRET *42*
III-D.2) BRET : un phénomène naturel *44*
III-D.2.a) La bioluminescence chez *Aequoria Victoria* et chez *Renilla Reniformis* 44
III-D.2.b) Utilisation du BRET en biologie 45
III-D.3) Le FRET en temps résolu (technologie HTRF) *46*
III-D.3.a) Généralités 46
III-D.3.b) Les fluorophores 47
III-D.3.c) Transfert d'énergie : sélectivité temporelle et spectrale 49
III-D.3.d) Détection à double longueur d'onde 50
III-D.3.e) Expression du signal HTRF 51
III-E) UTILISATION DES TECHNIQUES DE TRANSFERT D'ENERGIE EN BIOLOGIE CELLULAIRE 52
III-E.1) Transfert d'énergie intermoléculaire *52*
III-E.2) Transfert d'énergie intramoléculaire (changements conformationnels) *53*

CHAPITRE IV : NOUVELLES METHODES DE MARQUAGE DES PROTEINES 55

IV-A) INTRODUCTION 55
IV-B) MARQUAGES REVERSIBLES 55
IV-B.1) TrétraCystéine FlAsH *55*
IV-B.2) Nickel NTA *57*
IV-B.3) Streptavidine monovalente – biotine *59*
IV-B.4) eDHFR *60*
IV-B.5) α-bungarotoxine *61*
IV-B.6) FKBP12 – SLF' *62*
IV-C) MARQUAGES IRREVERSIBLES 63
IV-C.1) Biotine – ligase *63*
IV-C.2) Halo-tag *64*
IV-C.3) ACP-tag *64*
IV-C.4) SNAP-tag *66*
IV-E) CONCLUSION 67

CHAPITRE V : OBJECTIF DE LA THESE 68

CHAPITRE VI : LE RECEPTEUR $GABA_B$ COMME MODELE D'ETUDE 70

CHAPITRE VII : RESULTATS ET DISCUSSION 74

VII-A) DETECTION DE DIMERES DU RECEPTEUR $GABA_B$ A LA SURFACE CELLULAIRE. 74
VII-A.1) Contexte et but. *74*
VII-A.2) Article : "Cell surface detection of membrane protein interaction with HTRF technology" *74*
VII-A.3) Données expérimentales complémentaires. *76*

VII-B) DETECTION DE DIMERES DU RECEPTEUR $GABA_B$ A L'INTERIEUR DE LA CELLULE. 78
VII-B.1) Contexte et but. *78*
VII-B.2) Résultats. *78*
VII-C) OLIGOMERISATION DE L'HETERODIMERE $GABA_B$ A LA SURFACE CELLULAIRE. 82
VII-C.1) Contexte et but. *82*
VII-C.2) Stratégie. *83*
VII-C.3) Résultats. *85*
VII-C.4) Eléments de discussion. *92*

CONCLUSION ET PERSPECTIVES 96

ANNEXE I : MATERIELS ET METHODES 100

ANNEXE II : SPECTRES DES COULEURS 104

ANNEXE III : NOTIONS THEORIQUES DE LA FLUORESCENCE 105

LA PHOTOLUMINESCENCE 105
SPECTRES D'ABSORPTION ET D'EMISSION, DEPLACEMENT DE STOKES 106
LE RENDEMENT QUANTIQUE 106
DUREE DE VIE DE FLUORESCENCE 107
INTENSITE DE FLUORESCENCE 108

ANNEXE IV : PUBLICATIONS 109

BIBLIOGRAPHIE 110

LISTE DES ABREVIATIONS

A647	AlexaFluor 647
AC	Adénylate cyclase
ACP	Acyl carrier protein
AcpS	Phosphopantetheine transferase (PPTase) de *E.Coli*
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFM	Atomic force microscopy
AGT	O^6-alkylguanine DNA alkyltransferase
AMPA	Alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate
AMPc	Adénosine 3', 5'-monophosphate cyclique
AP	Acceptor peptide
βAR	β–adrenergic receptor
ATP	Adénosine triphosphate
BBS	Bungarotoxin binding site
BCCP	Biotin carboxyl carrier protein
BFP	Blue fluorescent protein
BG	Benzyl guanine
BRET	Bioluminescence resonance energy transfer
BTX	α-bungarotoxine
CCR5	Récepteur des chimiokines CC de type 5
CD4	Cluster of differenciation
CFP	Cyan fluorescent protein
CoA	Coenzyme A
COPI	Coat protein
COS-7	CV1simian cells transformed by an origin-defective mutant of SV40
CXCR	Récepteur des chimiokines CXC
DAG	Diacylglycérol
DEC	Domaine extracellulaire
D_1R, D_2R	Récepteur de la dopamine de type 1, 2
eDHFR	Dihydrofolate réductase bactérienne
EDT	1,2-éthanedithiol
EDTA	Ethylène diamine tétra-acétate

ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FKBP12	FK506-binding protein 12
FlAsH	Fluorescein arsenical hairpin binder
EGFR	Epidermal growth factor receptor
FALI	Fluorophore-assisted laser inactivation
FLIM	Fluorescence lifetime imaging microscopy
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
FSH	Follicle stimulating hormone
GABA	Gamma-aminobutiric acid
$GABA_AR$	Récepteur ionotropique au GABA
$GABA_BR$	Récepteur métabotropique au GABA
GB1, GB2	Sous-unités de type 1 et 2 du récepteur $GABA_B$
GDP	Guanosine diphosphate
GFP	Green fluorescent protein
GIRK	G protein-coupled inwardly rectifying K^+
GluR	Récepteur ionotropique au glutamate
GMPc	Guanosine 3', 5'-monophosphate cyclique
GRK	G protein receptor kinase
GTP	Guanosine triphosphate
HA	Hémagglutinine
HEK293	Human Embryonic Kidney 293
His	Histidine
HTRF	Homogeneous time-resolved fluorescence
IP_3	Inositol 1,4,5-triphosphate
K	Cryptate d'europium
KF	Ion fluorure
LH	Luteinizing hormone
$mGluR_1$	Récepteur métabotropique du glutamate de type 1
MIP	Macrophage inflammatory protein
NK1R	Récepteur de la neurokinine-1
NRPS	Non ribosomal peptide synthetase
NTA	Nitrilotriacétate
PAR	Protease activated receptor
pbFRET	Photobleaching FRET

PBP4COOH	Pyridine bipyridine tetracarboxylate europium cryptate
PCP	Peptidyl carrier protein
PDE	Phosphodiestérase
PIP_2	Phosphatidyl Inositol 4,5-diphosphate
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PLC	Phospholipase de type C
Ppant	4'-phosphopantetheinyl
PPTase	Phosphopantetheine transférase
PTX	Pertussis toxin
QD	Quantum dots
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
RE	Réticulum endoplasmique
RGS	Regulator of G-protein signaling
Rluc	*Renilla* luciférase
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
SLF	Synthetic ligand for FKBP12
$SSTR_1$, $SSTR_5$	Récepteur de la somatostatine de type 1 et 5
ST	SNAP-tag
TBP	Trisbipyridine europium cryptate
TfR1	Récepteur transférrine de type 1
TM	Domaine transmembranaire
TMP	Triméthoprime
TR	Taste receptor
TSH	Thyroid stimulating hormone
VFT	Venus Flytrap
VIH	Virus d'immunodéficience humaine
V_{1a}, V_2	Récepteur de la vasopressine de type 1a et 2
YFP	Yellow fluorescent protein

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figures : **Pages** *(en face)*

Les récepteurs membranaires **9**

I.1 : Structure des RCPG **11**
I.2 : Les différentes classes de RCPG **12**
I.3 : Structure d'une protéine G hétérotrimérique **14**
I.4 : Modèles proposés pour l'activation des RCPG **15**
I.5 : Cycle d'activation des protéines G hétérotrimériques **16**
I.6 : RCPG et seconds-messagers **18**
I.7 : Désensibilisation des RCPG **19**

II.1 : Evidences de l'existence de dimères de RCPG **26**
II.2 : Organisation de la rhodopsine **30**

III.1 : Conditions du FRET **38**
III.2 : Les protéines GFP **42**
III.3 : La bioluminescence naturelle d'*Aequoria Victoria* **44**
III.4 : La technologie BRET **45**
III.5 : Les chélates et cryptates de terre rare **47**
III.6 : Structure et spectres des cryptates d'europium **48**
III.7 : Spectres d'absorption et d'émission de la XL665 **49**
III.8 : Sélectivité temporelle, sélectivité spectrale et détection à double longueur d'onde **50**
III.9 : Impact de la concentration en fluorophores sur le signal HTRF **51**
III.10 : Transfert d'énergie intramoléculaire **53**

IV.1 : L'approche tétracystéine – FlAsH **56**
IV.2 : L'approche Ni-NTA **57**
IV.3 : L'approche biotine monovalente – streptavidine **59**
IV.4 : L'approche eDHFR **60**
IV.5 : L'approche bungarotoxine **61**
IV.6 : L'approche FKBP (F36V) **62**
IV.7 : L'approche biotine-ligase – hydrazide **63**
IV.8 : L'approche Halo-tag **64**
IV.9 : L'approche ACP-tag **65**
IV.10 : L'approche SNAP-tag **66**

Tableau : Méthodes de marquage des proteines **67**

VI.1 : Localisation et rôles physiologiques du récepteur $GABA_B$ au niveau des synapses **71**
VI.2 : Le récepteur $GABA_B$: un hétérodimère obligatoire **72**
VI.3 : Modèle de fonctionnement du domaine extracellulaire du récepteur $GABA_B$ **73**

VII.1 : Les techniques de transfert d'énergie **75**
VII.2 : Sensibilité de détection de l'hétérodimère $GABA_B$ à la surface cellulaire en FRET **76**
VII.3 : Spécificité du signal de FRET **77**
VII.4 : FRET intracellulaire sur cellules fixées **78**
VII.5 : FRET GB1/GB1 dans les compartiments intracellulaires **79**
VII.6 : FRET GB1/GB2 en intra- ou extracellulaire **80**
VII.7 : Représentations du signal de FRET **81**
VII.8 : Caractérisation des protéines de fusion HA-ST- GB1a et Flag-ST- GB2 **85**
VII.9 : Mise au point des conditions de marquage **86**
VII.10 : Rendement de marquage des protéines de fusion **87**
VII.11 : FRET entre un SNAP-tag et un anticorps **88**
VII.12 : FRET entre deux SNAP-tag **89**
VII.13 : Oligomérisation du récepteur $GABA_B$ **90**
VII.14 : Homodimérisation des sous-unités HA-ST- $GB1a_{ASA}$ et Flag-ST- GB2
VII.15 : Influence des domaines sushi de GB1a sur l'oligomérisation du récepteur $GABA_B$ **91**
VII.16 : Effet du GABA sur le FRET
VII.17 : Modélisation de l'oligomérisation du récepteur $GABA_B$ **93**

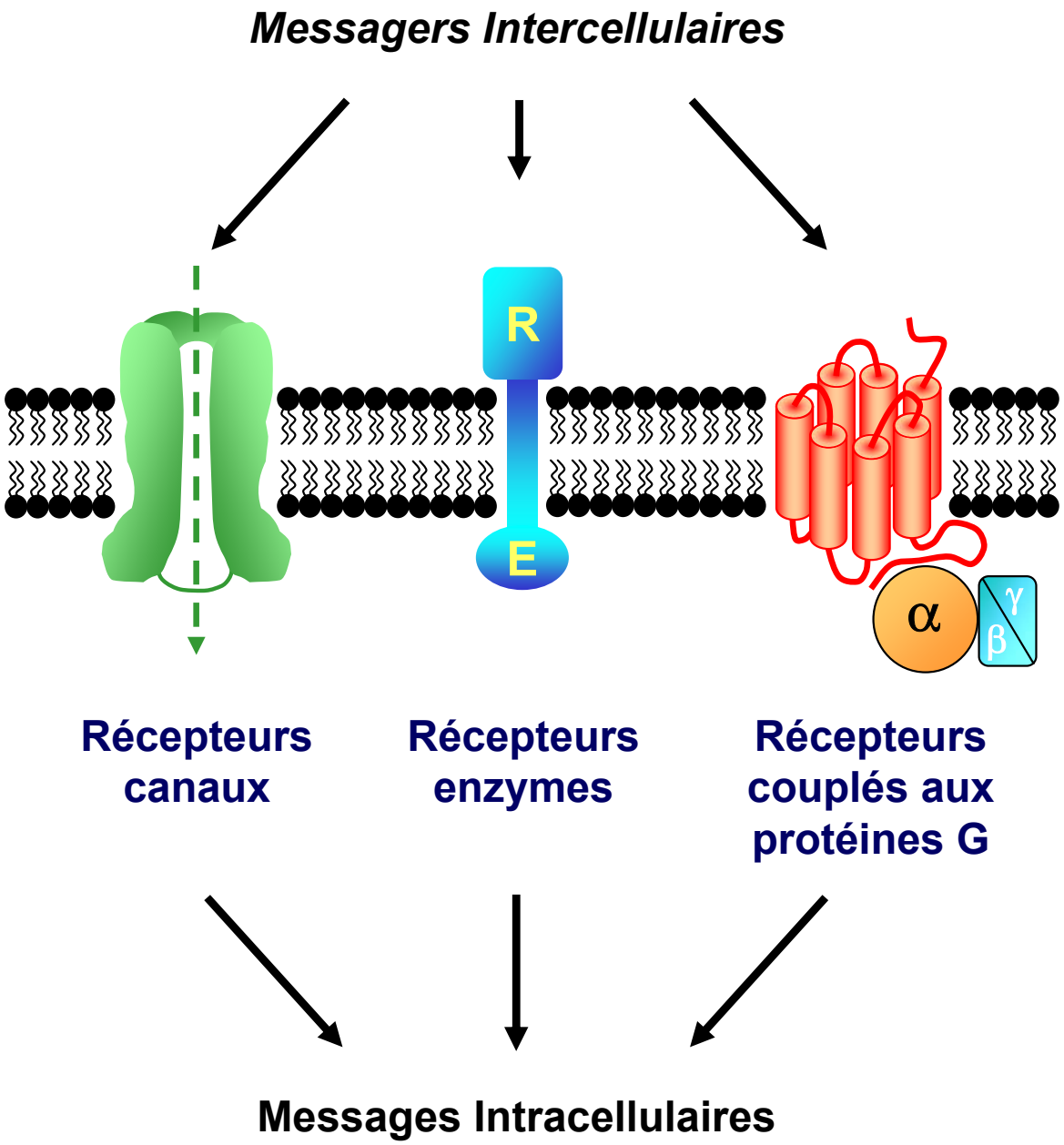


Figure : les récepteurs membranaires.

AVANT - PROPOS

La capacité des organismes vivants, qu'ils soient animaux ou végétaux, à réagir aux signaux provenant de leur environnement est déterminante pour leur survie. Cette nécessité d'adaptation, essentielle au maintien d'un certain équilibre de l'organisme, apparaît déjà à l'échelle cellulaire comme un élément déterminant de la communication cellulaire. Plus précisément, la communication cellulaire peut être définie comme l'ensemble des mécanismes permettant à une cellule de recevoir, analyser et répondre aux signaux émis par d'autres cellules ou par leur environnement. L'ensemble de ces mécanismes (émission, réception, transduction des messages et génération d'une réponse appropriée) nécessite la présence de différents partenaires notamment de protéines membranaires capables de relayer l'information à l'intérieur de la cellule. Le message est donc décodé au niveau de ces protéines - récepteurs avant d'être transformé en réponse spécifique.

Les protéines membranaires forment une grande famille de récepteurs très diversifiés pouvant être classés en trois catégories définies notamment par leurs mécanismes de transduction du signal. Selon cette classification, peuvent être distingués les récepteurs canaux, les récepteurs à activité enzymatique et les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) dénommés également récepteurs à sept segments transmembranaires (7TMR). L'étude des mécanismes impliqués dans la transduction du signal au niveau de ces récepteurs membranaires a révélé l'importance des interactions protéine - protéine. Il a été ainsi démontré que l'association spécifique de protéines membranaires pouvait être une étape-clé dans la transmission du signal. Plus généralement, ce phénomène d'assemblage protéique est un mécanisme essentiel à l'initiation de nombreux processus biologiques au niveau cellulaire. L'association de facteurs de transcription ou de récepteurs intracellulaires aux hormones stéroïdiennes est un exemple bien connu de ce type d'interaction. Concernant les récepteurs membranaires, cette association protéine - protéine a tout d'abord été définie sous le terme de dimérisation, illustrant les interactions observées au niveau des récepteurs aux cytokines ou encore des récepteurs à activité tyrosine kinase. Pour cette dernière famille de récepteurs, ne possédant qu'un seul domaine transmembranaire, à l'instar des récepteurs aux facteurs de croissance, la dimérisation constitutive ou induite par la fixation du ligand représente une étape importante dans les mécanismes d'activation. C'est en effet, sous forme dimérique, que

ces récepteurs sont transphosphorylés sur des résidus tyrosine dans la partie intracytoplasmique, étape essentielle à l'ancrage de multiples protéines impliquées dans les cascades de signalisation.

Concernant les RCPG la notion de dimérisation a été difficilement admise en raison de la complexité de leur organisation structurale et de la nature des partenaires protéiques. Ainsi, les RCPG ont longtemps été considérés comme monomériques et répondant à une stœchiométrie d'un ligand pour un récepteur couplé à une protéine G. Le dogme du complexe à trois partenaires, largement accepté, n'a donc pas permis d'envisager précocement la question de la dimérisation pour ces récepteurs. Ceci étant, alors que la notion de dimérisation des RCPG était difficilement concevable il y a vingt ans, il apparaît clairement que cette hypothèse a depuis été progressivement acceptée par la communauté scientifique. En effet, l'importante quantité de résultats accumulés au cours de ces années a considérablement changé notre perception sur l'organisation de ces récepteurs membranaires dont l'association en dimères peut paraître aujourd'hui une évidence, au moins pour la plupart d'entre eux. Il faudra cependant attendre le développement de techniques biophysiques de transfert d'énergie, FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) et BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer) pour confirmer les résultats obtenus auparavant par des approches pharmacologiques et biochimiques. Ces techniques de fluorescence permettront de démontrer pour la première fois l'existence de dimères dans des cellules vivantes. Ainsi, les avancées technologiques permettent de mieux comprendre les phénomènes d'oligomérisation des RCPG dont l'assemblage en homo- et/ou hétérodimères paraît être un mécanisme général.

Mon travail de thèse a consisté à développer des technologies basées sur un transfert d'énergie en temps résolu (HTRF®) dans ce contexte d'interactions entre récepteurs membranaires. L'objectif de ce travail était de mettre au point des systèmes basés sur l'utilisation de molécules à durée de vie de fluorescence longue (cryptates de terre rare) afin de révéler des interactions protéiques spécifiques, exclusivement à la surface de cellules vivantes.

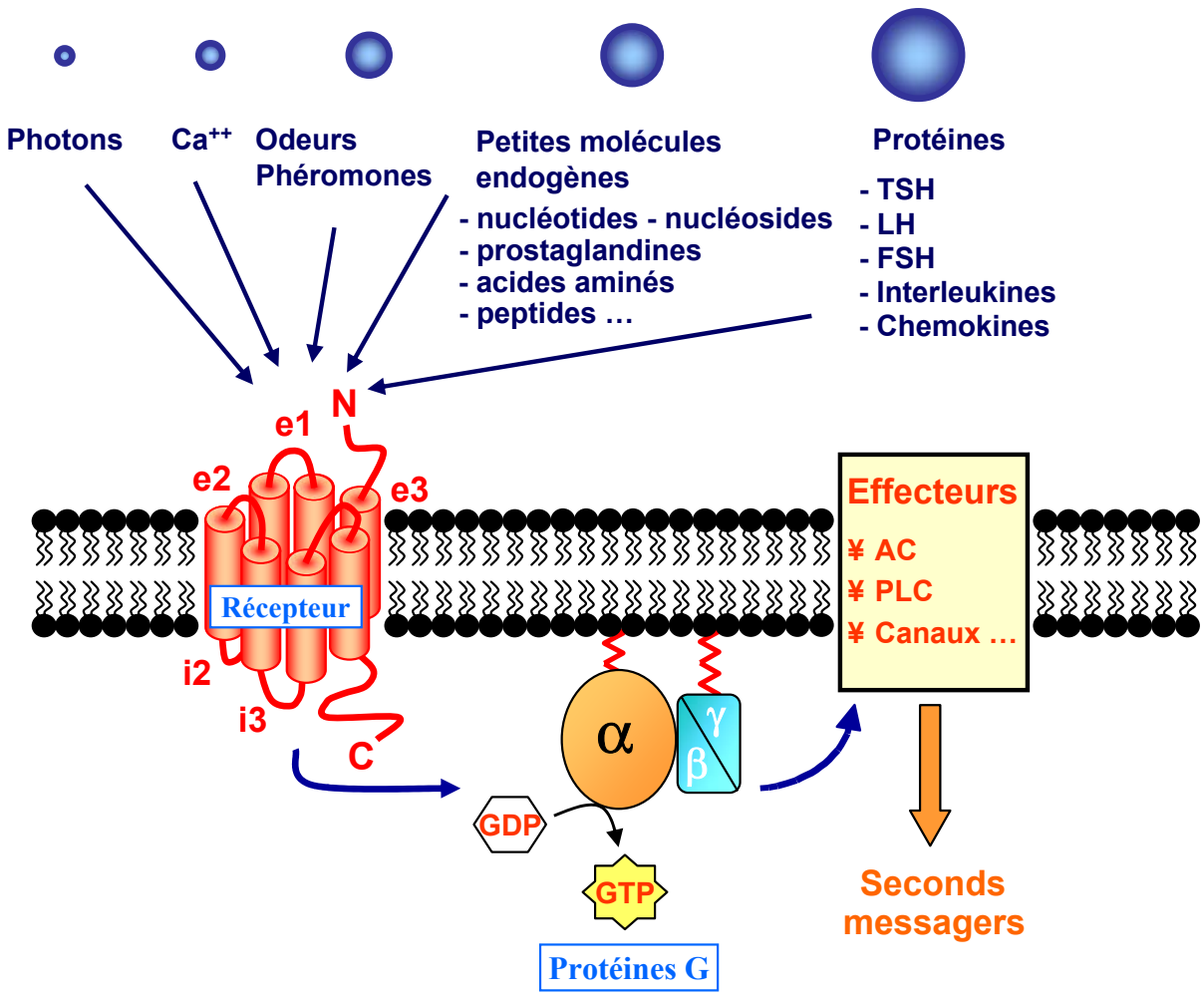


Figure I.1 : Structure des RCPG. Ce sont des récepteurs membranaires constitués de 7 hélices transmembranaires (TM) connectées par trois boucles extracellulaires et trois boucles intracellulaires. La liaison de molécules messages sur la face extracellulaire du récepteur permet l'activation au niveau intracellulaire de protéines G (échange GDP/GTP). Les protéines G, une fois activées, agissent à leur tour sur différents effecteurs responsables d'effets intracellulaires.

I-A) Introduction

L'organisme, sollicité en permanence par son environnement, est amené à analyser simultanément des milliers d'informations de natures diverses allant de simples photons à des molécules odorantes en passant par des hormones, acides aminés et nucléotides. La réception de ces informations et leur décodage par les cellules nécessitent la présence de récepteurs spécifiques présents à l'interface entre le milieu extra- et intracellulaire. Parmi ces récepteurs, les RCPG constituent la plus grande famille de récepteurs membranaires de mammifères puisqu'elle représente 3,4 % du génome (Bockaert and Pin, 1999; Gershengorn and Osman, 2001). Ces récepteurs doivent leur appellation à leur capacité de couplage, une fois activés, à des protéines hétérotrimériques liant le GTP, aussi appelées protéines G. Ces protéines transmettent le signal provenant du récepteur à différents effecteurs intracellulaires permettant la génération d'une réponse cellulaire appropriée. L'isolation puis le clonage des RCPG a permis d'identifier chez l'Homme autour de 900 gènes dont environ 500 correspondent aux récepteurs olfactifs et gustatifs et 400 à des récepteurs capables de lier des ligands endogènes (Fredriksson and Schioth, 2005; Takeda et al., 2002; Vassilatis et al., 2003). Ainsi, l'hétérogénéité de ces récepteurs assure une reconnaissance très large de signaux tant externes (odeurs, lumière, molécules du goût) qu'internes (hormones et neurotransmetteurs) **(Figure I.1)**.

Les RCPG sont des acteurs essentiels de nombreux processus physiologiques et par conséquent, des cibles de choix pour des médicaments dans le cas de pathologies (épilepsie, diabète, allergies, SIDA…). En effet, ils représentent la cible d'environ 50% des médicaments actuellement sur le marché pharmaceutique (Takeda et al., 2002; Wise et al., 2002). Des études précises portant sur les mécanismes moléculaires des processus d'activation et de régulation de ces récepteurs devraient permettre de trouver de nouveaux médicaments plus ciblés, en limitant les effets secondaires de certains traitements.

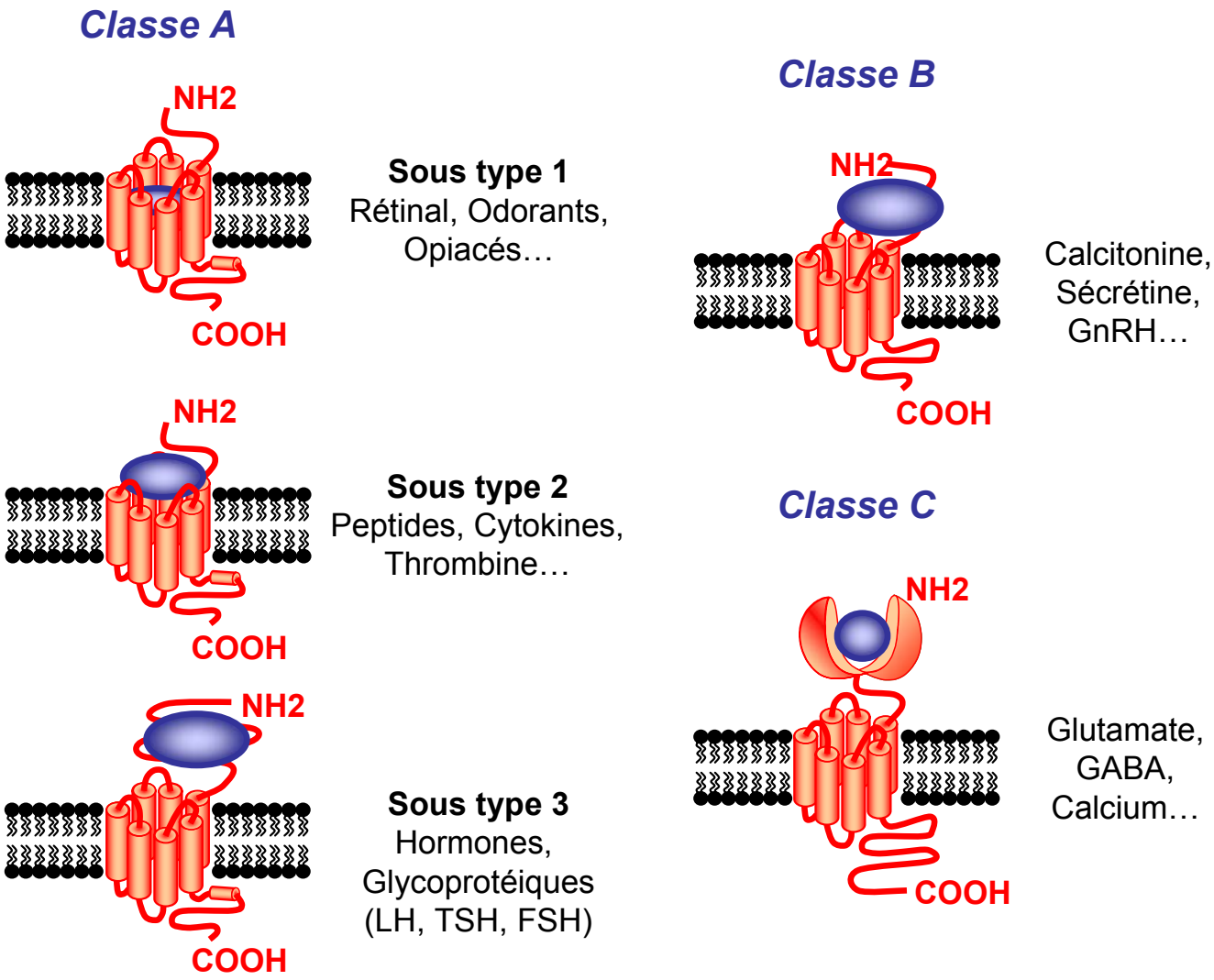


Figure I.2 : Les différentes classes de RCPG. Représentation schématique des principales classes de RCPG. Le site de liaison du ligand, représenté en bleu, est différemment positionné selon les récepteurs considérés.

I-B) RCPG et protéines G hétérotrimériques

I-B.1) Structure des RCPG

Les RCPG sont des protéines membranaires dont la masse moléculaire varie pour la plupart de 40 à 85 kDa. Il existe cependant des récepteurs beaucoup plus gros avec des masses moléculaires pouvant atteindre jusqu'à 620 kDa. Basés sur le modèle de la rhodopsine dont la structure tridimensionnelle a été récemment résolue (Palczewski et al., 2000), les RCPG se caractérisent par une structure commune de sept hélices hydrophobes transmembranaires (TM), connectées par trois boucles extracellulaires et trois boucles intracellulaires **(Figure I.1)**. Le domaine N-terminal orienté du côté extracellulaire est opposé au domaine C-terminal intracytoplasmique (Bockaert and Pin, 1999; Pierce et al., 2002; Schertler, 1998). Selon des homologies de séquences, les RCPG sont référencés en trois classes majeures **(Figure I.2)** (Bockaert and Pin, 1999).

La classe A, avec comme archétype la rhodopsine, est la classe la plus représentée, composée entre autres des récepteurs aux catécholamines, chimiokines et glycoprotéines. Une vingtaine d'acides aminés très conservés représentent la signature de cette classe. Le haut degré de conservation de ces résidus sous-tend qu'ils pourraient jouer un rôle important dans la conservation de l'intégrité structurale et/ou fonctionnelle de ces récepteurs. Parmi ces acides aminés nous retiendrons l'aspartate du TM_{II} et quatre résidus hydrophobes des TM_{VI} et TM_{VII} (proline, phénylalanine, asparagine) qui seraient importants pour l'activation des récepteurs ainsi que l'arginine du motif Asp-Arg-Tyr (DRY) entre le passage du TM_{III} et la boucle i_2. A noter aussi la présence de deux cystéines sur les boucles extracellulaires e_1/e_2 engagées dans un pont disulfure et un site possible de palmitoylation après la courte hélice VIII située directement à la sortie du TM_{VII}. Ce site de modification post-traductionnelle représente un point d'ancrage labile à la membrane plasmique pouvant former une quatrième boucle intracellulaire. Le site de liaison des ligands implique principalement les domaines transmembranaires ainsi que les boucles extracellulaires (Hibert et al., 1991; Kristiansen, 2004).

La classe B des RCPG se caractérise par un large domaine N-terminal extracellulaire (entre 100 et 500 acides aminés) contenant des cystéines conservées et engagées dans des ponts disulfures. Ces récepteurs sont capables de lier un grand nombre de peptides (calcitonine,

sécrétine…) exclusivement au niveau des domaines extracellulaires (domaine N-terminal et boucles extracellulaires) (Trumpp-Kallmeyer et al., 1992).

La classe C comprend les récepteurs du glutamate, de l'acide γ-amino butyrique ($GABA_B$), les récepteurs du calcium, trois récepteurs du goût, le récepteur GPRC6A récemment déorphanisé ainsi que quelques récepteurs orphelins. Ces récepteurs sont caractérisés par un très grand domaine extracellulaire (~ 600 acides aminés) ressemblant aux protéines périplasmiques bactériennes, impliquées dans le transport d'acides aminés de sucres et d'ions (Felder et al., 1999; O'Hara et al., 1993; Pin and Bockaert, 1995).

I-B.2) Structure des protéines G

Les protéines hétérotrimériques sont aussi appelées protéines G car elles portent une activité GTPasique. Ces protéines intracellulaires, localisées préférentiellement au niveau de la membrane plasmique, forment un assemblage tripartite composé d'une sous-unité Gα et d'un complexe βγ indissociable, sauf en milieu dénaturant. A l'heure actuelle, seize gènes codant pour les sous-unités Gα ont été identifiés et les vingt trois protéines dérivant de ces gènes ont été classées en quatre familles selon des homologies de séquence : $G\alpha_{s/olf}$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_{q/11}$, $G\alpha_{12/13}$ (Gilman, 1987). Concernant le complexe βγ, cinq gènes codant pour la sous-unité Gβ ainsi que douze gènes codants pour la sous-unité Gγ ont été identifiés (Bockaert and Pin, 1998; Gilman, 1987; Neer, 1995). En raison de la spécificité d'association des différentes sous-unités, il apparaît clairement que toutes les combinaisons aléatoires envisageables (environ 960 hétérotrimères différents) ne sont pas efficaces dans la transduction du signal (Hynes et al., 2004a; Hynes et al., 2004b; Lei et al., 2000). Un grand nombre de structures cristallines a été obtenu sur ces protéines notamment pour $G\alpha_t$ (de la transducine), $G\alpha_{i1}$, les complexes $G\alpha_{t/i}\beta_1\gamma_1$, $G\alpha_{i1}\beta_1\gamma_2$ et cela dans différentes configurations (en présence de GDP, GDP + Mg^{2+}, GTP-γ-S…) (Lambright et al., 1996). Les données structurales obtenues sur l'hétérotrimère à une résolution de 2 Å ont apporté des informations essentielles à la compréhension du fonctionnement des protéines G (Lambright et al., 1996; Sondek et al., 1996).

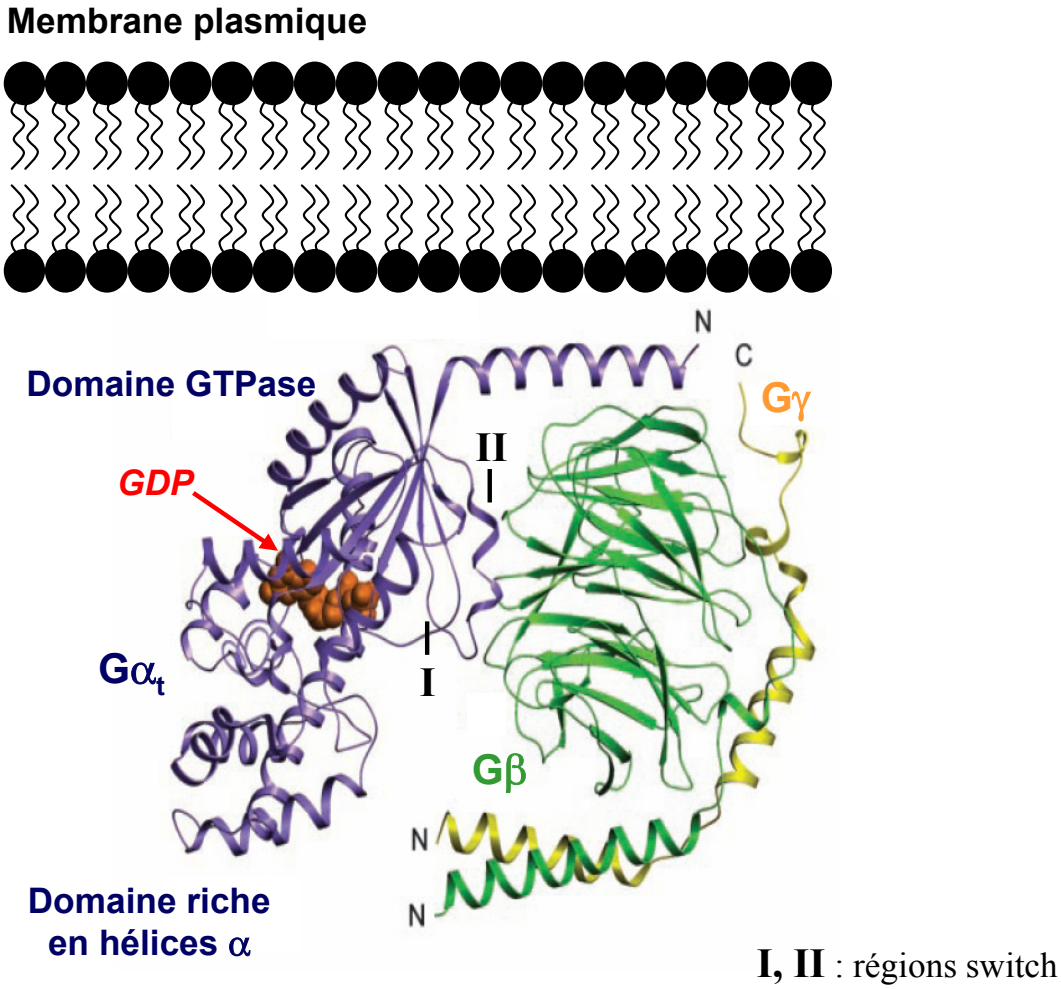


Figure I.3 : Structure d'une protéine G hétérotrimérique (Hamm et al., 2003). La sous unité Gα est formée de deux domaines : un domaine analogue aux petites protéines G de type Ras qui lie le nucléotide et un domaine α-hélicoïdal. La sous-unité Gα interagit avec Gβ au niveau de deux interfaces : au niveau de l'hélice N-terminale et au niveau de deux régions, appelées Switch I et II, qui ferment le site de fixation du GDP. Enfin, il existe une modification lipidique au niveau de l'extrémité N-terminale de la sous-unité Gα sur des résidus non présents dans la structure, et au niveau du domaine C-terminal de la sous-unité Gγ . Ces modifications lipidiques permettent l'ancrage des différentes sous-unités à la membrane plasmique.

La sous-unité Gα est une protéine de 39 – 52 kDa composée de deux domaines bien distincts : un domaine GTPase impliqué dans l'échange GDP/GTP et dans l'hydrolyse du GTP ainsi qu'un domaine riche en hélices α susceptible d'interagir avec les RCPG et la sous-unité Gβ **(Figure I.3)**. Même si les domaines N- et C- terminaux de Gα, tous deux proches de la membrane plasmique, n'ont pas été résolus, il a été suggéré qu'ils pourraient jouer un rôle clé dans les processus d'activation et dans la spécificité des interactions protéine – protéine (récepteurs, effecteurs…).

Concernant le complexe βγ, la masse moléculaire des sous-unités Gβ et Gγ est respectivement de 36 kDa et 6 – 9 kDa. Il apparaît que les sous-unités Gβ présentent une très haute affinité pour les sous-unités Gγ. De plus, l'interaction entre ces deux protéines est stabilisée par une interaction entre leurs domaines N-terminaux de type superhélicoïdale (Garritsen et al., 1993) **(Figure I.3)**. Enfin, le complexe βγ subit des modifications post-traductionnelles par ajout de lipides qui permettent l'ancrage du complexe à la membrane plasmique.

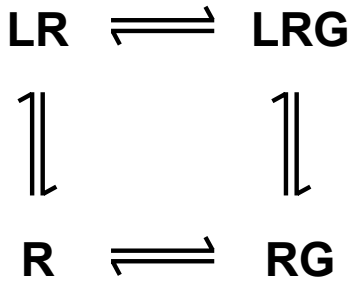
I-C) Mécanismes d'activation des RCPG

I-C.1) Evolution des modèles

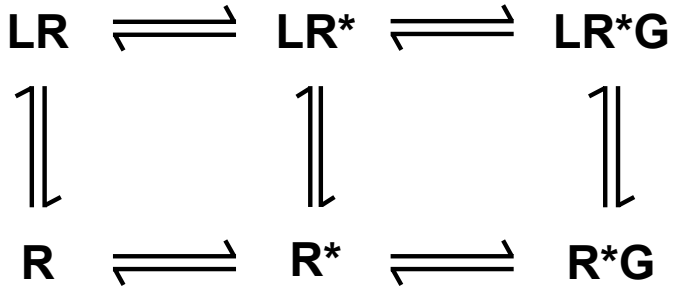
La reconnaissance des molécules messages par les récepteurs membranaires constitue la première étape de la communication cellulaire. Les premiers concepts formalisés vers le milieu du XIXème siècle étaient basés notamment sur la loi d'action de masse. Cette loi stipule la réversibilité de la liaison ligand – récepteur selon des constantes d'association et de dissociation.

Dans les années 70-80, les premiers travaux réalisés sur le récepteur β_2-adrénergique (β_2AR) révèlent l'existence de deux populations différentes de récepteurs : une population de haute affinité et une autre de basse affinité pour le même ligand (Kent et al., 1980; Lefkowitz et al., 1976). Le passage de la population de haute affinité vers une basse affinité dépend de la présence de magnésium (Mg^{2+}) et de GTP et s'avère associé à une augmentation de l'activité de l'adénylate cyclase (un effecteur du β_2AR) en réponse à la stimulation par l'agoniste

A. Modèle ternaire



B. Modèle ternaire étendu



C. Modèle ternaire cubique

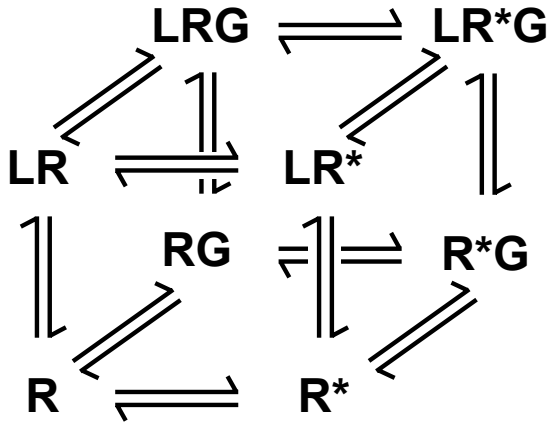


Figure I.4 : Modèles proposés pour l'activation des RCPG.
(L : Ligand; R : Récepteur inactif; R* : Récepteur actif; G : protéine G)

(Stadel et al., 1980). Ces observations ont donné lieu à l'énoncé d'un modèle dit modèle ternaire mettant en jeu trois partenaires : le ligand, le récepteur et un facteur X indéterminé alors (De Lean et al., 1980) mais identifié aujourd'hui comme étant la protéine G **(Figure I.4.A)**. Plus récemment, des études portant sur l'existence de formes constitutivement actives de récepteurs et la découverte de molécules capables de bloquer cette activité constitutive, ont permis de générer un nouveau modèle ternaire étendu **(Figure I.4.B)**. Il existerait un équilibre entre deux formes conformationnellement et fonctionnellement différentes pour un même récepteur, définies sous les termes de forme inactive (R) et forme active (R*) (De Lean et al., 1980; Gether and Kobilka, 1998; Kenakin, 2002b). Cette isomérisation conformationnelle du récepteur (passage de R à R*) nécessite soit la fixation d'un ligand, soit des changements conformationnels spontanés, soit des mutations du récepteur.

Sur la base de cet équilibre, **l'agoniste plein** présente une forte affinité pour la forme active du récepteur (R*) et une faible affinité pour sa forme inactive (R). Sa fixation sur le récepteur favorise le déplacement de l'équilibre vers R* ce qui permet d'augmenter le nombre des protéines G activées. **L'agoniste partiel** a une préférence mais à un moindre degré pour la forme active du récepteur plutôt que pour sa forme inactive. Ainsi, la forme R* est moins représentée d'où un effet de plus faible intensité que l'agoniste plein. **Les agonistes inverses**, présentent une haute affinité pour la forme inactive du récepteur et une faible affinité pour sa forme active. Ils suppriment l'activité basale intrinsèque du récepteur (Barker et al., 1994; Chidiac et al., 1994). Enfin, **l'antagoniste** sans activité propre, lie les formes actives et inactives du récepteur avec la même affinité. **L'antagoniste compétitif** bloque l'activité de l'agoniste en s'opposant à sa liaison sur le récepteur. Il se distingue de **l'antagoniste non compétitif** qui se fixe sur des sites différents de celui de l'agoniste (sites allostériques) mais empêche les changements conformationnels nécessaires à l'induction d'une réponse biologique.

Bien que le modèle ternaire étendu permette d'expliquer un certain nombre de situations, ce modèle n'envisage pas tous les cas de figures. Ainsi, un modèle plus complexe, dit modèle ternaire cubique, a été proposé (Weiss et al., 1996) **(Figure I.4.C)**. Ce modèle conserve les caractéristiques du modèle ternaire étendu mais diffère sur la capacité de couplage des récepteurs inactifs aux protéines G. Ce dernier point permet d'expliquer comment un agoniste inverse, préférentiellement lié à la forme inactive d'un récepteur, est capable d'induire la

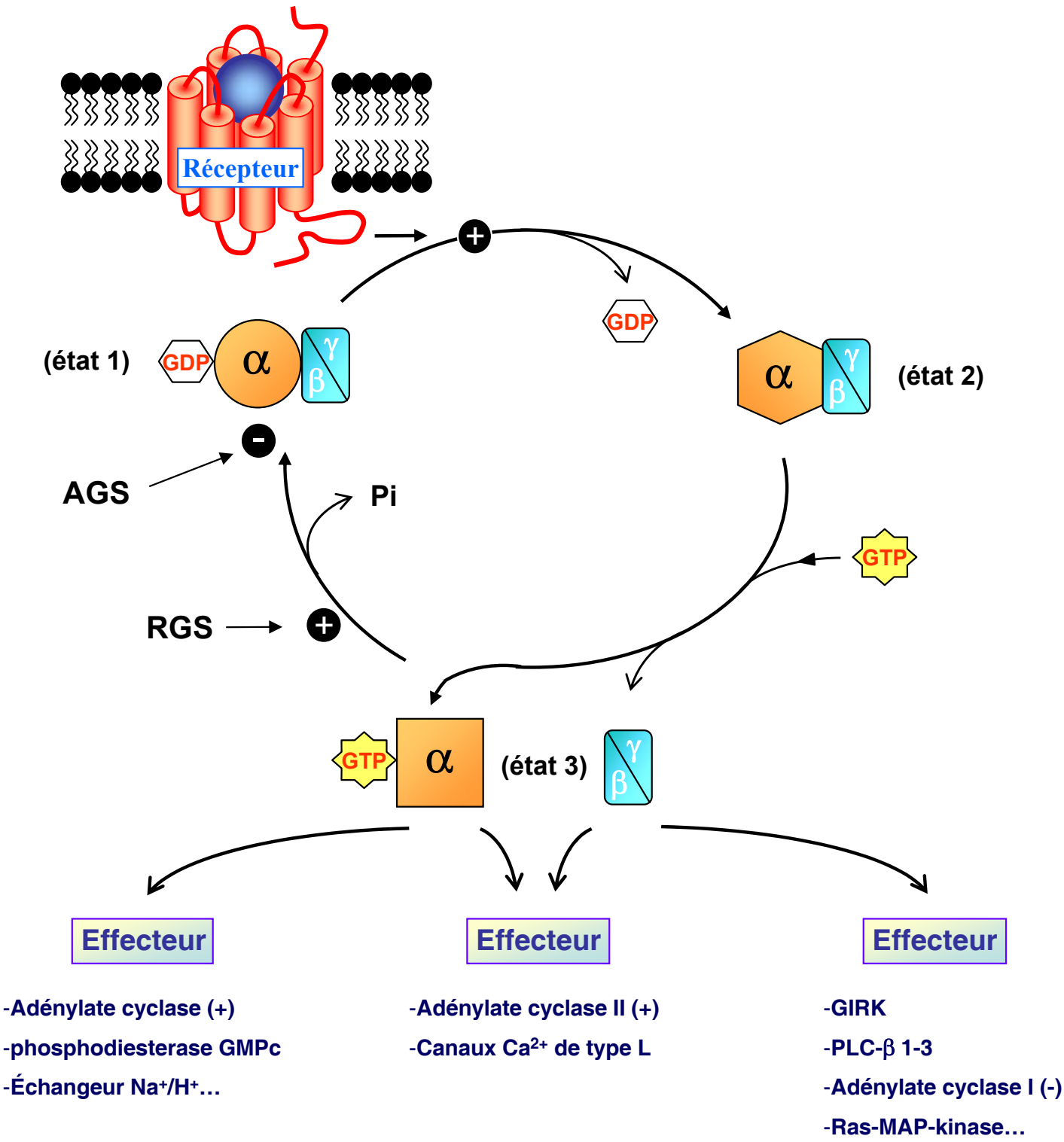


Figure I.5 : Cycle d'activation des protéines G hétérotrimériques. Dans son état actif, un RCPG peut activer une protéine G en la faisant passer d'un état trimérique lié au GDP (état 1) à un état vide de nucléotide de haute affinité pour le récepteur. Selon le modèle classique, la liaison du GTP présent à haute concentration dans la cellule, entraîne d'une part la dissociation du complexe récepteur - protéine G (état 2) et d'autre part la dissociation de la protéine G en ses deux sous-unités Gα et Gβγ (état 3). Néanmoins, de nouvelles données obtenues par des approches de transfert d'énergie ont relancé le débat sur le degré d'association de ces protéines au cours des processus d'activation.

formation d'un complexe inactif à trois partenaires (ligand – récepteur – protéine G) (Kenakin, 2004).

A la lumière des données pharmacologiques récentes, les mécanismes moléculaires d'activation des RCPG semblent beaucoup plus complexes. En effet, un modèle récent suggère que la liaison d'un agoniste partiel ou plein stabilise des états conformationnels distincts, qui sont associés à des niveaux d'activation différents des récepteurs (Yao et al., 2006). Ces différents états actifs sont définis par la capacité d'un ligand à rompre les interactions non covalentes qui stabilisent l'état basal. Le ligand se lie directement au niveau des acides aminés impliqués dans ces interactions et stabilise indirectement de nouvelles interactions intramoléculaires. Ces états conformationnels spécifiques d'un ligand donné peuvent être à l'origine des différentes voies de signalisation induites par un récepteur. Ainsi, les données de « ligand – trafficking » supportent ce modèle. En effet, des résultats de plus en plus nombreux montrent qu'en fonction du type de ligand utilisé pour activer un récepteur, les voies de signalisation induites peuvent être différentes (Azzi et al., 2003; Kohout et al., 2004; Reversi et al., 2005). La nature de l'agoniste va donc influencer l'état conformationnel du récepteur à l'état actif, favorisant ainsi certaines voies de signalisation.

La compréhension du mode d'action de ces molécules et la maîtrise de leurs effets représentent un enjeu majeur pour la mise sur le marché de nouveaux médicaments. Ces candidats médicaments associeraient à la fois spécificité de liaison sur les récepteurs et sélectivité d'activation des voies de signalisation.

I-C.2) Activation des protéines G

Les protéines G représentent les principaux effecteurs des RCPG et répondent toutes au même mécanisme d'activation **(Figure I.5)**. A l'état inactif, la protéine G comprend les trois sous-unités Gα, Gβ et Gγ. La sous-unité Gα lie une molécule de GDP (guanosine diphosphate) au niveau de son domaine GTPase. Selon le modèle classique, l'activation du récepteur par son agoniste, se traduit par des modifications structurales qui favorisent le couplage du récepteur à la protéine G. Il en résulte une diminution de l'affinité de la sous-unité Gα pour le GDP, qu'elle expulse (Gilman, 1987; Neer, 1995). L'état de transition qui suit, bien qu'instable, n'en reste pas moins un état de haute affinité pour le récepteur. La

fixation du GTP (présent à de hautes concentrations) au niveau de la sous-unité Gα « vide » clôture finalement cette première phase d'activation. La conséquence majeure de l'échange GDP/GTP semble être une dissociation du complexe hétérotrimérique : Gα-GTP et le complexe Gβγ (Neer, 1995). Les sous-unités dissociées activent alors différents effecteurs spécifiques : adénylate cyclase (AC), phospholipase C (PLC)… Pour terminer le cycle, la déphosphorylation du GTP en GDP par l'action d'une RGS met fin au signal d'activation. Le complexe Gαβγ se recompose, stabilisant la liaison du GDP au niveau de la sous-unité Gα. (De Vries et al., 1995).

Ce modèle d'activation des protéines G, caractérisé par une dissociation du complexe hétérotrimérique avec un découplage des sous-unités α, βγ au niveau du récepteur, est remis en question et rediscuté au regard des données récentes obtenues dans ce domaine. Une hypothèse avait été avancée par Neubig et coll.. Selon ces auteurs, les récepteurs et les protéines G pourraient être pré-assemblés pour permettre une haute sélectivité d'interaction et favoriser ainsi des réponses rapides (Neubig, 1994). La mise au point de techniques de transfert d'énergie de type Förster (FRET, BRET) permet désormais d'analyser ces processus d'activation en cellules vivantes et de juger cette hypothèse. Les analyses et les interprétations du signal basal obtenues entre certains récepteurs et protéines G ainsi que les variations de transfert d'énergie détectées au cours des processus d'activation font actuellement débat. En effet, certaines données semblent confirmer le modèle d'association – dissociation (Hein et al., 2005) alors que d'autres supportent le concept de pré-assemblage du récepteur et de la protéine G (Gales et al., 2005; Gales et al., 2006; Nobles et al., 2005). Des divergences existent aussi sur la stabilité du complexe hétérotrimérique. La baisse de signal issue du transfert d'énergie entre les sous-unités α et βγ pourrait refléter une dissociation réversible de ces sous-unités au cours du processus d'activation (Azpiazu and Gautam, 2004; Janetopoulos et al., 2001; Yi et al., 2003). Pour d'autres auteurs, cette baisse de signal est interprétée comme un simple changement de positionnement relatif des sous-unités α et βγ sans dissociation du complexe (Bunemann et al., 2003). Toutes ces divergences reflètent certainement les difficultés d'interprétation et les limites liées aux techniques utilisées.

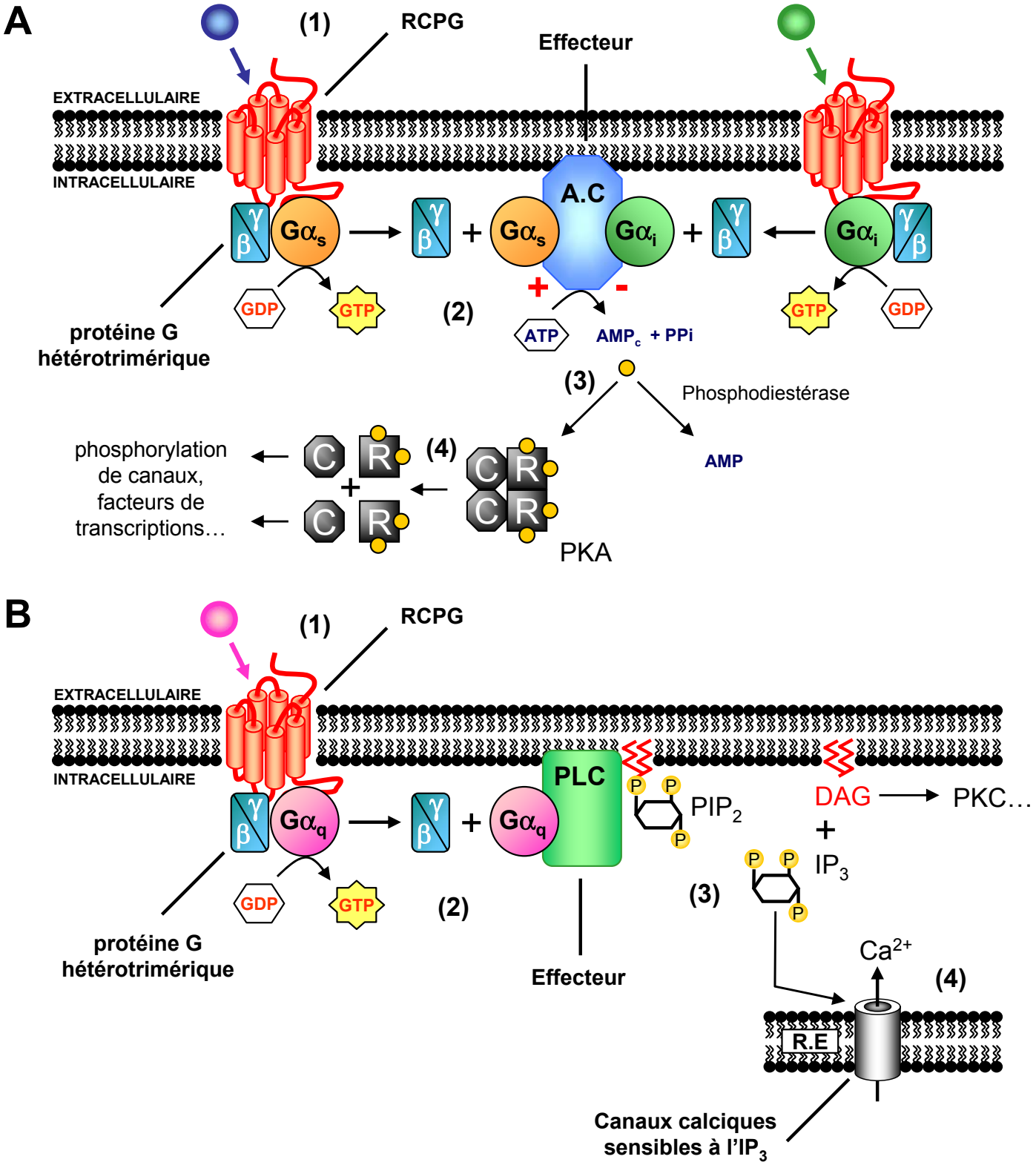


Figure I.6 : RCPG et seconds-messagers. A. Voie de signalisation AMP_c dépendante. (1) activation du récepteur par un signal externe. (2) activation des protéines $G\alpha_s$ ou $G\alpha_i$. (3) activation via $G\alpha_s$ ou inhibition via $G\alpha_i$ de la production d'AMP_c par l'adénylate cyclase (A.C). (4) activation de la protéine kinase A (PKA) par l'adénosine monophosphate cyclique (AMP_c) suite à la dissociation de ses sous-unités régulatrices (R) et catalytiques (C). **B. Voie de signalisation inositol phosphate dépendante.** (1) activation du récepteur par un signal externe. (2) activation de la protéine $G\alpha_q$. (3) hydrolyse du phosphatidyl-inositol-4-5-biphosphate (PIP_2) en inositol triphosphate (IP_3) et diacylglycérol (DAG). (4) ouverture de canaux calciques du RE via l'IP3 et activation de la PKC via le DAG. Cette dernière va induire l'ouverture de canaux calciques présents au niveau de la membrane plasmique.

I-C.3) Transduction du signal

La liaison d'un ligand sur son récepteur et l'activation successive de la protéine G, représentent les deux premières étapes indispensables à la transmission d'un signal à l'intérieur de la cellule. La protéine Gα activée peut interagir avec différentes classes d'effecteurs dont l'AC et la PLC **(Figure I.6)** (Cabrera-Vera et al., 2003).

L'AMPc, considéré comme second messager, est produit à partir d'ATP par l'AC membranaire. La régulation de la concentration intracellulaire en AMPc est contrôlée par l'équilibre entre sa synthèse à partir d'ATP et sa dégradation rapide en 5'-AMP par une phosphodiestérase (PDE) (Simonds, 1999). Certains récepteurs peuvent contrôler la production d'AMPc en agissant via l'activation de protéines G spécifiques, capables de stimuler (G_s) ou inhiber (G_i) sa production.

D'autres protéines G sont associées à des voies de signalisation distinctes de celles déclenchées par les protéines $G\alpha_s$ ou $G\alpha_i$. C'est le cas par exemple des protéines $G\alpha_q$ activant la PLCβ. Cette enzyme membranaire, une fois activée par la sous-unité $G\alpha_q$, clive le phosphatidyl-inositol-4,5-diphosphate en inositol-triphosphate (IP_3) et en diacylglycérol (DAG). Ces deux seconds messagers agissent à leur tour comme des effecteurs : l'IP_3 en se liant sur des canaux calciques du réticulum endoplasmique (RE) permet d'augmenter la concentration cytoplasmique en calcium et le DAG en agissant sur la PKC favorise, entre autre, l'ouverture de canaux calciques membranaires.

G$\beta\gamma$ peut également moduler l'activité d'effecteurs au moins aussi nombreux que ceux contrôlés par les Gα. On retrouve des canaux potassiques à rectification entrante ("GIRK: G protein-coupled inwardly rectifying K^+"), des enzymes (phospholipases A2 et C…) (Katz et al., 1992; Kim et al., 1989), l'AC (Federman et al., 1992) ainsi qu'un nombre important de kinases (MAP kinases, tyrosines kinases…).

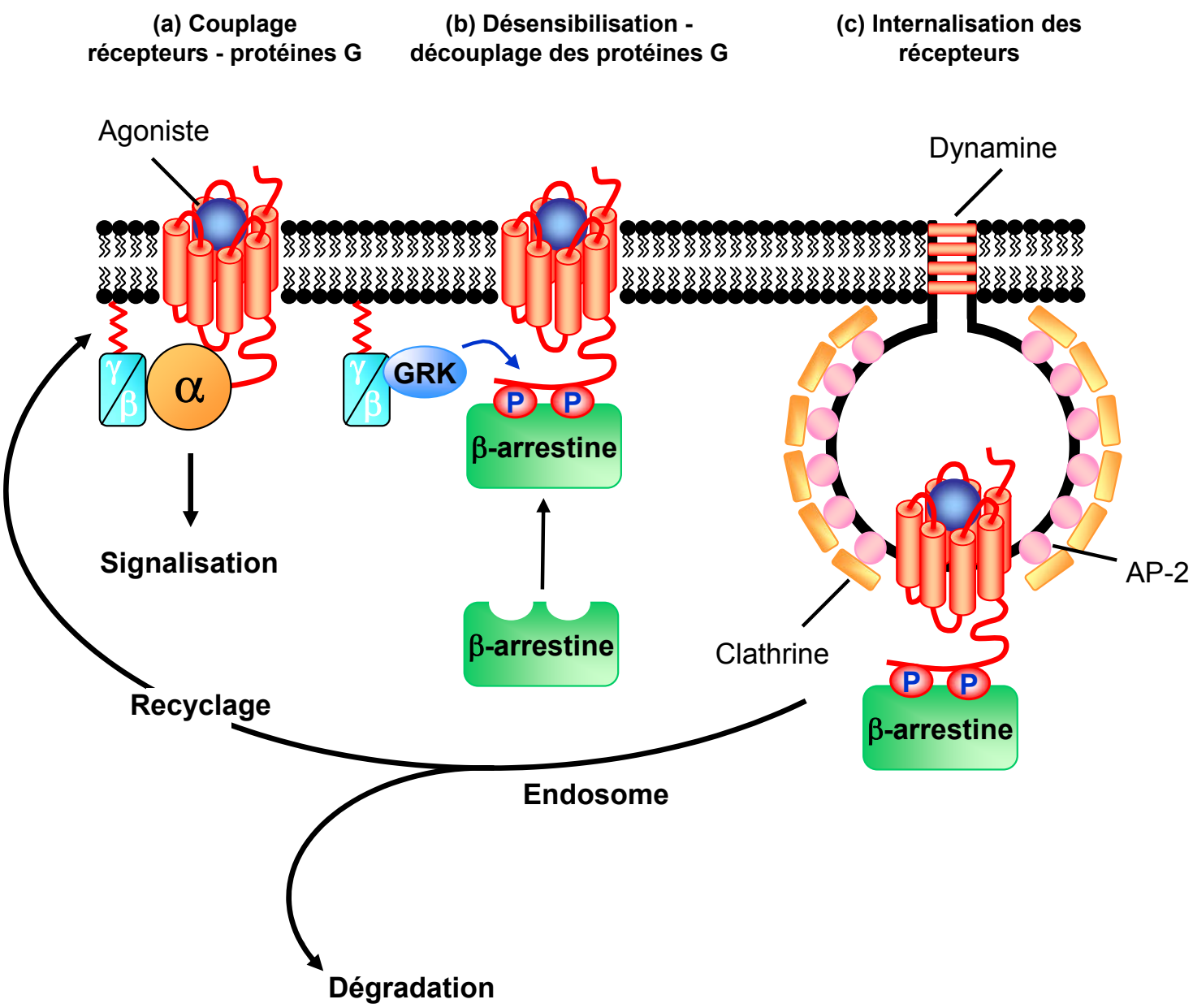


Figure I.7 : Désensibilisation des RCPG. (a) activation d'un RCPG par un agoniste et déclenchement d'une signalisation cellulaire induite par les protéines G. (b) phosphorylation du domaine carboxy-terminal du récepteur par des GRK (G protein – coupled Receptor Kinase) et recrutement de la β-arrestine cytoplasmique au niveau du récepteur avec en parallèle un découplage de la protéine G. (c) formation des puits recouverts de clathrine et endocytose des récepteurs qui sont soit recyclés à la membrane plasmique soit dégradés via leur orientation vers les compartiments lysosomiaux.

I-D) Désensibilisation des RCPG

L'activation d'un RCPG par un agoniste induit non seulement le déclenchement de voies de signalisation mais aussi une régulation de l'activité du récepteur. Cette régulation dite « négative » permet un contrôle de la durée d'activation de manière à éviter les effets néfastes d'une stimulation prolongée du récepteur. Pour être effective cette régulation nécessite un découplage physique entre le récepteur et la protéine G **(Figure I.7)**. Pour cela, le récepteur doit d'abord être phosphorylé sur des résidus sérine/thréonine, localisés dans son extrémité C-terminale (Bouvier et al., 1988; Hausdorff et al., 1989; Lohse et al., 1990).

Trois classes de protéines kinases susceptibles de réaliser cette phosphorylation se distinguent : les protéines kinases A ou C (PKA, PKC) activées par les seconds messagers (AMPc, calcium et DAG) qui phosphorylent le récepteur indépendamment de son état conformationnel (Hausdorff et al., 1989) et les GRK ("G protein receptor kinase") plus spécifiques des RCPG, qui phosphorylent le récepteur dans sa conformation active (Ferguson et al., 1996; Lohse et al., 1989). Concrètement, cette phosphorylation se traduit par le recrutement à la membrane plasmique d'une protéine cytosolique, la β-arrestine, qui prend probablement la place de la protéine G sous le récepteur (Lohse et al., 1990).

Cette étape de translocation marque l'arrêt de la signalisation cellulaire induite par le récepteur activé. Une fois à la membrane, la β-arrestine devient un partenaire essentiel de la machinerie d'endocytose en permettant la formation des puits recouverts de clathrine, indispensables à l'internalisation du récepteur. La β-arrestine pourrait constituer un pont moléculaire entre les RCPG et le complexe AP-2. Cette proposition n'exclut pas une interaction directe entre la β-arrestine et la clathrine (Laporte et al., 2000). Le récepteur une fois internalisé peut suivre deux voies : soit il est dirigé vers des endosomes de recyclage, soit il est orienté vers le compartiment lysosomial (Dery et al., 1999; Zhang et al., 1996). Le pH acide des endosomes de recyclage peut favoriser la dissociation entre le ligand et le récepteur (Krueger et al., 1997). Le récepteur « vidé » de son ligand peut alors reprendre sa conformation de repos, être déphosphorylé par des phosphatases et être recyclé à la membrane plasmique : on parle de resensibilisation (récepteurs β_2AR, récepteurs μ opiacés…) (Oakley et al., 2000). Cette resensibilisation permet d'éviter une désensibilisation prolongée des récepteurs, qui aboutirait à l'incapacité pour la cellule de répondre de manière appropriée à des signaux extracellulaires. En revanche, d'autres récepteurs sont dirigés vers les lysosomes où ils sont dégradés par des protéases (récepteur PAR-1 de la thrombine,

récepteurs δ opiacés…) (Trejo and Coughlin, 1999). Ce mécanisme favorise vraisemblablement une transmission extrêmement transitoire du signal cellulaire. Le rôle de l'ubiquitinylation de certains RCPG dans leur orientation vers le compartiment lysosomial a récemment été démontré (Shenoy et al., 2001).

II-A) Introduction

Pendant longtemps les RCPG ont été considérés comme des protéines monomériques répondant à une stœchiométrie d'activation d'un ligand par récepteur, couplé à une protéine G. Depuis, les avancées technologiques et les nombreux travaux réalisés dans ce domaine ont permis de remettre en question ce dogme, largement accepté jusqu'alors. Il a ainsi été proposé que les RCPG ne seraient pas des protéines monomériques mais dimériques. Cette notion de dimérisation des RCPG fait encore débat (Chabre et al., 2003) et n'est pas un concept novateur dans le domaine des récepteurs membranaires. En effet, le rôle de la dimérisation dans l'activation des récepteurs à un domaine transmembranaire (EGF…) est déjà bien caractérisé. Plus généralement, les réponses biologiques comme la croissance, la différenciation, l'adhésion cellulaire ou encore la neurotransmission, impliquent très souvent l'assemblage en dimères ou oligomères (multimères) des protéines de la signalisation (Goetz et al., 2003; Storez et al., 2005; Ye et al., 2004).

La notion d'oligomérisation est un terme général qui décrit l'association de protéines au sein d'un même complexe. La structure minimale d'un oligomère s'organise autour de deux protéines formant un dimère. Une association en homodimères correspond à une interaction entre deux protéines identiques et une association en hétérodimères à deux protéines différentes. Une certaine ambiguité existe cependant entre les termes de dimérisation et d'oligomérisation. En effet, les techniques d'analyse décrivant des dimères de RCPG ne permettent pas de distinguer les formes dimériques des autres formes oligomériques. Toutefois, pour simplifier la lecture de ce manuscrit, le terme de dimère sera employé pour décrire des interactions entre RCPG même s'il n'est pas permis d'exclure une organisation plus complexe de ces récepteurs.

L'objectif de ce chapitre est de rappeler dans un premier temps les arguments expérimentaux en faveur de la dimérisation des RCPG et de montrer dans un second temps l'impact de cette organisation sur le trafic, la liaison, la signalisation et l'internalisation des récepteurs.

II-B) Techniques pour mettre en évidence la dimérisation des RCPG

II-B.1) Les méthodes pharmacologiques

Dès 1975, Limbird et coll. suggèrent l'existence d'une interface d'interaction entre deux récepteurs pouvant expliquer la coopérativité négative observée sur la liaison des ligands du récepteur β_2AR. Dans ces expériences, les récepteurs sont exprimés en large excès de manière à ce qu'une minorité des sites soient occupés par le ligand. La dissociation du complexe ligand – récepteur est ensuite suivie selon deux conditions : 1) dilution infinie du ligand pour que le ligand tritié ne puisse pas se réassocier après dissociation 2) même condition en présence d'un excès de ligand froid de manière à ce que les sites non marqués par le ligand tritié puissent être saturés par le ligand froid. En l'absence de coopérativité entre les sites, le taux de dissociation devrait être le même dans les deux cas. L'expérience montre qu'il n'en est rien. L'augmentation du taux de dissociation en présence d'un excès de ligand froid indique que l'occupation des sites vides du récepteur entraîne une accélération de la dissociation sur les sites adjacents. Les mêmes conclusions ont été obtenues sur les récepteurs muscariniques m1et m2 (Potter et al., 1991; Potter et al., 1989), les récepteurs FSH, LH aux hormones glycoprotéiques (Urizar et al., 2005) ou encore sur les récepteurs aux chimiokines (El-Asmar et al., 2005).

Ces observations suggèrent une interaction entre les récepteurs dont les preuves n'en restent pas moins indirectes. En outre, il n'est pas exclu, dans l'hypothèse où il n'y aurait que des monomères, qu'il puisse exister plusieurs sites allostériques sur la même protéine modifiant les propriétés de liaison du ligand d'un site par rapport à l'autre (Christopoulos and Kenakin, 2002). De plus, des travaux récents ont permis de démontrer que les phénomènes d'allostérie négative observés entre les récepteurs, peuvent mettre en jeu des protéines localisées au niveau membranaire. Ainsi, Springael et coll. ont rapporté que le couplage de la protéine G au récepteur CCR5 est nécessaire pour restaurer une liaison de haute affinité du ligand MIP-1β sur le récepteur (Springael et al., 2006). Il s'est avéré que la dissociation de la protéine G après incubation avec du Gpp(NH)p (un analogue non hydrolysable du GTP) favorise la libération du ligand radiomarqué lié au récepteur avec une cinétique de dissociation similaire à celle observée après ajout d'un excès de ligand froid. Cette observation suggère une participation de la protéine G à l'allostérie négative observée entre

les différents monomères. Peu d'études ont rapporté des phénomènes d'allostérie positive sauf sur les récepteurs muscariniques (Mattera et al., 1985; Wreggett and Wells, 1995), les hétérodimères δ / κ opiacés (Jordan and Devi, 1999) et récemment sur le récepteur V_{1a} de la vasopressine et OT de l'ocytocine (Albizu et al., 2006). Par opposition à l'allostérie négative, l'allostérie positive implique nécessairement la formation de complexes multivalents comprenant les récepteurs, ce qui permet de soutenir la notion d'oligomérisation (Kenakin, 2002a; Wreggett and Wells, 1995).

II-B.2) Les méthodes biochimiques

Les techniques de pontage chimique (« cross-linking ») et de co-immunoprécipitation ont été beaucoup utilisées pour mettre en évidence la dimérisation des RCPG. La première technique consiste à figer chimiquement les protéines dans leur environnement cellulaire. Cette étape de fixation est suivie d'une séparation des protéines sur gel SDS-PAGE puis d'une révélation des complexes par autoradiographie (ligands radiomarqués) ou par immunoblot (anticorps anti-récepteurs ou anticorps dirigés contre des épitopes fusionnés aux récepteurs). Finalement, l'analyse des bandes donne des informations sur la masse moléculaire des complexes ciblés. Les résultats obtenus sur différents RCPG révèlent la présence de bandes de plus haut poids moléculaire que celle prédite par la séquence des récepteurs monomériques. Il a été ainsi démontré que des complexes pouvant correspondre à la taille de dimères étaient détectables pour de nombreux récepteurs, notamment les récepteurs calcium (Bai et al., 1998), angiotensine II (Capponi and Catt, 1980), bradykinine (AbdAlla et al., 1999), chimiokines de types 2 (CCR2) (Rodriguez-Frade et al., 1999) et glutamate de type 5 (Romano et al., 1996).

Toutefois, il n'est pas exclu que les bandes de haut poids moléculaire détectées par ces approches soient la conséquence :

1) d'une agrégation des protéines très hydrophobes et présentant une forte affinité mutuelle une fois extraites de leur environnement lipidique de la membrane plasmique ;

2) d'une interaction avec d'autres molécules comme par exemple les protéines G ;

3) de modifications post-traductionnelles (Avissar et al., 1983; Peterson et al., 1986; Rogers, 1984; Rondeau et al., 1990).

Cependant, la co-immunoprécipitation a permis de mettre en évidence avec une certaine spécificité la dimérisation des RCPG. Il s'agit d'une méthode biochimique qui consiste à immunoprécipiter puis à détecter un complexe via l'utilisation d'anticorps différents dirigés contre des épitopes (généralement HA, c-Myc ou Flag) fusionnés aux récepteurs étudiés. La mise au point de contrôles négatifs visant à écarter l'hypothèse d'une interaction artéfactuelle par agrégation, a apporté une certaine fiabilité quant aux résultats obtenus par ce type d'approche. C'est le cas par exemple du récepteur β_2AR étiqueté HA et c-Myc, dont l'homodimérisation a été démontrée en immunoprécipitant le dimère avec un anticorps anti-c-Myc puis en révélant l'interaction avec un anticorps anti-HA (Hebert et al., 1996). L'absence d'association, quand il y a co-expression du récepteur c-Myc-muscarinique avec le HA-β_2AR, a permis de prouver la spécificité de l'homodimérisation du β_2AR. Plus largement, cette méthode a révélé l'existence aussi bien d'homodimères de récepteurs : D_1 de la dopamine (Ng et al., 1996), V_2 de la vasopressine (Zhu and Wess, 1998), H_2 de l'histamine (Fukushima et al., 1997), $mGlu_5$ du glutamate (Romano et al., 2001) que d'hétérodimères de récepteurs : α_{2A}- et β_1-adrénergiques (Xu et al., 2003), V_{1a} et V_2 de la vasopressine (Terrillon et al., 2003) ou encore β_2-adrénergique et olfactif M71 (Hague et al., 2004a).

Il est quand même important de souligner que certains auteurs ont rapporté des cas de populations hétérogènes de récepteurs concernant le poids moléculaire des complexes détectés. Par exemple, le récepteur D_3 de la dopamine a été observé sous forme d'oligomères en utilisant une approche d'immunoprécipitation, suivie d'une analyse en Western blot (Nimchinsky et al., 1997). Les auteurs décrivent, à partir de préparations membranaires de cerveau humain, l'existence de trois formes du récepteur : une bande de 45 kDa qui correspond aux monomères ainsi qu'une bande de 85 et 180 kDa correspondant respectivement à la taille probable de dimères et tétramères. Il n'est cependant pas permis d'exclure que ces différences de poids moléculaire soient dues à des protéines d'interaction associées au récepteur.

II-B.3) Les méthodes biophysiques

Le développement d'approches non invasives (FRET et BRET) (voir Chapitre III) a permis l'analyse de la dimérisation des RCPG sur cellules vivantes (Selvin, 1995). Au cours de l'année 2000, trois approches biophysiques ont permis de démontrer l'existence de

dimères de RCPG (Angers et al., 2000; Overton and Blumer, 2000; Rocheville et al., 2000). Par une technique de FRET utilisant des variants de la GFP (CFP/YFP), Overton et Blumer ont révélé la présence d'homodimères du facteur α dans la levure alors que l'homodimérisation du récepteur β_2AR exprimé en système hétérologue était démontrée en BRET (Rluc/YFP) par Angers et coll. (Angers et al., 2000; Overton and Blumer, 2000). Parallèlement, Rocheville et coll. mettaient en évidence l'existence d'homo- ou hétérodimères de récepteurs de la somatostatine à la surface cellulaire à l'aide d'anticorps conjugués à des fluorophores. Par la suite, l'homo- ou hétérodimérisation de nombreux récepteurs a été rapportée majoritairement par les approches FRET et BRET. De manière générale, la fusion de fluorophores (CFP/YFP pour le FRET et Rluc/YFP pour le BRET) au niveau de l'extrémité C-terminale des récepteurs a permis de mettre en évidence des interactions spécifiques par la détection d'un transfert d'énergie (chapitre III-D.1-3) (Ayoub et al., 2002; Kroeger et al., 2001; McVey et al., 2001; Ramsay et al., 2002; Terrillon et al., 2003).

Ces approches FRET, basée sur une paire CFP/YFP, et BRET ont été largement utilisées pour l'analyse des interactions protéiques dans une population de cellules vivantes, en dépit de certaines limites.

Tout d'abord, il n'est pas possible, sans étape de purification ou analyse microscopique, de définir l'origine subcellulaire du signal (Golgi, RE, membrane plasmique…). En effet, dans les systèmes hétérologues une large proportion de récepteurs sont localisés à l'intérieur de la cellule du fait de leur surexpression. Il est donc difficile de séparer le signal des récepteurs fonctionnels à la surface, du signal provenant des récepteurs retenus dans les compartiments intracellulaires.

De plus, un signal détectable n'implique pas nécessairement une véritable interaction physique entre deux protéines. Des études sur la rhodopsine ont permis de montrer que le diamètre d'un monomère de rhodopsine est d'environ 43 Å (Palczewski et al., 2000). Or, dans le cas du FRET le transfert d'énergie peut encore avoir lieu entre deux protéines distantes de 100 Å, cette distance étant quand même dépendante du type de fluorophores utilisés. Il est donc envisageable de détecter pour des fluorophores avec de grands R_o (> 50 Å ; voir chapitre III) un FRET entre deux récepteurs alors que ceux-ci seraient à une distance équivalente à deux fois le diamètre d'un récepteur. De plus, la concentration de certains

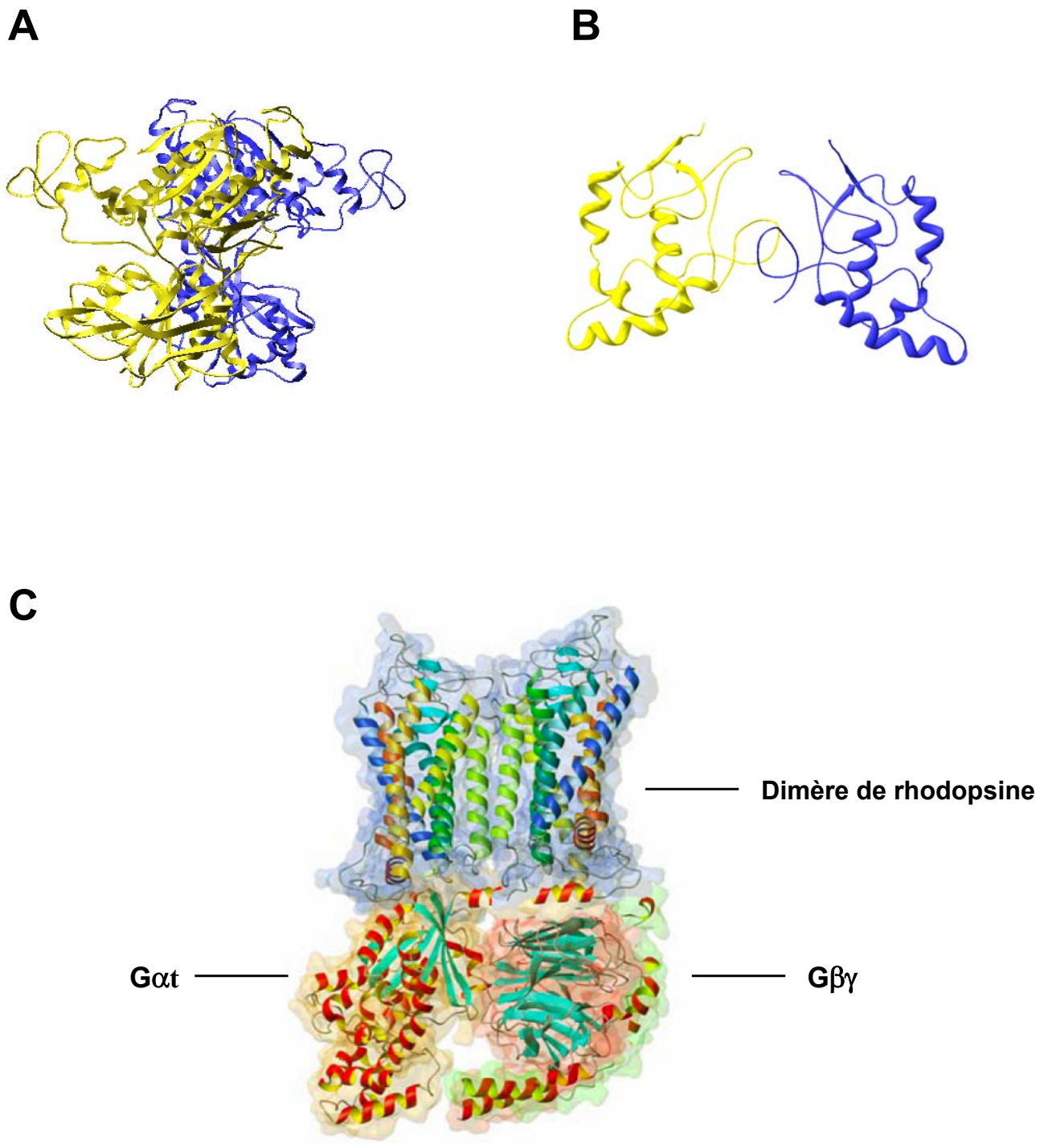


Figure II.1 : Evidences de l'existence de dimères de RCPG. A. Structure cristallographique du domaine extracellulaire (DEC) du récepteur $mGlu_1$ obtenu sous forme dimérique (code pdb : 1EWV). **B.** Structure cristallographique du DEC du récepteur Frizzled, lui aussi dimérique (code pdb : 1IJY). **C.** Modèle d'interaction théorique entre un dimère de rhodopsine et la transducine (Gt) (Liang et al., 2003).

récepteurs au niveau de microdomaines peut favoriser la détection d'un signal reflétant une forte proximité plutôt qu'une interaction directe.

Enfin, concernant la technique de FRET, le principal problème vient du recouvrement important des spectres d'absorption et d'émission des fluorophores. En effet, la source d'excitation du donneur (GFP, CFP) excite aussi l'accepteur (YFP, RFP) ce qui rend l'analyse du signal relativement complexe (chapitre III-D.1).

Il est important dans le cas de la dimérisation des RCPG d'avoir des approches permettant de détecter uniquement les récepteurs de surface. A cet effet, des techniques de FRET basées sur l'utilisation d'anticorps ont été développées. Les anticorps, incapables de pénétrer à l'intérieur de la cellule, ne peuvent atteindre leurs cibles que si celles-ci sont exposées à la surface cellulaire. Ainsi, seules les protéines de surface sont détectées. Suite aux travaux de Rocheville et coll., d'autres approches basées sur l'utilisation d'anticorps ont permis de valider des interactions de RCPG à la surface cellulaire. Ces techniques consistent à cibler spécifiquement les récepteurs étudiés avec des anticorps conjugués à des fluorophores donneurs ou accepteurs d'énergie. En tirant profit des propriétés de fluorescence particulières de leurs fluorophores, McVey et coll. ont démontré l'homo-oligomérisation des récepteurs δ opiacés à la surface cellulaire par une technique de FRET en temps résolu (Chapitre III-D.4) (McVey et al., 2001). D'autres auteurs ont utilisé cette approche pour analyser les phénomènes d'oligomérisation du récepteur D2 de la dopamine (Gazi et al., 2003) ou de récepteurs canaux de type $GABA_A$ (Farrar et al., 1999).

II-B.4) Les méthodes structurales

Les études cristallographiques de certains récepteurs ont contribué à renforcer le concept de dimérisation. C'est le cas par exemple du récepteur Wnt, Frizzled (Dann et al., 2001) ou encore du récepteur $mGlu_1$ dont la structure tridimensionnelle du domaine extracellulaire (DEC) a été résolue **(Figure II.1.A et B)**. L'analyse structurale de ce dernier a révélé l'existence de DEC dimériques et symétriques (Kunishima et al., 2000). Cette structure a été résolue en l'absence et en présence de glutamate. L'analyse de la conformation active du récepteur a ainsi permis de montrer que l'occupation des deux sites de liaison par un agoniste entraîne des changements d'orientation relatifs des deux DEC. Ces changements n'affectent

pas l'état dimérique des deux DEC. Des résultats fonctionnels obtenus sur cette famille de récepteurs ont confirmé l'importance de cette dimérisation. Ils démontrent de manière originale que l'activation d'un seul DEC au sein de l'homodimère $mGluR_5$ est suffisante pour activer le récepteur mais que la fermeture des deux DEC est nécessaire pour avoir une pleine activité (Kniazeff et al., 2004).

Pour les récepteurs de classe A, des données obtenues en microscopie de force atomique à partir de membranes natives de photorécepteurs de souris, ont permis à Liang et coll. de proposer un modèle d'organisation de la rhodopsine en rangée de dimères (Liang et al., 2003). En tenant compte des données structurales de la rhodopsine (Palczewski et al., 2000) et d'une protéine G (Lambright et al., 1996; Sondek et al., 1996), ces mêmes auteurs proposent une interface de contact permettant d'ancrer une protéine G sous un dimère de rhodopsine. Ils indiquent en effet que la surface intracellulaire d'un monomère de rhodopsine serait trop petite pour être simultanément en contact avec les différentes parties des sous-unités $G\alpha$ et $G\beta\gamma$ connues pour interagir avec le récepteur. Ainsi, au sein d'un dimère de rhodopsine, chaque protomère serait en contact avec une sous-unité de la protéine G ($G\alpha$ ou $G\beta\gamma$) **(Figure II.1.C)**. Des données obtenues sur le récepteur BLT_1 du leukotriène B_4 confirment ce modèle (Baneres and Parello, 2003).

Cependant, un certain nombre d'arguments expérimentaux démontrent aussi qu'un monomère de RCPG est tout à fait capable d'activer une protéine G (Chabre et al., 2003; Chabre and le Maire, 2005). Récemment, l'équipe de Palczewski a suggéré que les formes dimériques ou oligomériques de la rhodopsine permettraient une meilleure efficacité de couplage du récepteur à la protéine G (Fotiadis et al., 2006; Jastrzebska et al., 2006). Selon ces auteurs, le dimère serait la forme « active » du récepteur (processus d'activation rapide) alors que le monomère aurait perdu la capacité à activer efficacement les protéines G.

Ces quelques exemples renforcent le rôle potentiel de la dimérisation dans le couplage aux protéines G. Il serait pertinent de connaître la sélectivité d'association des récepteurs ce qui reviendrait à identifier les zones précises de contact au sein des dimères. Enfin, il reste à savoir si cet état dimérique est régulé et les conséquences fonctionnelles de ce phénomène de dimérisation.

II-C) Domaines impliqués dans la dimérisation

La dimérisation des RCPG implique nécessairement des zones de contact entre les différents récepteurs. Des liaisons covalentes (ponts disulfures) et/ou non covalentes de type hydrophobes pourraient permettre l'association de deux protomères au niveau des domaines extracellulaires, intracellulaires et transmembranaires.

II-C.1) Domaines extracellulaires et intracellulaires

L'implication du DEC dans la dimérisation a été beaucoup étudiée pour les récepteurs de classe C. Comme nous l'avons vu précédemment, les données cristallographiques du récepteur $mGlu_1$ ont révélé l'existence de DEC dimériques (Kunishima et al., 2000). Ces résultats confirment les travaux de Romano et coll. qui avaient déjà identifié la présence d'un pont disulfure au niveau des DEC du récepteur $mGlu_5$ stabilisant les dimères (Romano et al., 1996). Plus récemment, les mêmes observations ont été rapportées pour un mutant du récepteur calcium n'exprimant plus que la partie extracellulaire du récepteur (Goldsmith et al., 1999). Ces résultats indiquent que les larges DEC des récepteurs de classe C peuvent constituer une première interface de contact entre deux protomères via l'établissement de liaisons covalentes. Cependant, les récepteurs de classe A, qui sont majoritairement représentés au sein des récepteurs heptahélices, possèdent un DEC beaucoup plus petit que celui des récepteurs de classe C. Le rôle de ce domaine N-terminal bien que peu étudié, n'apparaît pas essentiel à la dimérisation de ces récepteurs. Toutefois, d'autres zones de contact ont été identifiées. C'est le cas par exemple de la région C-terminale des récepteurs δ opiacés (Cvejic and Devi, 1997). La délétion de quinze acides aminés du domaine C-terminal de ce récepteur réduit considérablement le nombre de dimères suggérant la participation d'une partie de ce domaine dans l'interface de dimérisation. De même, la région C-terminale des sous-unités $GABA_{B1}$ et $GABA_{B2}$ du récepteur $GABA_B$ (classe C) est un point d'association au sein de l'hétérodimére (Kuner et al., 1999). En effet, ce domaine contient un motif de type superhélicoïdal qui solidarise les deux protomères (Kuner et al., 1999; White et al., 1998) et stabilise le dimère.

II-C.2) Domaines transmembranaires

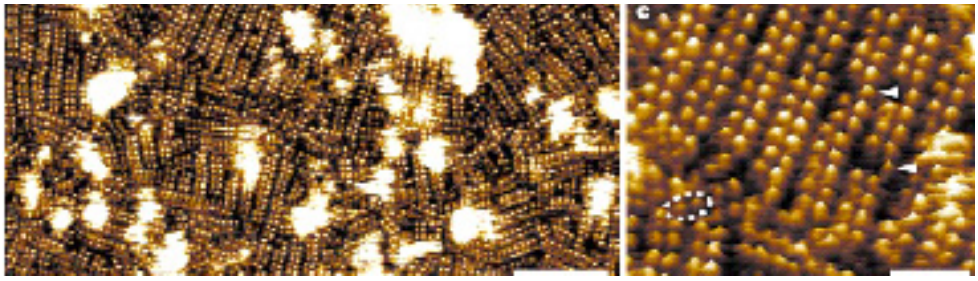
Les domaines transmembranaires, très étudiés, présentent plusieurs interfaces potentiellement impliquées dans les zones de contact assurant l'association de différents récepteurs.

La première zone identifiée est le TM_{VI}. En effet, Hebert et coll. ont mis en évidence au niveau de ce domaine un motif particulier qui serait impliqué dans la dimérisation du β_2AR (Hebert et al., 1996). L'utilisation de peptides synthétiques mimant ce motif sur des cellules exprimant le β_2AR entraîne une réduction du nombre de dimères. La conclusion des auteurs est que le TM_{VI} pourrait constituer une interface de dimérisation via des interactions hydrophobes entre les hélices VI des deux protomères. Plus récemment, il a été démontré que la mutation de cette interface de dimérisation hypothétique empêche l'adressage du récepteur β_2AR à la membrane plasmique. Ce résultat indique très certainement le rôle critique de cette zone de contact dans la dimérisation et l'envoi du récepteur β_2AR en surface (Salahpour et al., 2004).

L'implication du TM_I comme interface de contact a aussi été suggérée (Overton et al., 2003). Le récepteur du facteur α présent chez la levure possède en effet une séquence glycophorine A – like (GXXXG) au niveau de son domaine TM_I. La mutation des glycines de cette séquence affecte l'expression des récepteurs en surface. Ce défaut d'adressage est la conséquence d'une rétention des récepteurs au niveau des compartiments intracellulaires qui semble corrélée à une perte d'oligomérisation. Les auteurs proposent que cette séquence serait engagée dans un contact direct entre les deux protomères comme cela a pu être démontré pour la glycophorine A. La présence de ce motif dans d'autres domaines transmembranaires de différents RCPG suggère que cette zone de contact pourrait être importante pour de nombreux récepteurs.

Plus récemment, des analyses de pontage covalent sur le récepteur D_2 de la dopamine ont mis en évidence le rôle du TM_{IV} dans l'homodimérisation de ce récepteur. Ces analyses ont permis notamment de montrer l'implication des changements conformationnels de cette interface dans les mécanismes d'activation (Guo et al., 2005).

A



B

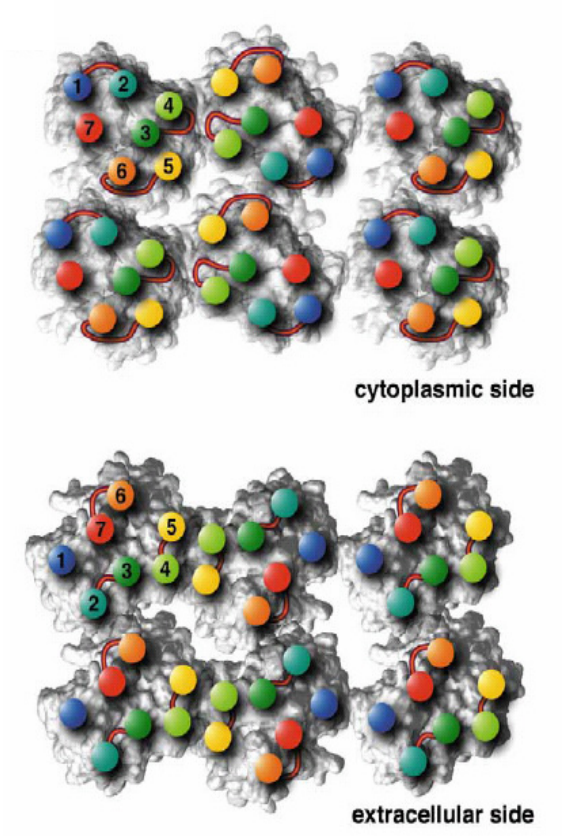


Figure II.2 : Organisation de la rhodopsine. A. Révélation par AFM (Atomic Force Microscopy) de rangées de dimères de rhodopsine dans des membranes de rétine de souris. La flèche indique la présence occasionnelle de monomères de rhodopsine (Fotiadis et al., 2003). **B.** Modélisation de l'arrangement de la rhodopsine au niveau de la face cytoplasmique ou extracellulaire de la membrane. L'interface de contact entre monomères intervient au niveau des domaines TM4 et TM5. Les contacts entre dimères prennent place entre la boucle séparant les TM5 et TM6 et celle séparant les TM1 et TM2 (Fotiadis et al., 2004).

Au regard de ces résultats, l'interface de contact entre deux récepteurs semble a priori difficile à définir. Pourtant, les données récentes obtenues en AFM sur l'organisation de la rhodopsine dans des membranes de rétine de souris permettent de réconcilier l'ensemble de ces données (Fotiadis et al., 2003) **(Figure II.2.A)**. Ainsi, la résolution de la structure cristalline de la rhodopsine (Palczewski et al., 2000) associée à la visualisation en AFM de son organisation en rangées de dimères a permis à Fotiadis et coll. de proposer un modèle décrivant deux interfaces d'interaction du récepteur avec lui-même (Fotiadis et al., 2004) **(Figure II.2.B)**. Une interface symétrique, au niveau des TM_{IV} et TM_{V} correspondrait à l'organisation dimérique des récepteurs, l'autre asymétrique, formée par les boucles comprises entre les TM_{V}-TM_{VI} et TM_{I}-TM_{II} supporterait l'interaction entre dimères (rangées de récepteurs).

Si la dimérisation paraît être un plan d'organisation de nombreux RCPG, il se pourrait que ces récepteurs dimériques s'intègrent dans un réseau beaucoup plus complexe d'interactions. Cette organisation oligomérique, en augmentant considérablement la complexité d'interconnexions possibles des récepteurs à la surface cellulaire, pourrait avoir comme conséquence un accroissement de la diversité des réponses physiologiques engendrées.

Finalement, l'ensemble de ces résultats démontre l'existence de plusieurs zones de contacts possibles entre deux ou plusieurs protomères, localisées au niveau des domaines extracellulaires, intracellulaires et transmembranaires des récepteurs. Toutefois, les déterminants moléculaires de la spécificité d'association entre des récepteurs homodimériques, hétérodimériques ou oligomériques restent encore méconnus à ce jour.

II-D) Equilibre monomère – dimère ?

Si la dimérisation semble avérée pour bon nombre de récepteurs, il n'est cependant pas permis d'exclure une dynamique d'association – dissociation des complexes oligomériques à la surface cellulaire. Ainsi, certains auteurs soutiennent que la liaison du ligand pourrait réguler la dimérisation, soit en la favorisant (AbdAlla et al., 1999; Patel et al., 2002; Rocheville et al., 2000; Roess and Smith, 2003; Ward, 2006), soit en l'inhibant (Gines et al., 2000; Latif et al., 2002). D'autres concluent que l'homodimérisation et l'hétérodimérisation sont des processus constitutifs non modulables par la liaison du ligand (Ayoub et al., 2002;

Jordan and Devi, 1999; Overton and Blumer, 2000; Terrillon et al., 2003). Ces divergences reflètent certainement en partie les difficultés d'interprétation et les limitations liées aux techniques utilisées. En effet, une variation de transfert d'énergie FRET ou BRET en réponse à un agoniste peut aussi bien s'expliquer par une modification du processus de dimérisation (association, dissociation) que par de simples modifications conformationnelles au sein du dimère préexistant. De même, la détection d'une augmentation des formes dimériques par des techniques d'immunodétection de type Western blot pourrait s'expliquer par une stabilisation conformationnelle du complexe, suite à la liaison de l'agoniste, qui deviendrait plus résistant aux détergents.

II-E) Conséquences fonctionnelles de la dimérisation

La principale question concernant la dimérisation repose sur l'implication de ce phénomène dans la fonction physiologique et la régulation des récepteurs. Pourquoi la dimérisation des RCPG serait-elle nécessaire et quel pourrait être l'avantage évolutif d'un tel phénomène ? Il apparaît clairement que la dimérisation des RCPG perturbe notre perception sur le mode de fonctionnement de ces récepteurs membranaires. Qu'il s'agisse de la capacité d'une molécule à lier un récepteur, de la signalisation induite par cette liaison ou encore de la régulation de l'expression des récepteurs à la surface, il apparaît de plus en plus évident que la dimérisation affecte tous ces processus avec comme conséquence une augmentation de la diversité des réponses engendrées.

II-E.1) Effet de la dimérisation sur l'adressage à la surface cellulaire

Le rôle de la multimérisation des protéines est soutenu par l'importance de ce mécanisme dans la stabilité structurale des protéines. En effet, dans le cas des protéines membranaires, la stabilité structurale d'une protéine est reflétée par sa capacité à atteindre la membrane plasmique. Seules les protéines correctement repliées peuvent passer les systèmes de contrôle-qualité de la cellule pour finalement atteindre leur lieu d'adressage. L'oligomérisation précoce dans le RE est justement un mécanisme utilisé comme contrôle-qualité des voies de biosynthèse de nombreuses protéines membranaires. C'est le cas par exemple du récepteur de l'insuline (famille des récepteurs tyrosines kinases) qui

homodimérise temporairement au niveau du RE en formant un pro-récepteur (Bass et al., 1998). Les pro-récepteurs mutants incapables d'homodimériser sont détruits. Pour les canaux potassiques (tétramères, octamères…), la biogénèse a lieu dans le RE et c'est aussi une étape clé dans le contrôle-qualité de ces molécules (Papazian, 1999; Zerangue et al., 1999). En ce qui concerne les RCPG, la nécessité de dimériser pour un transport correct vers la surface est bien illustrée par le récepteur $GABA_B$. Ce récepteur est un hétérodimère obligatoire constitué de deux sous-unités différentes, $GABA_{B1}$ et $GABA_{B2}$. La sous-unité $GABA_{B1}$ retenue naturellement dans le RE doit être co-exprimée avec la sous-unité $GABA_{B2}$ pour pouvoir être adressée à la surface cellulaire et former un récepteur fonctionnel. Comme pour le $GABA_B$, d'autres récepteurs doivent être sous forme dimérique pour atteindre la membrane plasmique. C'est ainsi le cas pour les récepteurs α_{1D} – α_{1B} adrénergiques (Hague et al., 2004b; Uberti et al., 2003), les récepteurs T_1R_3 / T_1R_1 et T_1R_3 / T_1R_2 du goût (Nelson et al., 2002; Nelson et al., 2001) et les récepteurs olfactifs dont l'interaction entre le récepteur olfactif M71 et le β_2AR permet l'adressage d'un hétérodimère en surface (Hague et al., 2004a).

D'autres données expérimentales soutiennent cette dimérisation précoce qui représente une étape clé dans l'envoi en surface des récepteurs. La co-expression de récepteurs mutés (retenus dans les compartiments intracellulaires) empêche l'envoi en surface des formes sauvages de ces mêmes récepteurs. Cela a pu être démontré pour les récepteurs V_2 de la vasopressine (Zhu and Wess, 1998), D_3 de la dopamine (Karpa et al., 2000) et β_2-adrénergiques (Salahpour et al., 2004). Ainsi, des mutations naturelles dominantes de RCPG peuvent avoir des conséquences pathophysiologiques. CCR_5 et $CXCR_4$ sont des co-récepteurs connus pour l'entrée du VIH dans la cellule (Cairns and D'Souza, 1998). Chez des patients présentant le génotype CCR_5 / $CCR_5\Delta32$, la perte d'expression du récepteur CCR_5 co-exprimé avec le mutant $CCR_5\Delta32$ retenu dans le RE, retarde l'infection par le VIH (Benkirane et al., 1997; Chelli and Alizon, 2001).

II-E.2) Effet de la dimérisation sur la liaison du ligand

Le concept selon lequel la dimérisation aurait un rôle dans la diversité pharmacologique des RCPG a d'abord été mis en évidence par des études sur les récepteurs δ et κ opiacés (Jordan and Devi, 1999). En effet, la co-expression des deux récepteurs permet la formation

d'un hétérodimère présentant une faible affinité pour les ligands sélectifs des deux protomères. En revanche, une haute affinité est restaurée si les deux ligands sont appliqués simultanément, ce qui suggère une coopérativité positive entre les récepteurs. Cet effet synergique n'est pas observé sur des membranes de cellules exprimant individuellement les récepteurs δ ou κ opiacés. L'hétérodimérisation des récepteurs δ et κ entraîne donc un changement dans les propriétés de liaison des ligands. Bien qu'un lien direct avec l'hétérodimérisation des récepteurs n'ait pas été démontré, ces résultats de coopérativité positive ou négative au niveau de la liaison des ligands peuvent être interprétés comme la conséquence de l'hétérodimérisation de nombreux RCPG. C'est le cas des récepteurs m2 / m3 muscariniques (Maggio et al., 1999), des récepteurs SST_5 de la somatostatine / D_2 de la dopamine (Rocheville et al., 2000), des récepteurs δ / μ opiacés (Gomes et al., 2000), des récepteurs A_{2A}-adrénergique / D_1 de la dopamine (Franco et al., 2000) ou encore du récepteur $GABA_B$ (Galvez et al., 2001). Plus récemment, une étude basée sur la technologie BRET a suggéré que l'hétérodimère MT1 / MT2 de la mélatonine représente une entité assez importante dans la cellule. Les hétérodimères présenteraient des propriétés de liaison du ligand différentes de celles des homodimères correspondants (Ayoub et al., 2004).

Ces résultats permettent d'illustrer une des conséquences possibles de la dimérisation. Cette diversification observée lors de la création de nouvelles unités fonctionnelles apporterait à la cellule des propriétés pharmacologiques originales.

II-E.3) Effet de la dimérisation sur la signalisation

Les RCPG à l'état actif sont capables de se coupler spécifiquement à des protéines, relais intracellulaire de l'information extracellulaire détectée par les récepteurs. Nous avons discuté précédemment du modèle selon lequel le dimère permettrait un couplage efficace du récepteur à une protéine G. Au regard de ce modèle, il paraît évident que la nature des protomères formant le dimère est déterminante dans la spécificité de couplage du récepteur aux différentes protéines G (G_s, G_i, G_q et G_{12}). Si les récepteurs sont sous forme d'homo- ou hétérodimères, les voies de signalisation activées par ces complexes pourront être différentes. Les récepteurs δ et μ opiacés peuvent individuellement se coupler à des protéines G sensibles à la PTX (Gi/o). Sous forme hétérodimérique, ces récepteurs sont toujours capables de

signaler en présence de cette toxine (Charles et al., 2003; George et al., 2000). L'hétérodimère pourrait donc s'associer spécifiquement à des protéines G insensibles à la PTX. Les mêmes conclusions ont été rapportées notamment pour les récepteurs aux chimiokines CCR_2 / CCR_5 (Mellado et al., 2001) et plus récemment pour les récepteurs de la Dopamine (Lee et al., 2004; Pollack, 2004).

Récemment, des résultats ont permis de démontrer par des techniques de BRET et de co-immunoprécipitation, l'hétérodimérisation du récepteur EP_1 de la prostaglandine E_2 avec le récepteur β_2AR, dans des cellules musculaires des voies respiratoires (McGraw et al., 2006). Le récepteur EP_1 qui, exprimé seul, n'a pas d'effet significatif sur le tonus respiratoire, agirait comme un modulateur du β_2AR en le découplant des protéines Gs via la formation d'un hétérodimère. L'effet bronchodilatateur induit par l'agoniste du β_2AR serait ainsi fortement réduit. D'un point de vue pathologique, cette hétérodimérisation pourrait contribuer à réduire la réponse des agonistes du β_2AR dans le cas de crises d'asthme sévères. Concernant les récepteurs du goût, il a été proposé que la réponse aux goûts sucrés (saccharine, sucrose…) serait strictement dépendante de la formation de l'hétérodimère T_1R_3 / T_1R_2 (Nelson et al., 2001) alors que l'hétérodimère T_1R_3 / T_1R_1 serait préférentiellement sensible aux acides aminés (Nelson et al., 2002). De manière intéressante, des études de souris KO suggèrent que l'hétérodimère T_1R_3 / T_1R_1 est nécessaire pour avoir une sensation umami (goût différent apporté notamment par le glutamate) (Zhao et al., 2003). De multiples exemples démontrant l'impact de la dimérisation sur la signalisation des RCPG traduisent l'importance de ce phénomène.

II-E.4) Effet de la dimérisation sur l'endocytose

Pour un certain nombre d'hétérodimères, il a pu être démontré que la stimulation d'un seul protomère permet la co-internalisation des deux « récepteurs ». Parmi ces récepteurs, on trouve les récepteurs de la somatostatine $SSTR_1$ / $SSTR_5$ (Rocheville et al., 2000), δ opiacés / β_2AR (Jordan et al., 2001), α_{2A}AR / β_1AR (Xu et al., 2003), α_{1A}AR / α_{1b}AR (Stanasila et al., 2003), $SSTR_{2A}$ de la somatostatine / μ opiacés (Pfeiffer et al., 2002) et A_{2A} de l'adénosine / D_2 de la dopamine (Hillion et al., 2002). A l'inverse, l'hétérodimérisation peut aussi empêcher l'endocytose d'un protomère par un effet dominant négatif du protomère qui lui est

associé. On citera le cas du récepteur κ opiacé qui empêche l'endocytose du récepteur δ opiacé (Jordan and Devi, 1999) et du β_2AR. De même, le β_1AR bloque l'internalisation du β_2AR lorsqu'ils sont co-transfectés dans les mêmes cellules (Lavoie et al., 2002).

III-A) Introduction

La caractérisation de la dynamique des interactions protéine – protéine a été marquée par l'évolution des biotechnologies notamment dans le domaine de la biophysique. C'est ainsi que les techniques de fluorescence, vieilles pour certaines depuis plus d'un demi-siècle, connaissent depuis une dizaine d'années un regain d'intérêt en biologie. Ces méthodes, basées sur l'utilisation des propriétés de fluorescence de molécules particulières, se sont avérées des outils parfaitement adaptés à la cellule vivante. Elles permettent notamment le suivi dans l'espace et dans le temps de la dynamique des interactions protéiques intervenant au sein même de la cellule. Parmi ces méthodes, les technologies basées sur un transfert d'énergie de fluorescence de type Förster, représentent des outils de choix pour mesurer des variations de distance intra ou intermoléculaires de l'ordre de quelques nanomètres. Ainsi, le FRET et le BRET ont été largement utilisés ces dernières années pour l'étude des interactions moléculaires aussi bien *in vitro*, qu'*in vivo*.

Dans une première partie, nous rappellerons les principales propriétés caractérisant un fluorophore puis nous verrons comment ces molécules fluorescentes peuvent être mises à contribution dans des approches de transfert d'énergie de type Förster. Nous aborderons ensuite des applications biologiques de ces méthodes pour l'étude de la dynamique des interactions protéiques dans la cellule.

III-B) Fluorescence et fluorophore

Pour simplifier la lecture de ce manuscrit, les formulations mathématiques à la base des notions théoriques de la fluorescence sont développées en annexe II. Nous ne rappellerons ici que quelques définitions et principes de base permettant de mieux comprendre le principe du FRET.

La luminescence peut se définir comme une émission de lumière (photons), produite par le retour d'électrons excités vers un état de moindre énergie au sein d'une molécule. Parmi les phénomènes de luminescence, on distingue la photoluminescence (fluorescence, phosphorescence) qui est un phénomène radiatif consécutif à une excitation lumineuse, de la chimioluminescence dont l'émission de lumière est consécutive à une réaction chimique ou enzymatique (bioluminescence). Concernant la photoluminescence, une représentation de ce phénomène dans le diagramme de Jablonski est détaillée en annexe.

Une molécule capable d'émettre un signal de fluorescence est qualifiée de fluorophore. Différentes caractéristiques photophysiques permettent de le définir :

- les spectres d'excitation et d'émission. Ils représentent la signature de la structure énergétique du fluorophore. La différence de longueur d'onde séparant leur maximum s'appelle le déplacement de Stokes.

- le coefficient d'extinction molaire (ε). Il correspond à la capacité d'absorption par le fluorophore de l'énergie apportée par un photon à une longueur d'onde donnée.

- le rendement quantique (Φ). Il caractérise la capacité du fluorophore à re-émettre sous forme de lumière, l'énergie absorbée. Il est défini comme étant le rapport du nombre de photons émis sur le nombre de photons absorbés.

- la durée de vie de fluorescence (τ). Elle représente le temps de séjour moyen du fluorophore dans son état excité et peut être déterminée par la formule suivante :

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}}$$

Ce temps est d'autant plus court que les constantes de dés-excitation radiative (k_r) et non radiatives (k_{nr}) sont rapides. La durée de vie pour un fluorophore classique est de l'ordre de la nanoseconde.

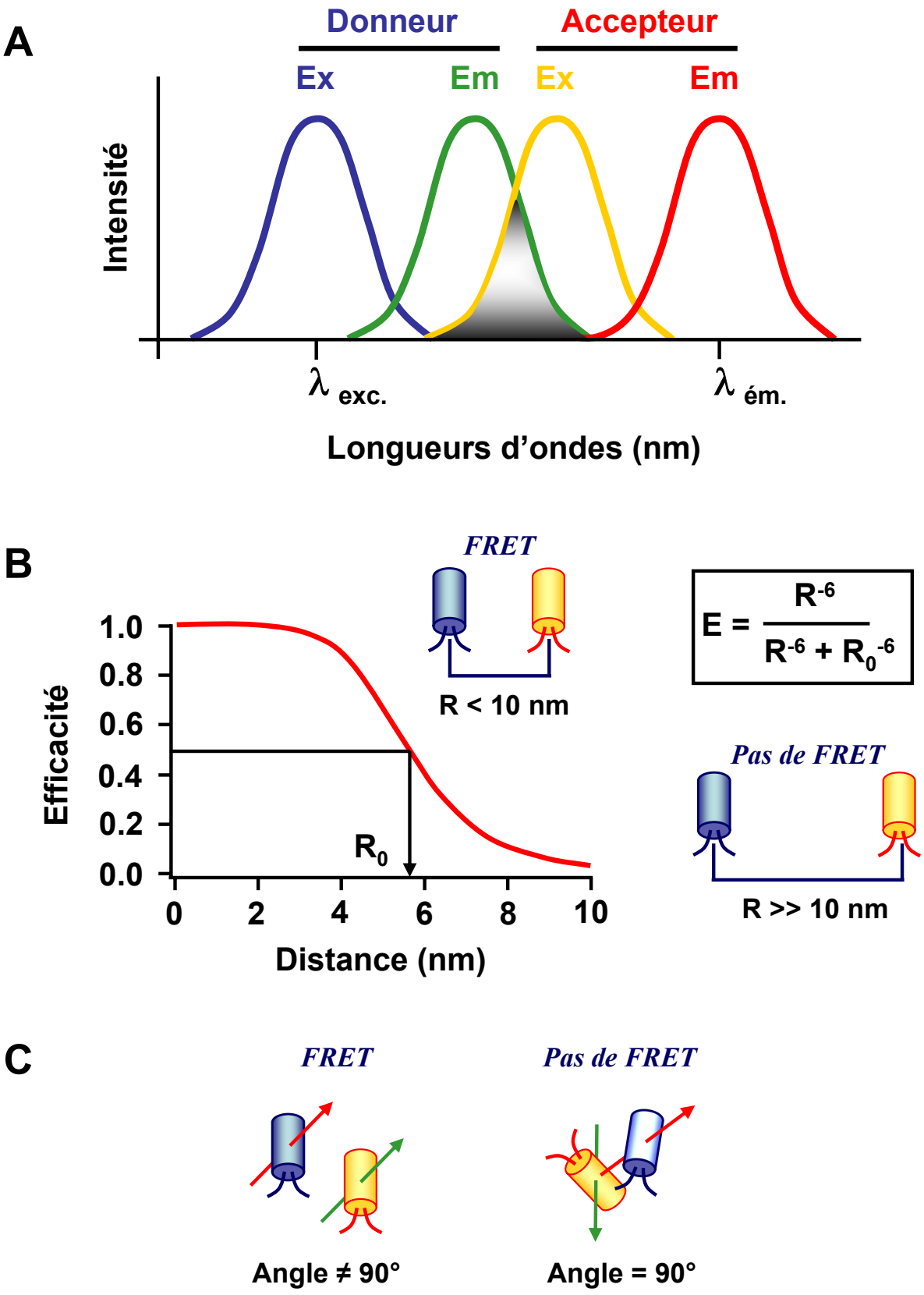


Figure III.1 : Conditions du FRET. A. Un FRET peut apparaître seulement si le spectre d'émission du donneur recouvre le spectre d'excitation de l'accepteur. Ce recouvrement est défini par une intégrale de recouvrement J. **B.** Un FRET est observé si la distance séparant les deux fluorophores est inférieure à 1.8 x le rayon de Förster (R_0). Ce dernier définit la distance donneur – accepteur pour laquelle l'efficacité du transfert d'énergie est de 50%. **C.** Importance de l'orientation relative des dipôles du donneur et de l'accepteur pour la mise en place d'un transfert d'énergie.

III-C) Transfert d'énergie de type Förster (FRET)

III-C.1) Conditions du transfert d'énergie

Le FRET, bien qu'observé par Perrin au début du XXième siècle, est décrit pour la première fois par Förster en 1946. Les applications de cette approche à l'étude des interactions protéiques apparaîtront vers la fin du XXème siècle (Selvin, 2000). D'après la théorie de Förster, le FRET est défini comme un transfert d'énergie non radiatif résultant d'une interaction dipôle – dipôle entre deux molécules (donneur et accepteur d'énergie) (Stryer, 1978). Ce phénomène physique nécessite une compatibilité énergétique entre ces molécules. Cela signifie que le spectre d'émission du donneur doit recouvrir, au moins partiellement, le spectre d'absorption de l'accepteur **(Figure III.1.A)**. Ce recouvrement des spectres est défini par une intégrale appelée intégrale de recouvrement J(λ) :

$$J = \frac{\int F_D(\lambda)\varepsilon_A(\lambda)\lambda^4 d\lambda}{\int F_D(\lambda)d(\lambda)}$$

où $F_D(\lambda)$ est l'intensité de la fluorescence émise par le donneur à une longueur d'onde donnée et $\varepsilon_A(\lambda)$ le coefficient d'extinction molaire de l'accepteur. Le facteur J reflète donc la capacité d'une paire de fluorophores à émettre et absorber de l'énergie à la même longueur d'onde.

En accord avec la théorie de Förster, le FRET est un processus qui dépend de la distance séparant les deux molécules, donneur et accepteur, comme le montre la formule suivante :

$$E = \frac{R^{-6}}{R^{-6} + R_0^{-6}}$$

où R est la distance effective qui sépare les deux molécules et R_0 le rayon de Förster. Ce dernier correspond à la distance donneur - accepteur pour laquelle l'efficacité du transfert d'énergie est de 50% **(Figure III.1.B)**. Cette distance, qui dépend de la nature des fluorophores utilisés, est généralement comprise entre 1 et 10 nm (Stryer and Haugland,

1967). Au-delà de cette gamme, l'efficacité du transfert d'énergie chute très rapidement. L'expression mathématique pour le calcul de cette distance s'écrit :

$$R_0 = \left(J \times 10^{-3} \times k^2 \times n^{-4} \times Q_D\right)^{1/6} \times 9730$$

où J est l'intégrale de recouvrement, n l'indice de réfraction du milieu (n^{-4} est généralement compris entre 1/3 et 1/5), Q_D le rendement quantique du donneur en absence d'accepteur et k^2 le facteur d'orientation qui est fonction de l'orientation relative des dipôles du donneur et de l'accepteur **(Figure III.1.C)**. Même si la valeur de k^2 est théoriquement comprise entre 0 et 4, 2/3 est la valeur habituellement utilisée pour déterminer le R_0. En effet, k^2 est assimilé à 2/3 lorsque le donneur et l'accepteur présentent un degré de liberté suffisant pour être aléatoirement orientés dans l'espace (Stryer, 1978). Cette condition est généralement satisfaite pour les fluorophores attachés à des biomolécules car ils peuvent avoir une certaine liberté de rotation (Dale et al., 1979).

III-C.2) Influence du FRET sur la durée de vie

Au même titre que les processus radiatifs et non radiatifs, le FRET contribue à dépeupler les niveaux excités du donneur. Ainsi, aux constantes de désactivation k_r et k_{nr} vient s'ajouter la constante k_t qui est caractéristique du transfert d'énergie. La durée de vie du donneur en présence d'un transfert d'énergie est donc sous la dépendance de ces trois constantes et peut s'écrire :

$$\tau_{DA} = \frac{1}{k_r + k_{nr} + k_t}$$

où τ_{DA} représente la durée de vie du donneur en présence d'accepteur, k_r la constante de désactivation radiative, k_{nr} la constante de désactivation non radiative et k_t la constante de transfert.

Ainsi, plus le FRET est efficace (k_t important), plus la durée de vie du donneur est courte. Ce lien entre efficacité du transfert et durée de vie est utilisé dans certaines technologies pour mettre en évidence des évènements de FRET.

III-C.3) Comment mettre en évidence le FRET ?

Le FRET mesure des intensités. Expérimentalement, ce signal peut être mesuré à l'aide d'un fluorimètre ou en microscopie. Dans un fluorimètre, le signal de FRET mesuré provient d'une population cellulaire disposée dans des puits de taille différente selon les microplaques utilisées. En revanche, les techniques microscopiques mesurent des évènements de transfert d'énergie à l'échelle subcellulaire. Quel que soit le type de détection choisi, la mesure d'un FRET entre deux fluorophores peut être effectuée de différentes manières.

La première consiste à quantifier les variations de l'intensité de fluorescence en mesurant la diminution de la fluorescence du donneur (Sokol et al., 1998), l'augmentation de celle de l'accepteur (Chan et al., 1979) ou en calculant un rapport que nous appelerons ratio (fluorescence d'émission de l'accepteur/fluorescence d'émission du donneur) (Miyawaki et al., 1997). Cette analyse est réalisable aussi bien en microplaque qu'en microscopie. La principale difficulté d'analyse de ces signaux vient du recouvrement pouvant exister entre les spectres d'excitation et d'émission des fluorophores utilisés. Ce manque de sélectivité spectrale est à l'origine d'un important bruit de fond avec comme conséquence une réduction de la sensibilité du test. Des couples de fluorophores tels que la fluorescéine/rhodamine ou les protéines CFP/YFP présentent ce type de limitation (Zheng et al., 2002). Cependant, le signal sur bruit du FRET peut être amélioré en s'affranchissant d'une partie des signaux parasites grâce à une lecture en temps résolu. Ceci est possible en TR-FRET (Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer) grâce à l'utilisation de fluorophores à durée de vie longue tels que les chélates ou cryptates de terre rare (cf. chapitre III-D.3). A ce jour, le TR-FRET est appliqué uniquement dans des formats microplaques.

D'autres méthodes permettent de déterminer indirectement l'existence d'un FRET par photoblanchiment (pbFRET). Le photoblanchiment est une méthode qui consiste à éteindre un fluorophore par une exposition prolongée à une source lumineuse. La mise en œuvre de cette approche est préférable en microscopie confocale car il est ainsi possible d'obtenir une

bonne résolution spatiale pour éteindre directement les fluorophores dans leur environnement cellulaire. Dans le cas du FRET par photoblanchiment (pbFRET), le photoblanchiment du fluorophore donneur entraîne une diminution de son intensité de fluorescence qui est mesurée en présence ou non d'accepteur. Lorsque l'accepteur est en étroite proximité avec le donneur, un FRET apparaît et entre en compétition avec le processus de photoblanchiment. Cette compétition se traduit par une augmentation de la résistance du donneur au photoblanchiment dont les constantes de temps mesurées (en présence ou non d'accepteur) permettent de mettre en évidence un transfert d'énergie (Rocheville et al., 2000). Une autre alternative au pbFRET du donneur est le pbFRET de l'accepteur. Les émissions de fluorescence du donneur et de l'accepteur sont mesurées avant et après photoblanchiment de l'accepteur. L'augmentation de la fluorescence du donneur après destruction de l'accepteur prouve l'existence d'un FRET entre les deux molécules (Gregan et al., 2004; He et al., 2003). Un des désavantages du pbFRET est qu'une mesure répétée du même échantillon n'est pas envisageable en raison de la destruction des fluorophores par l'excitation continue.

L'utilisation de la durée de vie de fluorescence du donneur est aussi une approche adaptée à la mesure des évènements de FRET. Cette méthode consiste à mesurer le déclin de fluorescence du donneur au cours du temps. Cela peut être réalisé aussi bien sur des populations de cellules au format microplaque, que par des techniques microscopiques. La base physique de cette approche repose sur le fait que la durée de vie d'une molécule fluorescente dépend notamment de l'efficacité du processus de FRET. Par conséquent, plus le transfert d'énergie entre les deux molécules est efficace plus le déclin de fluorescence du donneur est rapide. Le FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy) est un exemple de technologie basée sur l'analyse de durée de vie (Bastiaens and Squire, 1999). Il est préférable avec ce type d'approche d'utiliser des molécules fluorescentes dont le déclin de fluorescence est monoexponentiel. La CFP par exemple est utilisée en FLIM en dépit de certains désavantages dus à son faible rendement quantique, son faible coefficient d'extinction molaire et surtout à son déclin de fluorescence qui présente deux exponentielles (Tramier et al., 2002). Ainsi, afin de faciliter l'analyse des durées de vie en FLIM des mutations de cette protéine ont permis de générer un variant nommé Cerulean plus lumineux que la CFP et présentant une décroissance monoexponentielle (Rizzo et al., 2004).

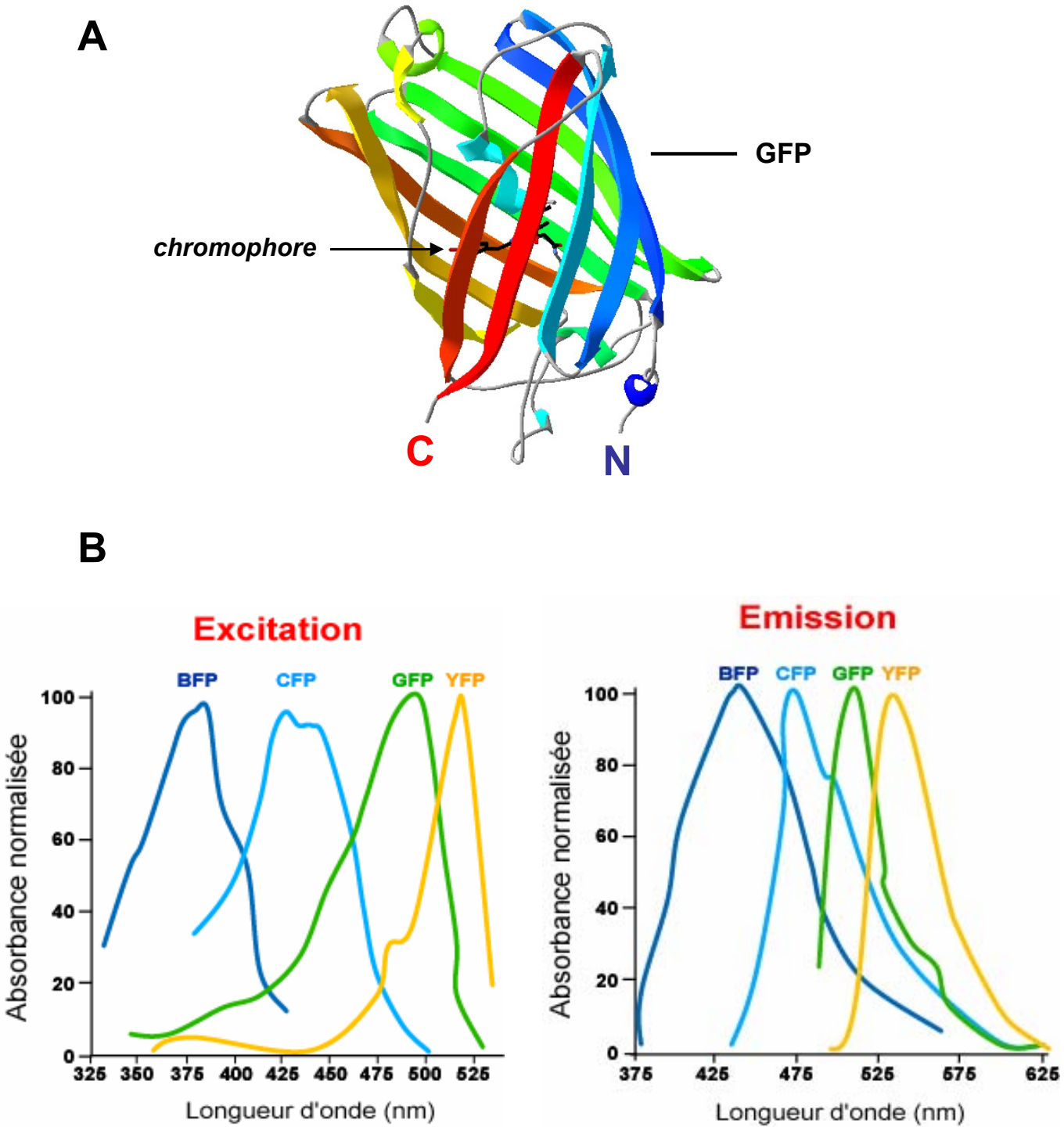


Figure III.2 : **Les protéines GFP. A.** Structure cristallographique de la GFP (code pdb : 1EMB). **B.** Spectres d'excitation et d'émission des variants de la GFP.

II-D) FRET et BRET : des techniques adaptées à l'étude des protéines

Les méthodes biophysiques, en palliant un certain nombre de contraintes liées à l'utilisation de techniques biochimiques, ont permis d'étudier les protéines directement dans leur environnement cellulaire. Qu'il s'agisse du FRET ou du BRET, ces technologies ont rendu possible non seulement l'étude des interactions protéiques mais aussi le suivi des changements conformationnels intervenant au cours des processus d'activation des protéines dans la cellule.

III-D.1) Utilisation de la GFP et de ses dérivés en FRET

L'innovation probablement la plus importante dans le domaine des fluorophores fut marquée par la découverte d'une protéine fluorescente pouvant être directement encodée à l'intérieur de la cellule. Il s'agit de la GFP (Green Fluorescent Protein). L'exploitation de la GFP et la génération de variants de cette protéine ont permis le développement de technologies de FRET parfaitement adaptées à l'étude de la dynamique des interactions moléculaires dans l'espace et dans le temps à l'intérieur de cellules vivantes.

Initialement identifié chez la méduse *Aequorea Victoria*, le gène codant pour la GFP a été cloné en 1992 par Prasher et coll. Cristallisée pour la première fois en 1974, il faudra attendre 1996 pour obtenir la structure tridimensionnelle de la GFP par diffraction de rayons X (Ormo et al., 1996). Cette protéine de 27 kDa se présente sous forme d'un cylindre de 30 Å de diamètre et 40 Å de hauteur composé de onze feuillets β (9 à 13 résidus par feuillet) qui entourent une hélice α contenant le chromophore **(Figure III.2.A)**. Le chromophore résulte d'une réaction spontanée de cyclisation des chaînes latérales de trois acides aminés (Sérine^{65} – Tyrosine^{66} – Glycine^{67}) à l'intérieur du tonneau. L'organisation des feuillets β, en formant une véritable cage, confère au chromophore son propre environnement (Ward, 2006).

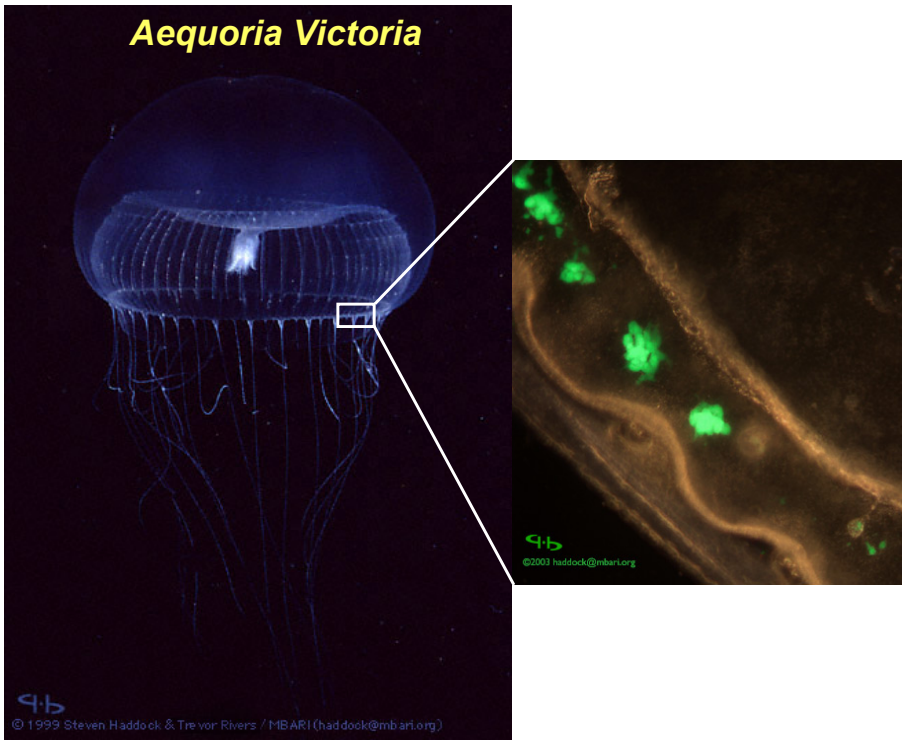
La photoactivation de cette protéine dont le pic d'absorption majoritaire est à 395 nm entraîne une réaction autocatalytique provoquant l'émission d'une lumière verte avec un pic d'émission à 508 nm. Différentes protéines mutantes de la GFP ont été produites. En changeant, entre autres, la structure des trois acides aminés formant le chromophore, il a été

possible de modifier les longueurs d'onde d'absorption et d'émission de la GFP devenant alors, une BFP, une YFP ou de nombreux autres variants bien caractérisés (CFP, RFP…) **(Figure III.2.B)**. L'utilisation de ces différents mutants comme sondes moléculaires en font des outils de choix aussi bien dans l'étude de l'expression de gènes, le suivi de protéines et leur compartimentalisation cellulaire que dans l'analyse des interactions protéine – protéine par des approches de transfert d'énergie. Concernant ce dernier point, deux paires de fluorophores ont été largement utilisées. Ces molécules BFP/GFP et CFP/YFP dérivées de la GFP présentent en effet des propriétés photophysiques compatibles avec la mise en place d'un transfert d'énergie.

Le point fort de cette technologie réside dans l'encodage des protéines fluorescentes. Il est donc possible de suivre en microscopie la localisation cellulaire des protéines avec une bonne résolution spatiale. De plus, grâce à la forte intensité de fluorescence des molécules utilisées, les phénomènes de transfert d'énergie peuvent être visualisés directement dans la cellule permettant de définir à la fois la nature des protéines en interactions, la dynamique de ces phénomènes et leur localisation cellulaire.

Dans le domaine des RCPG cette approche a été beaucoup utilisée pour caractériser la dimérisation des récepteurs. La fusion des GFP au niveau de la région carboxy-terminale des récepteurs a permis d'analyser leur organisation sans pour autant altérer leur structure, fonction ou localisation dans les travaux publiés. Le principal inconvénient de cette approche pour l'étude de la dimérisation vient de la nécessité de passer par la microscopie confocale. En effet, en microscopie classique par épifluorescence ou dans un fluorimètre il n'est pas possible de séparer le signal provenant des récepteurs de surface de celui des récepteurs retenus dans les compartiments intracellulaires. De plus, la difficulté de miniaturisation de cette approche en microplaque ne permet pas d'étendre ce type d'analyse à du moyen ou haut débit.

A



B

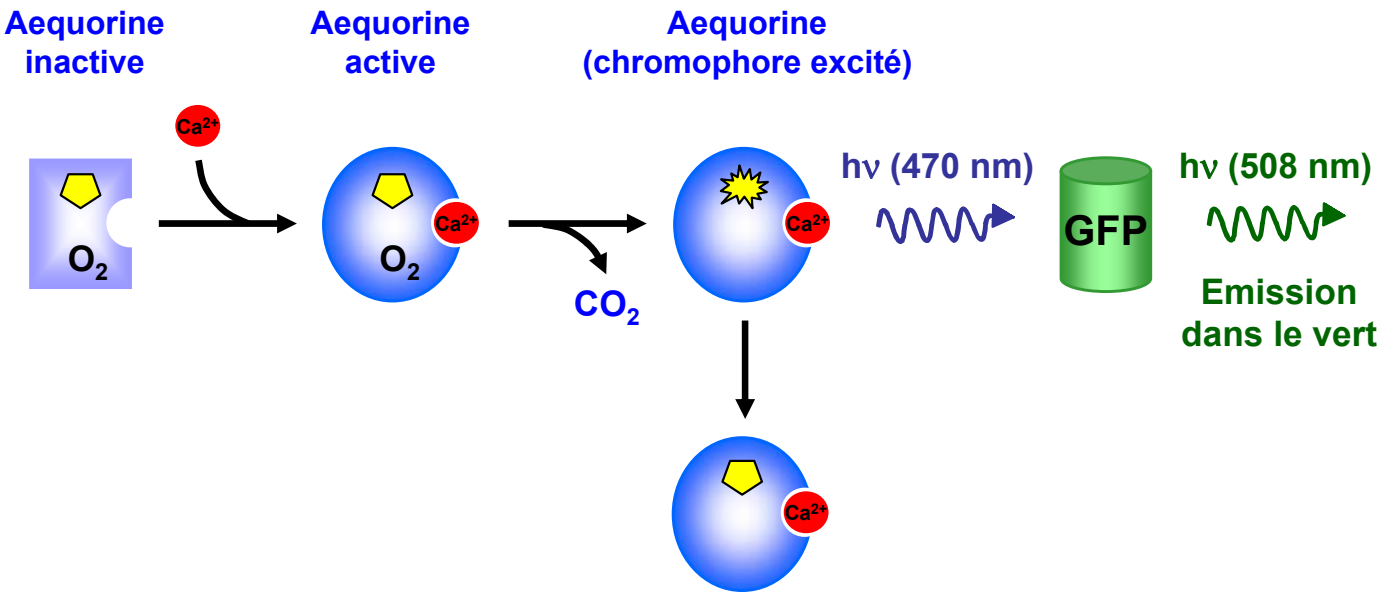


Figure III.3 : La bioluminescence naturelle d'Aequoria Victoria. A. La méduse Aequoria Victoria est un organisme marin chez lequel le transfert d'énergie est naturel. **B.** Mécanisme de production de lumière par le système Aequorine - GFP.

III-D.2) BRET : un phénomène naturel

III-D.2.a) La bioluminescence chez *Aequoria Victoria* et chez *Renilla Reniformis*

Dans les années 60, le Dr. Shimomura mit en évidence un phénomène de bioluminescence existant chez un organisme marin, la méduse *Aequoria Victoria* **(Figure III.3.A)**. Quelques années plus tard l'extraction et la purification d'une protéine bioluminescente, appelée aequorine, permit de démontrer son rôle dans la luminescence naturelle de cet organisme. L'aequorine s'est révélée être par la suite un complexe moléculaire formé d'une protéine de 21 kDa ou apo-aequorine possédant trois sites de haute affinité pour le calcium, d'oxygène moléculaire et d'un chromophore, la coelenterazine **(Figure III.3.B)**. Lorsque trois ions calcium se lient à l'apo-aequorine, il se produit un changement conformationnel permettant l'oxydation de la coelenterazine en coelenteramide qui se trouve alors dans un état excité. Le complexe ainsi formé est aussi appelé : blue fluorescent protein. En effet, i*n vitro*, la réaction se termine par la libération d'une molécule de CO_2 et l'émission d'une lumière bleue avec un pic à 469 nm (Shimomura and Johnson, 1969). Cependant, *in vivo*, la bioluminescence de certaines cellules de la méduse n'est pas de couleur bleue mais verte **(Figure III.3.A)**. En 1974 fut établie l'existence d'un transfert d'énergie de l'aequorine vers une protéine isolée à partir du même organisme, la GFP. L'excitation de la GFP par l'aequorine au cours du transfert d'énergie est responsable d'une émission dans le vert avec un pic à 510 nm (Morise et al., 1974).

Par la suite d'autres organismes présentant des mécanismes de bioluminescence semblables ont été identifiés. Parmi ces organismes, *Renilla Reniformis* (pensée de mer) possède une enzyme de 36 kDa, la Renilla luciférase, qui catalyse l'oxydation de la coelentérazine (luciférine) en présence d'oxygène mais sans nécessité d'un cofacteur (calcium). *In vitro*, cette réaction catalytique produit une lumière bleue avec un pic d'émission à 480 nm (Matthews et al., 1977; Wampler et al., 1971). Comme pour l'aequorine, la présence d'une GFP chez *Renilla Reniformis* permet un transfert d'énergie qui se traduit par une émission dans le vert à 510 nm.

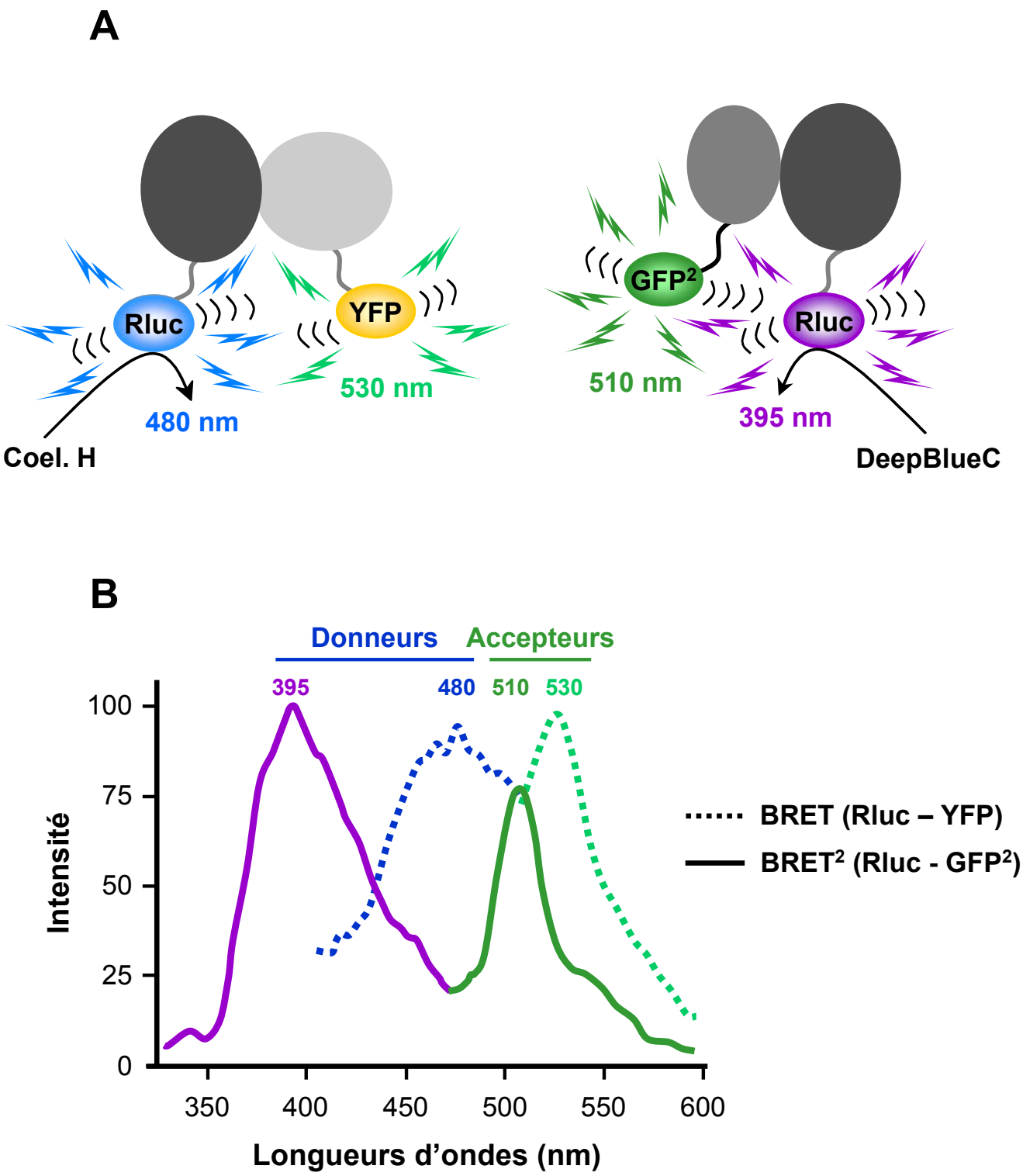


Figure III.4 : La technologie BRET. A. En fonction du type de substrat dégradé, la Rluc (Renilla Luciférase) émet dans le bleu à 480 nm (Coelenterazine H, BRET¹) ou à 395 nm (DeepBlueC, BRET²). La YFP (BRET¹) est excitée à 480 nm et émet à 530 nm alors que la GFP² (BRET²) absorbe à 395 nm et émet à 510 nm. **B.** Spectres d'émission du donneur et de l'accepteur en BRET¹ et en BRET².

III-D.2.b) Utilisation du BRET en biologie

L'identification puis le clonage des protéines impliquées dans un processus naturel de BRET (cf. ci-dessus) ont permis d'adapter ce système à l'étude des protéines en cellules vivantes. La particularité du BRET vient de la nature du donneur. En effet, il s'agit d'une molécule luminescente, la coelenterazine, dont l'excitation est déclenchée par une enzyme, la *Renilla Luciferase* (Rluc). Comme pour le FRET, l'accepteur du BRET peut être une protéine fluorescente comme la GFP ou la YFP. Pour l'instant, le BRET est limité à des applications au format fluorimètre. En effet, l'analyse microscopique du signal de BRET est rendue difficile par la faible intensité d'émission de la Rluc.

Le BRET est un processus qui dépend entre autres, de la distance séparant le donneur de l'accepteur. Ainsi, lorsque la Rluc et la YFP se trouvent à proximité (d < 10 nm), un transfert d'énergie peut avoir lieu entre les deux molécules avec l'émission d'une fluorescence caractéristique à 530 nm **(Figure III.4)**. L'excellente compatibilité de ces deux molécules en fait un couple très utilisé pour l'étude des interactions protéiques. Pour cela, les protéines d'intérêt sont fusionnées à la Rluc ou la YFP avant d'être exprimées dans la cellule. En absence de toute interaction, l'ajout de coelenterazine sur des cellules co-exprimant les deux protéines recombinantes se traduit par un spectre d'émission avec un pic centré à 480 nm. Toutefois, si les deux protéines sont en interaction un deuxième pic caractéristique du BRET apparaît aux environs de 530 nm. Ce pic correspond à l'émission de la YFP excitée par le transfert d'énergie provenant de la réaction enzymatique.

Expérimentalement, le BRET est déterminé ratiométriquement en divisant l'émission de l'accepteur à 530 nm par l'émission du donneur à 480 nm. Ce mode ratiométrique permet d'éliminer les variations de signal dues à des fluctuations de la lumière émise (interférences optiques des milieux, variations du nombre de cellules, volume de l'essai…). De plus, l'utilisation d'une enzyme pour exciter le donneur luminescent (coelenterazine) permet de s'affranchir d'une source excitatrice extérieure évitant ainsi les problèmes de photoblanchiment des GFP, d'effet de filtre des milieux à la longueur d'onde d'excitation du donneur ou encore de l'excitation croisée de l'accepteur. Enfin, les taux d'expression relatifs des molécules peuvent être quantifiés séparément en mesurant la luminescence du donneur à 480 nm et la fluorescence de l'accepteur à 530 nm.

Cependant, comme pour le FRET, le signal sur bruit d'un essai en BRET est significativement affecté par le recouvrement des spectres d'émission du substrat de la Rluc et de la YFP. Pour cette raison, une version améliorée du BRET, nommée $BRET^2$ a été développée (Bertrand et al., 2002; Jensen et al., 2002; Vrecl et al., 2004). Dans cette version, un analogue de la coelenterazine, le DeepBlueC, est utilisé comme substrat de la Rluc **(Figure III.4)**. Ce substrat se caractérise par une émission de fluorescence significativement décalée de 480 à 400 nm. Un accepteur nommé GFP^2 a été spécialement développé afin de présenter un pic d'excitation à 400 nm et un pic d'émission à 510 nm. Ainsi, la résolution spectrale du $BRET^2$ est significativement améliorée par rapport au BRET classique avec une séparation presque complète des spectres d'émission (déplacement de Stokes de 115 nm en $BRET^2$ et de 50 nm en BRET standard). Le rapport déterminé dans le $BRET^2$ (510 nm / 400 nm) présente par conséquent un bruit de fond négligeable. Néanmoins, l'utilisation du DeepBlueC comme substrat de la Rluc donne un rendement quantique beaucoup plus faible que celui de la coelenterazine. La nécessité d'avoir un lecteur sensible pour le $BRET^2$ est une limite à l'utilisation de cette technologie.

L'approche BRET a été particulièrement utilisée pour analyser l'oligomérisation et l'activation des RCPG. Plus sensible que le FRET CFP/YFP et adaptable au format microplaque, le BRET est un outil de choix pour l'étude des protéines en cellules vivantes. Toutefois, comme pour le FRET, cette technologie ne permet pas de discriminer aisément le signal de BRET provenant des interactions entre les protéines de surface du signal provenant des protéines retenues dans les compartiments intracellulaires.

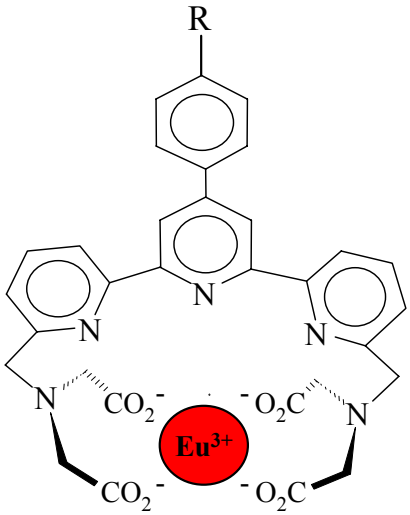
III-D.3) Le FRET en temps résolu (technologie HTRF)

III-D.3.a) Généralités

La principale limite du FRET est liée au manque de sélectivité spectrale des fluorophores utilisés ainsi qu'à la difficulté de s'affranchir des signaux parasites (bruit de fond). Ceci a des conséquences sur la sensibilité des tests mis en œuvre. Ainsi, l'utilisation de traceurs présentant des propriétés originales de luminescence a permis de mettre au point des tests plus sensibles en améliorant la résolution spectrale et temporelle du signal de FRET. Ces molécules sont des complexes formés par l'association d'un chromophore (cryptand ou

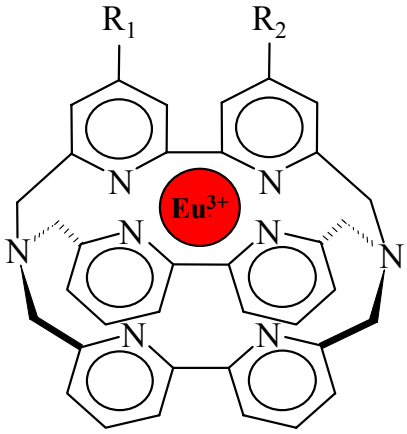
A

Les chélates de terre rare



Terre rare en interaction avec le chélatant

Les cryptates de terre rare



Terre rare incluse dans une structure tridimensionnelle (cryptand)

B

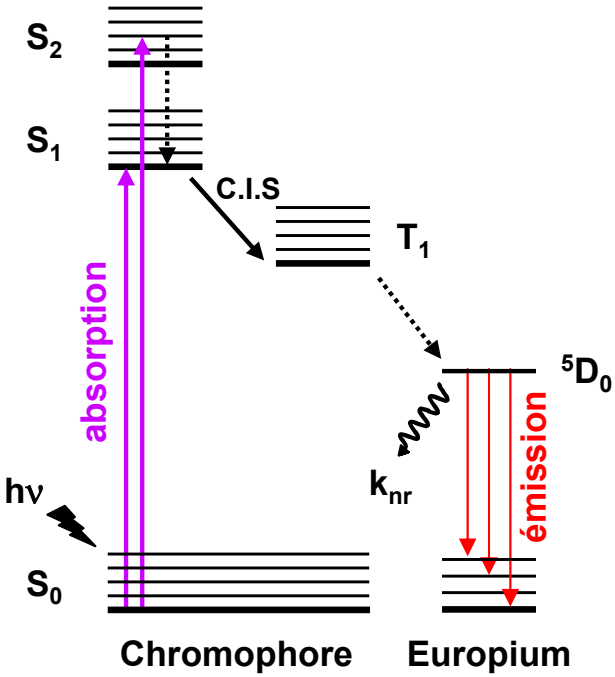


Figure III.5 : Les chélates et cryptates de terre rare. A. Structure des chélates et cryptates de terre rare. **B.** Transfert d'énergie entre le chromophore (chélate ou cryptate) et l'ion europium. C.I.S = croisement intersystème.

chélate) et d'un cation lanthanide faisant parti du groupe des terres rares (europium, terbium…). La principale caractéristique des lanthanides vient de leur durée de vie de luminescence relativement longue (de l'ordre de la milliseconde). Il est important de rappeler que la durée de vie de fluorescence de la plupart des fluorophores organiques et des protéines fluorescentes est de l'ordre de la nanoseconde tout comme les fluorescences parasites (autofluorescence, diffraction de la lumière…). Grâce à cette propriété des ions lanthanides, les systèmes de détection de fluorescence en phase homogène et en temps résolu ont pu être développés. Ces systèmes reposent sur l'application d'un délai entre l'excitation de l'échantillon et la mesure du signal émis de manière à s'affranchir des fluorescences parasites à durée de vie courte. Cette résolution temporelle du signal permet ainsi d'améliorer le rapport entre le signal du traceur et le bruit de fond inhérent aux conditions du test sans qu'aucune étape de séparation des espèces ne soit nécessaire. Cette partie sera plus détaillée que les précédentes car la technologie HTRF est une méthode largement utilisée dans mon travail de thèse.

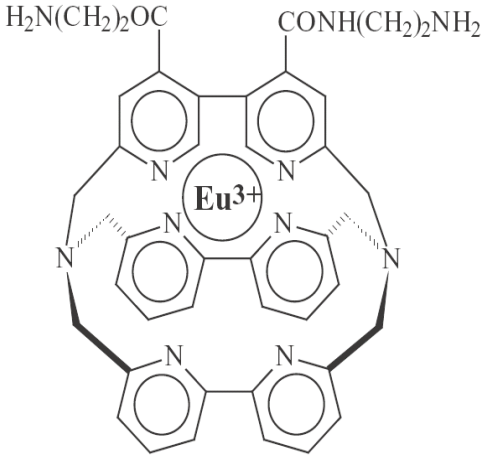
III-D.3.b) Les fluorophores

- Le donneur

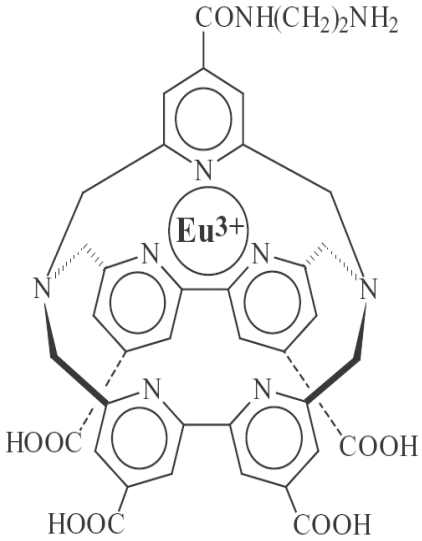
Au cours des années 1970, les complexes luminescents de lanthanide se sont révélés des candidats intéressants comme marqueurs dans le développement de systèmes d'analyse et de diagnostic. En effet, l'utilisation des chélates et cryptates de terre rare a permis de mettre au point des systèmes de détection en temps résolu caractérisés par une réduction du bruit de fond. Chacune de ces sondes est constituée d'un chromophore organique et d'une terre rare (principalement europium et terbium). La complexation de l'ion par le chélate est basée sur une interaction réversible alors que dans la structure du cryptate, le cryptand encage irréversiblement l'ion en le protégeant des interactions environnementales (extinction de fluorescence par les molécules d'eau…) **(Figure III.5.A)**. La présence de groupements réactifs au niveau du chromophore permet de greffer le complexe à des biomolécules (anticorps, antigènes…). Une propriété intéressante de ces chromophores est leur capacité à collecter l'énergie excitatrice (effet d'antenne) et à la transférer sur le cation lanthanide. L'antenne est nécessaire du fait de la faible capacité d'absorption de la lumière par les lanthanides qui rend leur excitation directe difficile (< fluorophores organiques conventionnels). Ainsi, l'excitation du complexe de lanthanide par une lumière incidente (laser, lampe flash…) contribue à peupler les niveaux vibrationnels singulets de haute énergie

A

Cryptate d'europium
Trisbipyridine
(TBP)



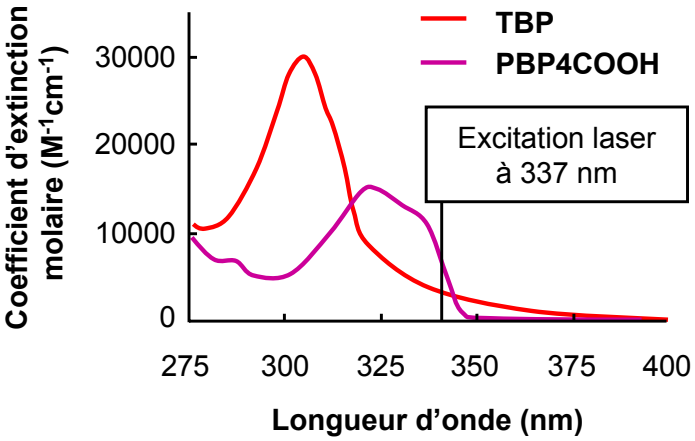
Cryptate d'europium
Pyridine Bipyridine Tetracarboxylate
(PBP)



Pas besoin de KF

B

Spectres d'absorption



Spectres d'émission

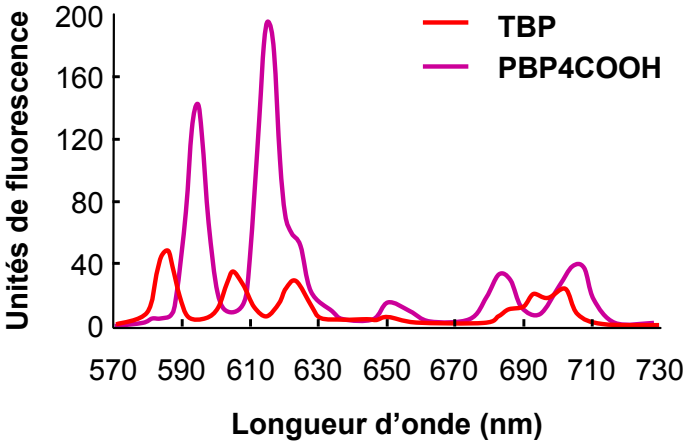


Figure III.6 : Structure et spectres des cryptates d'europium. A. Structure des cryptates d'europium TBP et PBP4COOH. **B.** Spectres d'absorption et d'émission du TBP et PBP4COOH.

du chromophore (transition $S_0 \rightarrow S_1$, S_2) **(Figure III.5.B)**. Le retour vers l'état fondamental S_0 est influencé par la présence du lanthanide qui favorise le croisement intersystème permettant de peupler les états triplets (T_1) du chromophore. Finalement, le passage $T_1 \rightarrow S_0$ induit un transfert d'énergie favorisant le remplissage des niveaux excités du lanthanide ($^5D_0$ pour l'europium et $^5D_4$ pour le terbium) dont la composante de désexcitation par voie radiative est responsable de l'émission luminescente.

Le transfert d'énergie intramoléculaire existant au sein de ces complexes est responsable du grand déplacement de Stokes (de l'ordre de 200 – 250 nm) qui permet de s'affranchir de l'interférence due à la source d'excitation. Ce décalage est la conséquence de la séparation des fonctions absorption (par le chromophore) et émission (par la terre rare) au sein du complexe. Ainsi, les chromophores organiques (chélate, cryptate) absorbent majoritairement dans l'UV et la partie bleue du spectre visible alors que les terres rares réémettent dans le vert – rouge : 560 nm pour le terbium et 605 nm pour l'europium. La longue durée de vie de cette émission (µs → ms) est principalement la conséquence des transitions électroniques particulières qui interviennent au niveau des terres rares. Cette caractéristique permet d'ailleurs l'utilisation de ces molécules dans des applications en temps résolu.

Dans les milieux biologiques classiquement utilisés, le complexe formé par le chélate et le lanthanide peut être dissocié en raison d'une faible stabilité de l'interaction (compétition entre l'ion lanthanide et les ions Mn^{2+}, Mg^{2+}, Ca^{2+} ou chélation du lanthanide par de l'EDTA), ce qui constitue un inconvénient majeur. Dans le cas des cryptates de terre rare l'inclusion de l'europium dans une cage tridimensionnelle formée par le cryptand empêche ces phénomènes de dissociation conférant au complexe une très haute stabilité.

Les cryptates de terre rare sont les donneurs d'énergie utilisés dans la technologie HTRF (Homogeneous Time Resolved Fluorescence). La mise au point de leur structure découle des travaux de J.M Lehn, prix Nobel de chimie en 1987. Plusieurs types de cryptate d'europium ont été développés par la société CisBio International (CBI) mais deux retiendront particulièrement notre attention **(Figure III.6)**.

Le TBP (Trisbipyridine Europium cryptate) est un cryptate qui, en présence d'ions fluorures (KF, 400mM), résiste à la désactivation non radiative de l'europium par les molécules d'eau et les « quenchers » présents dans le milieu (solvant, cations divalents,

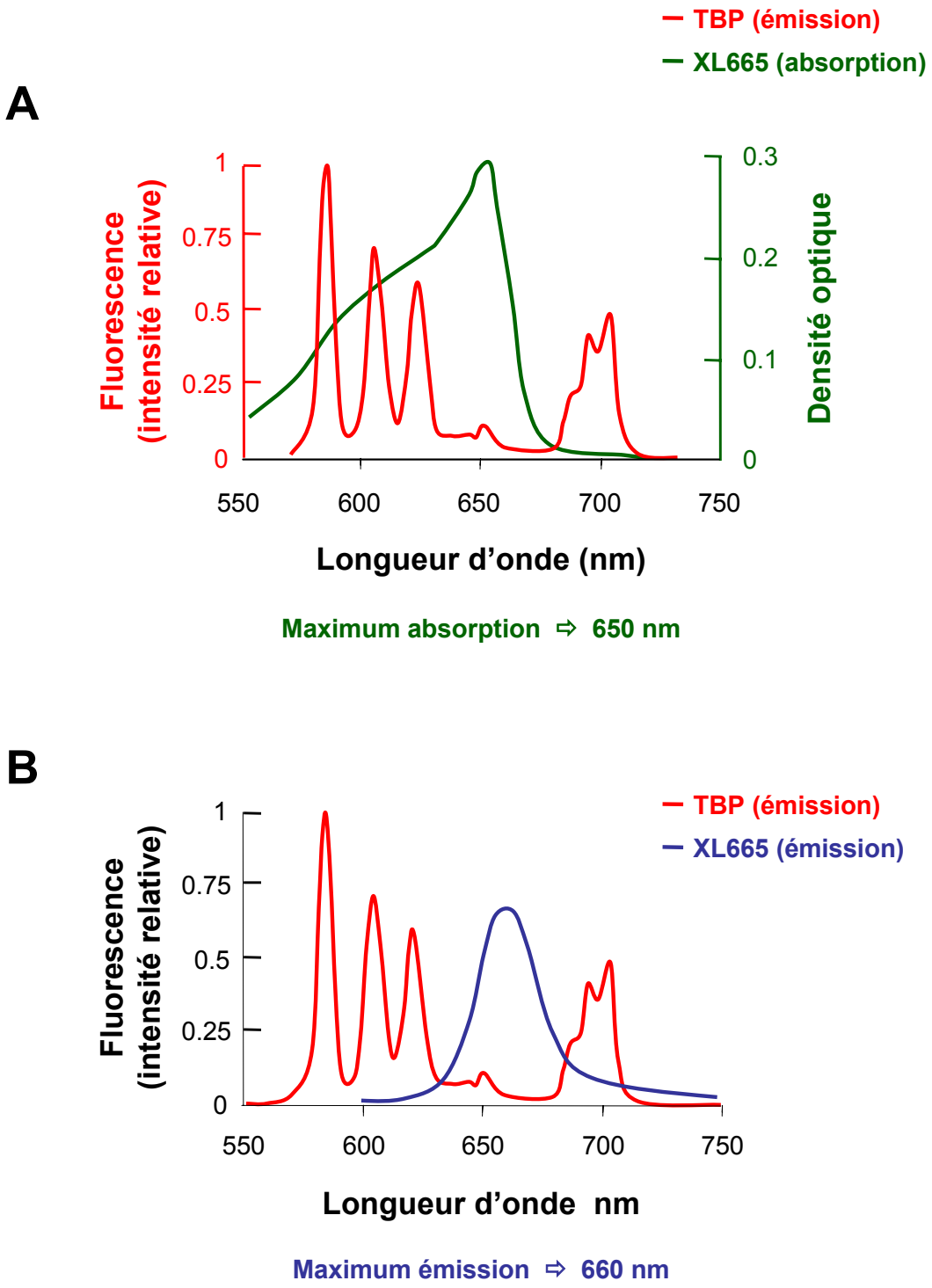


Figure III.7 : Spectres d'absorption et d'émission de la XL665. A. Compatibilité énergétique entre le cryptate d'europium TBP et la XL665 (idem d2, Cy5…). **B.** Spectres d'émission du cryptate d'europium TBP et de la XL665.

chélatants…) (Mathis, 1995). Toutefois, pour des applications cellulaires, les ions fluorures utilisés à de telles concentrations présentent une importante toxicité pour la cellule.

Pour cette raison, un deuxième cryptate, le PBP4COOH (Pyridine Bipyridine Tetracarboxylate Europium Cryptate) a été synthétisé. Cette molécule possède les mêmes avantages que le TBP mais ne nécessite pas l'utilisation des ions fluorures. En effet, la structure de sa cage (plus petite que celle du TBP) empêche la réduction de la forme Eu^{3+} en Eu^{2+}. La possibilité de ne pas utiliser le KF fait de ce cryptate un fluorophore idéal pour des tests cellulaires.

- L'accepteur

Deux accepteurs dont les propriétés spectrales sont compatibles avec celles des cryptates d'europium ont été élaborés.

Le premier accepteur développé pour des tests HTRF est une phycobiliprotéine de 105 kDa, l'allophycocyanine purifiée et modifiée chimiquement (XL665) (Mathis, 1993; Trinquet et al., 2001). Cette molécule présente une très bonne compatibilité énergétique avec le cryptate ce qui permet une importante efficacité de transfert (Bazin et al., 2002) **(Figure III.7)**. De plus, l'émission de la XL665 est maximale à 665 nm alors que l'émission du cryptate est très faible dans cette région. Enfin, cette molécule présente un bon rendement quantique (≈ 70%) et peut être couplée à diverses biomolécules par ses groupements amines.

La deuxième génération d'accepteurs est représentée par le d2, une petite molécule organique d'environ 1 kDa. Comme la XL665, le d2 est un accepteur fortement compatible avec le cryptate d'europium. D'autres molécules très semblables au d2 telles que l'AlexaFluor 647 ou le Cy5 sont aussi utilisables dans ce type de tests. La petite taille de ces molécules représente un avantage certain pour des tests biologiques en évitant notamment les problèmes d'encombrement stérique.

III-D.3.c) Transfert d'énergie : sélectivité temporelle et spectrale

La grande sensibilité de détection de la technologie HTRF est la conséquence de l'analyse du signal de FRET en temps résolu (sélectivité temporelle) et d'une bonne séparation des spectres d'émission des molécules donneur et accepteur (sélectivité spectrale).

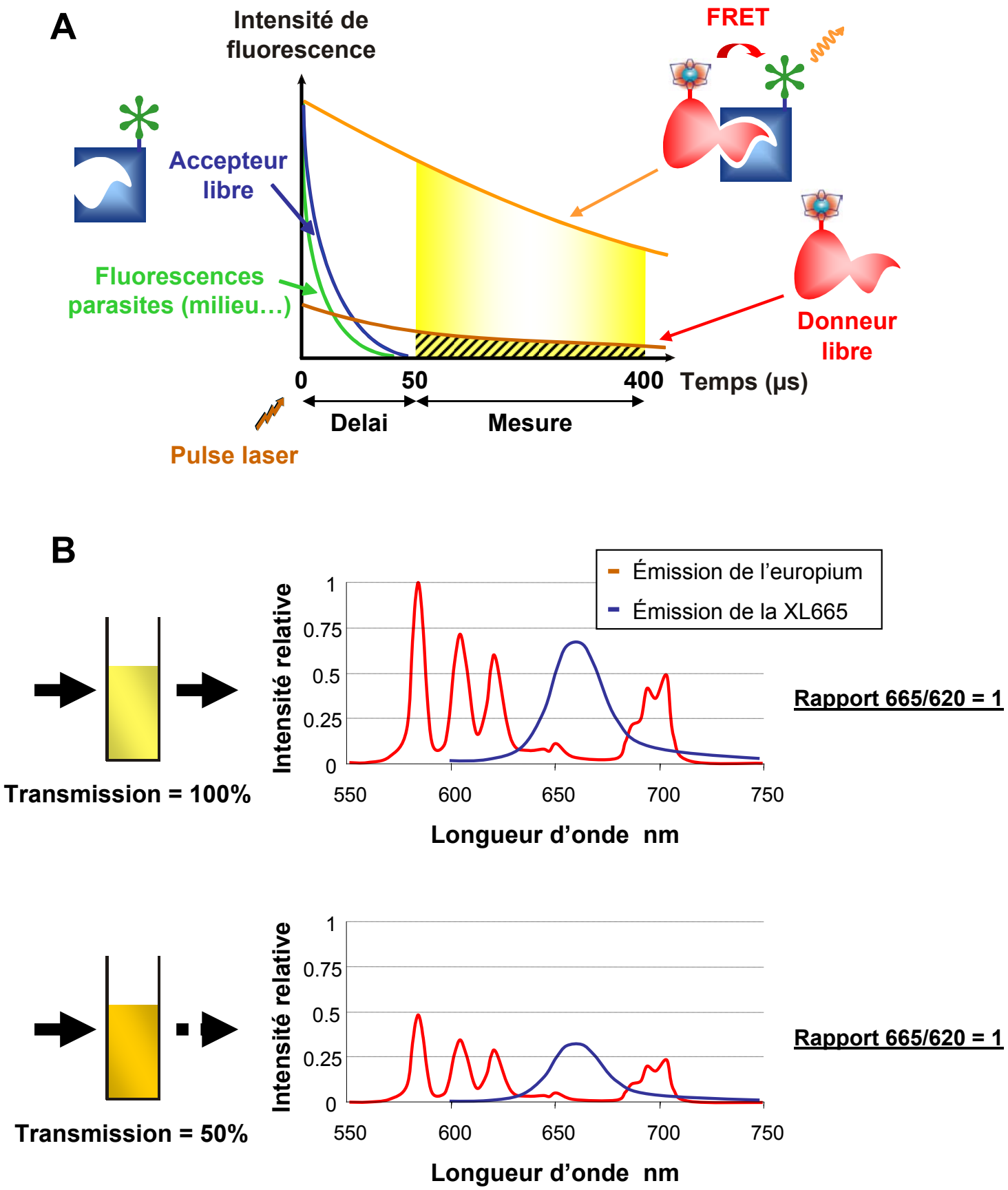


Figure III.8 : Sélectivité temporelle, sélectivité spectrale et détection à double longueur d'onde. A. Détection du signal de FRET à 665 nm en temps résolu. **B.** Spectres d'émission de l'europium (donneur) et de l'accepteur XL665 (ou d2). Le rapport 665/620 permet de s'affranchir des interférences optiques entre les différents milieux.

❖ *La sélectivité temporelle*

Lors d'un transfert d'énergie entre un donneur possédant une durée de vie de fluorescence longue et un accepteur fluorescent, ce dernier émettra un signal de fluorescence présentant une durée de vie apparente similaire à celle du donneur (Mathis, 1995; Morrison, 1988). Ainsi, l'utilisation des cryptates de terre rare permet de mesurer l'émission de fluorescence de l'accepteur en temps résolu (intégration du signal après un délai de 50µs pendant 350µs) **(Figure III.8.A)**. Cette propriété permet de distinguer la fluorescence de l'accepteur engagé dans un FRET (durée de vie longue) de la fluorescence de l'accepteur libre (durée de vie courte ~ ns) et des fluorescences parasites émises par les biomolécules présentes dans les milieux biologiques (~ ns).

❖ *La sélectivité spectrale*

La sélectivité spectrale est obtenue grâce à une bonne séparation entre le pic d'émission de l'accepteur et les pics d'émission du cryptate d'europium. En effet, l'accepteur (d2, XL665) émet dans une zone où le cryptate n'émet quasiment pas **(Figure III.8.B)**.

III-D.3.d) Détection à double longueur d'onde

Dans la technologie HTRF, l'émission de fluorescence de l'accepteur à 665 nm est normalisée par celle du cryptate à 620 nm. Les deux longueurs d'ondes sont mesurées simultanément. Le calcul du rapport des intensités de fluorescence à 665 et 620 nm permet de s'affranchir des variations optiques entre les différents milieux. Dès lors, la valeur de ce rapport ne dépendra que des interactions biologiques **(Figure III.8.B)**. La robustesse de ce signal permet par exemple d'analyser le FRET dans des milieux biologiques complexes (sérum, cellules…) ou de tester des librairies dont les composés peuvent présenter de fortes absorbances.

La sensibilité et la robustesse du signal HTRF font de cette technologie une approche parfaitement adaptée à l'étude des interactions entre biomolécules dans des systèmes de criblage à haut débit tel qu'il est pratiqué dans l'industrie pharmaceutique. Ainsi, une large variété de tests permettant de détecter de nombreux évènements biologiques a pu être développée. Parmi ces gammes de produits, CBI a mis au point une série de kits de dosage de

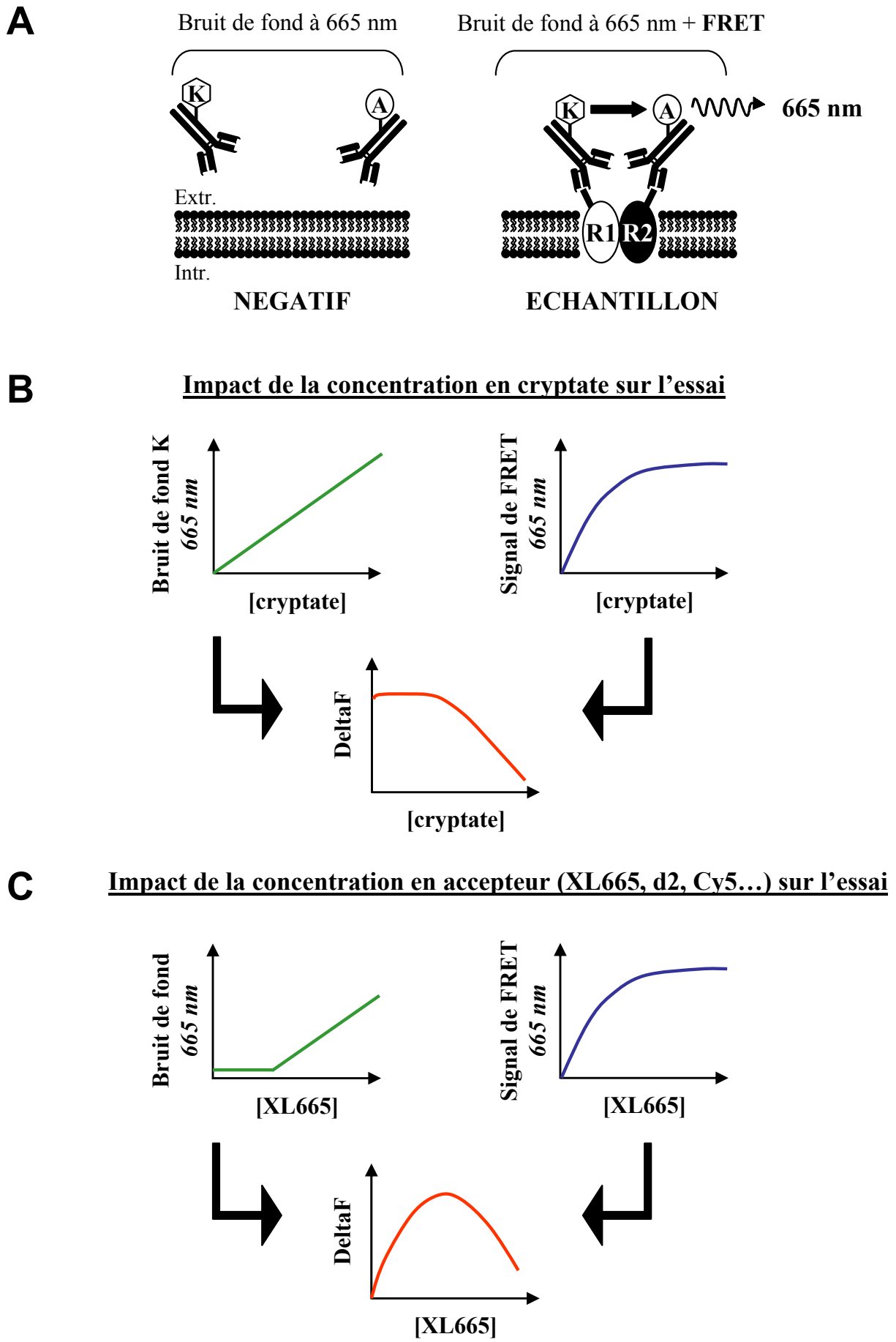


Figure VIII.9 : Impact de la concentration en fluorophores sur le signal HTRF

seconds messagers permettant de mesurer l'activation des protéines G_s, G_i et G_q couplées à des RCPG (Gabriel et al., 2003; Trinquet et al., 2006). Concernant l'étude de l'oligomérisation de ces récepteurs, les réactifs CBI (anticorps conjugués à des fluorophores) semblent tout à fait adaptés à la détection d'interactions protéiques à la surface de cellules vivantes. La mise au point d'un tel système de détection a constitué la première partie de mon travail de thèse.

III-D.3.e) Expression du signal HTRF

Dans cette partie, les formules utilisées pour exprimer les signaux mesurés en HTRF ont été détaillées.

Exemple de table d'analyse :

	665 nm A	**620 nm B**	**Ratio**	**Delta R**	**Delta F**
Négatif	2228	48765	**457** *(A/B)x10⁴*		
Echantillon	22695	44978	**5046**	**4589**	**1004 %**

Δ

/ R(-)

Négatif : cellules Mock + anticorps-cryptate + anticorps-XL665 **(Figure VIII.9.A)**.
Echantillon : cellules exprimant les partenaires d'interaction + anticorps-cryptate + anticorps-XL665.

Calcul du Delta Ratio (DeltaR) :

$$\text{DeltaR} = [\text{Ratio}(665/620)_{\text{échantillon}} - \text{Ratio}(665/620)_{\text{négatif}}]$$

Cette valeur exprime le signal de l'essai normalisé par unité de cryptate. Elle est dépendante de l'appareillage.

<u>Le DeltaF est obtenu par la formule suivante</u> :

$$DeltaF = [DeltaR \times 100]/Ratio_{négatif}$$

Le DeltaF tient compte à la fois du signal spécifique et du bruit de fond de l'essai. Il représente le signal sur bruit. La valeur obtenue, que l'on exprime en pourcentage, est indépendante de l'appareillage.

III-E) Utilisation des techniques de transfert d'énergie en biologie cellulaire

Toutes les approches basées sur un transfert d'énergie de type Förster nécessitent la fusion, le greffage ou le ciblage de molécules fluorescentes au niveau des protéines d'intérêt. Comme nous l'avons déjà évoqué, ces molécules fluorescentes sont choisies par paires (un donneur et un accepteur) et doivent répondre à un certain nombre d'exigences. Ainsi, lorsque deux protéines d'intérêt sont co-exprimées dans la même cellule, il ne s'établit un transfert d'énergie entre les deux fluorophores que si la distance qui les sépare et leur orientation respective sont favorables (voir chapitre III-C.3). Ces conditions remplies, un transfert d'énergie intermoléculaire peut être mesuré. Il est représentatif de l'association des deux protéines dans la cellule. Pour mesurer des changements conformationnels les deux fluorophores doivent être portés par la même protéine. Le transfert d'énergie est alors intramoléculaire. Il est essentiel dans ce cas précis de bien choisir les sites d'insertion des fluorophores. En effet, la distance séparant le donneur de l'accepteur doit être suffisamment affectée par les changements conformationnels de la protéine pour induire des variations dans l'efficacité du transfert d'énergie.

III-E.1) Transfert d'énergie intermoléculaire

Les techniques de transfert d'énergie, FRET (variants de la GFP, anticorps marqués…) ou BRET, ont été beaucoup utilisées pour démontrer des interactions protéines – protéines aussi bien à l'intérieur de la cellule qu'à la surface cellulaire. Quelle que soit la méthode choisie, cette démonstration repose sur la détection d'un signal caractéristique reflétant la forte proximité, si ce n'est l'association, des protéines cibles. Dans le domaine des RCPG, ces approches ont révélé l'existence de récepteurs membranaires homo- ou hétérodimériques et

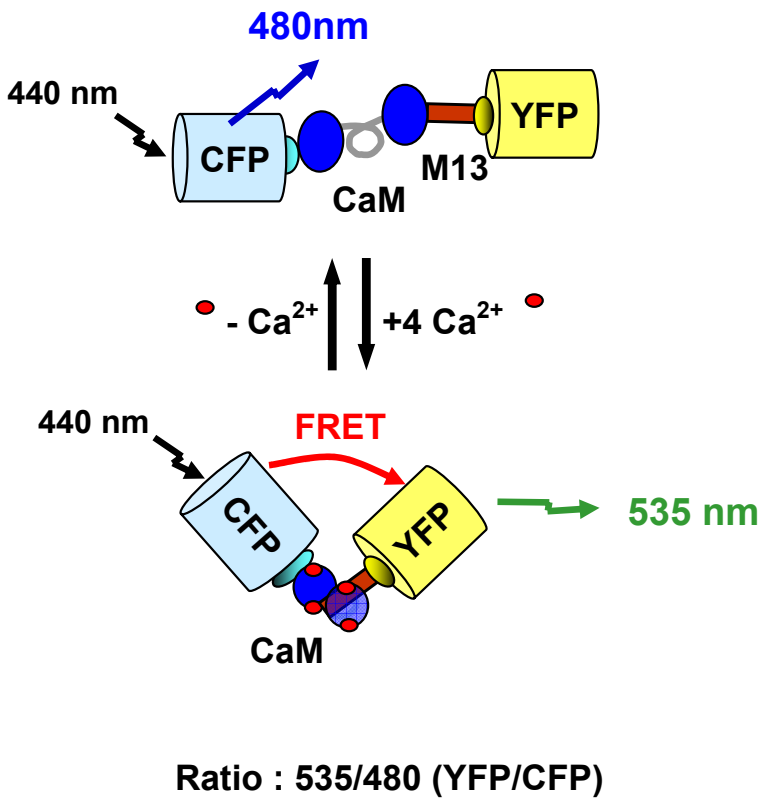


Figure III.10 : Transfert d'énergie intramoléculaire : sonde calcique (d'après Miyawaki et al., 1997).

ont contribué à mieux comprendre les mécanismes intervenant au cours de l'activation des protéines G (cf. chapitres II-B.3 et I-C.2). Elles ont aussi permis de développer, entre autres, des sondes sensibles à des seconds messagers comme par exemple l'AMPc (Zaccolo et al., 2000). En effet, l'AMPc en se fixant au niveau des sous-unités catalytiques et régulatrices de la PKA, entraîne une dissociation de ce complexe. Ainsi, en fusionnant les fluorophores au niveau des différentes sous-unités, il est possible de corréler directement la production d'AMPc intracellulaire à une diminution du signal de FRET.

III-E.2) Transfert d'énergie intramoléculaire (changements conformationnels)

Les techniques de transfert d'énergie sont des approches suffisamment sensibles pour mesurer des changements conformationnels intervenant au sein d'une protéine. Ceci est possible en incorporant les fluorophores donneur et accepteur à différentes positions de la protéine d'intérêt. Les points d'insertion sont choisis de manière à ce que les changements conformationnels, en modifiant la distance et/ou l'orientation des fluorophores, entraînent des modifications du transfert d'énergie (augmentation ou diminution).

Le transfert d'énergie intramoléculaire a permis d'analyser les changements conformationnels intervenant au cours des processus d'activation des récepteurs membranaires. Ainsi, Vilardaga et coll. ont analysé les réarrangements intracellulaires induits par la fixation de molécules agonistes et antagonistes au niveau des récepteurs α_{2A}-adrénergiques et des récepteurs aux hormones parathyroïdiennes (Vilardaga et al., 2003). Le même type d'analyse a permis d'étudier les changements conformationnels du récepteur aux androgènes (Schaufele et al., 2005).

De nombreuses sondes intracellulaires ont aussi été développées sur ce principe. L'objectif de ces systèmes est de pouvoir révéler l'activation d'une voie de signalisation particulière en mesurant les variations de concentrations de différents seconds messagers. La première sonde fluorescente appelée caméléon, a été développée par Miyawaki et coll. afin de mesurer les modifications de la concentration calcique à l'intérieur de la cellule (Miyawaki et al., 1997) **(Figure III.10)**. Suite à la fixation de quatre ions calcium au niveau de son domaine calmoduline, la sonde subit des changements conformationnels provoquant un rapprochement des fluorophores. L'augmentation du signal de FRET à 510 (GFP) ou 535 nm (YFP) est

dépendante de la production calcique intracellulaire. Il est ainsi possible de mesurer en temps réel, les variations de la concentration calcique à l'intérieur de la cellule. D'autres sondes ont aussi été développées pour mesurer notamment la concentration en GMPc (Nikolaev et al., 2006) ou pour détecter simultanément l'activité de la PKA et de la PKC (Brumbaugh et al., 2006). Comme nous l'avons déjà détaillé dans le chapitre I-D, l'activation de RCPG par des molécules agonistes est régulée par des processus de désensibilisation et d'internalisation des récepteurs. Ces mécanismes de régulation sont dépendants du recrutement de la β-arrestine, indépendamment du type de protéine G couplée au récepteur. Ainsi, cette étape de recrutement, qui représente un mécanisme largement répandu pour les RCPG, peut être utilisée pour mesurer l'activation des récepteurs dans des tests cellulaires. Ces tests consistent à détecter les changements conformationnels de la β-arrestine suite à son recrutement au niveau d'un récepteur activé, en utilisant un biosenseur double brillance Rluc-β-arrestine-YFP (Charest et al.). Le recrutement de la β-arrestine sous le récepteur peut alors être associé à des changements du signal de BRET intervenant au niveau de la double fusion. Ce système représente un outil général permettant de mesurer l'activation de nombreux récepteurs dans des tests de criblage de molécules à haut débit (Heding, 2004).

IV-A) Introduction

L'utilisation des technologies de transfert d'énergie en biologie a été marquée par la découverte de la GFP chez *Aequoria Victoria* (Lippincott-Schwartz and Patterson, 2003). Le principal inconvénient de cette protéine fluorescente vient de sa taille (27 kDa) qui est suffisamment grande pour pouvoir interférer (selon le site de son insertion) avec la localisation, le repliement ou encore l'activité de la protéine cible (Lisenbee et al., 2003). De plus, il n'est pas possible, sans visualisation en imagerie ou purification, de distinguer le signal provenant des protéines (fusion GFP) exprimées à la surface, du signal émis par les protéines retenues dans les compartiments intracellulaires. Cela peut être un inconvénient pour certaines applications bien particulières (oligomérisation des RCPG par exemple). Pour ces différentes raisons, des approches alternatives ont dû être développées. L'objectif commun à toutes ces techniques est de pouvoir marquer spécifiquement avec des sondes de petite taille et de nature diverse (choix des fluorophores) des protéines extracellulaires ou intracellulaires sans pour autant altérer leur localisation ou fonction. Parmi ces approches, se distinguent des réactions de marquage covalent et des réactions de marquage réversible. Il est important de souligner que ces méthodes peuvent potentiellement être croisées pour permettre des marquages multiples de différentes protéines. La mise au point de nouveaux systèmes de FRET peut être envisagée.

IV-B) Marquages réversibles

IV-B.1) TétraCystéine FlAsH

En 1998, le laboratoire de Roger Tsien publie un nouveau système de marquage permettant de cibler directement à l'aide de fluorophores des protéines exprimées à l'intérieur de cellules vivantes (Griffin et al., 1998). Cette technique repose sur une interaction entre un petit peptide tétracystéine (CCXXCC, où la séquence est optimale avec une proline et une glycine à la place de X) et un composé biarsenic, le 4',5'-bis(1,2,3-dithioarsolan-2-yl)fluorescein appelé

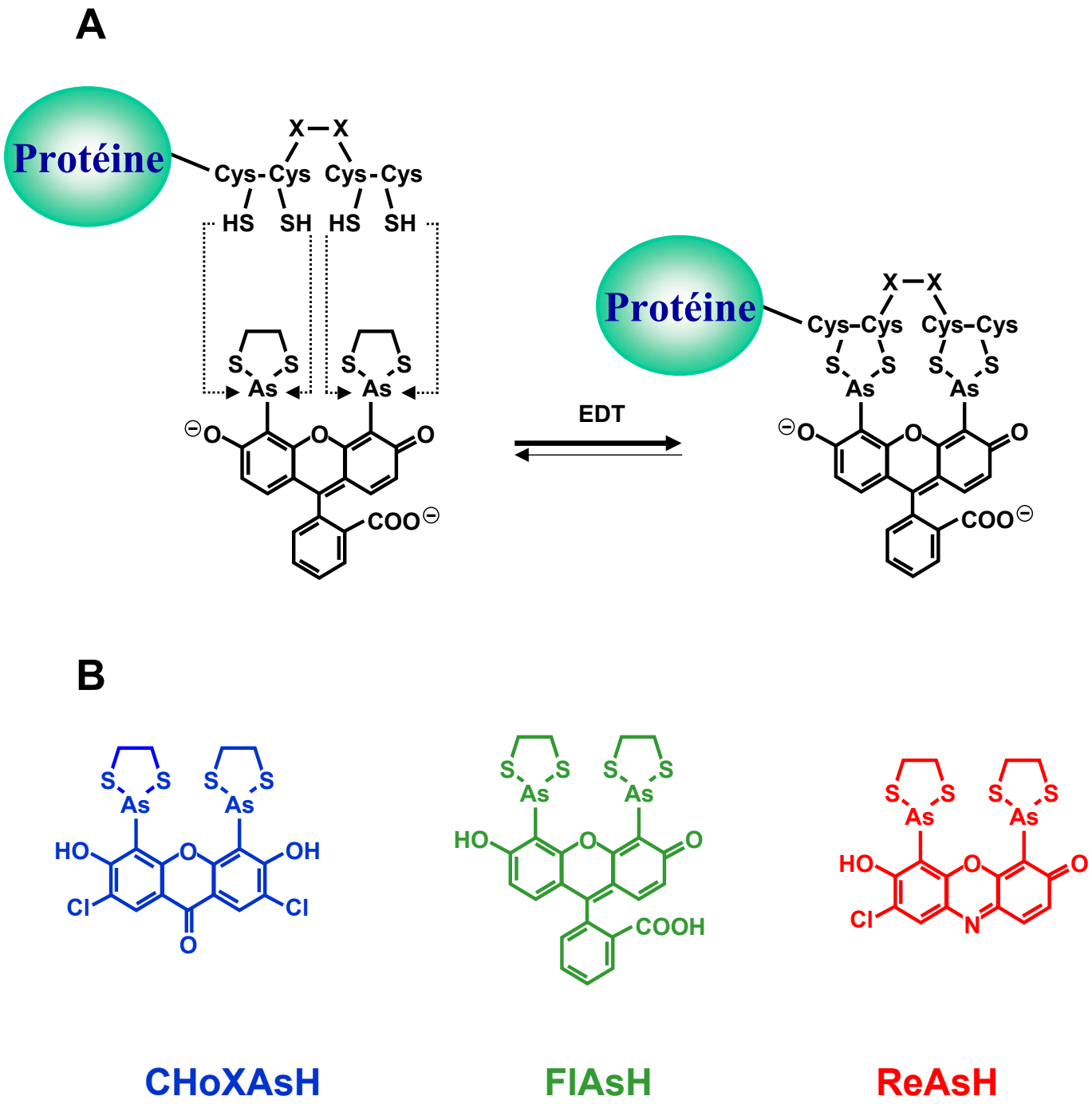


Figure IV.1 : L'approche tétracystéine – FlAsH. A. Réaction de marquage de la séquence CCXXCC par le FlAsH (d'après Tsien R.). L'EDT (1,2-éthanedithiol) est utilisé comme « antidote » pour bloquer les paires de cystéines (dithiols) portées par les protéines endogènes de manière à réduire au maximum la liaison non spécifique et la toxicité. **B.** Structure chimique du FlAsH et de ses dérivés.

FlAsH (pour "Fluorescein arsenical hairpin binder") **(Figure IV.1)**. Dans cette approche, la protéine d'intérêt est fusionnée avec le motif tétracystéine pour être marquée par le FlAsh (ligand organoarsenic). Cette sonde est administrée sur des cellules exprimant la protéine recombinante en présence d'un excès de 1,2-éthanedithiol (EDT). L'EDT est utilisé comme « antidote » pour bloquer les paires de cystéines (dithiols) portées par les protéines endogènes de manière à réduire au maximum la liaison non spécifique et la toxicité. L'ajout simultané de l'EDT avec le FlAsH est possible car le peptide tétracystéine est optimisé pour fixer le ligand organoarsenic avec une plus haute affinité que l'antidote. Afin d'élargir la palette des fluorophores, d'autres dérivés biarsenic présentant des propriétés de fluorescence différentes ont été générés : les dérivés bleus (ChoXAsH) et rouges (ReAsH).

Le marquage des protéines avec ce système présente certains avantages. Tout d'abord, le dérivé biarsenic, très peu fluorescent sous sa forme libre, révèle une importante augmentation de sa fluorescence une fois fixé sur le peptide. Cette propriété permet de minimiser le bruit de fond de l'essai. De plus, le motif tétracystéine est suffisamment petit pour pouvoir être introduit dans des boucles et hélices α de la protéine cible sans risquer d'affecter sa fonction. Enfin, l'interaction entre le peptide et le ligand organoarsenic est très stable et ne peut être dissociée que pour des concentrations en EDT de l'ordre du millimolaire.

Une étude a récemment démontré l'intérêt de cette technique pour détecter les changements conformationnels intervenant au cours de l'activation des récepteurs adénosines A_{2A} et α_{2A}-adrénergiques en FRET (Hoffmann et al., 2005). Dans cette étude, le couple CFP – FlAsH s'avère tout à fait adapté à la détection de l'activation des récepteurs en FRET sans perturbation du couplage aux effecteurs. Ce dernier point est important car il montre l'avantage d'une petite séquence de fusion de type tétracysteine à une grosse protéine (YFP) qui empêche le fonctionnement du récepteur par une perte de couplage à l'AC.

Le système FlAsh présente cependant certaines limites. Même si l'ajout d'EDT permet de réduire le bruit de fond, la fluorescence parasite générée par le marquage des protéines endogènes riches en cystéines n'est pas négligeable (Stroffekova et al., 2001). Afin de minimiser cette contrainte, des mutations ont permis de déterminer deux séquences peptidiques optimales (HRW**CCPGCC**KFT et FLN**CCPGCC**MEP). Ces séquences présentent de meilleurs rendements quantiques en présence de ReAsH et sont plus résistantes aux dithiols permettant d'améliorer le rapport signal sur bruit (Martin et al., 2005).

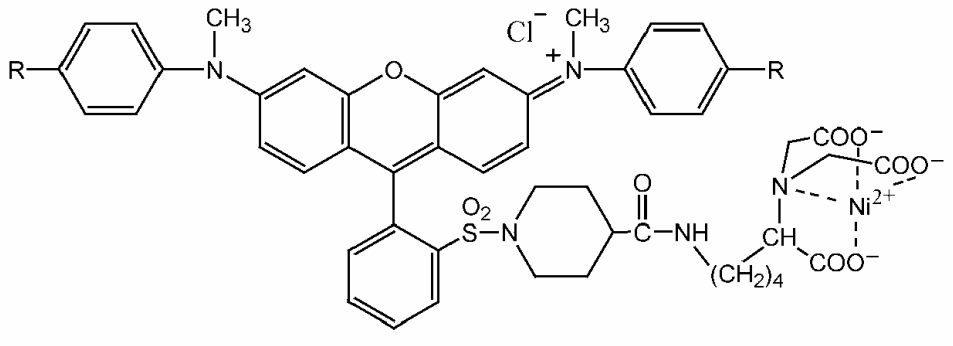


Figure IV.2 : L'approche Ni-NTA. Structure chimique du nickel-nitrilotriacétate (Ni-NTA). Cette sonde, formée par un chromophore et un domaine nitrilotriacetate (NTA) chélatant les ions métalliques (Nickel, Ni^{2+}), est capable de se fixer spécifiquement et réversiblement sur des séquences oligohistidines (6His, 10His). En fonction de la nature du radical R, la sonde Ni-NTA est capable (NTA-I, R = H) ou non (NTA-II, R = SO_3H) de traverser la membrane plasmique.

L'inconvénient de ces nouvelles séquences réside dans leurs longueurs plus importantes que la séquence initiale de six acides aminés. L'autre limitation de ce système est liée au fait que les cystéines du peptide doivent être sous forme réduite rendant difficile le marquage des protéines dans des environnements cellulaires oxydants (RE ou milieu extracellulaire par exemple) (Chen et al., 2005).

IV-B.2) Nickel NTA

La technologie de purification des protéines sur matrices de Nickel-NTA est une technique qui s'est généralisée dans les laboratoires de recherche au point qu'il est difficile de dire combien de protéines ont été étudiées à l'aide de ce système. Cette approche basée sur une interaction Nickel – Histidine, a suscité un grand intérêt pour le développement de nouveaux outils notamment dans l'étude structurale des protéines. L'utilisation de cette approche pour le marquage de protéines exprimées à la surface ou à l'intérieur de cellules vivantes a permis de bénéficier de la sélectivité et de la rapidité de cette interaction. La sonde non fluorescente est formée par un chromophore et un domaine nitrilotriacetate (NTA) chélatant les ions métalliques (Nickel, Ni^{2+}) **(Figure IV.2)**. Une fois l'ion complexé par le chélatant, la sonde est capable de se fixer spécifiquement et réversiblement sur des séquences oligohistidines (6 ou 10 histidines) qu'il est possible d'introduire génétiquement sur les protéines d'intérêt. En fonction de la nature du radical R, la sonde Ni-NTA est capable (NTA-I, R = H) ou non (NTA-II, R = SO_3H) de traverser la membrane plasmique ce qui permet de définir sélectivement un marquage extracellulaire ou intracellulaire des protéines.

D'un point de vue biophysique, le Ni-NTA agit comme un accepteur de fluorescence parfaitement compatible avec la protéine GFP ou la fluorescéine. Si les deux molécules sont à une distance compatible avec l'apparition d'un transfert d'énergie, le Ni-NTA absorbe une partie de l'énergie émise par le donneur sans pour autant réémettre un signal de fluorescence (faible rendement quantique). La diminution de l'émission de fluorescence du donneur en présence d'accepteur (Ni-NTA) démontre l'existence d'un transfert d'énergie entre les deux molécules. Il est possible de restaurer la fluorescence du donneur par l'ajout d'EDTA ou d'imidazole dissociant l'interaction Ni-NTA – 6His.

Cette approche a permis à Guignet et coll. d'apporter des informations sur l'organisation du récepteur ionotropique $5HT_3$ exprimé transitoirement dans des cellules HEK293 (Guignet et al., 2004). Le système mis en place a consisté à mesurer un transfert d'énergie entre un antagoniste - fluorescéine (Tairi et al., 1998) et la sonde Ni-NTA fixée sélectivement sur trois positions du récepteur. Les auteurs proposent que les différences d'efficacité de transfert observées pour ces trois positions soient liées à des différences de distance séparant les deux molécules. Ils ont ainsi été capables, grâce à l'utilisation de sondes perméantes et non perméantes, de cartographier l'environnement du site de liaison (distance entre les différents domaines et orientation intra- ou extracellulaire).

Le principal inconvénient de cette approche vient de la faible affinité du NTA pour la séquence 6His (de l'ordre du micromolaire). En microscopie par exemple, les concentrations nécessaires pour un marquage optimal risquent d'entraîner un important bruit de fond dû à l'excès de fluorophores libres. Pour minimiser cet inconvénient, une séquence 10His a été générée avec un gain d'affinité d'un facteur six (Guignet et al., 2004). Ce gain d'affinité n'est cependant pas suffisant pour permettre une amélioration significative du système de marquage.

Plus récemment, cette approche a été utilisée pour déterminer les changements conformationnels intervenant au cours de l'activation de récepteurs AMPA purifiés (Ramanoudjame et al., 2006). Dans cette étude, la séquence 6His a été introduite au niveau de la région N-terminale de la sous-unité GluR2 alors qu'une cystéine a été insérée au niveau de ses lobes. L'ajout d'une sonde Ni-NTA-Cy3 (accepteur) (Kapanidis et al., 2001) spécifique de la séquence 6His et d'un chélate de terbium - DPTA (acide diethylenetriaminepentaacétique) (donneur) (Selvin, 2002) spécifique de l'unique cystéine libre introduite par mutagénèse, entraîne l'apparition d'un signal de FRET. La mesure de la durée de vie d'émission de fluorescence de l'accepteur en FRET permet de mesurer l'efficacité du transfert d'énergie qui dépend, notamment, de la distance séparant les deux fluorophores (voir chapitre III-C.2). Il est donc possible par cette méthode de mesurer le degré de fermeture des lobes suite à des changements conformationnels induits par la fixation de différents ligands.

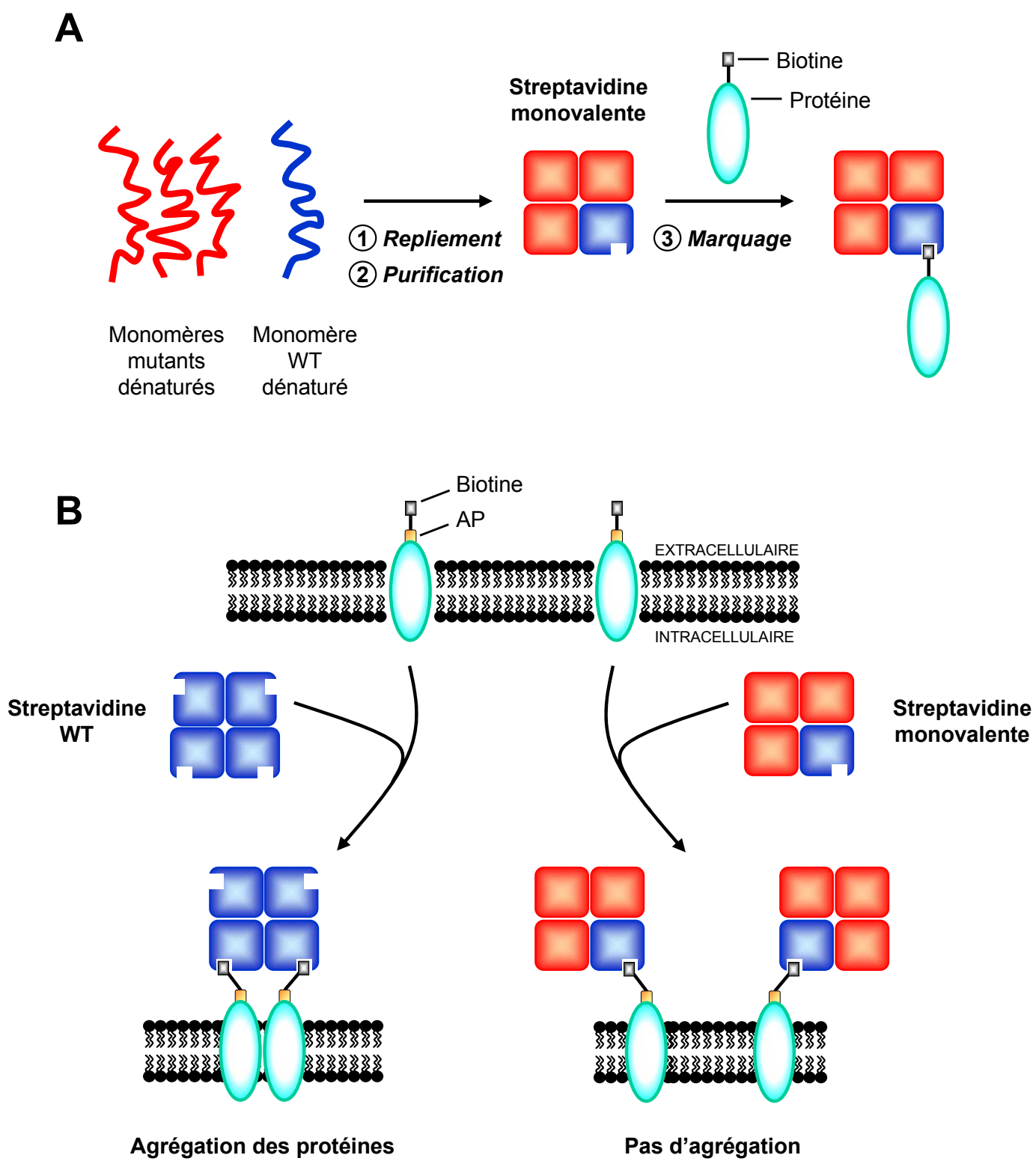


Figure IV.3 : L'approche biotine monovalente – streptavidine. A. Génération de streptavidines monovalentes (d'après Lemercier et Johnsson). **B.** Expression d'une protéine de fusion avec la séquence AP (Acceptor Peptide) à la membrane plasmique. La séquence AP doit être exposée au niveau extracellulaire pour pouvoir être sélectivement biotinylée par la biotine ligase. La streptavidine monovalente n'induit pas d'agrégation des protéines après marquage.

IV-B.3) Streptavidine monovalente – biotine

L'interaction streptavidine – biotine est un modèle de couple très bien caractérisé dans la littérature notamment pour le marquage d'anticorps et la purification de protéines. Cette interaction a permis récemment de marquer de manière très spécifique, avec une haute affinité (constante de dissociation, $k_d \sim 10^{-14}$) et dans des temps assez courts des protéines exprimées à la surface de cellules vivantes. La première étape consiste à biotinyler une petite séquence consensus AP (Acceptor Peptide), (Beckett et al., 1999) génétiquement introduite sur la protéine d'intérêt (voir marquages irréversibles biotine – ligase). Une deuxième étape de marquage permet de greffer une streptavidine conjuguée à un fluorophore au niveau de la biotine. La streptavidine étant tétravalente, elle est susceptible d'induire des phénomènes d'agrégation en pontant les différentes protéines biotinylées. Les effets indésirables de ces phénomènes peuvent être divers : ralentissement du déplacement des protéines à la surface, activation des récepteurs… Afin de pallier ces problèmes, des streptavidines monovalentes ont été progressivement générées. Cependant, la rupture des interfaces connectant les tétramères s'accompagne d'une chute dramatique de l'affinité pour la biotine. Les valeurs de constantes de dissociation mesurées sont : $K_d \sim 10^{-10}$ dans les meilleures conditions pour la streptavidine (Qureshi and Wong, 2002) et $K_d \sim 10^{-6}$ pour l'avidine (Chilkoti et al., 1995; Laitinen et al., 2003; Sano and Cantor, 1995).

Récemment, des auteurs ont réussi à générer une streptavidine monovalente sans perte d'affinité (Howarth et al., 2006; Lemercier and Johnsson, 2006). La structure tétramérique de cette streptavidine est conservée mais trois des quatre domaines de liaison de la biotine sont mutés ($K_d \sim 10^{-3}$ M au lieu de 10^{-15} M). Pour générer cette streptavidine monovalente une séquence 6His a dû être rajoutée à la sous-unité sauvage ; le mélange de sous-unités monomériques mutantes et sauvages (ratio 3 : 1) préalablement dénaturées, génère après repliement des protéines, un mélange statistique de tétramères de compositions différentes **(Figure IV.3)**. Une étape de purification du mélange sur colonne Ni-NTA permet d'éluer sélectivement, en accord avec le nombre de 6His par tétramère et la concentration utilisée en imidazole, les différentes formes de streptavidine (monovalente, bivalente et trivalente).

Afin de démontrer l'intérêt de cette nouvelle streptavidine, les conséquences du marquage de protéines d'adhésion postsynaptiques (neuroligine – 1) ont été examinées à la surface de neurones avec des streptavidines monovalentes ou tétravalentes (Howarth et al., 2006). Dans

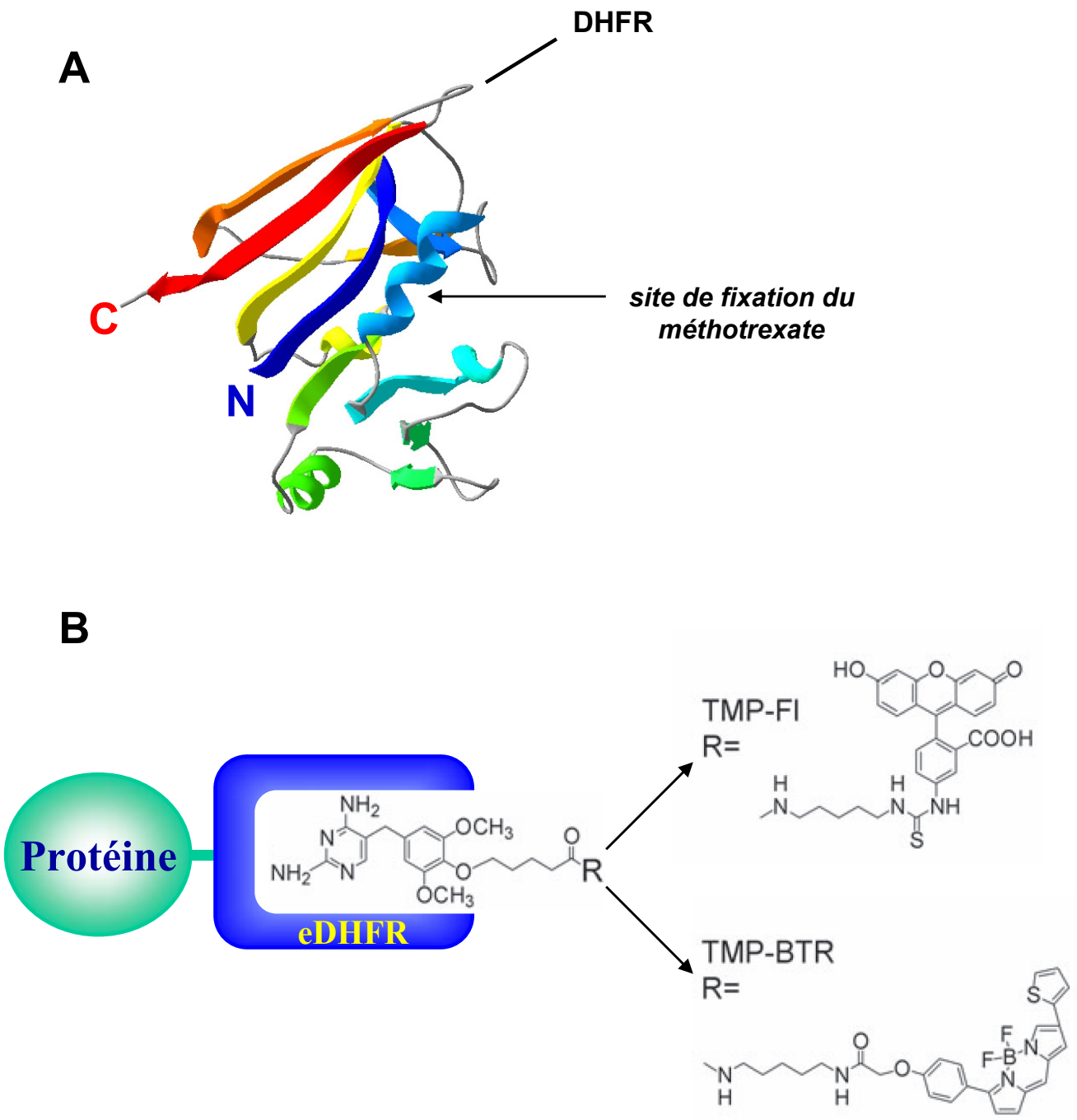


Figure IV.4 : L'approche eDHFR. A. Organisation spatiale de la DHFR (code pdb : 3DFR). **B.** Expression d'une fusion entre la protéine d'intérêt et la eDHFR puis étape de marquage via la liaison entre la eDHFR et le triméthoprime (TMP) préalablement dérivatisé avec de la fluorescéine (Fl) ou du BODIPY Texas Red (BTR).

ces expériences, la neuroligine – 1 est fusionnée au niveau N-terminal avec la séquence consensus AP pour pouvoir être biotinylée. L'ajout de streptavidine monovalente sur les neurones exprimant les protéines recombinantes permet un marquage stable des protéines sans induction de phénomènes d'agrégation. A l'inverse, la forme tétramèrique de la streptavidine conduit à une réticulation de la neuroligine – 1 qui a pour conséquence une rupture dans la formation des contacts présynaptiques.

IV-B.4) eDHFR

La DHFR est une enzyme impliquée dans la production d'acide tétrahydrofolique, un cofacteur essentiel à la synthèse des acides aminés (sérine, méthionine) et des bases puriques et pyrimidiques. Le trimethoprime (TMP) est un antibiotique mis au point pour interférer avec l'action de la dihydrofolate réductase bactérienne (eDHFR) sans interagir avec les protéines de mammifères. La fixation du TMP sur la eDHFR permet de bloquer spécifiquement la prolifération bactérienne sans pour autant affecter la DHFR de Mammifère. En effet, le TMP présente une haute affinité (K_I ~ 1nM) pour la eDHFR de *E.Coli* et une faible affinité (K_I ~ 4µM) pour la DHFR de Mammifère. En tirant profit de cette interaction TMP - DHFR un système de marquage a été adapté au greffage spécifique et rapide de fluorophores au niveau de protéines exprimées à la surface ou à l'intérieur de cellules vivantes. La sonde TMP, aussi appelée 2,4-diamino-5-(3,4,5-trimethoxybenzyl) pyrimidine, est utilisée pour marquer sélectivement la eDHFR fusionnée à une protéine d'intérêt. Le choix de cette interaction inhibiteur - enzyme comme système de marquage repose sur plusieurs aspects :
- la spécificité d'interaction TMP/eDHFR,
- la petite taille de eDHFR (~ 18 kDa) qui est monomérique,
- la facilité de dérivatisation du TMP (fluorescéine, BODIPY Texas Red) sans affecter sa liaison sur la eDHFR (Roth et al., 1981) **(Figure IV.4)**.

Pour évaluer la performance de cette approche, le TMP-fluorescéine a été utilisé pour marquer la eDHFR fusionnée à une protéine cytosolique : la puromycine N-acétyl transferase (Miller et al., 2005). L'ajout de TMP-fluorescéine sur des cellules exprimant la protéine recombinante permet de révéler la formation du complexe TMP-eDHFR-puromycine dont la détection est encore possible deux heures après le marquage.

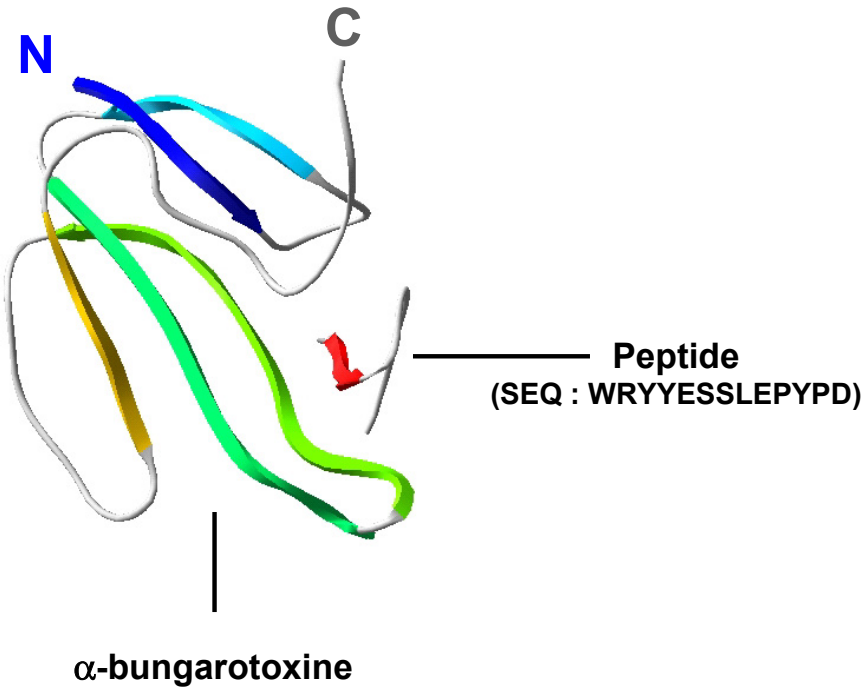


Figure IV.5 : L'approche bungarotoxine. Structure RMN de l'α-bungarotoxine en présence d'un peptide de 13 acides aminés liant la toxine avec une haute affinité (code pdb : 1HAA).

IV-B.5) α-bungarotoxine

L'α-bungarotoxine (BTX) est un peptide de 74 acides aminés contenu dans le venin de serpents (Bungare) de la famille des Cobras. Cette neurotoxine se fixe sur des sites de très haute affinité (K_d ~ 0.4 nM) de récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine. L'inhibition de ces récepteurs postsynaptiques de la synapse neuromusculaire empêche la transmission du message nerveux conduisant à une paralysie.

Cette toxine est utilisée depuis près de 30 ans pour l'étude de la structure, de la fonction et du trafic des récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine (Luetje et al., 1990; Tzartos and Changeux, 1983). La génération de séquences aléatoires par "phage display" et la modification de ces séquences a permis de sélectionner des peptides présentant une haute affinité pour cette toxine. Ainsi, une séquence de seulement 13 acides aminés s'est révélée être suffisante pour lier la BTX avec une bonne affinité (Scherf et al., 1997). Ce petit peptide lie la BTX en mimant son site de liaison sur le récepteur acétylcholine (BBS, Bungarotoxin Binding Site) **(Figure IV.5)**. Cette liaison confère une certaine stabilité au complexe ligand - récepteur ce qui permet d'envisager l'utilisation de cette interaction comme système de marquage des protéines membranaires. Il suffit pour cela de fusionner la séquence BBS au niveau de la partie extracellulaire de la protéine d'intérêt et de cibler cette séquence avec la BTX préalablement conjuguée à un traceur fluorescent (rhodamine, Alexa…). Après élimination de l'excès de ligand libre les récepteurs marqués peuvent être détectés en microscopie.

Sekine-Aizawa et Huganir ont ainsi suivi les phénomènes d'internalisation et de recyclage des récepteurs AMPA dans des cellules HEK293 et dans des neurones (Sekine-Aizawa and Huganir, 2004). D'autres travaux se sont focalisés sur le trafic des récepteurs de l'acétylcholine (nAChRα3), du glutamate (mGluR2) et de l'acide γ-aminobutyrique ($GABA_A$α3) (McCann et al., 2005). Plus récemment, cette approche a été utilisée pour inactiver par la méthode FALI (Fluorophore-Assisted Laser Inactivation) le récepteur $mGlu_{8a}$ (Guo et al., 2006).

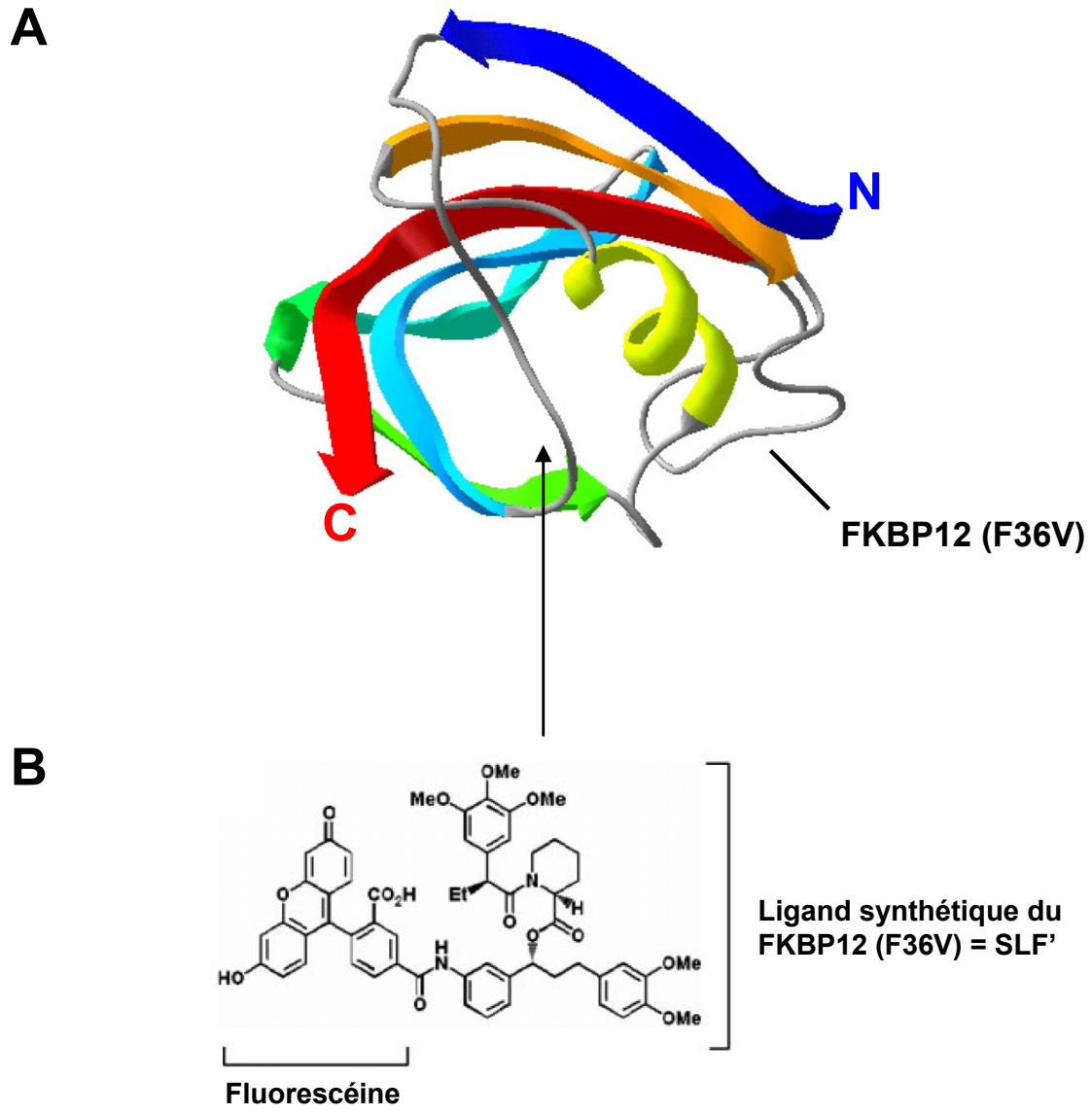


Figure IV.6 : L'approche FKBP (F36V). A. Structure cristallographique du FKBP12 (FK-binding protein) (code pdb : 1FKL). **B.** Structure du conjugué fluorescéine – ligand synthétique du FKBP12 (SLF').

IV-B.6) FKBP12 – SLF'

Le tacrolimus ou FK506 est un immunosuppresseur très utilisé en transplantation d'organes. Il constitue une alternative à la cyclosporine particulièrement dans les cas de rejet de greffe réfractaire à la cyclosporine. Cette molécule découverte en 1984, est un produit naturel de l'actinomycète (champignon microscopique) ou *Streptomyces tsukubaensis* qui présente un puissant effet immunosuppresseur en bloquant l'activité de la calcineurine (sérine/thréonine phosphatase calcium dépendante) dans les lymphocytes T. Son mécanisme d'action implique la formation d'un complexe à cinq sous-unités comprenant une protéine de liaison du FK506 ou FKBP12 (FK-binding protein), le tacrolimus, la calmoduline et les calcineurines A et B dont l'activité phosphatase est inhibée. L'action des facteurs de transcription dépendant de la déphosphorylation pour leur transport vers le noyau est inhibée ce qui conduit au blocage de la prolifération et des fonctions des lymphocytes T.

De nombreux analogues du FK506 ont été créés comme par exemple le ligand synthétique SLF (Synthetic Ligand for FKBP12) qui perd l'effet immunosuppresseur du FK506. En se basant sur des données structurales Clarkson et coll. ont généré un analogue du SLF (SLF') qui est mille fois plus affin ($K_d \sim 10^{-8}$M) pour un mutant du FKBP12 (F36V) que pour la forme sauvage (Clackson et al., 1998) **(Figure IV.6)**.

Cette paire de molécules représente un système tout à fait adapté pour des marquages de protéines aussi bien *in vitro* qu'*in vivo.* De plus, ce système présente une spécificité suffisante pour permettre une inactivation des protéines par la technique FALI (Fluorophore-Assisted Laser Inactivation). Cette méthode permet d'inactiver des protéines avec une bonne précision dans l'espace et dans le temps (Jay, 1988). Classiquement cette technique requiert l'introduction d'anticorps conjugués avec la fluorescéine à l'intérieur de cellules avant l'irradiation de celles-ci. L'irradiation génère localement la production d'oxygène radicalaire par le fluorophore. Cet oxygène réactif peut réagir avec l'antigène se trouvant à proximité ce qui le détruit. La principale limitation de cette technique vient de l'utilisation d'anticorps difficiles à faire entrer dans la cellule. Marks et coll. ont tiré profit du système SLF' - FKBP12 pour s'affranchir de l'utilisation d'anticorps en ciblant directement les protéines à inactiver à l'aide de ces deux molécules (Marks et al., 2004). Par cette méthode ils inactivatent une fusion β-galactosidase-FKBP12 exprimée dans des cellules NIH 3T3 de fibroblaste suite à la liaison du SLF'-fluorescéine.

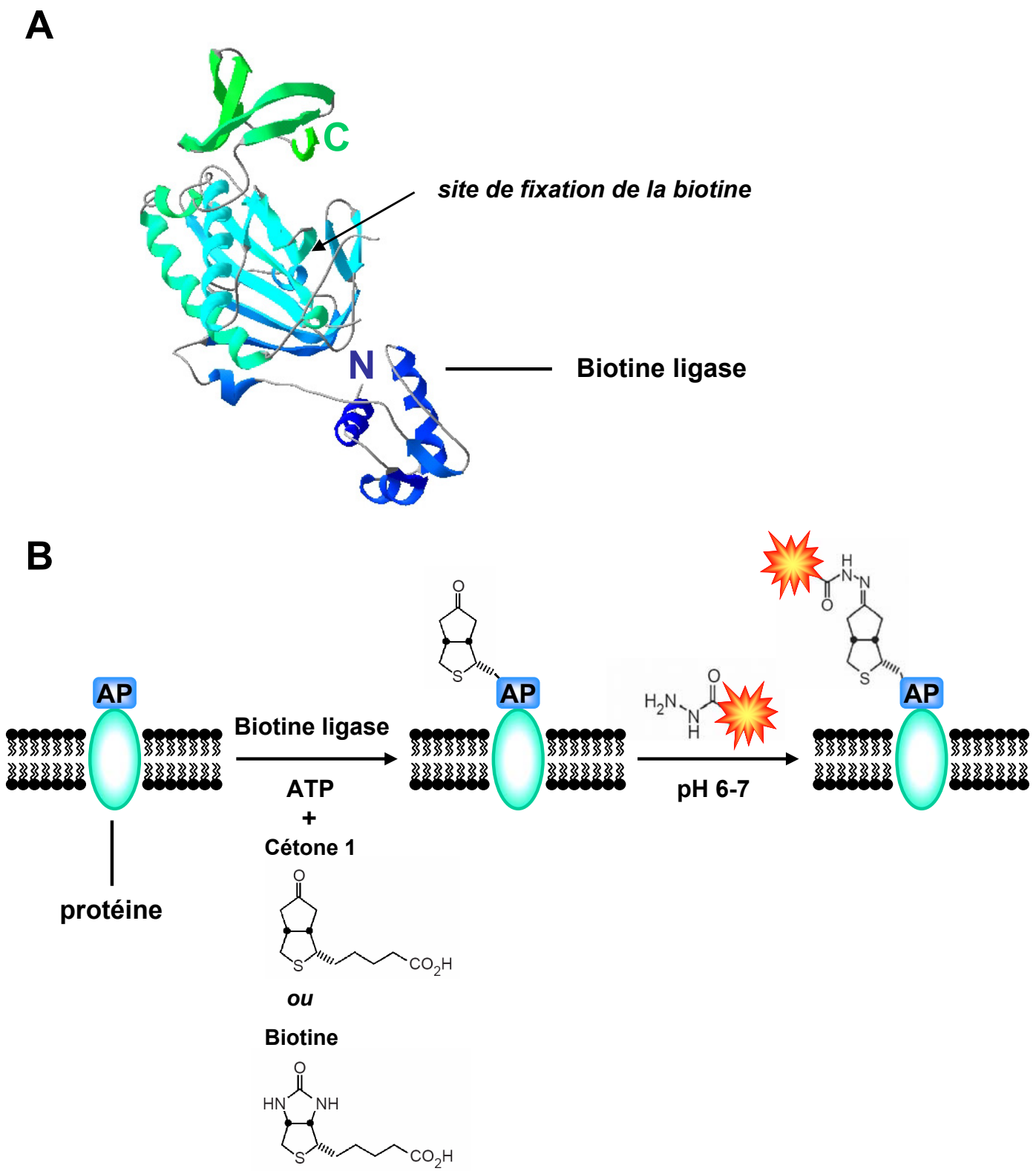


Figure IV.7 : L'approche biotine-ligase - hydrazide. A. Structure cristallographique de la biotine ligase (BirA) (code pdb : 1HXD). **B.** Une protéine de fusion AP (Acceptor Peptide) est exprimée à la surface cellulaire. La biotine ligase catalyse la ligation de la cétone 1 sur la séquence AP et une réaction de marquage successive permet la ligation sur la cétone 1 d'un groupement hydrazide (ou hydroxylamine) fusionné à la sonde.

IV-C) Marquages irréversibles

IV-C.1) Biotine – ligase

Cette méthode permet de marquer de manière hautement spécifique et irréversible des protéines exprimées à la surface de cellules. Le principe de cette approche consiste à utiliser une enzyme de *E. Coli* (BirA) qui catalyse la biotinylation de la chaîne latérale d'une lysine faisant partie d'une séquence consensus AP (Acceptor Peptide) (Beckett et al., 1999) **(Figure IV.7)**. Par sa petite taille (15 acides aminés) cette séquence est peu susceptible d'interférer avec le repliement, la fonction ou la localisation de la protéine recombinante. De plus, cette séquence est très spécifique car elle n'a pas été retrouvée dans les protéines de mammifères et un seul substrat naturel de l'enzyme, le BCCP (Biotin Carboxyl Carrier Protein) a été identifié dans des bactéries (Beckett et al., 1999). Afin de permettre le greffage de différents fluorophores sur la séquence AP, des analogues de la biotine ont été générés. La cétone 1 qui est un isostère de la biotine (remplacement de deux groupements NH par deux carbones) s'est révélé être tout à fait interessant pour réaliser ce type de marquage. Tout d'abord, la liaison de cet analogue sur la séquence AP présente la même caractéristique cinétique et la même spécificité de liaison que la biotine. D'autre part, l'absence de groupement cétone à la surface cellulaire, permet de cibler spécifiquement cette molécule (une fois liée à la séquence AP) avec des groupements hydrazides ou hydroxylamines portant le fluorophore.

La réaction de marquage se fait en deux étapes. La première consiste à ajouter la biotine ligase (BirA), l'analogue de la biotine et de l'ATP sur des cellules exprimant la protéine recombinante (AP-protéine). Une étape de rinçage est ensuite indispensable pour éliminer l'excès de molécules non fixées. Une deuxième étape de marquage permet de greffer sur l'analogue de la biotine un groupement hydrazide (ou hydroxylamine) portant le fluorophore.

La spécificité de ce type de marquage a été validée aussi bien *in vitro* qu'en système cellulaire notamment sur le récepteur EGF (Chen et al., 2005). Ce système a aussi été utilisé récemment pour biotinyler puis marquer avec un conjugué streptavidine – quantum dots (QD) les récepteurs AMPA exprimés dans des neurones (Howarth et al., 2005). Cette méthode permet de suivre le déplacement des protéines à la surface cellulaire en bénéficiant d'un marquage stable ($K_d \sim 10^{-13}$M) et d'une réduction de l'encombrement stérique dû aux conjugués QD (Streptavidine = 60 kDa versus méthode classique avec anticorps = 150 kDa).

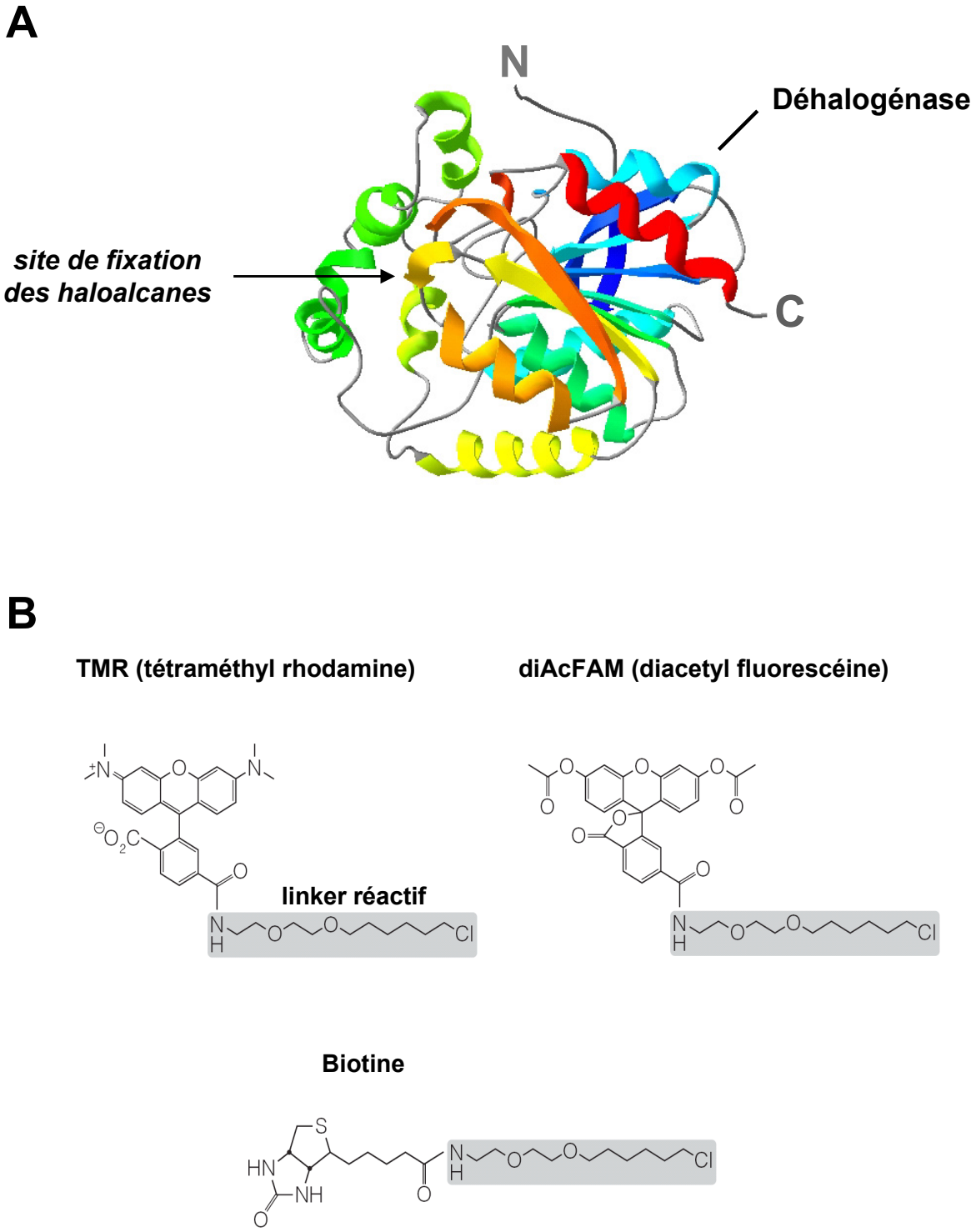


Figure IV.8 : L'approche Halo-tag. A. Organisation spatiale de la déhalogénase (code pdb : 1BN6). **B.** Ligands Halo-tag formés d'un chloroalcane réactif dérivatisé avec des fluorophores ou de la biotine (d'après Promega).

IV-C.2) Halo-tag

Rhodococcus rhodochrous est une bactérie isolée en Angleterre à partir d'un prélèvement de sol provenant d'une usine exposée à des chloroalcanes. Cette bactérie utilise le 1-chlorobutane ainsi que d'autres haloalcanes comme unique source de carbone et d'énergie. Le clivage de la chaîne carbonée du 1-chlorobutane est catalysé par une déhalogénase de 33 kDa qui hydrolyse les haloalcanes pour former du n-butanol. Cet intermédiaire est oxydé en deux étapes pour générer de l'acide n-butyrique qui sert de substrat à la croissance bactérienne.

La société Promega a tiré profit de cette interaction enzyme – substrat pour réaliser un système de marquage des protéines. Le remplacement d'une histidine par une phénylalanine dans le site actif de l'enzyme empêche l'hydrolyse d'un ester intermédiaire conduisant à la formation d'une liaison covalente entre l'enzyme et le substrat. L'enzyme modifiée (Halo-tag) peut être fusionnée en N- ou C-terminal d'une protéine cible. L'Halo-tag n'étant pas endogène des cellules eucaryotes, son marquage est très spécifique. Les substrats utilisés pour réaliser ces marquages sont de petites molécules qui présentent un domaine réactif essentiel à la formation de la liaison covalente avec l'enzyme ainsi qu'un fluorophore (tétraméthyl rhodamine, diacétyl fluorescéine ou ligand de la biotine) **(Figure IV.8)**.

Ce système a principalement été utilisé pour localiser les protéines dans la cellule en microscopie (site Promega, « HaloTag Interchangeable Labeling Technology », 2006). Zhang et coll. ont aussi démontré *in vitro* que cette approche peut être utilisée pour fixer des QD sur des protéines cibles (Zhang et al., 2006).

IV-C.3) ACP-tag

Chez les micro-organismes, il existe un mécanisme non ribosomal à l'origine de la synthèse de peptides. En effet les peptides sont produits grâce à des protéines spéciales : les synthétases ou NRPS (Non Ribosomal Peptide Synthetase). Ces dernières sont agencées sous la forme de modules (un module d'initiation suivi de plusieurs modules d'élongation) qui présentent plusieurs domaines. Parmi ces domaines, le PCP (Peptidyl Carrier Protein) permet au peptide en cours de synthèse de rester fixé à la synthétase tout au long du processus d'élongation. Chez *Bacillus subtilis* une modification post-translationnelle du domaine PCP

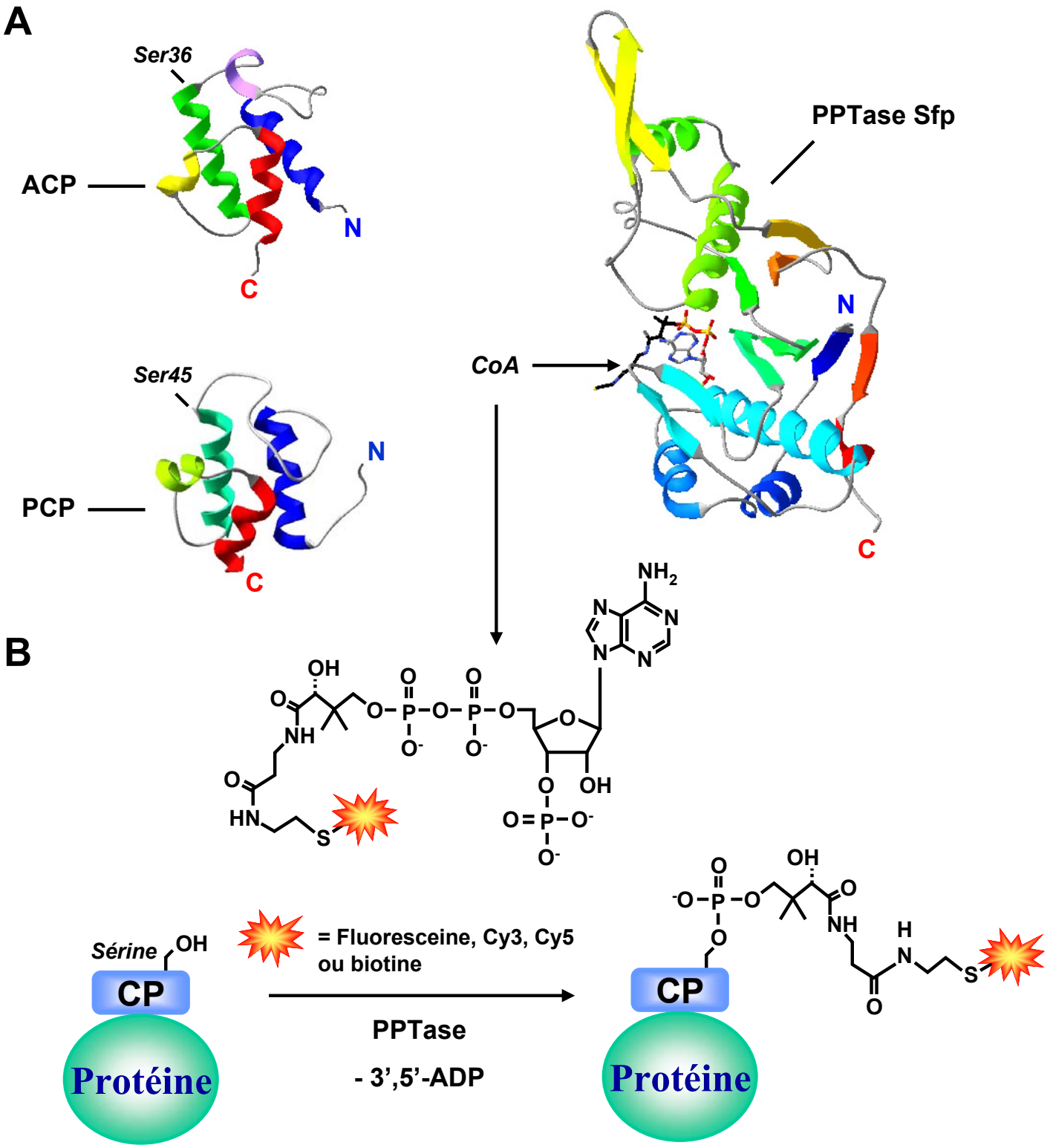


Figure IV.9 : L'approche ACP-tag. A. Structures cristallographiques de l'ACP (Acyl Carrier Protein) (code pdb : 1T8K) et de la phosphopantetheine transférase (PPTase) en présence de coenzyme A (CoA) (code pdb : 1QR0) ainsi que la structure RMN du PCP (Peptidyl Carrier Protein) (code pdb : 1DNY). **B.** Réaction de marquage des protéines de fusion ACP par la PPTase. L'enzyme transfère un groupement 4'-phosphopantetheinyl (Ppant) provenant de la CoA sur une sérine conservée de l'ACP. La dérivatisation de la CoA avec un fluorophore permet ainsi de marquer la protéine de fusion.

est catalysée par une phosphopantetheine transférase (PPTase) de 240 acides aminés appelée Sfp, qui transfère un groupement 4'-phosphopantetheinyl (Ppant) provenant du coenzyme A (CoA) sur une sérine conservée du PCP.

Sur la base de cette réaction, un système de marquage des protéines a été mis au point par la société Covalys. Dans ce système la protéine cible est exprimée en fusion avec le domaine PCP (~ 80 acides aminés) excisé à partir de la NRPS. Profitant du fait que la PPTase accepte la dérivatisation (greffage d'un fluorophore) du groupement thiol de la CoA, il a été possible d'utiliser cette enzyme pour marquer sélectivement les protéines de fusion PCP à la surface cellulaire (Yin et al., 2004) **(Figure IV.9)**. Plus récemment, le trafic du récepteur de la transférrine (TfR1) durant les processus de capture du fer a pu être suivi grâce à la mise en place d'un système FRET entre la transférrine marquée à l'Alexa 568 et la protéine recombinante (PCP-TfR1) marquée à l'Alexa 488 par la PPTase (Yin et al., 2005).

Une autre approche basée sur ce principe a été commercialisée par la même société. En effet, *Escherichia coli* (*E.Coli*) possède une Acyl-carrier protein Synthase (AcpS) de 120 acides aminés qui modifie de petites protéines ACP (Acyl Carrier Protein) de 77 acides aminés via le transfert d'un groupement 4'-phosphopantetheinyl de la CoA sur une sérine conservée de l'ACP (liaison phosphodiester). Il résulte de ce marquage une activation de l'ACP qui est une coenzyme essentielle à la synthèse des acides gras. L'ajout de ce groupement permet notamment de transporter les acides gras intermédiaires via l'établissement d'une liaison thioester au niveau de la fonction thiol du groupement prosthétique. Il est possible, comme pour le PCP, de fusionner l'ACP à une protéine d'intérêt et de réaliser un marquage via l'ajout d'AcpS et de CoA modifiée (George et al., 2004).

Cette approche a été utilisée récemment pour analyser en FRET l'organisation du récepteur de la neurokinine-1 (NK1) à la surface cellulaire (Meyer et al., 2006). Les résultats obtenus tendent à montrer que les récepteurs NK1 sont monomériques et localisés dans des microdomaines.

Enfin, les deux approches ACP et PCP peuvent être combinées pour réaliser des marquages multiples. L'AcpS de *E.Coli* présente une très bonne spécificité en modifiant seulement l'ACP alors que la Sfp modifie à la fois la PCP et l'ACP. Ainsi, pour obtenir un marquage spécifique, les cellules exprimant les deux protéines recombinantes doivent être

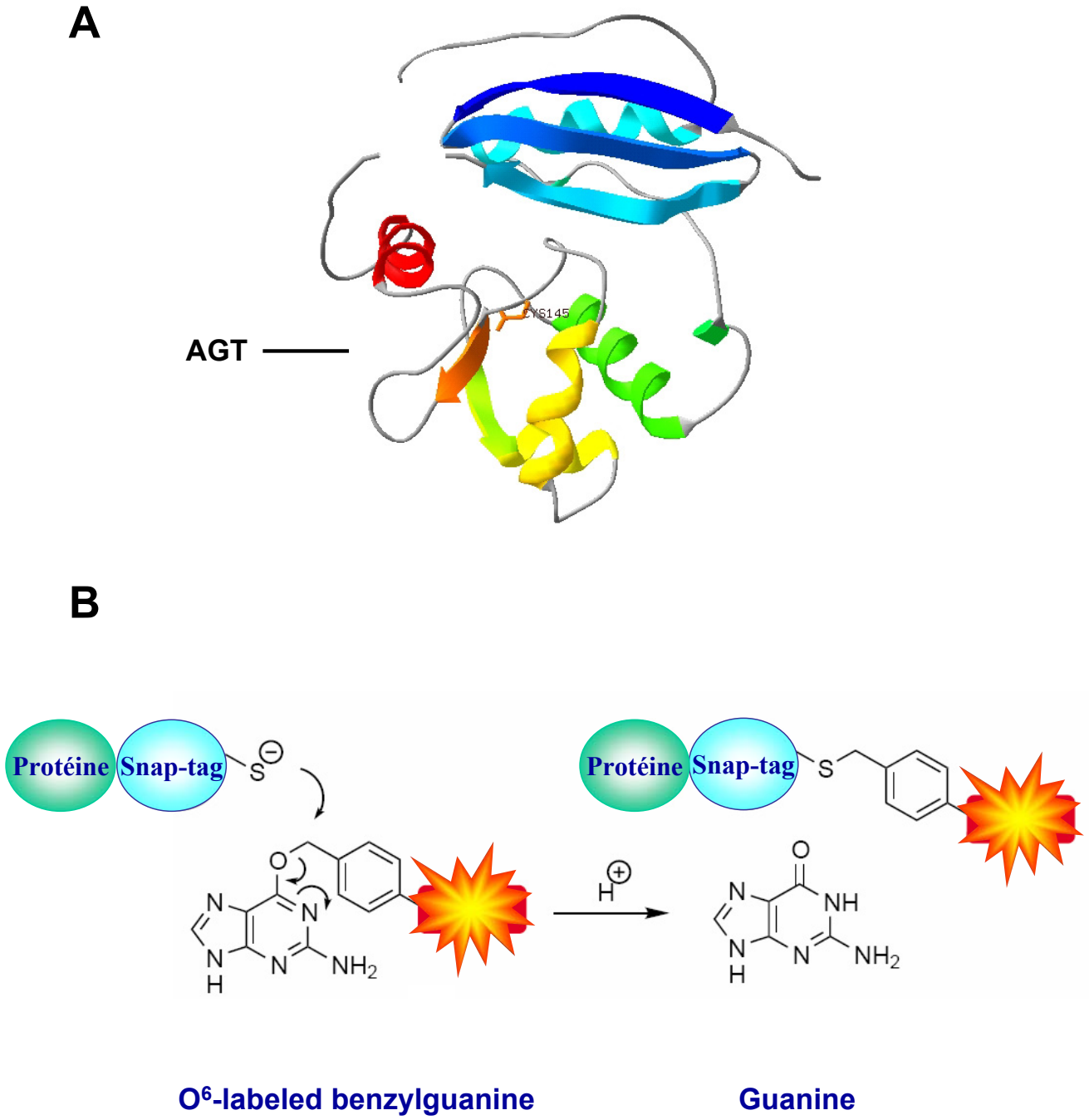


Figure IV.10 : L'approche SNAP-tag. A. Structure cristallographique de l'O^6-alkylguanine-DNA alkyltransférase (AGT) (code pdb : 1EH6). **B.** Expression d'une protéine de fusion SNAP-tag (AGT modifiée) puis liaison d'un groupement benzyl couplé à un fluorophore au niveau de la cystéine 145.

incubées d'abord avec l'AcpS et la CoA dérivatisée pour marquer toutes les ACP accessibles, puis avec la Sfp et une CoA modifiée différemment pour marquer les PCP (Vivero-Pol et al., 2005).

IV-C.4) SNAP-tag

Le principe de cette technique repose sur la fusion de la protéine d'intérêt à une enzyme légèrement modifiée, l'O^6-alkylguanine DNA alkyltransferase (AGT) (Juillerat et al., 2003 ; Juillerat et al., 2005). Cette enzyme de 207 acides aminés, est une enzyme de réparation de l'ADN qui reconnaît *in vivo* les groupements alkyls présents sur les guanines de l'ADN. Cette étape de reconnaissance est suivie d'un transfert du groupement alkyl au niveau d'une cystéine réactive (Cys145) présente dans le site catalytique de l'enzyme. Cette réaction qualifiée de suicide est irréversible et unique. En effet, une fois le groupement alkyl fixé par liaison covalente dans le site catalytique de l'enzyme, celle-ci est dégradée dans les heures qui suivent. En chimiothérapie, les propriétés cytotoxiques de ces lésions de l'ADN (alkylation) sont utilisées pour détruire les cellules cancéreuses. Dans ce type de traitement, l'inhibition de l'AGT est essentielle. Le O^6-BG (O^6-Benzyl Guanine) est un exemple de molécule qui permet de potentialiser l'efficacité du traitement en entrant en compétition avec l'ADN pour l'enzyme (Dolan and Pegg, 1997; Rabik et al., 2006).

L'approche SNAP-tag (AGT modifiée) développée par la société Covalys est basée sur ce principe (Keppler et al., 2003). L'idée consiste à fixer sur le groupement benzyl du BG un fluorophore de type Cy3 ou Cy5 (Damoiseaux et al., 2001). Après avoir réalisé la fusion par biologie moléculaire entre le SNAP-tag (182 acides aminés) et la protéine cible, il suffit d'exprimer cette construction dans des cellules et d'ajouter le BG-fluorophore. L'enzyme catalyse alors la réaction de transfert du groupement Benzyl-fluorophore permettant d'obtenir ainsi un marquage sélectif du fluorophore sur la protéine d'intérêt **(Figure IV.10)**. Selon les propriétés du fluorophore ceux-ci seront perméants ou non, permettant ainsi de choisir plutôt un marquage spécifiquement extracellulaire ou intracellulaire.

Le principal inconvénient de cette approche pour les marquages intracellulaires vient de l'existence d'AGT endogènes dans les cellules de mammifères qui peuvent induire une augmentation du bruit de fond. Pour cette raison, un inhibiteur de l'AGT humaine a été

Méthode	*Taille séquence	Spécificité	Limitations	Commentaires
Tétracystéine - FlAsh	6 - 12	Bruit de fond dû au cystéines endogènes	Environnements réducteurs	Possible toxicité résiduelle de l'arsenic, interaction de très haute affinité
Nickel-NTA	6 - 10		Aucune	Rapide dissociation du complexe (K_d ~ µM)
eDHFR	187	Marquage des DHFR endogènes	Aucune	Interaction de haute affinité (K_d ~ 1 nM)
Bungarotoxine	13	Marquage des récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine	Protéines à la surface cellulaire	Taille de la toxine ~ 74 a.a
FKBP12 (F36V)	108	Excellente	Aucune	Interaction de haute affinité (Kd ~ 10^{-8} M)
Biotine ligase - Hydrazide	15	Excellente	Protéines à la surface cellulaire	Enzyme biotine ligase (BirA) deux étapes de marquage, liaison irréversible
Halo-tag	305	Excellente	Aucune	Enzyme déhalogénase, liaison irréversible
ACP-tag	77	Excellente	Protéines à la surface cellulaire	Enzyme PPTase, liaison irréversible
SNAP-tag	207	Marquage des AGT endogènes	Aucune	Enzyme hAGT, liaison irréversible

* Taille en nombre d'acides aminés

Tableau : Méthodes de marquage des protéines.

synthétisé en parallèle d'une forme mutante de l'enzyme (^{GE}AGT) résistante à cet inhibiteur (Juillerat et al., 2005).

IV-E) Conclusion

Quelle que soit la méthode envisagée, la spécificité, l'affinité, le choix du fluorophore, la taille de la séquence à fusionner et la perméabilité des réactifs sont autant de critères à prendre en compte pour des tests de marquage des protéines en cellules vivantes **(Tableau)**. Par exemple, les techniques ACP-tag, biotine-ligase et bungarotoxine sont limitées à des marquages de surface alors que les autres systèmes peuvent être employés pour des marquages intracellulaires. De plus, dans des environnements réducteurs, la technique tétracystéine ne peut être efficacement utilisée. Cependant cette même approche ainsi que les systèmes FKBP (F36V), eDHFR, Ni-NTA, SNAP-tag et Halo-tag sont parfaitement adaptés à des marquages cytosoliques. La spécificité de l'interaction sonde – cible est aussi un critère important. Ainsi, si la sonde peut interagir ou non avec des composants endogènes, la sensibilité du test permettra de détecter plus ou moins facilement des protéines faiblement exprimées. Les approches FKBP12 (F36V), Halo-tag, SNAP-tag et eDHFR ne souffrent pas de cette limitation alors que la technique tétracystéine est désavantagée par la présence de cibles endogènes pour la sonde. Enfin, la taille de la séquence à insérer est un critère très important car la fusion de cette séquence cible sur la protéine d'intérêt ne doit pas affecter la stabilité ou fonction de cette dernière. Bien d'autres critères tels que la stabilité de l'interaction ou le nombre d'étapes de marquage sont à considérer en fonction du but recherché. Finalement, l'utilisation croisée de ces techniques devrait permettre de réaliser des marquages multiples, favorables à l'étude simultanée de plusieurs cibles protéiques à l'intérieur de la cellule. Des systèmes de FRET originaux pourraient aussi être adaptés à partir de ces techniques.

CHAPITRE V : OBJECTIF DE LA THESE

Il a été longtemps admis que les RCPG fonctionnent selon une stoechiométrie d'un ligand par monomère couplé à une protéine G. Cependant, comme nous venons de le voir, la synergie d'approches biophysiques et biochimiques, a permis de démontrer une organisation plus complexe des RCPG en dimères, voire en structures oligomériques plus grandes. Ainsi, depuis moins de dix ans, les techniques de transfert d'énergie sont largement utilisées pour démontrer la stœchiométrie d'assemblage de ces récepteurs en cellules vivantes. Parmi ces méthodes, bon nombre utilisent des protéines fluorescentes directement encodées dans la cellule. Même si cela est un avantage certain pour des analyses à l'échelle cellulaire, il s'avère que pour des formats de détection à partir de populations de cellules, il est très difficile de déterminer avec précision la provenance du signal (compartiments intracellulaires, membrane plasmique). Pourtant, il est essentiel, pour comprendre le lien entre l'oligomérisation des RCPG et l'impact sur leur fonction, de déterminer le degré d'organisation des récepteurs alors que ceux-ci sont exprimés à la surface cellulaire.

Mon travail de thèse a principalement porté sur la mise au point de tests cellulaires visant à détecter spécifiquement des interactions entre différentes sous-unités de RCPG exprimées à la surface de cellules vivantes. L'utilisation de fluorophores avec des durées de vie de fluorescence relativement longues était un pré-requis pour pouvoir réaliser ces essais biologiques en temps résolu et s'affranchir d'une partie du bruit de fond (meilleure sensibilité de détection). A cette fin, deux approches différentes ont été développées. Une première approche basée sur l'utilisation d'anticorps conjugués à des molécules fluorescentes a d'abord été abordée. Comme nous le verrons, cette méthode de détection a permis de démontrer différentes associations de dimères. Par la suite, une amélioration du système de détection via la combinaison de la technologie HTRF avec l'approche SNAP-tag, a rendu possible l'analyse de l'oligomérisation du récepteur $GABA_B$ à la surface cellulaire.

La validation de ces nouveaux outils a nécessité un modèle d'étude. Notre choix s'est porté sur le récepteur $GABA_B$ car il forme un hétérodimère obligatoire bien caractérisé dans le laboratoire, constitué des sous-unités $GABA_{B1}$ (GB1) et $GABA_{B2}$ (GB2). Ainsi, ce modèle offre la possibilité de cibler spécifiquement à l'aide de fluorophores, chacune des sous-unités

formant le récepteur tout en contrôlant leur niveau respectif d'expression dans la cellule. De plus, comme nous allons le voir, la sous-unité GB1 ne peut être envoyée en surface qu'après avoir interagi avec GB2, ce qui garantit une association spécifique et mutuelle des deux sous-unités à la surface cellulaire. Le récepteur $GABA_B$ constitue donc un modèle idéal pour déterminer les conditions expérimentales qui permettront de révéler en FRET, l'association de deux protéines à la surface de cellules vivantes.

CHAPITRE VI : LE RECEPTEUR $GABA_B$ COMME MODELE D'ETUDE

L'objectif de ce chapitre est de donner un aperçu des propriétés physiologiques et moléculaires du récepteur modèle de cette thèse, le récepteur $GABA_B$.

L'acide γ-aminobutyrique (GABA) est le principal neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux central. Il interviendrait dans de nombreux processus physiologiques comme la mémorisation, le sommeil ou la dépendance aux drogues. Il apparaît qu'un dysfonctionnement du système GABAergique est à l'origine de nombreux troubles du système nerveux (Bettler et al., 2004). Ainsi, une hyperactivité de ce système est associée à la schizophrénie alors qu'une hypoactivité peut provoquer des crises d'épilepsie, d'anxiété, des états dépressifs ainsi que des troubles du sommeil. Sur la base de ce simple constat, il semble évident que la mise au point de molécules capables de réguler le fonctionnement du système GABAergique représente un enjeu majeur pour l'industrie pharmaceutique (Martin and Dunn, 2002). Sur le plan physiologique, les effets du GABA sont médiés via l'activation de récepteurs ionotropiques, $GABA_A$ et métabotropiques, $GABA_B$. Ces deux types de récepteurs sont des cibles potentielles pour le développement de nouveaux médicaments.

Les récepteurs $GABA_A$ localisés au niveau post-synaptique, sont des récepteurs - canaux laissant passer majoritairement les ions chlores au travers de la membrane plasmique. Ces récepteurs, composés de plusieurs sous-unités, sont inhibés par un antagoniste, la bicuculine, à l'exception d'une composition spécifique de sous-unité, aussi dénommée $GABA_C$ (Bormann, 2000). Dans des conditions normales, l'ouverture du pore du canal qui fait suite à la fixation du GABA, permet une entrée d'ions chlores présents en excès à l'extérieur de la cellule. Cette entrée massive d'ions négatifs, hyperpolarise la membrane plasmique rendant le passage d'une vague de potentiel d'action plus difficile. Ces récepteurs - canaux sont qualifiés d'inhibiteurs. Ils sont impliqués dans des effets rapides en réponse au GABA.

Le récepteur $GABA_B$ existe sous deux populations se différenciant par leur fonction et leur localisation pré- ou postsynaptiques. En effet, ce récepteur hétérodimérique constitué de deux sous-unités $GABA_{B1}$ (GB1) et $GABA_{B2}$ (GB2), présente deux isoformes de GB1, GB1a et GB1b. Ces deux variants se distinguent respectivement par la présence ou non de deux domaines sushi dans leur région extracellulaire. L'isoforme GB1a est exprimée très tôt à l'issu

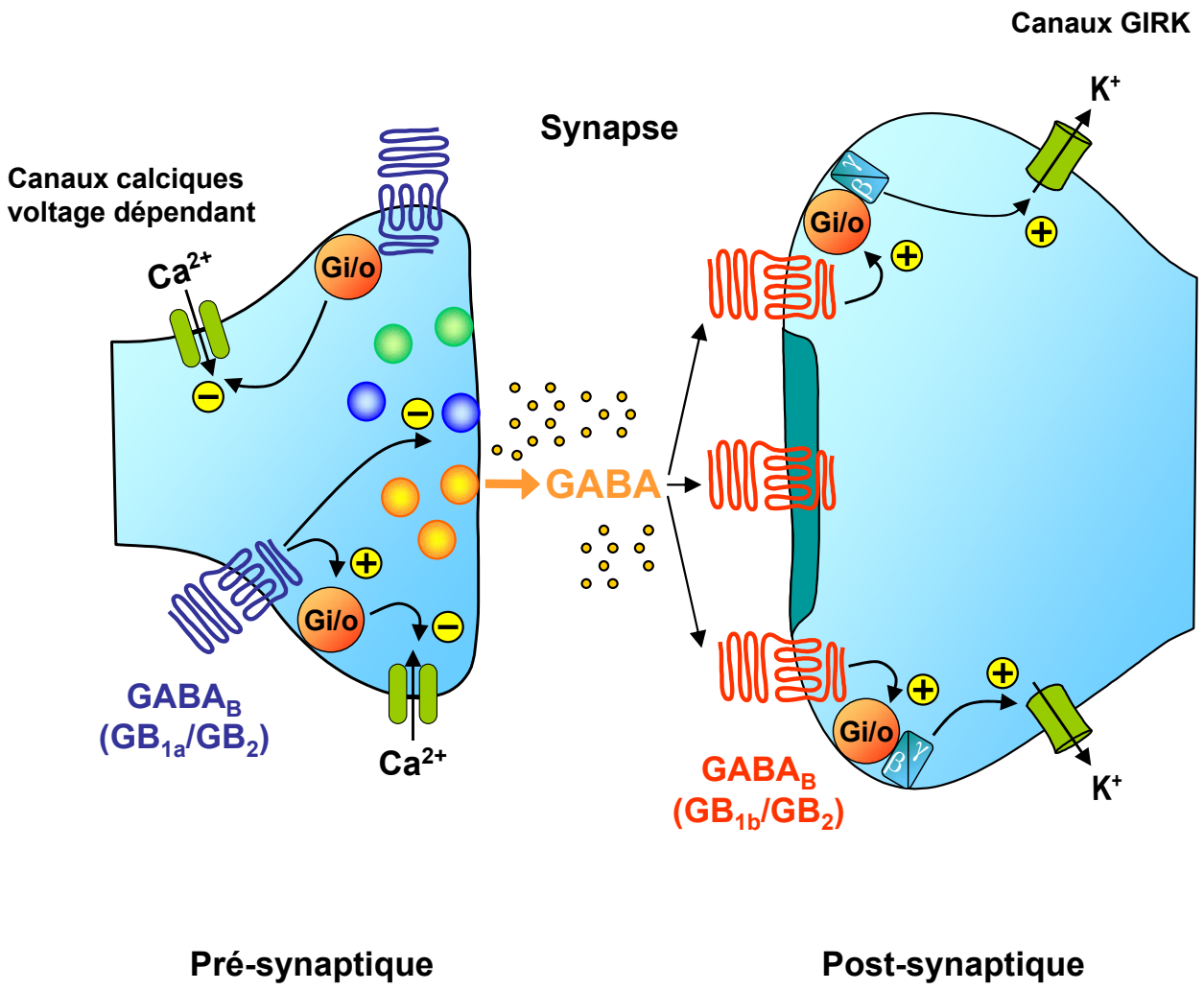


Figure VI.1 : Localisation et rôles physiologiques du récepteur $GABA_B$ au niveau des synapses. L'activation du récepteur $GABA_B$ entraîne une inhibition de l'activité de l'adénylate cyclase conjointe à une diminution du Ca^{2+} dans les neurones pré-synaptiques et une hyperpolarisation au niveau post-synaptique par sortie de K^+.

de la naissance et se localise au niveau pré-synaptique alors que GB1b est exprimée plus tardivement au niveau post-synaptique (Kaupmann et al., 1998 ; Fritschy et al., 1999 ; (Vigot et al., 2006). Globalement, ces deux populations de récepteurs sont largement distribuées dans le système nerveux central et dans les terminaisons périphériques autonomes. La population pré-synaptique semble essentiellement couplée aux canaux calciques (blocage de l'entrée de calcium) et régule l'exocytose des neurotransmetteurs présents dans les terminaisons nerveuses. L'inhibition des canaux calciques passe par des protéines Gi/o couplées au récepteur (Strock and Diverse-Pierluissi, 2004) alors que l'inhibition de l'exocytose passe par un blocage de la machinerie de fusion membranaire dont le mécanisme reste encore méconnu à ce jour (Capogna et al., 1996 ; Wu and Saggau, 1997 ; Spafford and Zamponi, 2003) **(Figure VI.1)**. La population post-synaptique semble quant à elle préférentiellement couplée aux canaux GIRK (Luscher et al., 1997). Cet effet passe par le complexe βγ, associé aux protéines Gi/o, qui favorise la sortie d'ions potassium via l'ouverture de canaux potassiques. Cette sortie d'ions positifs entraîne une hyperpolarisation des neurones post-synaptiques qui contribue à augmenter le seuil d'excitabilité du neurone (McCormick, 1989).

En 1997 le premier ADNc du récepteur $GABA_B$ fut cloné (Kaupmann et al., 1997). Ce récepteur nommé GB1, bien qu'étant capable de lier différents ligands dont le GABA, n'est pas fonctionnel car non adressé à la surface cellulaire (Couve et al., 1999). En effet, la présence d'une séquence minimale de type RSR au niveau de son domaine carboxy-terminal est responsable de sa rétention au niveau du RE. Récemment, des travaux ont permis d'identifier la liaison de protéines COPI au niveau de ce motif (Brock et al., 2005). Cette interaction avec COPI est responsable du transport rétrograde de GB1, exprimé seul, du *cis*-Golgi vers le RE. Cependant, même lorsque ce système de rétention est rendu inopérant par mutation, la sous-unité GB1 atteint la surface cellulaire seule mais ne peut activer les protéines G. Ceci suggérait qu'une autre protéine associée à GB1 était nécessaire à sa fonction.

Un an après la découverte de GB1, un récepteur homologue nommé GB2 fut cloné (Jones et al., 1998 ; Kaupmann et al., 1998 ; White et al., 1998 ; Kuner et al., 1999 ; Ng et al., 1999). Ce récepteur exprimé seul, est bien adressé à la surface cellulaire mais est incapable de lier le GABA. Lorsqu'il est co-exprimé avec GB1, il permet alors la formation d'un récepteur fonctionnel possédant toutes les propriétés décrites pour le récepteur $GABA_B$ neuronal (Marshall et al., 1999). L'identification d'un motif d'interaction de type superhélicoïdal entre

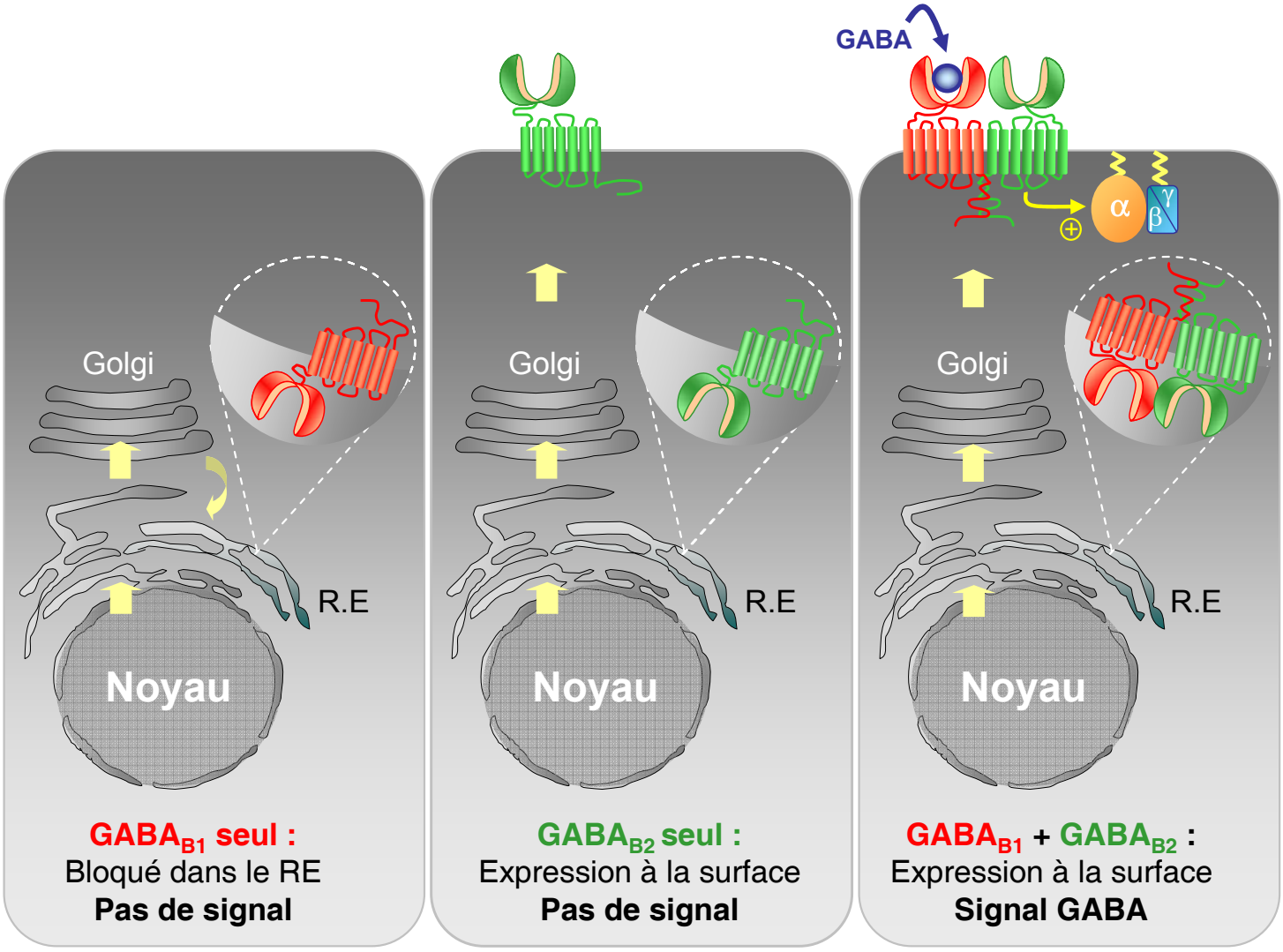


Figure VI.2 : Le récepteur GABA$_B$: un hétérodimère obligatoire. Système de contrôle de l'envoi en surface du récepteur GABA$_B$. GABA$_{B1}$ exprimée seule est retenue dans le RE à cause d'une séquence de rétention RxR présente dans son domaine carboxy-terminal. GABA$_{B2}$ qui est faiblement exprimée, peut atteindre seule la membrane plasmique mais ne peut lier le GABA. Par contre, l'interaction des deux sous-unités notamment au niveau de leur extrémité C-terminale permet l'adressage à la surface cellulaire d'un hétérodimère parfaitement fonctionnel capable de lier le GABA via GABA$_{B1}$ et d'activer les protéines G via GABA$_{B2}$.

les domaines C-terminaux de GB1 et GB2 a permis de mieux comprendre le mécanisme d'adressage de l'hétérodimère à la surface cellulaire (Kammerer et al., 1999). En effet, l'interaction des domaines C-terminaux de GB1 et GB2, à l'issue de leur synthèse dans le RE, conduirait à la formation de la structure superhélicoïdale essentielle au masquage du motif RSR présent chez GB1. Cette interaction ne permettrait pas aux protéines COPI d'accéder à ce motif, favorisant ainsi l'envoi en surface de l'hétérodimère (Bouvier, 2001 ; Pin et al., 2004) **(Figure VI.2)**.

Toutefois, GB2 n'a pas qu'un rôle de protéine d'adressage. En effet, GB1 muté en son site de rétention, nommé $GB1_{ASA}$, atteint seul la surface cellulaire (Pagano et al., 2001). Cette sous-unité reconnaît les ligands (Galvez et al., 1999, 2000) mais n'active pas les protéines G. La sous-unité GB2 est donc indispensable à la fonctionnalité du récepteur. En fait, il semble que ce soit GB2 qui se couple aux protéines G (Duthey et al., 2002 ; Galvez et al., 2002). Ces données supportent donc l'hypothèse d'une trans-activation allostérique du récepteur $GABA_B$. Ainsi, ce serait la liaison du GABA sur GB1 qui conduirait à l'adoption par GB2 d'une conformation favorable à un couplage aux protéines G (Galvez et al., 2001).

Cette interaction GB1/GB2 semble très spécifique. Cependant, les deux sous-unités généralement colocalisées dans la plupart des régions du cerveau (Bischoff et al., 1999) se retrouvent parfois exprimées dans des régions distinctes (Jones et al., 1998 ; Kaupmann et al., 1998 ; Kuner et al., 1999).). La sous-unité GB1 a été ainsi retrouvée dans certaines régions du cerveau n'exprimant pas la sous-unité GB2. Ce dernier point ne permet donc pas d'exclure que GB1 puisse présenter des rôles indépendants de GB2 qui sont encore indéterminés à ce jour.

La particularité des récepteurs de classe C vient de la structure de leur domaine N-terminal extracellulaire où se fixe le ligand. En effet, la résolution de la structure de ce domaine pour un récepteur (mGlu1) (Kunishima et al., 2000) de la même famille que le récepteur $GABA_B$ montre qu'il s'agit de deux lobes se faisant face (Kaupmann et al., 1997 ; Galvez et al., 1999) **(Figure VI.3)**. Ces lobes sont capables de se refermer sur le ligand agoniste à l'image de la fermeture des deux lobes de la dionée (plante carnivore appelée aussi « gobe mouche ») au contact d'un insecte. Ainsi, alors que la forme ouverte semble prépondérante en l'absence de ligand, la fixation d'une molécule agoniste au niveau de ces domaines stabiliserait la forme fermée. La résolution des structures cristallographiques des domaines externes de mGlu1, en présence ou absence d'agoniste, a permis de montrer que cette fermeture s'accompagne d'un

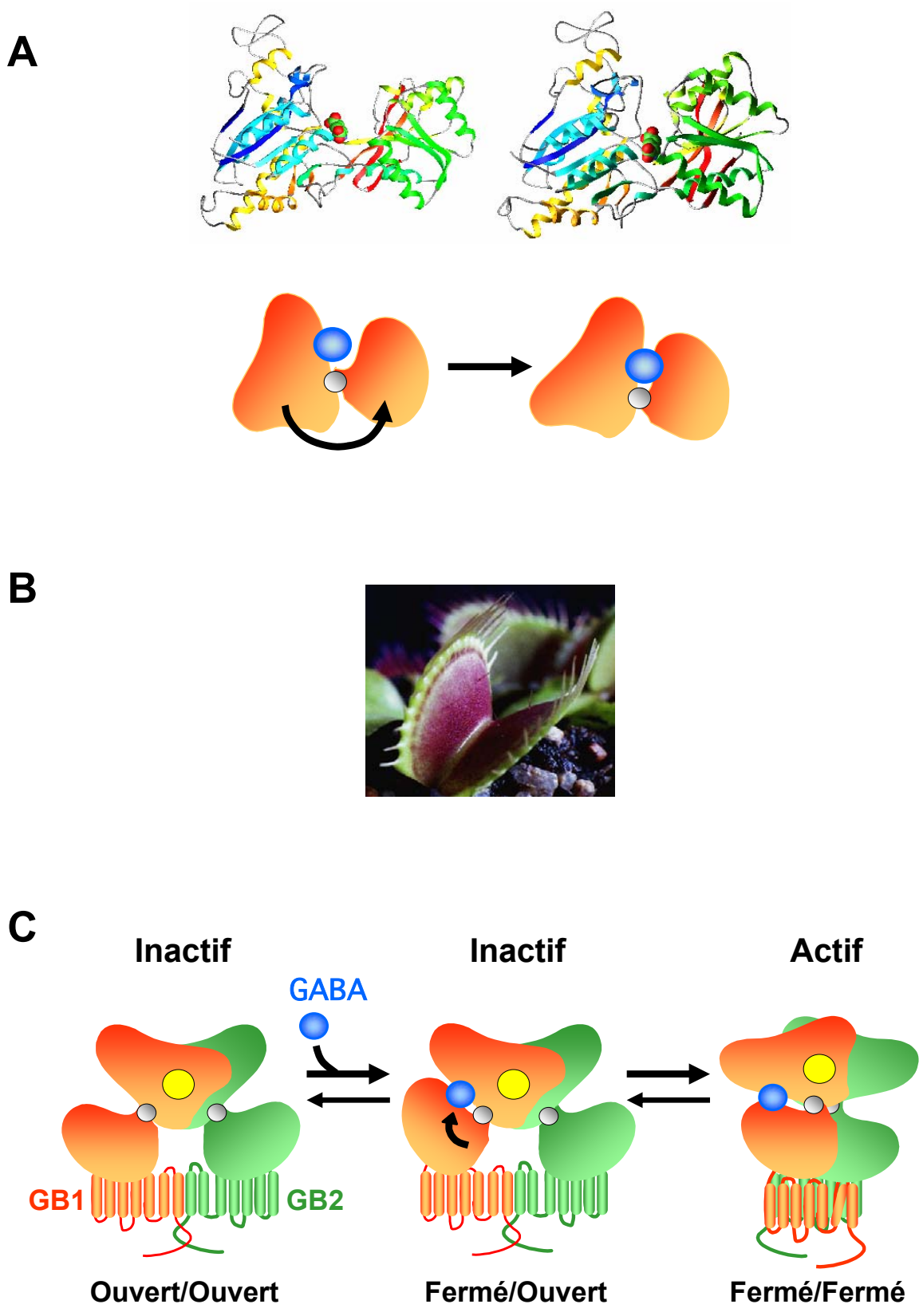


Figure VI.3 : Modèle de fonctionnement du domaine extracellulaire (DEC) du récepteur $GABA_B$. A. La liaison d'un agoniste (en bleu) au niveau de GB1 stabilise la forme fermée du DEC. **B.** La dionée (de son nom anglais Venus Flytrap) qui a donné son nom à ce DEC. **C.** Modèle d'activation du récepteur $GABA_B$ (d'après Pin et al., 2004).

changement conformationnel aboutissant à une modification de l'orientation relative des deux protomères. Ce mouvement de grande amplitude entre sous-unités permettrait le passage à l'état actif du domaine heptahélice conduisant à l'activation des protéines G. Pour plus d'informations sur le mécanisme d'activation du récepteur $GABA_B$, voir la revue de Pin et coll. (Pin et al., 2004).

Application de la technologie HTRF à la détection d'interactions protéiques : homo-, hétéro- et oligomérisation du récepteur $GABA_B$.

VII-A) Détection de dimères du récepteur $GABA_B$ à la surface cellulaire.

VII-A.1) Contexte et but.

En 1999, la stœchiométrie d'assemblage d'un isoforme du récepteur $GABA_A$ est analysée par une approche de FRET (Farrar et al., 1999). En ciblant spécifiquement les différentes sous-unités du récepteur avec des anticorps couplés à des molécules fluorescentes, les auteurs déterminent en TR-FRET (Time-Resolved FRET) la composition en sous-unités de cette isoforme. Deux années plus tard, l'équipe de Milligan utilise la même stratégie pour démontrer l'homodimérisation du récepteur δ opiacé à la surface cellulaire (McVey et al., 2001). Le principal avantage de cette méthodologie est de pouvoir analyser uniquement des interactions de surface tout en bénéficiant d'une grande sensibilité de détection du signal (cf. chapitre III-D.3). Toutefois, il était essentiel de simplifier la procédure expérimentale pour que cette technique puisse être transférée sur des tests à plus grande échelle. Nous avons donc initié un travail d'optimisation permettant de réaliser ces expériences dans un format microplaque et en phase homogène (sans étape de lavage) afin de satisfaire aux exigences du marché de criblage pour les sociétés pharmaceutiques. La première partie de mon travail de thèse a donc consisté à mettre au point un test de détection d'interactions protéiques à la surface cellulaire selon les conditions décrites précédemment. L'enjeu de ce projet était aussi de démontrer que la technologie HTRF (Homogeneous Time Resolved Fluorescence), principalement utilisée jusque là dans des systèmes de compétition sur lysats cellulaires, pouvait aussi être adaptée à des formats non invasifs de détection sur cellules intactes. Pour atteindre cet objectif nous avons choisi de valider cette approche en révélant l'hétérodimère fonctionnel $GABA_B$ à la surface cellulaire (cf. chapitre V).

VII-A.2) Article : "Cell surface detection of membrane protein interaction with HTRF technology".

Available online at www.sciencedirect.com
SCIENCE DIRECT®
Analytical Biochemistry 329 (2004) 253–262
ANALYTICAL BIOCHEMISTRY
www.elsevier.com/locate/yabio

Cell surface detection of membrane protein interaction with homogeneous time-resolved fluorescence resonance energy transfer technology

Damien Maurel,[a,b] Julie Kniazeff,[b] Gérard Mathis,[a] Eric Trinquet,[a] Jean-Philippe Pin,[b] and Hervé Ansanay[a,*]

[a] *Cis Bio International, BP 84175, 30204 Bagnols sur Ceze Cedex, France*
[b] *UPR 2580 CNRS, 141 Rue de la Cardonille, 34094 Montpellier Cedex 5, France*

Received 10 December 2003
Available online 30 April 2004

Abstract

Direct or indirect interactions between membrane proteins at the cell surface play a central role in numerous cell processes, including possible synergistic effects between different types of receptors. Here we describe a method and tools to analyze membrane protein–protein interaction at the surface of living cells. This technology is based on the use of specific antibodies directed against each partner and labeled either with europium cryptate or with Alexa Fluor 647. This allows the measurement of a fluorescence resonance energy transfer (FRET) signal in a time-resolved manner if both antibodies are in close proximity. This approach is here validated using the heterodimeric γ-aminobutyrate B receptor as a model. We show that after washing out the unbound antibodies, the time-resolved FRET signal can be measured together with the expression level of both partners via the quantification of the donor and the acceptor fluorophores bound to the cells. Thanks to the high sensitivity of this method and to the low concentration of antibodies required, we show that the signal can also be measured directly after the incubation period without washing out the unbound antibody (homogeneous time-resolved FRET). As such, this method is highly sensitive, reproducible, and compatible with the development of high-throughput screening protocols.
© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Protein–protein interactions, either direct or indirect, play a central role in numerous cellular processes. Although this is the subject of intense research for intracellular proteins, less is known for the membrane proteins at the cell surface. Indeed, a number of regulatory processes have been recently shown to result from the direct association of membrane proteins, either via their direct interaction or through intracellular scaffolding proteins [1–6]. Such interactions likely have important consequences in the integration of simultaneous extracellular signals via synergistic effects between the activities of these interacting proteins. It is therefore of importance to develop tools and technologies that can be used to analyze selectively interactions between membrane proteins at the cell surface.

Up to now, interactions between membrane proteins have been examined through biochemical approaches such as migration of protein complexes in SDS–PAGE or coimmunoprecipitation studies [7]. Enzyme complementation assays have also been used successfully to demonstrate protein–protein interaction in living cells [8]. Within the last few years, FRET[1] methodologies are being commonly used to measure molecular proximity. These methods need labeling of target proteins with a pair of donor and acceptor fluorophores. This can be

* Corresponding author. Fax: +33-466-791-947.
E-mail address: hansanay@cisbiointernational.fr (H. Ansanay).

[1] *Abbreviations used:* FRET, fluorescence resonance energy transfer; GFP, green fluorescent protein; BRET, bioluminescence resonance energy transfer; HTS, high-throughput screening; TR, time-resolved; HTRF, homogeneous time-resolved FRET; $GABA_B$, γ-aminobutyrate B; ER, endoplasmic reticulum; HEK, human embryonic kidney; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; HA, haemagglutin; PBP, pyridine–bipyridine; PBS, phosphate-buffered saline; IP, inositol phosphate.

0003-2697/$ - see front matter © 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.ab.2004.02.013

achieved either by genetic fusion of a cDNA encoding a fluorescent protein [9,10] or by direct chemical labeling of the proteins [11]. So far, the most commonly used methods take advantage of either the cyan and yellow variants of the green fluorescent protein (GFP) for FRET (FRET-GFP) [12] or the luciferase and GFP for bioluminescence resonance energy transfer (BRET) [13]. Although the FRET-GFP assay is well suited to imaging [14], it is not sensitive enough for direct measurement in culture wells, as requested for high-throughput screening (HTS) protocols. Whereas the BRET assay can be used in such a multiwell-plate format, the addition of coelenterazin to stimulate luciferase at a precise time before reading the signal impairs the use of this method in HTS. Finally, all these methodologies measure the association of the studied proteins in all cell compartments, leading to the possible observation of membrane protein–protein association resulting from their clustering during their trafficking to or from the plasma membrane but not necessarily from their association at the cell surface.

Recently, fluorophore-conjugated antibodies specific for extracellular epitopes (either native or engineered) of membrane proteins were used to visualize protein interaction at the cell surface of intact cells. Patel's group [15,16] used antibodies labeled with fluorescein and rhodamine to monitor the association of various types of GPCRs at the cell surface. However, FRET between these two fluorophores could be measured only by using photobleaching of the acceptor molecule, a technique not suitable for rapid measurements in a multiwell-plate format. A second group used europium-chelate and allophycocyanin protein (XL665)-conjugated antibodies [17]. The long emission lifetime allows a time-resolved (TR) measurement of the FRET signal (TR-FRET). This avoids any signal contamination generated by shorter-lived signals and makes this system very sensitive. However, the washing steps needed to extract the specific signals from the large background resulting from the use of high concentration of antibodies limited its usefulness in high-throughput analysis of membrane protein interaction.

In the present study, we examined whether the homogenous time-resolved FRET (HTRF) technology [18] (measurement of the TR-FRET signal at the end of the incubation period without washing out the unbound antibodies) using europium cryptate and Alexa Fluor 647 or europium cryptate and XL665-anti-tag-labeled antibodies can be used to visualize membrane–protein interactions at the surface of living cells. To that aim we used the γ-aminobutyrate B ($GABA_B$) receptor as a model system since this GPCR has been reported to form obligatory heterodimers composed of the $GABA_{B1}$ and $GABA_{B2}$ subunits [19]. Indeed, the $GABA_{B1}$ subunit involved in agonist binding [20,21] is naturally retained in the endoplasmic reticulum (ER) when expressed alone. The $GABA_{B2}$ subunit, responsible for G protein activation [22,23], unmasks the ER retention of $GABA_{B1}$ and thus allows the expression of the heterodimer at the cell surface [24,25].

We show here the reproducibility and the specificity of the TR-FRET method that allows the quantification of the FRET signal and the expression level of both partners in the same well. We also show that the method is sensitive enough for HTRF measurements, making it compatible with the development of HTS assays. Recently, this technology has been used to elucidate the molecular determinants involved in the allosteric control of agonist affinity within the dimeric $GABA_B$ receptor [26].

Materials and methods

Culture and transfection of human embryonic kidney (HEK 293) cells

Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Invitrogen SARL) supplemented with 10% fetal calf serum and antibiotics (penicillin and streptomycin, 100 U/ml final). The plasmids expressing the rat V_2 vasopressin receptor [27] and the $GABA_{B1}$ and $GABA_{B2}$ receptor subunits [22,23] carrying either a haemagglutin (HA) or a myc epitope at their N termini were described previously. Electroporation was performed in a volume of 300 μl with a total of 10 μg of DNA ($GABA_B$ subunits 1 and 2 plasmid DNA (2 μg each), V_2 receptor (1 μg), and carrier DNA (pRK6 to a final amount of 10 μg)) and 10 million cells in electroporation buffer (50 mM K_2HPO_4, 20 mM CH_3COOK, and 20 mM KOH, pH 7.4). After electroporation (260 V, 1 mF, Bio–Rad Gene Pulser electroporator; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), cells were resuspended in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum and antibiotics in culture dishes for 24 h.

Antibodies and labeling

The monoclonal anti-myc antibody 9E10 (ATCC No. CRL-1729) and the monoclonal anti-HA antibody 12CA5 mAb provided by Cis Bio Int. Research were labeled in house with the different fluorescent donors or acceptors. The donor was a pyridine–bipyridine (PBP) europium cryptate (europium cryptate-PBP). Such europium cryptate allows the development of HTRF assays without the addition of fluoride ions in the reaction buffer. Such ions prevent any potential fluorescence quenching effect from media [28]. However, they have to be avoided in cellular assays to ensure a perfect cellular integrity. A maleimide derivative of the europium cryptate-PBP was used to label the different antibodies as the following.

Both anti-HA and anti-myc antibodies were activated with eight equivalents of *N*-succidimidyl 3-[2-pyridylthio]propionate (Pierce) previously dissolved in ethanol (Fluka). After a 30-min incubation at room temperature,

dithiothreitol (Sigma) dithiothrectol was added at the final concentration of 10 mM in the antibody solution. Reduction step was incubated 15 min at room temperature, followed by an activated antibody purification on a Sephadex-G25 SF HR10/10 column (Pharmacia) pre-equilibrated with a 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0. Antibody labeling with europium cryptate-PBP was done with a 12-fold excess of europium cryptate-PBP per antibody. Coupling reactions were incubated for 24 h at 4 °C. Europium cryptate-PBP conjugates were purified on a G25 SF HR10/30 column (Amersham Pharmacia Biotech) pre-equilibrated with a 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0. The number of europium cryptate-PBP per antibody (molar ratio) was determined spectrophotometrically by measuring their absorbance at 280 and 317 nm and inserting the measured values into the equation

$$\text{Molar ratio} = \frac{(\mathrm{OD}_{317\,\mathrm{nm}}/\varepsilon_{\text{Europiumcryptate-PBP}})}{[(\mathrm{OD}_{280\,\mathrm{nm}} - (\mathrm{OD}_{317\,\mathrm{nm}}/A))/\varepsilon_{\text{antibody}}]},$$

where the molar extinction coefficient of the europium cryptate-PBP ($\varepsilon_{\text{europiumcryptate-PBP}}$) was taken as 18,000 M^{-1} cm^{-1} and the molar extinction coefficient of the antibodies was taken as 210,000 $\mathrm{M}^{-1}\,\mathrm{cm}^{-1}$. The factor A expressed the ratio ($\mathrm{OD}_{317\,\mathrm{nm}}/\mathrm{OD}_{280\,\mathrm{nm}}$) for europium cryptate-PBP and was determined to be 2. Molar ratio was determined to be 7 for the anti-HA.

The acceptors used were Alexa Fluor 647 (Molecular Probes) [29] or XL665. XL665 conjugates were synthesized as previously described [30]. An *N*-hydroxysuccinimide ester derivative of Alexa Fluor 647 was used to label the different antibodies previously dissolved in a carbonate buffer (0.1 M, pH 9). An excess of six Alexa Fluor 647 per antibody was used in the labeling reaction during 30 min at room temperature. Final conjugates were purified using a G25 SF HR10/10 column (Amersham Pharmacia Biotech.). The final number of dyes per antibodies was determined spectrophotometrically as described above for the europium cryptate-PBP conjugates. OD at 317 nm was replaced by an OD at 650 nm, which is the maximum of absorption for Alexa Fluor 647. The molar extinction coefficient of the Alexa Fluor 647 at 650 nm was taken as 240,000 $\mathrm{M}^{-1}\,\mathrm{cm}^{-1}$ and the factor A expressed the ratio ($\mathrm{OD}_{650\,\mathrm{nm}}/\mathrm{OD}_{280\,\mathrm{nm}}$) for Alexa Fluor 647 and was determined to be 30. Molar ratios were determined to be 3 for the anti-HA conjugate and 3 for the anti-myc conjugate.

Time-resolved fluorescence measurements and data analysis

Fluorescence emissions were monitored both at 620 nm and at 665 nm. A 400-μs integration time was used after a 50-μs delay to remove the short-lived fluorescence background from the specific signal. These were measured on a dual-wavelength (665/620 nm) time-resolved fluorimeter (RubyStar, BMG Labtechnologies) equipped with a nitrogen laser as excitation source (337 nm). Fluorescence collected at 620 nm in the TR-FRET assay was defined as the total europium cryptate signal. For TR-FRET or HTRF assays, the ratio $R = [(\text{fluorescence } 665\,\text{nm}/\text{fluorescence } 620\,\text{nm}) \times 10^4]$ was computed. Assay signals were expressed using two parameters: Delta 665 or Delta F.

Delta 665 = (positive energy transfer signal at 665 nm) − (negative energy transfer signal at 665 nm). It represents the signal released by the acceptor after the FRET process.

The specific signal over background called Delta F was calculated using the following formula: Delta $\mathrm{F} = (R_{\mathrm{pos}} - R_{\mathrm{neg}})/(R_{\mathrm{neg}})$. R_{neg} corresponded to the ratio for the negative energy transfer control, whereas R_{pos} corresponded to the ratio for the positive energy transfer control. Two types of negative controls were used when two distinct antibodies (anti-HA and anti-myc, for example) were used. First, 1 μM unlabeled anti-myc monoclonal antibodies (9E10) was added. Second, HEK 293 cells were incubated with the donor-labeled antibodies only. When both controls were performed in parallel, ratios of the fluorescence measured at 665 nm over that measured at 620 nm after excitation at 337 nm were similar. Only the second type of negative control was then performed in all experiments thereafter. When FRET signals were measured with a single type of antibody (a 1:1 mixture of anti-HA antibody labeled with the donor fluorophore and anti-HA antibody labeled with the acceptor fluorophore), the negative control was measured using a 1:1 mixture of donor-labeled and unlabeled antibodies. R_0 calculation for the FRET pair europium cryptate-PBP and the Alexa Fluor 647 was done as described [30] and determined to be ~65 Å.

Measurement of the Alexa Fluor 647 fluorescence

The total fluorescence emitted by the Alexa Fluor 647 conjugates in the TR-FRET assay was measured using an Analyst reader (Molecular Devices) equipped with the appropriate filters set (XF47; Omega Optical). The Alexa Fluor 647 fluorescence was detected at 682 nm using 640-nm excitation.

TR-FRET experiments

Cells were harvested 24 h after transfection using dissociation solution (Sigma). The trypan blue viability test and counting were routinely performed after resuspension of transfected cells. An incubation under circle rotator (different time periods performed and described in Fig. 2) was performed at 4 °C with 200,000 cells in a total volume of 200 μl containing 1 nM europium cryptate-PBP-labeled antibody and 3 nM Alexa Fluor 647-labeled antibody in PBS supplemented with SVF 25%. Cells

were then washed, resuspended in 100 μl PBS, and distributed into a 96-well microtiter plate. The different fluorescence measurements were determined as described above.

HTRF measurement

Twenty-four hours after transfection, 200,000 cells resuspended in 100 μl PBS supplemented with SVF 25% and containing 1 nM europium cryptate-PBP- and 3 nM Alexa Fluor 647-labeled antibodies were dispatched into 96-well microtiter plates. After the indicated time at 4 °C (to prevent protein clustering and to limit the antibodies aspecific fixation) the FRET signal was directly measured as described above.

Ligand-binding assay

A ligand-binding assay on intact HEK 293 cells was performed as described previously using 0.1 nM [^{125}I]CGP64213 [23] with 1 mM GABA being used to determined the nonspecific binding.

Determination of inositol phosphate accumulation

Determination of IP accumulation in transfected cells was performed in a 96-well-plate format after labeling the cells overnight with *myo*-[^{3}H]inositol (23.4 Ci/mol) as previously described [31].

Results

As a protein model system, we choose the $GABA_B$ receptor because of its heteromeric nature, allowing the unambiguous labeling of each subunit (Fig. 1). The formation of this heterodimer was previously demonstrated after transient expression of these two subunits in HEK 293 cells as shown by coimmunoprecipitation experiments and functional coupling of the reconstituted receptor to G proteins [23]. Moreover, the wild-type $GABA_{B1}$ does not reach the cell surface in HEK 293 cells unless coexpressed with $GABA_{B2}$ or mutated in its ER retention signal ($GABA_{B1}$-ASA), offering the additional possibility to check that only surface proteins are detected [24,25]. Finally, insertion of either a myc or a HA epitope after the signal peptide did not affect the expression and function of these subunits [23].

TR-FRET experiments

In a first set of experiments we examined whether the TR-FRET technology could be applied with the chosen tools to monitor the existence of $GABA_B$ heterodimers. No specific fixation of the HA antibody was observed on cells expressing the HA-$GABA_{B1}$ subunit alone, as expected since this subunit is known not to reach the cell surface in the absence of $GABA_{B2}$ (Fig. 2). In agreement with this conclusion, specific labeling of the cells with the anti-HA-europium cryptate-PBP antibody was obtained in the absence of $GABA_{B2}$ with a HA-$GABA_{B1}$ mutant ($GABA_{B1}$-ASA) in which the ER retention signal

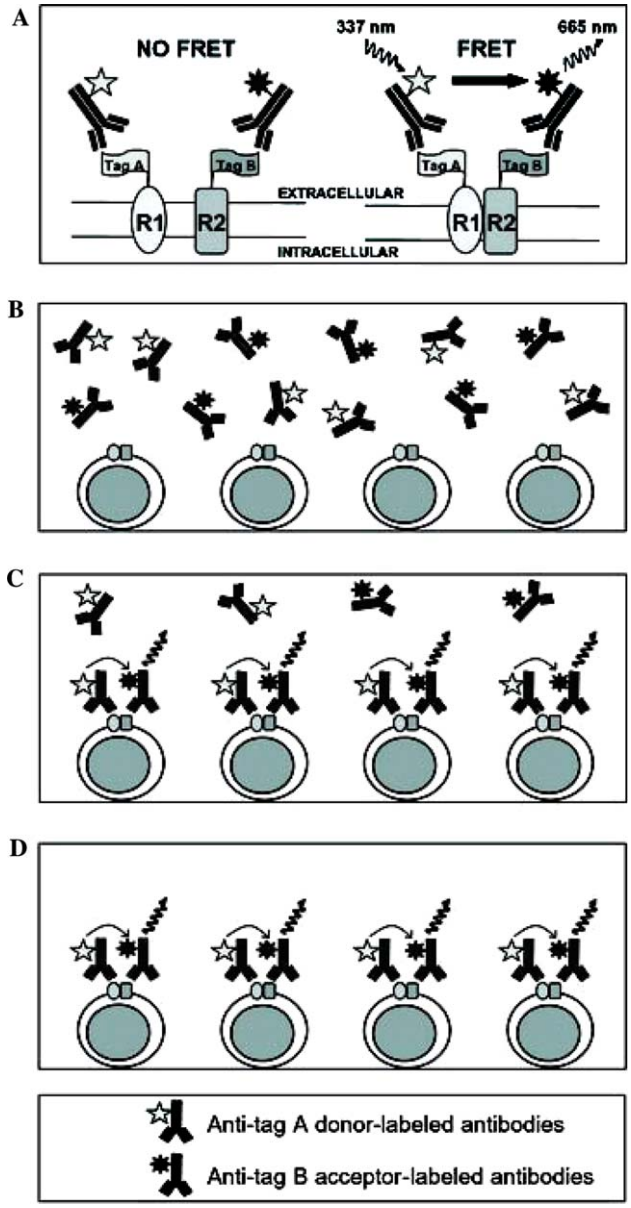


Fig. 1. (A) Model system used for the TR-FRET and HTRF protein–protein interaction assays. Two subunits constitute the dimeric protein and they carry epitope tags at their N-extracellular termini. Two conjugated antibodies were used to generate a FRET signal if the tandem pair was in close proximity. Finally, the energy transfer from europium cryptate-labeled anti-tag A antibodies to Alexa Fluor 647-labeled anti-tag B antibodies was evaluated (see Materials and methods). (B) Incubation of the antibodies with cells in TR-FRET and HTRF assays. (C) FRET signal in HTRF assays was measured without washing steps, making it compatible with the development of HTS assays. (D) FRET signal in TR-FRET assays was measured after washing steps. The fluorescence generated by the bound antibody is directly proportional to the amount of receptors at the cell surface.

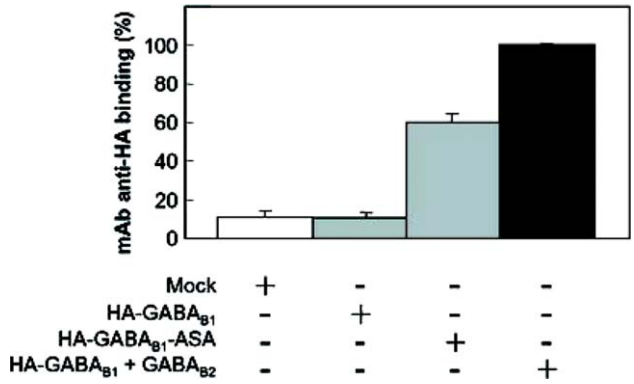


Fig. 2. Binding of the HA mAb was performed on HEK 293 cells transiently transfected (mock, HA-GABA$_{B1}$ alone, HA-GABA$_{B1}$-ASA, or HA-GABA$_{B1}$ and GABA$_{B2}$). The maximal binding (100%) corresponds to the heterodimeric GABA$_B$ format and the nonspecific binding is revealed on the mock. No specific fixation of the HA antibody was detected on cells expressing only the HA-GABA$_{B1}$ subunit whereas the HA-GABA$_{B1}$-ASA mutant able to reach the cell surface alone was unambiguously detected. Histobars represent the mean ± SD of quadruplicates of a representative experiment from three distinct experiments.

(RSRR) is mutated into ASAR [24]. This confirms that binding of the antibody relies on the presence of an extracellular epitope, such that only cell surface proteins can be detected (Fig. 2). Cells transiently expressing HA-GABA$_{B1}$ and myc-GABA$_{B2}$ were used to determine the binding conditions for the antibodies. We found that concentrations as low as 1 and 3 nM for the anti-HA-europium cryptate-PBP (donor) and anti-myc-Alexa Fluor 647 (acceptor) antibodies, respectively, were sufficient to get a large and specific signal for each fluorophore on intact cells at 4 °C. The detected fluorescence reached a plateau after 8 h incubation followed by cell washing, suggesting the saturation of the specific recognition sites of the conjugates (Figs. 3A and B). Moreover, the specific signal over background Delta F generated between the donor and the acceptor (Fig. 3C) in close proximity remains stable for at least 24 h at 4 °C. Similar data were obtained when XL665 was used as an acceptor fluorophore instead of Alexa Fluor 647 (data not shown).

We then compared the quantity of fluorescently labeled antibodies HA-GABA$_{B1}$ at the cell surface with the binding of the nonpermeant GABA$_{B1}$ radioligand [^{125}I]-CGP64213. The amount of HA-GABA$_{B1}$ at the cell surface was controlled by the quantity of GABA$_{B2}$. For this reason we coexpressed various amounts of myc-GABA$_{B2}$ subunit with a fixed amount of HA-GABA$_{B1}$. As shown in Fig. 4, a perfect correlation was found between both signals, indicating that the signal generated by the bound antibody is directly proportional to the amount of GABA$_B$ receptors at the cell surface.

Under similar conditions, the FRET signal between the bound HA-europium cryptate-PBP and the anti-myc-Alexa Fluor 647, as determined either by the Delta F (Fig. 5) or by the fluorescent signal at 665 nM (data not shown), was directly proportional to the amount of GABA$_{B1}$ at the cell surface measured with [^{125}I]-CGP64213 binding on intact cells. This confirms that the GABA$_B$ receptor is a heteromer at the cell surface and that this heteromer formation is not dependent on the amount of subunits at the cell surface, at least within the range of receptor density examined here.

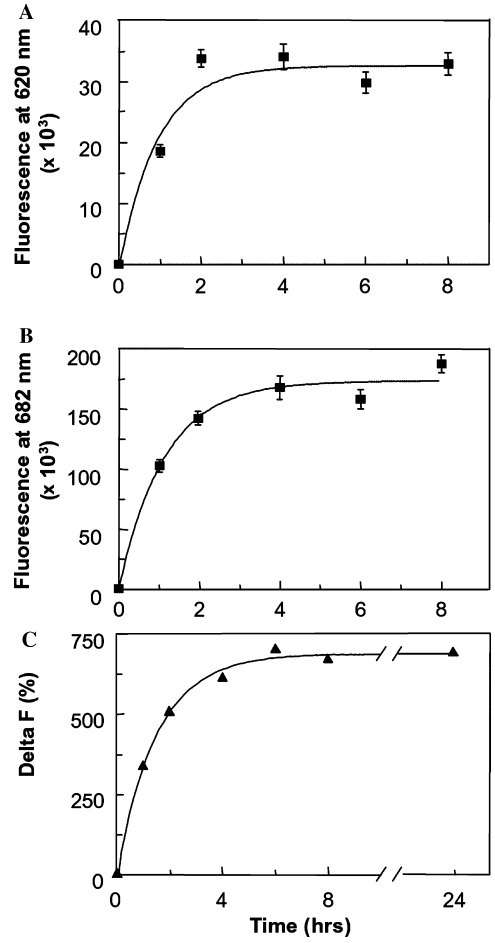


Fig. 3. Time course of binding of the two conjugated antibodies was measured as described under Materials and methods for the TR-FRET format assay. We performed binding of europium cryptate-labeled HA antibodies and Alexa Fluor 647-labeled myc antibodies on the heterodimer GABA$_B$ receptor at the HEK 293 cell surface. The fluorescence of the donor (europium cryptate-PBP) (A) and the fluorescence of the acceptor (Alexa Fluor 647) (B) were measured, respectively, at different times after washes. Finally the FRET signal over background which is assessed by the Delta F and represents the energy transfer between the two fluorophores is determined (C). Equilibrium is reached after 8 h. Each point represents the mean ± SD of quadruplicate of a representative experiment from at least four independent transfections. The lines shown through these points were calculated nonlinear regression analysis of the data points using the Prism Software package.

The presence of both anti-HA and anti-myc antibodies on the GABA$_B$ receptor subunits may possibly affect the changes in conformation required for ligand binding or activation of the receptor. However, this is very

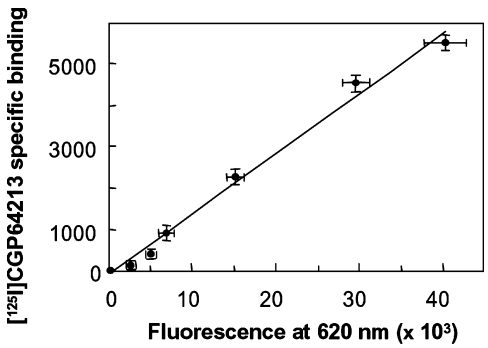


Fig. 4. Binding was determined as described under Materials and methods with the nonpermeant $GABA_{B1}$ radioligand [^{125}I]-CGP64213. HEK 293 cells were transiently cotransfected for 24 h with a fixed amount of HA-tagged $GABA_{B1}$ subunits and various amounts of myc-tagged $GABA_{B2}$ subunits. A perfect linear correlation ($R^2 = 0.9987$) was found between binding and fluorescence signals.

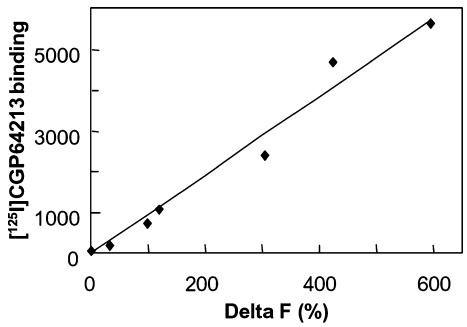


Fig. 5. FRET signal was calculated with two different ratio methods and compared to the binding on $GABA_{B1}$ at the cell surface. HEK 293 cells were transiently cotransfected for 24 h with HA-tagged $GABA_{B1}$ subunits and various amounts of myc-tagged $GABA_{B2}$ subunits. Anti-HA-europium cryptate-PBP and anti-myc-Alexa Fluor 647 antibodies were used as performed in Fig. 2. Delta F was calculated as described under Materials and methods. Linear correlation was calculated ($R^2 = 0.9733$) and reflected a direct proportion between the binding on HA-$GABA_{B1}$ with the nonpermeant radioligand [^{125}I]-CGP64213 and the fluorescence energy transfer signals between the two fluorophore on HA-$GABA_{B1}$ and myc-$GABA_{B2}$ in the TR-FRET format assay.

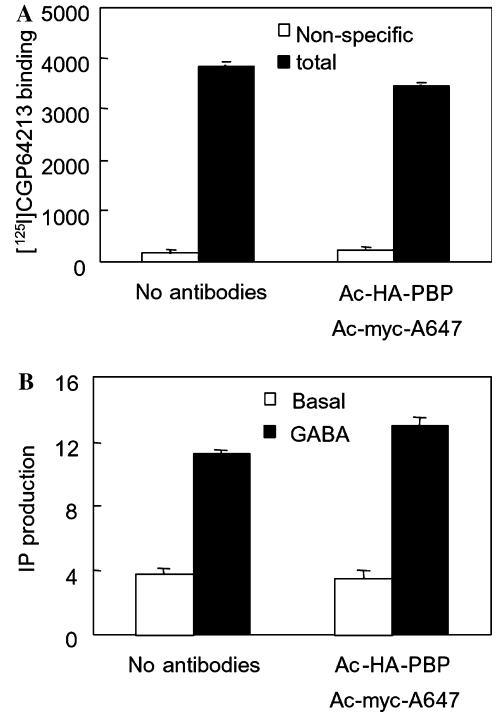


Fig. 6. (A) HEK 293 cells expressing HA-$GABA_{B1}$ and myc-$GABA_{B2}$ were preincubated or not overnight at 4 °C with saturating concentrations of anti-HA-europium cryptate-PBP and anti-myc-Alexa Fluor 647 antibodies (each at 45 nM). Then the amount of [^{125}I]-CGP64213 binding was measured on intact cells as described under Materials and methods. Histobars represent the mean ± SD of quadruplicates of a representative experiment from three distinct experiments. (B) Effect of one saturating concentration of GABA on IP formation in HEK 293 cells coexpressing HA-$GABA_{B1}$, myc-$GABA_{B2}$, and Gαqi9 is shown. Data are expressed as the IP production over the radioactivity remaining in the membrane and are means ± SD of triplicate determinations from a typical experiment. Histobars represent IP production from preincubated cells as described for (A) with or without stimulation and in presence or absence of preincubation of antibodies.

unlikely since the same amount of [^{125}I]-CGP64213 binding was measured on intact cells expressing both subunits before or after preincubation with saturating concentrations of both antibodies (each at 45 nM incubated overnight at 4 °C) (Fig. 6A). Moreover, such a cell treatment did not prevent the $GABA_B$ receptor from activating the chimeric G protein Gαqi9 that allows it to stimulate IP formation (Fig. 6B).

To verify further the specificity of the FRET signal, we examined whether such a signal can be generated with antibodies recognizing two membrane proteins that do not interact. In a first experiment, HA-$GABA_{B1}$ and nontagged $GABA_{B2}$ were coexpressed in a first set of cells, and nontagged $GABA_{B1}$ was coexpressed with myc-$GABA_{B2}$ in a second set of cells. No FRET signal was measured when both populations of cells where cocultured in the same wells (data not shown). Moreover, we also coexpressed the HA-$GABA_{B1}$-ASA mutant which can reach the cell surface alone and the vasopressin V_2 receptor tagged at its N-terminal end with a myc epitope, since these two receptors have been reported not to heterodimerize [32]. As shown in Fig. 7, a very small FRET signal was measured when these two receptors are coexpressed in the same cells. Indeed, a 10-fold higher signal was obtained in cells expressing both HA-$GABA_{B1}$-ASA and myc-$GABA_{B2}$. This difference did not result from a differential expression level at the cell surface of these different constructs, since myc-V_2 and myc-$GABA_{B2}$ proteins were expressed at a similar level as revealed by measurement of the acceptor fluorescent signal bound to the cells (Figs. 7B and C). This small signal may well be the consequence of a possible interaction of these two receptors expressed at a high level (cell density estimates for both receptors is 500,000 receptors per transfected cell). Alternatively, this may be the consequence of random transfer resulting from the relatively high probability that the two receptors can be close enough due to their high cell surface

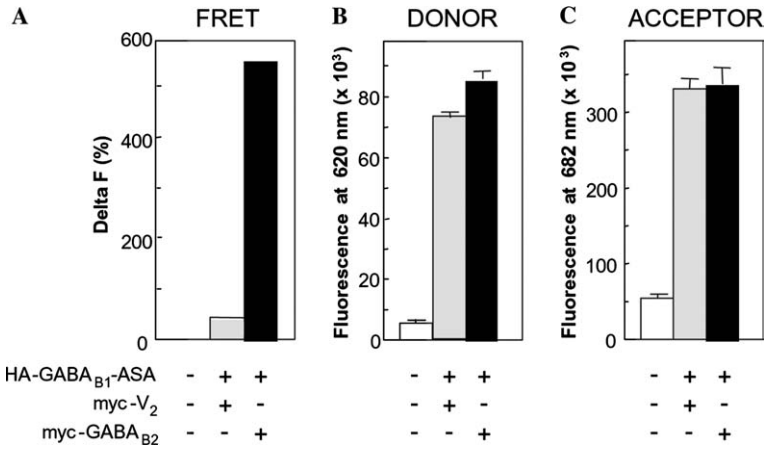


Fig. 7. (A) HEK 293 cells were transiently mock-transfected (only carrier DNA pRK6) or cotransfected with HA-GABA$_{B1}$-ASA and myc-GABA$_{B2}$ or with HA-GABA$_{B1}$-ASA and myc-V$_2$. Percentage of Delta F which represents the FRET signal over background in the TR-FRET format assay was measured in these transfected cells, revealing specificity of the fluorescence resonance energy transfer on the GABA$_B$ receptor. (B) Estimation of the receptor level carrying the HA epitope at cell surface in the cotransfected cells was performed by fluorescence measurement for the donor alone (europium cryptate-PBP coupled with HA mAb). (C) Estimation of the receptor level carrying the myc epitope at cell surface in the cotransfected cells was performed by fluorescence measurement for the acceptor alone (Alexa Fluor 647 coupled with myc mAb).

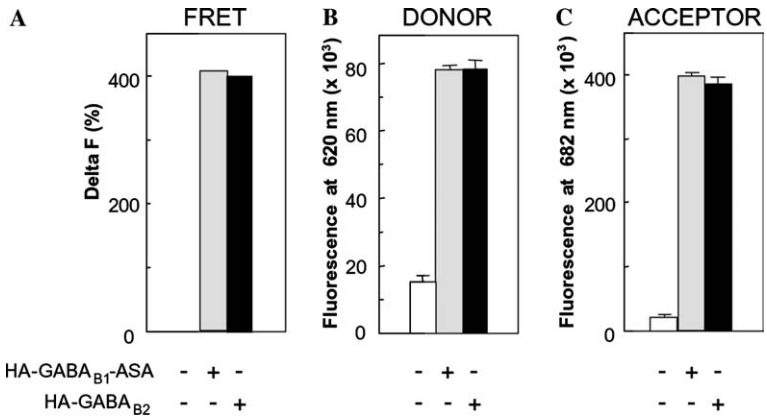


Fig. 8. HEK 293 cells were transiently mock-transfected (pRK6) or transfected with only HA-GABA$_{B1}$-ASA or HA-GABA$_{B2}$ alone. An equimolar mixture (3 nM) of HA antibodies labeled either with europium cryptate-PBP or Alexa Fluor 647 was applied on transfected cells. In the homodimeric format we attempt to loose logically 50% of the fluorescent signal because 50% of the closed combined antibodies are engaged with two donors or two acceptors. As described in the legend to Fig. 7 FRET signals represented by the Delta F and fluorescence estimation of the binding of each antibody on the HA epitope were measured. Histobars represent the mean ± SD of quadruplicates from three independent experiments.

density even though they do not physically interact with each other. Our previous study using chimeric GABA$_B$ subunits in which the extracellular domains were swapped suggested that the 7TM region of GABA$_{B2}$ could form homodimers [23,33]. We therefore examined whether the GABA$_{B1}$ and GABA$_{B2}$ subunits homooligomerize. To that aim, FRET signals were measured in cells expressing either HA-GABA$_{B1}$-ASA or HA-GABA$_{B2}$ using an equimolar mixture of HA antibodies labeled either with europium cryptate-PBP or Alexa Fluor 647. As shown in Fig. 8, a FRET signal could be detected in both cases, though smaller than that measured in cells expressing HA-GABA$_{B1}$ and HA-GABA$_{B2}$. This suggests that both GABA$_{B1}$-ASA and GABA$_{B2}$, when expressed alone, can exist as homooligomers at the cell surface. These experiments demonstrate that membrane protein association can be detected using time-resolved FRET, after labeling each protein with a specific antibody and washing out the excess of free antibodies. However, this washing step is a strong limitation in a systematic approach for detection of membrane protein association.

HTRF experiments

According to the high sensitivity of the TR-FRET signal generated and to the low concentration of the antibodies required for labeling the target proteins, we examine whether the same information could be obtained in a HTRF assay, reading the signal at the end of the incubation without removing the free antibodies. To that aim, the assay signal was measured in cells trans-

fected with HA-$GABA_{B1}$ and various amounts of myc-$GABA_{B2}$ plasmids, before (HTRF mode) or after washing the free antibodies (TR-FRET mode). Fig. 9 shows that the HTRF signal measured with Delta F within the homogeneous assay is directly proportional to the signal measured after washing. One can argue that the signal in

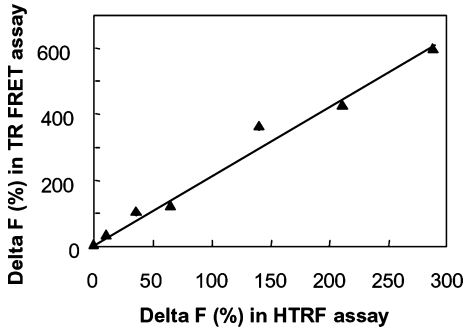


Fig. 9. HEK 293 cells were cotransfected with HA-$GABA_{B1}$ and various amounts of myc-$GABA_{B2}$ plasmids. After 8 h the HTRF signal was measured as described under Materials and methods and in the same way after washing the TR-FRET was performed. Correlation was performed in parallel between Delta F ($R^2 = 0.9809$) in these two methods.

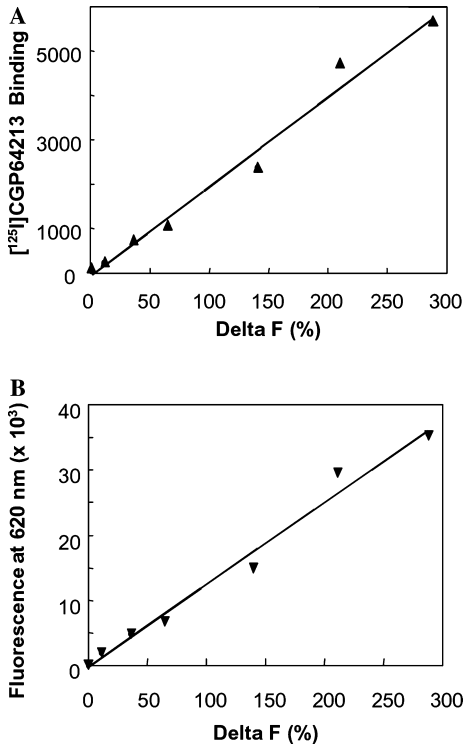


Fig. 10. HEK 293 cells were transiently cotransfected with HA-tagged $GABA_{B1}$ subunits and various amounts of myc-tagged $GABA_{B2}$ subunits. Twenty-four hours later transfected cells were incubated with anti-HA-europium cryptate-PBP and anti-myc-Alexa Fluor 647 antibodies and the HTRF signal was measured as described under Materials and methods. Linear correlations were calculated between binding (A) or fluorescence (B) on HA-$GABA_{B1}$ versus the percentage of Delta F in the HTRF format assay ($R^2 = 0.9807$ and $R^2 = 0.9846$, respectively).

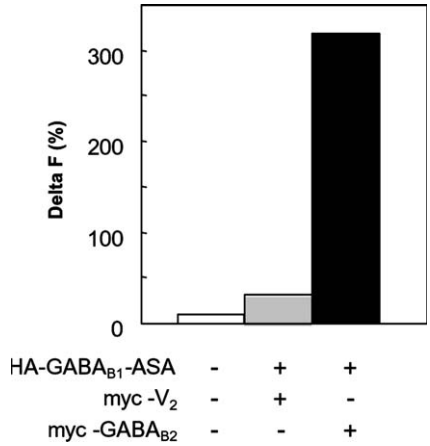


Fig. 11. HEK 293 cells were transiently mock-transfected or cotransfected with HA-$GABA_{B1}$ and myc-$GABA_{B2}$ or with HA-$GABA_{B1}$ and myc-V_2. HTRF measurements were performed as described under Materials and methods.

the TR-FRET mode was found to be twice as large than in the HTRF mode. This may be due to the removal of free residual antibodies during the washing steps in the heterogeneous assay that may increase the background. Even with the high background due to the presence of europium cryptate-PBP antibodies, the HTRF signal was found to be directly proportional to the amount of $GABA_B$ heterodimers at the cell surface (Fig. 10) and to be specific since only a small HTRF signal could be measured (10-fold lower signal) between the myc-V_2 and the HA-$GABA_{B1}$-ASA receptors (Fig. 11). For these HTRF experiments, similar data were also obtained using XL665 as acceptor molecule instead of Alexa Fluor 647 (data not shown).

Discussion

In this study, we examined whether a HTRF assay could be adapted to examine any possible interaction (direct or indirect) between plasma membrane proteins at the surface of living cells. For that purpose we used antibodies conjugated with europium cryptate-PBP or Alexa Fluor 647 (or XL665) as donor and acceptor fluorophores, respectively. The intrinsic fluorescence properties of these fluorophores allow monitoring of a FRET signal at 665 nm in a time-resolved manner, making this system very sensitive. Moreover, the method described below requires only nanomolar quantities of antibodies, allowing the measurement of the FRET signal in a homogenous way (HTRF) and making it compatible with the development of HTS assays.

In a first series of experiments, the TR-FRET signal was measured after washing out the unbound antibodies, as previously reported by others [17]. Using europium cryptate-PBP-labeled HA antibodies and Alexa Fluor 647-labeled myc antibodies, we were able to detect

oligomerization of HA-$GABA_{B1}$ and myc-$GABA_{B2}$subunits in living cells in a 96-well-plate format. The TR-FRET signal was observed only when the two partners were expressed in the same cells, and a 10- to 20-fold lower signal was measured when antibodies were directed against two transmembrane proteins known not to interact, the $GABA_{B1}$-ASA subunit and the vasopressin V_2 receptor [32]. This clearly demonstrates the specificity of this approach. Moreover, no binding of the HA antibodies could be detected with the wild-type HA-$GABA_{B1}$ subunit expressed alone. Since this subunit is known not to reach the plasma membrane alone, this further demonstrates that the assay is specific for the detection of extracellular epitopes.

The TR-FRET signal measured between the $GABA_{B1}$ and the $GABA_{B2}$ subunits was found to be directly proportional to the amount of $GABA_{B1}$ proteins at the cell surface. This indicates that the proportion of these subunits in a dimer is not dependent on their density in the plasma membrane, at least in the range of expression levels examined here. Such an observation would be consistent with the two subunits forming constitutive and stable dimers, in agreement with their association early after their synthesis, likely in the ER [24,25]. Such an analysis also revealed that a specific signal can be detected with as low as 500 cpm of [^{125}I]-CGP64213 bound to the cells, indicative of 10 fmol of receptors per well, demonstrating the sensitivity of this method.

Not only heterodimers but also homodimers can be analyzed. In the latter case we used equal amounts of europium cryptate-PBP- and Alexa Fluor 647-labeled anti-HA antibodies. This allowed us to show that both $GABA_{B1}$-ASA (the $GABA_{B1}$ mutant that can reach the cell surface alone), and $GABA_{B2}$ can form homodimers at the cell surface. Since no consistent functioning of the $GABA_{B1}$-ASA was reported [24,25], our data show that this is not due to the inability of this subunit to exist in a homodimeric form in the plasma membrane.

Our data also revealed that bound antibodies do not affect the ligand binding and G protein coupling of the $GABA_B$ receptor. However, the FRET signal measured on intact cells was affected neither by agonists nor by antagonists (data not shown), consistent with the notions that the $GABA_B$ receptor is a constitutive dimer and that ligand binding does not affect this process. Although agonist binding unlikely modifies the proportion of dimers at the cell surface, a possible large change in conformation may also result in a change in FRET signal, due either to a change in the distance between the two fluorophores or to a change in their relative orientation. Based on the crystal structure of the dimer of the ligand binding domain of the metabotropic glutamate receptor 1 (a receptor homologous to the $GABA_B$ receptor), a large change in conformation of the dimer of extracellular domains of the $GABA_B$ subunits is expected [34]. However, such a change in conformation is unlikely to be detected by our approach for several reasons. First, several (three to seven) fluorophores are usually linked to each antibody molecule, such that a positive change in the transfer efficacy between one donor and one acceptor molecule can be compensated by a negative change for another donor/acceptor pair. Second, the position of the antibody on each subunit is likely highly variable over time, making more difficult the detection of conformational changes. Third, the position of the fluorophore is not known and is unlikely the same for all antibody molecules. Finally, the change in conformation may be too small compared to the Foster's radius (R_0) of the fluorophore pair to be detected by such an approach.

Taking advantage of the high sensitivity of this assay and the low concentration of antibodies required for saturation of the recognized epitopes, the TR-FRET signal can also be measured in a homogeneous assay, i.e., without washing out the unbound antibodies (HTRF assay). Indeed, our data revealed that the signal measured under these conditions is even higher than that measured after washing, likely because some cells and some bound antibodies are lost during the washing step. Again, our data show that the signal is specific and the technique is sensitive. Such a technology is therefore well suited to rapid examination of protein–protein interaction and is compatible with an HTS format. Such an assay may prove to be useful for the screening of mutant subunits no longer interacting with each other and for the screening of other transmembrane or extracellular partners of these subunits. Other biological processes such as a dynamic association of membrane proteins upon activation of specific cellular pathways or ligand occupation of any of the studied partners can also be rapidly examined with this technique. This assay may also be of interest in the search for molecules able to modify the oligomerization state of transmembrane proteins. Such methodology has many potential fields of applications, as illustrated by the recent elucidation of the molecular determinants involved in the allosteric control of agonist affinity within the dimeric $GABA_B$ receptor [26]. With the help of powerful and well-designed antibodies raised against extracellular epitopes of two putative partners, this HTRF technology may be reasonably extended to wild-type native proteins. This will undoubtedly lead many researchers to investigate the mechanisms underlying numerous oligomeric assemblies.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Action Concertée Incitative "Molécules et Cibles Thérapeutiques" from the French government, and Cis Bio International (DIVT 2035–CNRS 751869/00) (Marco-

ule, France). The authors also thank K. Kaupmann and W. Froestl (Novartis Pharma, Basel, Switzerland) who allowed us to use [^{125}I]-CGP64213. We thank Drs. L. Prézeau and T. Durroux for constructive discussions and constant support throughout this work and C. Vannier for her technical assistance.

References

[1] S.G. Grant, T.J. O'Dell, Multiprotein complex signaling and the plasticity problem, Curr. Opin. Neurobiol. 11 (2001) 363–368.
[2] H.J. Kreienkamp, Organization of G-protein-coupled receptor signalling complexes by scaffolding proteins, Curr. Opin. Pharmacol. 2 (2002) 581–586.
[3] H. Gu, B.G. Neel, The 'Gab' in signal transduction, Trends Cell Biol. 13 (2003) 122–130.
[4] C. Nourry, S.G. Grant, J.P. Borg, PDZ domain proteins: plug and play!, Sci. STKE 2003 (2003) RE7.
[5] M. Sheng, M.J. Kim, Postsynaptic signaling and plasticity mechanisms, Science 298 (2002) 776–780.
[6] M. Bouvier, Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors, Nat. Rev. 2 (2001) 274–286.
[7] A. Salahpour, S. Angers, M. Bouvier, Functional significance of oligomerization of G-protein-coupled receptors, Trends Endocrinol. Metab. 11 (2000) 163–168.
[8] I. Remy, I.A. Wilson, S.W. Michnick, Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change, Science 283 (1999) 990–993.
[9] S. Angers, A. Salahpour, E. Joly, S. Hilairet, D. Chelsky, M. Dennis, M. Bouvier, Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97 (2000) 3684–3689.
[10] B. Pollock, R. Heim, Using GFP in FRET-based applications, Trends Cell Biol. 9 (1999) 57–60.
[11] F.S. Wouters, P.J. Verveer, P.I.H. Bastiaens, Imaging biochemistry inside cells, Trends Cell Biol. 11 (2001) 203–211.
[12] A. Miyawaki, Visualization of the spatial and temporal dynamics of intracellular signaling, Dev. Cell 4 (2003) 295–305.
[13] Y. Xu, D.W. Piston, C.H. Johnson, A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: application to interacting circadian clock proteins, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (1999) 151–156.
[14] I. Majoul, M. Straub, R. Duden, S.W. Hell, H.D. Soling, Fluorescence resonance energy transfer analysis of protein–protein interactions in single living cells by multifocal multiphoton microscopy, J. Biotechnol. 82 (2002) 267–277.
[15] M. Rocheville, D.C. Lange, U. Kumar, S.C. Patel, R.C. Patel, Y.C. Patel, Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity, Science 288 (2000) 154–157.
[16] M. Rocheville, D.C. Lange, U. Kumar, R. Sasi, R.C. Patel, Y.C. Patel, Subtypes of the somatostatin receptor assemble as functional homo- and heterodimers, J. Biol. Chem. 275 (2000) 7862–7869.
[17] M. McVey, D. Ramsay, E. Kellett, S. Rees, S. Wilson, A.J. Pope, G. Milligan, Monitoring receptor oligomerization using time-resolved fluorescence resonance energy transfer and bioluminescence resonance energy transfer. The human delta-opioid receptor displays constitutive oligomerization at the cell surface, which is not regulated by receptor occupancy, J. Biol. Chem. 276 (2001) 14092–14099.
[18] G. Mathis, Probing molecular interactions with homogeneous techniques based on rare earth cryptates and fluorescence energy transfer, Clin. Chem. 41 (1995) 1391–1397.
[19] F.H. Marshall, K.A. Jones, K. Kaupmann, B. Bettler, GABAB receptors—the first 7TM heterodimers, Trends Pharmacol. Sci. 20 (1999) 396–399.
[20] J. Kniazeff, T. Galvez, G. Labesse, J.-P. Pin, No ligand binding in the GB2 subunit of the $GABA_B$ receptor is required for activation and allosteric interaction between the subunits, J. Neurosci. 22 (2002) 7352–7361.
[21] T. Galvez, L. Prézeau, G. Milioti, M. Franek, C. Joly, W. Froestl, B. Bettler, H.-O. Bertrand, J. Blahos, J.-P. Pin, Mapping the agonist binding site of GABAB type 1 subunit sheds light on the activation process of GABAB receptors, J. Biol. Chem. 275 (2000) 41166–41174.
[22] B. Duthey, S. Caudron, J. Perroy, B. Bettler, L. Fagni, J.-P. Pin, L. Prézeau, A single subunit (GB2) is required for G-protein activation by the heterodimeric GABAB receptor, J. Biol. Chem. 277 (2002) 3236–3241.
[23] T. Galvez, B. Duthey, J. Kniazeff, J. Blahos, G. Rovelli, B. Bettler, L. Prézeau, J.-P. Pin, Allosteric interactions between GB1 and GB2 subunits are required for optimal GABAB receptor function, EMBO J. 20 (2001) 2152–2159.
[24] A. Pagano, G. Rovelli, J. Mosbacher, T. Lohmann, B. Duthey, D. Stauffer, D. Ristig, V. Schuler, I. Meigel, C. Lampert, T. Stein, L. Prézeau, J. Blahos, J.-P. Pin, W. Froestl, R. Kuhn, J. Heid, K. Kaupmann, B. Bettler, C-terminal interaction is essential for surface trafficking but not for heteromeric assembly of $GABA_B$ receptors, J. Neurosci. 21 (2001) 1189–1202.
[25] M. Margeta-Mitrovic, Y.N. Jan, L.Y. Jan, A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization, Neuron 27 (2000) 97–106.
[26] J. Liu, D. Maurel, S. Etzol, I. Brabet, H. Ansanay, J.-P. Pin, P. Rondard, Molecular determinants involved in the allosteric control of agonist affinity in GABAB receptor by the GABAB2 subunit, J. Biol. Chem. 279 (2004) 15824–15830.
[27] Y. Ala, D. Morin, B. Mouillac, N. Sabatier, R. Vargas, N. Cotte, M. Dechaux, C. Antignac, M.F. Arthus, M. Lonergan, M.S. Turner, M.-N. Balestre, G. Alonso, M. Hibert, C. Barberis, G.N. Hendy, D.G. Bichet, S. Jard, Functional studies of twelve mutant V2 vasopressin receptors related to nephrogenic diabetes insipidus: molecular basis of a mild clinical phenotype, J. Am. Soc. Nephrol. 9 (1998) 1861–1872.
[28] H. Bazin, E. Trinquet, G. Mathis, Time resolved amplification of cryptate emission: a versatile technology to trace biomolecular interactions, Rev. Mol. Biotech. 82 (2002) 233–250.
[29] G. Anderson, N. Nerurkar, Improved fluoroimmunoassays using the dye Alexa Fluor 647 with the RAPTOR, a fiber optic biosensor, J. Immunol. Methods 271 (2002) 17–24.
[30] E. Trinquet, F. Maurin, M. Preaudat, G. Mathis, Allophycocyanin 1 as a near-infrared fluorescent tracer: isolation, characterization, chemical modification, and use in a homogeneous fluorescence resonance energy transfer system, Anal. Biochem. 296 (2001) 232–244.
[31] J. Kniazeff, P.-P. Saintot, C. Goudet, J. Liu, A. Charnet, G. Guillon, J.-P. Pin, Locking the dimeric GABAB G-protein coupled receptor in its active state, J. Neurosci. 24 (2004) 370–377.
[32] S. Terrillon, T. Durroux, B. Mouillac, A. Breit, M.A. Ayoub, M. Taulan, R. Jockers, C. Barberis, M. Bouvier, Oxytocin and vasopressin V1a and V2 receptors form constitutive homo- and heterodimers during biosynthesis, Mol. Endocrinol. 17 (2003) 677–691.
[33] M. Havlickova, L. Prezeau, B. Duthey, B. Bettler, J.-P. Pin, J. Blahos, The intracellular loops of the GB2 subunit are crucial for G-protein coupling of the heteromeric gamma-aminobutyrate B receptor, Mol. Pharmacol. 62 (2002) 343–350.
[34] N. Kunishima, Y. Shimada, Y. Tsuji, T. Sato, M. Yamamoto, T. Kumasaka, S. Nakanishi, H. Jingami, K. Morikawa, Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor, Nature 407 (2000) 971–977.

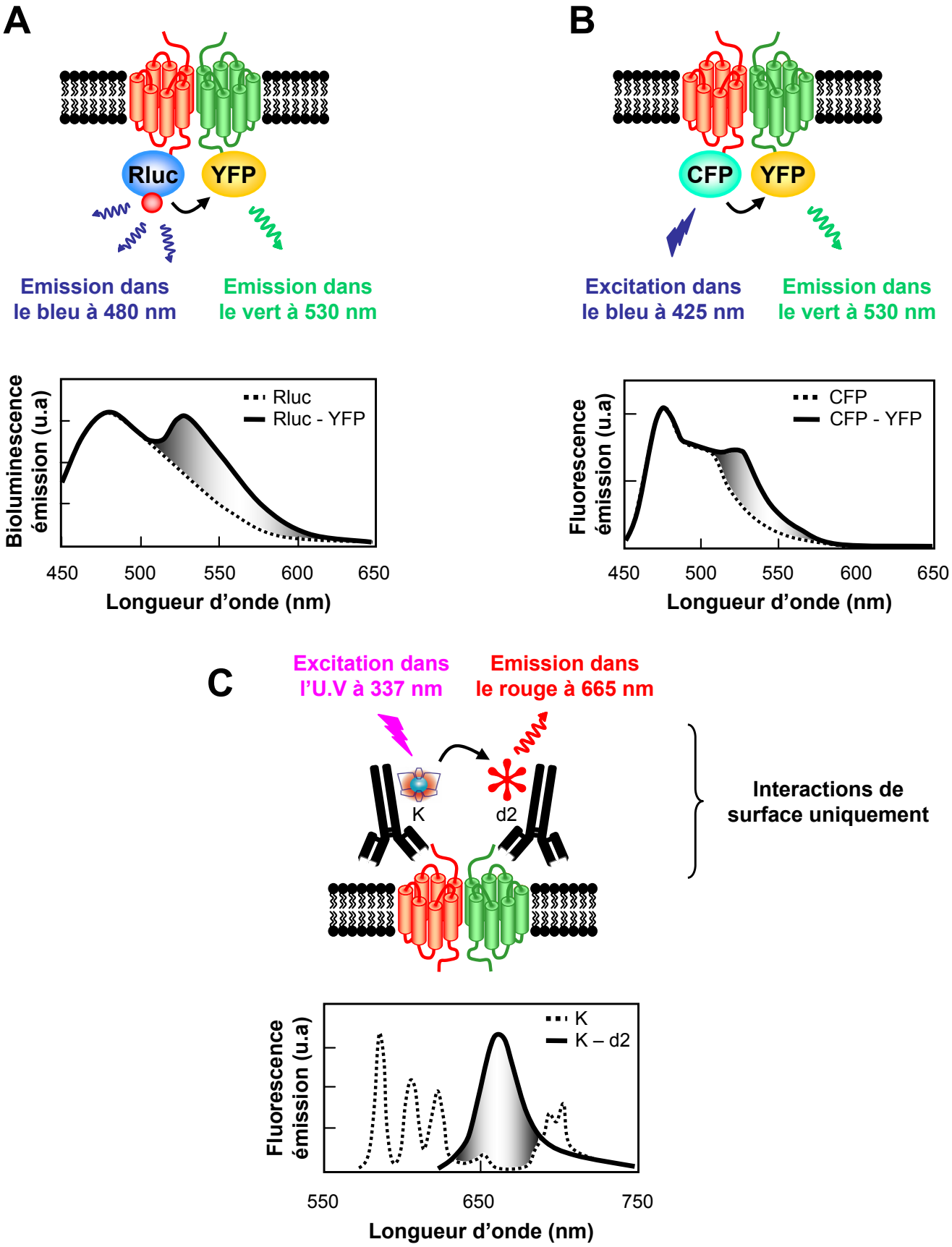


Figure VII.1 : Les techniques de transfert d'énergie. A. BRET : transfert d'énergie entre la Renilla luciférase (Rluc) et la YFP (Yellow Fluorescent Protein). **B. FRET** : transfert d'énergie entre la CFP (Cyan Fluorescent Protein) et la YFP. **C. TR-FRET :** transfert d'énergie en temps résolu entre un cryptate de terre rare (K) et une petite molécule organique (d2, Cy5 ou A647).

Dans cette étude nous avons démontré que la technologie HTRF peut s'appliquer à la détection d'interactions protéiques à la surface de cellules vivantes. Nous avons ainsi révélé l'association des sous-unités GB1 et GB2 du récepteur $GABA_B$. Trois points essentiels distinguent la méthode HTRF des méthodes de transfert d'énergie classiques (FRET et BRET).

Tout d'abord, les conjugués anticorps-fluorophores peuvent être assimilés à des sondes incapables de traverser la membrane plasmique. Cette limitation est dans ce cas précis un atout. En effet, seuls les récepteurs matures envoyés à la surface cellulaire sont détectés **(Figure VII.1.C)**. Dans les systèmes recombinants d'expression, la surexpression des protéines se traduit généralement par une fraction non négligeable de récepteurs présents dans les compartiments intracellulaires. Cette accumulation conduit à une augmentation du bruit de fond lorsque les fluorophores sont génétiquement fusionnées aux protéines d'intérêt (FRET et BRET). De même, la forte concentration des protéines dans ces compartiments peut générer un transfert d'énergie perturbant l'analyse des résultats.

D'autre part, l'utilisation de fluorophores avec des durées de vie d'émission de fluorescence longue (de l'ordre de la ms), par rapport à des fluorophores classiques (ns), permet de détecter le signal de FRET en temps résolu (sélectivité temporelle) (Mathis, 1993; Mathis, 1999). Il est ainsi possible de réduire les signaux parasites en appliquant un délai après l'excitation. Cette atténuation du bruit de fond améliore considérablement la sensibilité de la détection.

Enfin, les spectres d'émission du donneur et de l'accepteur présentent une bonne séparation ce qui n'est pas le cas des fluorophores classiquement utilisés pour les techniques FRET et BRET **(Figure VII.1)**. Cette sélectivité spectrale, associée au grand déplacement de Stokes du donneur, contribue à faciliter l'analyse des signaux en améliorant la sensibilité du système.

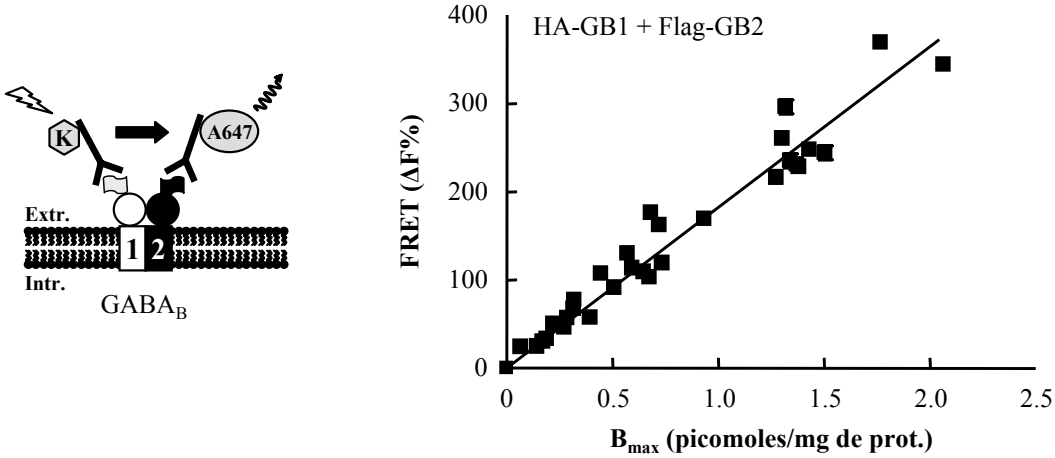


Figure VII.2 : Sensibilité de détection de l'hétérodimère GABA$_B$ à la surface cellulaire en FRET. Les cellules COS-7 ont été co-transfectées transitoirement pendant 24h avec une quantité fixe de HA-GB1 et une quantité variable de Flag-GB2. Pour chacune des transfections, le signal HTRF issu du transfert d'énergie entre un anticorps anti-HA-K et un anticorps anti-Flag-A647 a été représenté en DeltaF (%) comme décrit dans « Matériels et Méthodes » (Maurel et al., 2004). Une parfaite corrélation linéaire est observée entre la densité de récepteurs à la surface cellulaire et le signal de FRET. Les données obtenues sont la représentation de huit expériences différentes.

VII-A.3) Données expérimentales complémentaires.

- **Détermination de la sensibilité du système de détection.**

Quelle que soit la méthode choisie, la sensibilité du système de détection doit permettre, *in fine*, de révéler des interactions pour des densités de récepteurs proches des conditions physiologiques. En effet, la surexpression des protéines, associée à des R_0 en général autour de 50 Å, accentue le risque de détecter un transfert d'énergie reflétant une proximité plutôt qu'une interaction directe. Dans nos conditions, le R_0 du couple cryptate d'europium/Alexa647 est important ($R_0 \sim 65$ Å). Nous avons donc cherché à déterminer la densité minimale de récepteurs à laquelle le signal de FRET est détectable. Pour cela, des gammes d'expression du récepteur $GABA_B$ ont été réalisées de manière à évaluer la densité de récepteurs à la surface de cellules COS-7 par des expériences de saturation avec l'antagoniste radioactif [H^3]-CGP54626. **(Figure VII.2)**. Pour chaque population de cellules, le signal de FRET a été déterminé après l'incubation d'anticorps anti-HA-K et anti-Flag-A647. Ce signal, parfaitement corrélé à la densité du récepteur, est détectable pour des niveaux d'expression inférieurs à 500 femtomoles de récepteurs/mg de protéines. En conditions physiologiques, le récepteur $GABA_B$ est estimé sur des membranes totales de cerveau de rat à 3 picomoles/mg de protéines membranaires (Bischoff et al., 1999). Cette densité moyenne est largement inférieure à la densité de ces récepteurs au niveau de leur site de localisation subcellulaire en pré- et postsynaptique. La sensibilité de notre système de détection est donc parfaitement compatible avec ces niveaux.

- **Spécificité du signal HTRF.**

Une compartimentalisation des récepteurs à la surface cellulaire pourrait concentrer ces derniers dans des microdomaines permettant une proximité suffisante pour l'établissement d'un transfert d'énergie. Pour écarter cette possibilité, il est essentiel de mettre en place des contrôles appropriés. Dans cette étude, nous avons utilisé comme contrôles négatifs un RCPG, le récepteur de la vasopressine (V_2R) et un récepteur présent sur les cellules lymphocytaires, le CD4. Ces deux protéines ont été choisies car rien ne permet de supposer leur interaction avec le récepteur $GABA_B$. Dans la **Figure VII.3**, nous nous sommes placés à des niveaux d'expression de l'ordre de 2 picomoles de récepteurs $GABA_B$/mg de protéines en présence de densité équivalente de CD4 ou V_2R. Pour des niveaux d'expression équivalents, on constate

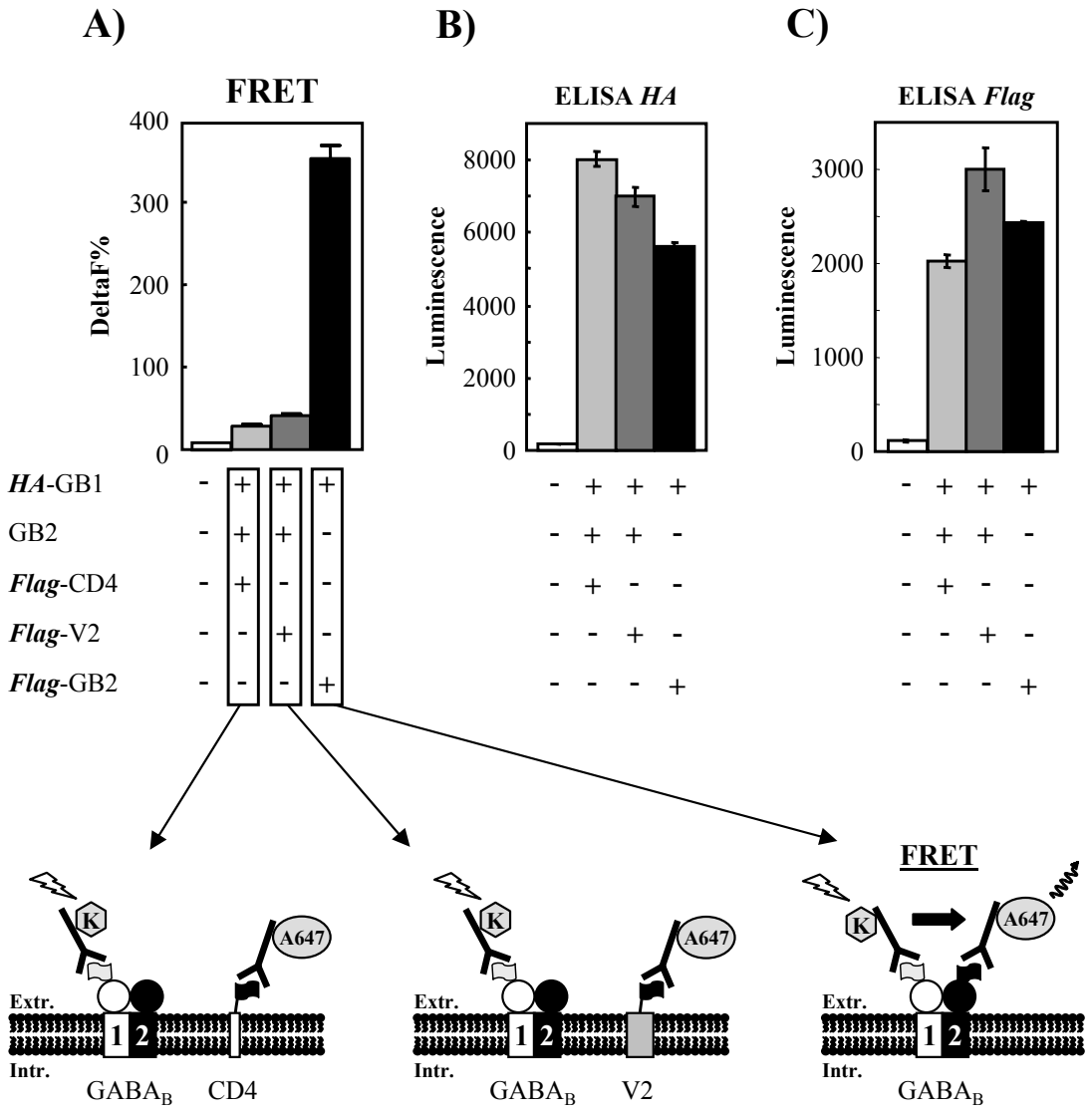


Figure VII.3 : Spécificité du signal de FRET. Les cellules COS-7 ont été transfectées transitoirement pendant 24h avec les sous-unités HA-GB1, GB2 et Flag-CD4 ou HA-GB1, GB2 et Flag-V2 ou enfin HA-GB1 et Flag-GB2. **A)** Après incubation des anticorps anti-HA-K et anti-Flag-A647, le signal de FRET (DeltaF %) a été déterminé. **B)** Estimation des niveaux d'expression des sous-unités HA-GB1 à la surface cellulaire. **C)** Estimation des niveaux d'expression des récepteurs portant un épitope Flag à la surface cellulaire.

un FRET important entre les sous-unités GB1 et GB2. En revanche, un transfert d'énergie très faible est mesuré entre la sous-unité GB1 (associée à GB2) et le CD4 ou le V_2R. Les mêmes données (non représentées) ont été obtenues avec la sous-unité GB2. Ces résultats confirment que les niveaux d'expression des récepteurs sont parfaitement adaptés à l'analyse d'interactions protéiques en écartant les phénomènes d'agrégation des protéines qui seraient la conséquence d'une surexpression.

Cette méthodologie nous a permis par la suite de contrôler l'état de dimérisation de sous-unités modifiées dans le cadre de différents projets (publications en annexe IV).

- **Applications.**

Dans une première étude, la question posée était de déterminer si la liaison d'un ou deux agonistes est nécessaire pour activer le récepteur homodimérique $mGlu_5$. Pour cela, un système a été développé afin de permettre l'envoi en surface d'une combinaison de deux sous-unités du récepteur portant ou non des mutations spécifiques. A cette fin, le système de contrôle qualité du récepteur $GABA_B$ a été transféré au récepteur $mGlu_5$ (Kniazeff et al., 2004). Cela a consisté à remplacer une partie de l'extrémité C-terminale du récepteur $mGlu_5$ par la région C-terminale de GB1 ou de GB2 ($mGlu_5$-C1 ou $mGlu_5$-C2). Ainsi, nous avons montré en TR-FRET que la co-transfection de ces deux chimères permet l'envoi en surface d'un récepteur $mGlu_5$ hétérodimérique ($mGlu_5$-C1/$mGlu_5$-C2). Il a été montré ensuite que la fixation d'un seul agoniste par hétérodimère est suffisante pour activer le récepteur $mGlu_5$, mais que la fixation d'un second est nécessaire pour une pleine activité du récepteur.

Dans une autre étude, nous avons analysé l'implication des domaines extracellulaires des sous-unités GB1 et GB2 dans le mécanisme d'activation du récepteur $GABA_B$ (Liu et al., 2004). En co-transfectant les domaines extracellulaires VFT (pour Venus FlyTrap) des sous-unités GB1 et GB2, nous avons montré en TR-FRET que ces domaines sont capables d'hétérodimériser en l'absence des régions heptahélices et C-terminales du récepteur. Cette capacité d'interaction entre ces domaines extracellulaires a été corrélée par la suite à des effets allostériques sur la liaison des ligands au niveau de GB1.

Au regard de toutes ces données, la technologie HTRF est une approche qui pourrait être adaptée à l'analyse d'interactions protéiques directement en système natif. En effet, alors que la dimérisation des RCPG est bien illustrée en système hétérologue, très peu de données

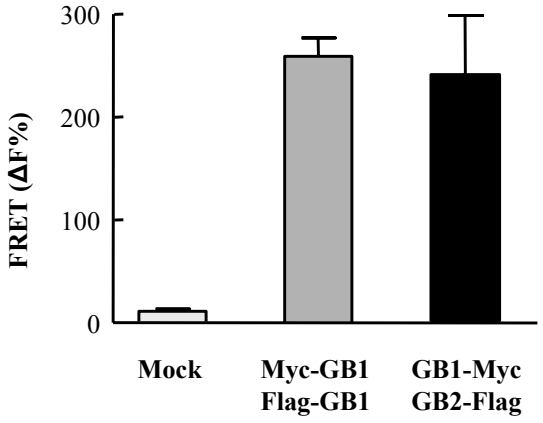


Figure VII.4 : FRET intracellulaire sur cellules fixées. Les cellules COS-7 ont été transitoirement transfectées avec le vecteur vide (pRK6) ou co-transfectées soit avec les sous-unités Myc-GB1 et Flag-GB1 soit avec les sous-unités GB1-Myc et GB2-Flag. Après incubation des anticorps anti-Flak-K et anti-Myc-A647 sur les cellules préalablement fixées et perméabilisées, le signal de FRET a été déterminé et représenté en DeltaF (%).

confirment ces observations en système natif. Toutefois, dans cette optique, l'utilisation d'anticorps reconnaissant des séquences introduites génétiquement n'est pas envisageable. Une alternative serait d'utiliser des anticorps dirigés directement contre les protéines cibles. En 2005, Urizar et coll. ont ainsi utilisé la technologie HTRF pour révéler l'homodimérisation du récepteur TSH en système hétérologue avec des anticorps anti-récepteurs (Urizar et al., 2005). L'utilisation d'anticorps monoclonaux, sélectifs, ayant une bonne affinité et dirigés contre les protéines cibles, devrait donc permettre à l'avenir de détecter des interactions directement en tissus natifs.

VII-B) Détection de dimères du récepteur $GABA_B$ à l'intérieur de la cellule.

VII-B.1) Contexte et but.

Afin d'élargir le champ d'applications de cette technologie, nous avons envisagé de détecter des interactions intracellulaires. Villemure et coll. ont démontré l'existence d'homodimères de GB1 dans le RE ainsi que dans les compartiments intermédiaires du RE et Golgi (Villemure et al., 2005). L'homodimérisation de la sous-unité GB1, exprimée seule, dans les compartiments intracellulaires nous a donc semblé un bon modèle. Toutefois, la fusion de l'étiquette (Flag ou c-Myc) en N-terminal de cette sous-unité implique son orientation dans la lumière des organites. Ainsi, les anticorps doivent traverser la membrane plasmique et la membrane des compartiments intracellulaires pour atteindre leur cible. Cette double difficulté nous a amenés à travailler aussi sur un deuxième modèle, a priori, plus simple. Il s'agit de révéler l'hétérodimère GB1/GB2 en ciblant les domaines C-terminaux cytosoliques de ces sous-unités. Evidemment, quel que soit le modèle, l'incapacité des anticorps à traverser la membrane plasmique constitue un obstacle pour ce type d'analyse.

VII-B.2) Résultats.

- **FRET sur cellules fixées et perméabilisées.**

Les techniques d'immunofluorescence et d'ELISA sur cellules entières consistent à faire entrer des anticorps dans des cellules fixées (PFA, paraformaldéhyde) et perméabilisées (Triton-X100). Cette stratégie a été adoptée dans un premier temps pour révéler des

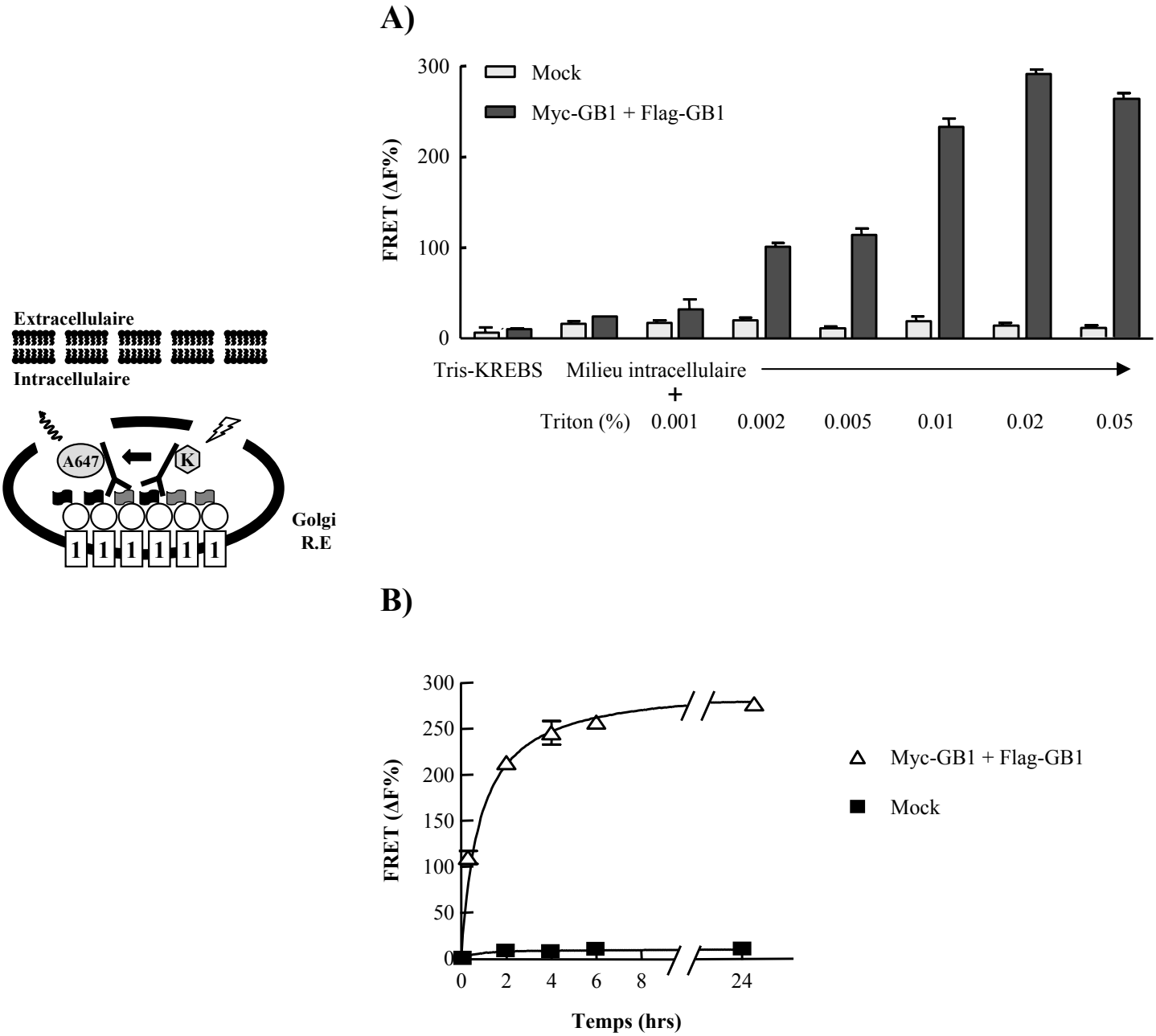


Figure VII.5 : FRET GB1/GB1 dans les compartiments intracellulaires. Les cellules COS-7 ont été transitoirement transfectées avec un vecteur vide (pRK6) ou co-transfectées avec les sous-unités Flag-GB1 et Myc-GB1. **A)** 24h après transfection les cellules ont été incubées avec les anticorps anti-Flag-K et anti-Myc-A647 dans un tampon extracellulaire Tris-KREBS ou dans un tampon intracellulaire en présence de détergent (Triton X-100) à différentes concentrations. Le signal de FRET est représenté en DeltaF (%). **B)** Evolution du signal FRET au cours du temps dans le milieu intracellulaire en présence de Triton X-100 à 0.02% .

interactions intracellulaires en HTRF. Ainsi, les cellules COS-7 ont été co-transfectées avec les sous-unités Myc-GB1 et Flag-GB1 (séquences fusionnées en N-terminal) ou GB1-Myc et GB2-Flag (séquences fusionnées en C-terminal). 24h après transfection, les cellules COS-7 ont été fixées, perméabilisées puis le signal de FRET détecté après incubation des cellules avec des anticorps anti-Flag-cryptate d'europium (K) et anti-Myc-A647. Un transfert d'énergie est détectable à la fois entre les sous-unités GB1 retenues dans les compartiments intracellulaires (orientation des étiquettes dans la lumière des organites) et entre les sous-unités GB1 et GB2 via leur domaine C-terminal **(Figure VII.4)**.

- **FRET sur cellules perméabilisées (non fixées).**

Notre but étant de développer ce type de détection en phase homogène et sans aucune étape de fixation, nous avons optimisé dans une deuxième série d'expériences les conditions de lyse ménagée des cellules COS-7.

Pour cela, les cellules ont été co-transfectées avec les sous-unités Myc-GB1 et Flag-GB1 puis incubées, 24h après transfection, avec des anticorps dilués dans un tampon isoosmotique, proche dans sa composition du milieu intracellulaire, en présence de concentrations croissantes de détergents (Triton X-100). Les détergents en dessous de leur concentration micellaire critique créent des pores dans la membrane des cellules. Ces ouvertures permettent aux anticorps d'atteindre les épitopes intracellulaires. En effet, il apparaît que les sous-unités GB1 retenues dans la cellule sont détectables en FRET à partir de 0.002% de Triton X-100 avec un signal maximum atteint pour 0.01%-0.02% **(Figure VII.5.A)**. Les mêmes données ont été obtenues avec de la saponine (non représentées). Ces paramètres établis, nous avons caractérisé la cinétique de fixation des anticorps. Il apparaît ainsi que le signal de FRET maximum est atteint au bout de 6h ce qui est en parfaite adéquation avec les données précédemment obtenues sur des cellules intactes **(Figure VII.5.B)**. La nécessité d'incuber longtemps les cellules s'explique à la fois par la faible concentration d'anticorps utilisée et par la température d'incubation. En effet, les cellules sont incubées à 4°C afin de réduire d'une part, les phénomènes de protéolyse et d'autre part, de « figer » les membranes, évitant ainsi une réticulation des protéines due à la liaison des anticorps et tout mouvement d'endocytose des protéines membranaires. Toutefois, à cette température, les cinétiques de fixation sont considérablements ralenties.

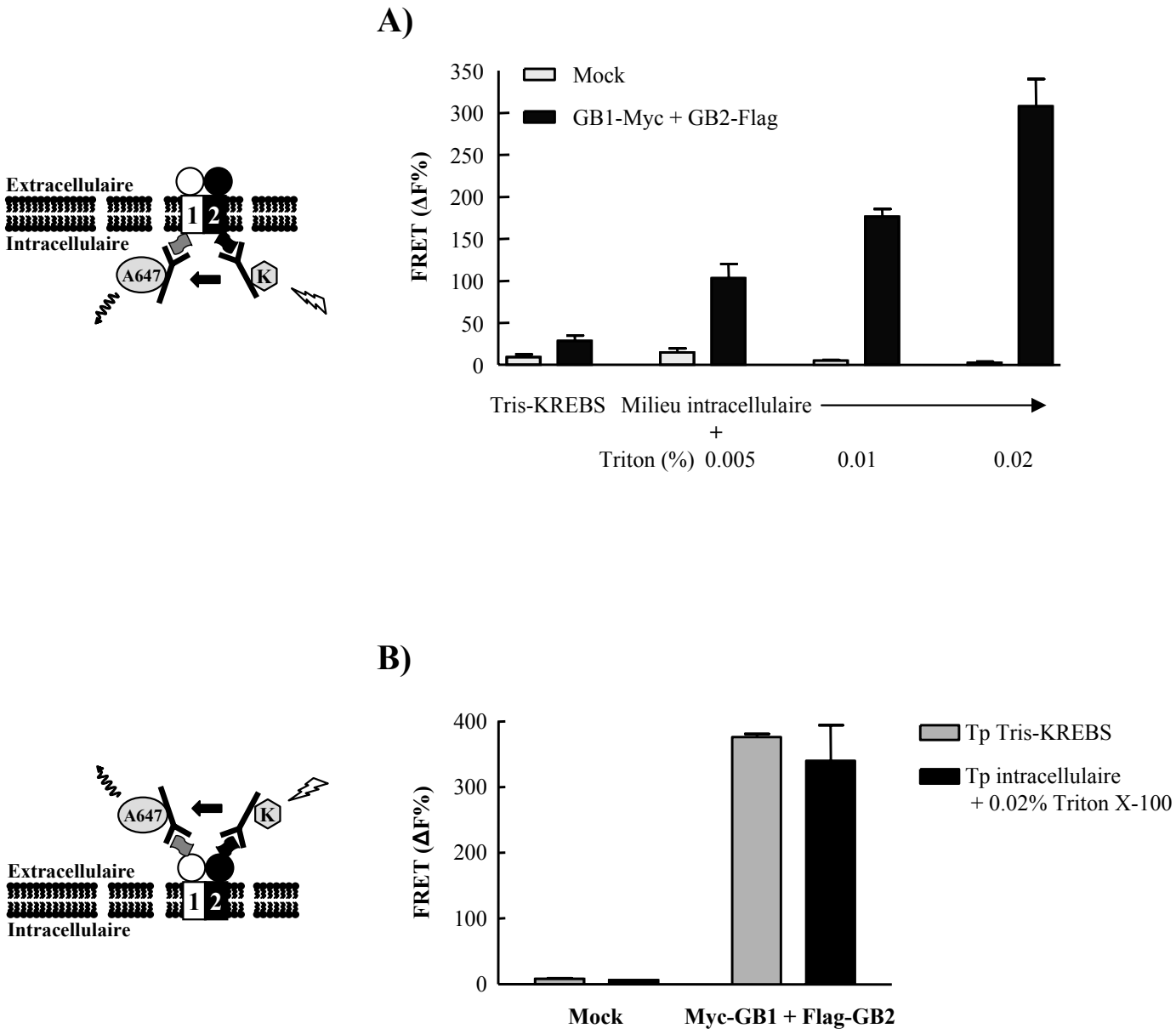


Figure VII.6 : FRET GB1/GB2 en intra- ou extracellulaire. A) Les cellules COS-7 ont été transitoirement transfectées avec un vecteur vide (pRK6) ou co-transfectées avec les sous-unités GB1-Myc et GB2-Flag. Après incubation des cellules avec les anticorps anti-Flag-K et anti-Myc-A647 dans un tampon extracellulaire Tris-KREBS ou dans un tampon intracellulaire en présence de Triton X-100 à différentes concentrations, le signal de FRET (DeltaF %) a été déterminé. **B)** Les cellules COS-7 ont été transfectées avec un vecteur vide (pRK6) ou co-transfectées avec les sous-unités Myc-GB1 et Flag-GB2. Après incubation des anticorps anti-Flag-K et anti-Myc-A647 dans du tampon Tris-KREBS ou dans du tampon intracellulaire avec du Triton X-100 à 0.02%, le signal de FRET (DeltaF %) a été déterminé pour chacune de ces conditions.

Les mêmes conditions ont été utilisées pour révéler l'interaction entre les sous-unités GB1 et GB2 via leur domaine C-terminal. Afin de vérifier les conditions de perméabilisation, une gamme de détergent (Triton X-100) a été appliquée sur les cellules co-transfectées avec les sous-unités GB1-Myc et GB2-Flag. Le FRET maximum est obtenu pour 0.02% de Triton X-100 comme précédemment **(Figure VII.6.A)**. Nous avons vérifié ensuite que ces conditions expérimentales n'altèraient pas les interactions entre sous-unités. Pour cela, le FRET Myc-GB1/Flag-GB2 bien caractérisé, a été comparé entre des cellules incubées dans du tampon Tris-KREBS et dans du milieu intracellulaire en présence de Triton X-100 à 0.02%. Aucune différence n'est observée **(Figure VII.6.B)**.

Cette stratégie de lyse ménagée des cellules représente un nouveau champ d'application pour la technologie HTRF. Il est ainsi possible d'accéder à des protéines intracellulaires en révélant en FRET d'éventuelles interactions. Cette stratégie est en cours d'évalutation sur d'autres partenaires d'interaction comme par exemple l'association d'un récepteur avec une protéine G.

- **Expressions du signal de FRET.**

Comme nous l'avons déjà abordé dans le chapitre III-D, la technologie HTRF est basée sur une mesure ratiométrique. Ce rapport 665/620 est utilisé pour calculer le DeltaF qui représente la valeur normalisée du rapport entre le signal de FRET et le bruit de fond de l'essai. L'utilisation du DeltaF, dans des applications industrielles, permet d'obtenir un résultat indépendant du niveau de signal brut mesuré sur un appareillage donné.

Dans le cadre du projet 2, exposé ci-dessous, la mesure du signal de FRET ne peut être déterminée en phase homogène. Des étapes de lavages sont alors nécessaires pour éliminer l'excès de réactifs non liés aux cibles protéiques. Dans ce format de détection (TRF), l'émission du cryptate de terre rare à 620 nm n'est plus une constante et ne peut donc plus être prise comme référence. En effet, l'intensité du signal dépend à la fois de la fixation non spécifique et spécifique du conjugué-cryptate. Nous avons de fait choisi d'exprimer par la suite le FRET en Delta665 ($\Delta 665$). Il représente l'intensité de l'émission de fluorescence de l'accepteur engagé dans un transfert d'énergie à 665 nm (cf. chapitre III-D.3.e).

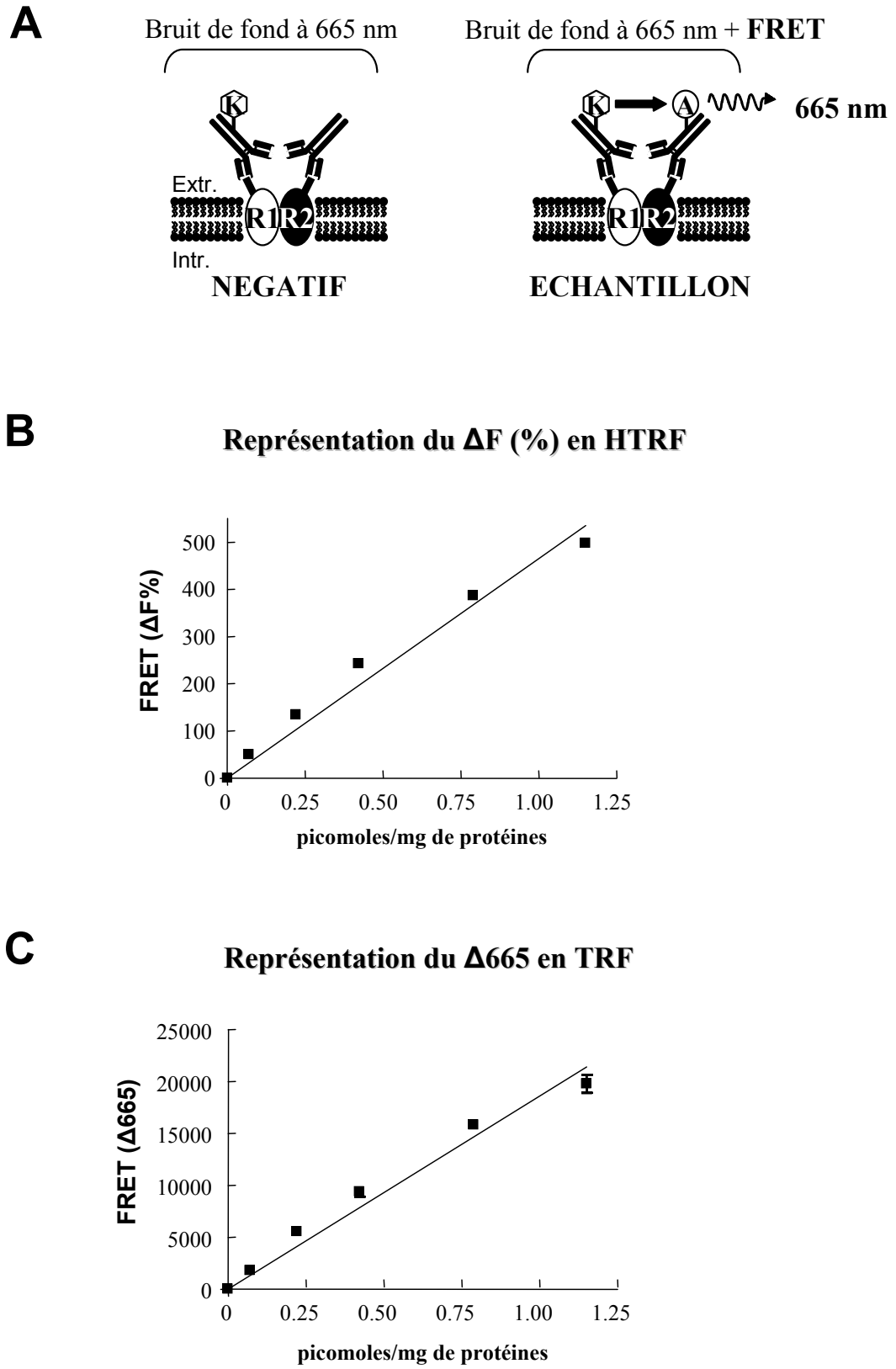


Figure VII.7 : Représentations du signal de FRET. Des gammes d'expression du récepteur $GABA_B$ ont été réalisées. Pour chaque population de cellules transfectées, la quantité de récepteurs à la surface cellulaire a été estimée par Scatchard et le signal de FRET détecté. **A.** Format du test. **B.** Le signal de FRET, représenté en ΔF (%) , est mesuré en phase homogène. **C.** Le signal de FRET, représenté en Δ665, est mesuré sur les mêmes cellules après lavages.

Son expression s'écrit :

$$\Delta 665 = (\text{signal à 665 nm de l'échantillon} - \text{signal à 665 nm du négatif})$$

Echantillon : cellules exprimant les partenaires d'interaction + conjugués donneur et accepteur.
Négatif : cellules exprimant les partenaires d'interaction + conjugué donneur et conjugué froid à la place de l'accepteur **(Figure VII.7)**.

Le Δ665 dépend de deux paramètres : l'efficacité du transfert d'énergie et le nombre d'évènements de FRET. Ainsi, sur la **Figure VII.7.C**, le signal de l'accepteur en FRET est bien dépendant du nombre de récepteurs en interaction à la surface cellulaire. Les valeurs obtenues peuvent être comparées si les expériences sont réalisées dans les mêmes conditions (milieu, cellules…) avec acquisition du signal sur le même appareillage.

VII-C) Oligomérisation de l'hétérodimère $GABA_B$ à la surface cellulaire.

VII-C.1) Contexte et but.

L'oligomérisation est un terme général qui décrit l'association de plusieurs protéines au sein d'un même complexe. Le dimère, qui correspond à l'interaction de deux protéines, constitue la stucture minimale de l'oligomère. Cette notion de dimérisation a été beaucoup utilisée pour décrire l'organisation des RCPG longtemps considérés uniquement sous forme monomériques. En réalité, il existe une certaine ambiguïté entre les termes de dimérisation et d'oligomérisation. Les méthodes décrivant des dimères de RCPG ne permettent pas d'exclure une oligomérisation plus grande de ces récepteurs. Les travaux de Fotiadis et coll. ont révélé pour la première fois en 2003, à partir de données obtenues en AFM, une organisation complexe de la rhodopsine en rangées de dimères (Fotiadis et al., 2003; Fotiadis et al., 2004). Fonctionnellement, ce niveau d'organisation oligomérique à grande échelle favoriserait des réponses rapides des récepteurs comme cela a été démontré ensuite par Jastrzebska et coll. (Jastrzebska et al., 2006). En effet, ces auteurs décrivent des cinétiques d'activation des protéines $G\alpha t$ plus rapides quand la rhodopsine est sous forme oligomérique plutôt que dimérique ou monomérique. D'autres données relativement récentes suggèrent aussi l'implication de l'oligomérisation du récepteur α_{1B}-adrénergique pour son envoi à la surface cellulaire (Milligan et al., 2006). Toutefois, hormis quelques récepteurs, peu d'informations ont été rapportées à ce jour sur l'oligomérisation d'autres RCPG.

Pourtant, les multiples zones de contact identifiées au niveau des domaines transmembranaires des RCPG (TMI, II, IV, VI…) ne permettent pas de définir simplement une seule interface de dimérisation entre deux récepteurs. Comme nous en avons déjà discuté dans le chapitre II-C.2, le modèle de Fotiadis et coll. permet de réconcilier l'ensemble de ces données en décrivant, pour la rhodopsine, une interface symétrique de dimérisation et une interface asymétrique qui supporterait une interaction interdimères (Fotiadis et al., 2004). Les récepteurs pourraient donc être organisés dans des complexes d'interaction oligomériques plus grands que les dimères. Dans ce contexte, nous avons souhaité aborder cette question de l'oligomérisation pour le récepteur $GABA_B$. En effet, ce récepteur nous a semblé être un bon modèle et ceci pour plusieurs raisons. Tout d'abord, il s'agit d'un hétérodimère obligatoire (cf. chapitre VI). L'oligomérisation de ce récepteur pourrait donc se traduire par des contacts entre des hétérodimères via les sous-unités GB1, GB2 ou éventuellement par des protéines

annexes encore méconnues. De plus, l'asymétrie de ce récepteur permet d'envisager le marquage ciblé de l'une de ces deux sous-unités à l'aide de molécules fluorescentes. Ainsi, en utilisant un couple adapté de fluorophores, il serait envisageable, avec une méthode de marquage appropriée, de détecter un éventuel transfert d'énergie entre des sous-unités GB1 ou GB2 présentes dans des hétérodimères distincts. La détection d'un tel signal indiquerait une interaction de ces sous-unités et serait un argument en faveur d'une organisation oligomérique de ce récepteur.

VII-C.2) Stratégie.

Le point de départ de ce projet a consisté à choisir une méthode permettant d'analyser le plus précisément possible ces interactions protéiques via un marquage ciblé des deux sous-unités du récepteur $GABA_B$ à la surface cellulaire. Précédemment, nous avons décrit une méthode de FRET basée sur l'utilisation d'anticorps couplés à des fluorophores. Ce type d'approche, bien qu'étant favorable à la détection d'interactions exclusivement de surface, présente toutefois un certain nombre de limites. La bivalence des anticorps par exemple, implique de prendre des précautions particulières pour éviter les phénomènes d'agrégation des protéines cibles. Il conviendrait, pour éviter ce problème, d'utiliser des anticorps dont seule la région Fab (Fragment antigen binding) est conservée. Cette stratégie n'a pas été adoptée car nous n'avions pas alors accès à de tels réactifs. Par ailleurs, concernant l'utilisation d'anticorps complets, il ne peut être exclu du fait de la taille de ces complexes (150 kDa), de détecter un transfert d'énergie entre deux protéines alors que celles-ci sont proches mais pas en interaction directe. Pour cette raison des contrôles négatifs, utilisant des protéines de surface n'interagissant pas, doivent être mis en place systématiquement pour valider la spécificité du signal mesuré. Fort de toutes ces raisons, l'approche anticorps ne semblait pas la plus appropriée pour permettre une analyse objective de l'oligomérisation du récepteur $GABA_B$ à la surface cellulaire.

D'autres méthodes ont de fait été envisagées. Comme nous l'avons détaillé dans le chapitre III, le BRET et le FRET entre variants de la GFP, sont des approches adaptées à l'étude des interactions protéiques. En effet, ces sondes (Rluc, CFP, YFP…) peuvent être génétiquement encodées et placées en fusion avec les protéines d'intérêt. Pourtant, ces dernières années, de nombreuses autres stratégies ont été développées (cf. chapitre IV). En effet, le BRET et le FRET sont des techniques qui souffrent d'un important bruit de fond provenant à la fois du

manque de sélectivité spectrale des molécules utilisées, de la présence de protéines de fusion en cours de maturation (retenues dans les compartiments intracellulaires) et de l'autofluorescence des cellules qui émettent dans la zone de détection du signal issu du transfert d'énergie. De plus, il est difficile de déterminer avec ces techniques la provenance du signal (surface cellulaire versus compartiments intracellulaires) à partir d'une population de cellules. Tous ces paramètres limitent la sensibilité de détection et compliquent l'analyse du signal. Ainsi, depuis quelques années, l'émergence de nouvelles approches de marquage a permis d'améliorer les systèmes de détection. Ces méthodologies innovantes permettent notamment de réduire la taille des séquences à fusionner, de choisir la nature des fluorophores (sélectivité spectrale, R_0 variables…) et de déterminer un marquage exclusivement de surface ou intracellulaire.

Notre objectif étant d'analyser avec précision le niveau d'organisation du récepteur $GABA_B$ à la surface cellulaire, nous avons choisi d'utiliser une méthode alliant une taille de sonde réduite et un marquage unique, stable et spécifique des protéines de surface. Parmi les méthodes à notre disposition, la technique SNAP-tag nous a semblé l'approche la plus adaptée à nos besoins. Brièvement, cette méthode (détaillée dans le chapitre IV-C.3) consiste à fusionner le domaine catalytique de la O^6-alkylguanine-DNA alkyltransferase (AGT) au niveau d'une protéine cible afin de marquer spécifiquement, par l'intermédiaire d'une réaction enzymatique, la protéine de fusion. Cette réaction de marquage est irréversible et unique. Selon la nature chimique de la molécule fluorescente utilisée, le marquage sera exclusivement de surface (fluorophores non perméants) ou intracellulaire, ce qui constitue un des atouts de cette technologie. Enfin, la sonde formée par la liaison d'un groupement benzyl-fluorophore au niveau de l'AGT est sept fois plus petite qu'un anticorps (21 kDa au lieu de 150 kDa). Ceci peut avoir des conséquences importantes sur la spécificité du signal de FRET mesuré. En effet, plus la taille de la sonde fluorescente est petite, moins grand est le risque de mesurer un transfert d'énergie entre deux protéines qui sont proches mais pas en interaction.

Certains points critiques restent cependant à élucider quant à l'utilisation de cette méthode. Le rendement de marquage de l'AGT avec nos fluorophores (cryptate, d2, Cy5…) n'ayant pas été déterminé, il faudra apprécier l'efficacité de la réaction enzymatique pour chacune de ces molécules. Il sera aussi important de contrôler la sensibilité de détection du signal de FRET entre les fluorophores spécifiquement greffées aux récepteurs. Cette caractérisation sera effectuée sur l'hétérodimère GB1/GB2 avant d'analyser des interactions entre dimères.

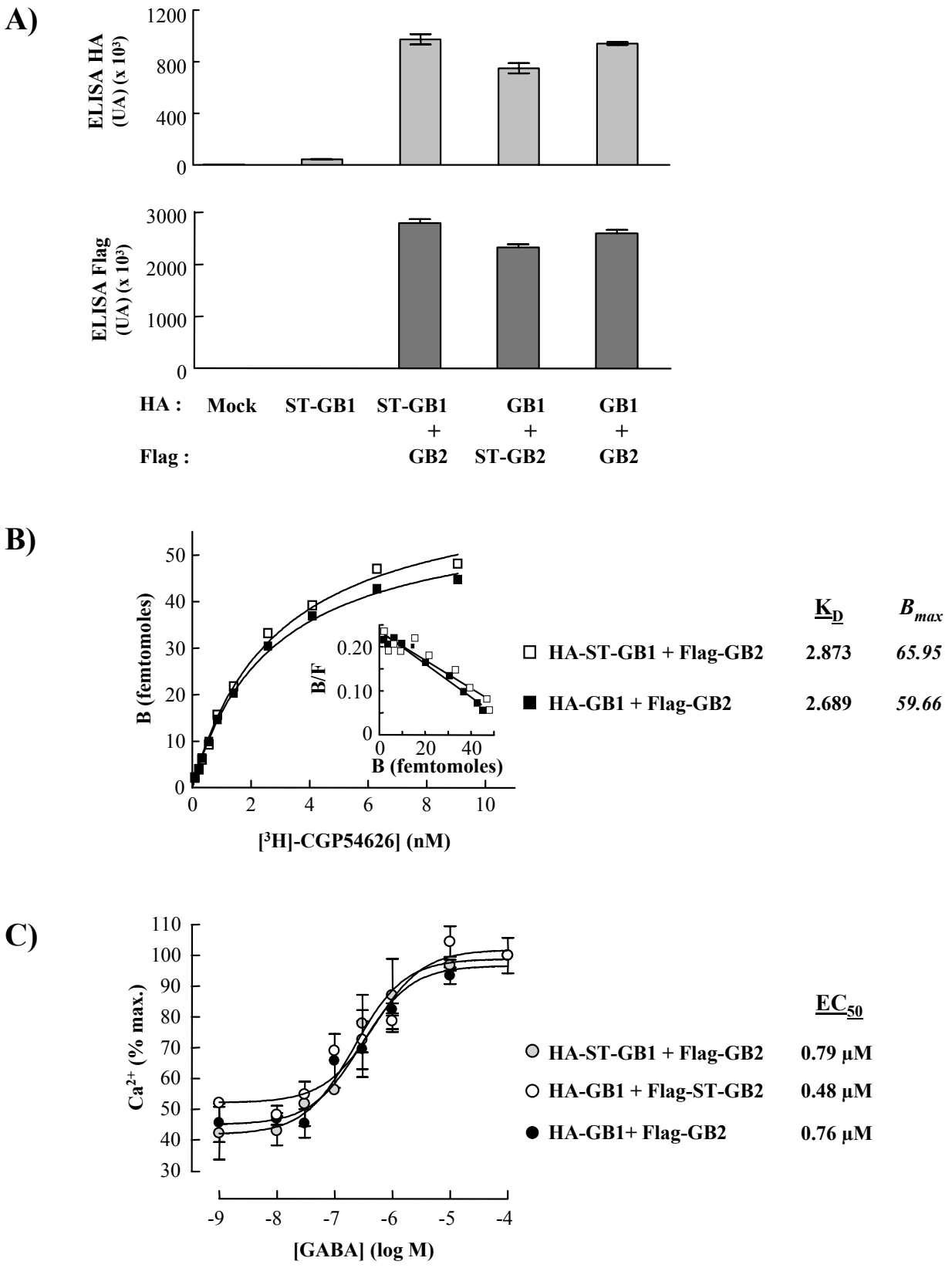


Figure VII.8 : Caractérisation des protéines de fusion HA-ST-GB1a et Flag-ST-GB2. A) Quantification par ELISA de l'expression à la surface de cellules COS-7 des différentes protéines de fusion. **B)** Détermination par Scatchard du nombre de récepteurs exprimés à la surface de cellules COS-7 et de l'affinité de l'antagoniste CGP54626. **C)** L'augmentation de calcium dans les cellules exprimant les sous-unités indiquées est représentée en fonction de la concentration en GABA. Les valeurs sont normalisées par rapport à la réponse maximale obtenue avec le récepteur sauvage et représentent la moyenne +/- SE de triplicats.

VII-C.3) Résultats.

- **Mise au point technologique.**

1) L'insertion d'un SNAP-tag en N-terminal du récepteur $GABA_B$ n'affecte ni son adressage ni son fonctionnement à la surface cellulaire.

L'AGT (O^6-alkyl Guanine-DNA alkyltransferase), qui sera nommée par la suite SNAP-tag (ST), a été fusionnée au niveau du domaine N-terminal des sous-unités GB1 et GB2 clonées dans le vecteur pRK5. L'insertion d'étiquette HA ou Flag en N-terminal du ST a pour but de suivre l'adressage à la membrane plasmique des différentes protéines de fusion (HA-ST-GB1 et Flag-ST-GB2). Ainsi, chacune des constructions a été transfectée transitoirement dans des cellules COS-7 avec une sous-unité GB1/GB2 complémentaire sauvage de manière à estimer par ELISA les niveaux d'expression. Les données obtenues montrent que toutes les protéines de fusion sont correctement adressées à la surface cellulaire à l'image du récepteur sauvage (90-100% du niveau d'expression du sauvage) **(Figure VII.8.A)**.

Nous avons ensuite vérifié que la présence du ST au niveau de la sous-unité GB1 ne modifie pas l'affinité des ligands. Pour cela un antagoniste tritié non perméant, le [H^3]-CGP54626, a été utilisé pour réaliser une expérience de saturation à l'équilibre ou Scatchard **(Figure VII.8.B)**. Les résultats confirment, tout d'abord, de manière quantitative que la présence du ST n'affecte pas le niveau d'expression du récepteur à la surface cellulaire (B_{max} : 59.6 femtomoles de récepteur sauvage pour 100.000 cellules COS-7 et 65.9 femtomoles pour les cellules exprimant la fusion HA-ST-GB1). D'autre part, la constante de dissociation (K_d) est identique pour le récepteur sauvage (K_d : 2.7 nM) et pour le récepteur avec la sous-unité GB1 fusionnée au ST (K_d : 2.9 nM).

Afin de vérifier que la présence du ST n'affecte pas la fonctionnalité du récepteur, un test de mesure de calcium intracellulaire a été effectué. Les cellules transfectées avec l'une des deux sous-unités fusionnées au ST génèrent une réponse suite à la stimulation par le GABA en entraînant la libération de calcium **(Figure VII.8.C)**. Les valeurs d'EC_{50} déterminées (0.79µM pour HA-ST-GB1a et 0.48µM pour Flag-ST-GB2) sont très proches de la valeur obtenue pour le récepteur sauvage (0.76µM). Le fonctionnement du récepteur n'est donc pas affecté par la présence de l'enzyme aussi bien au niveau du domaine N-terminal de GB1 que

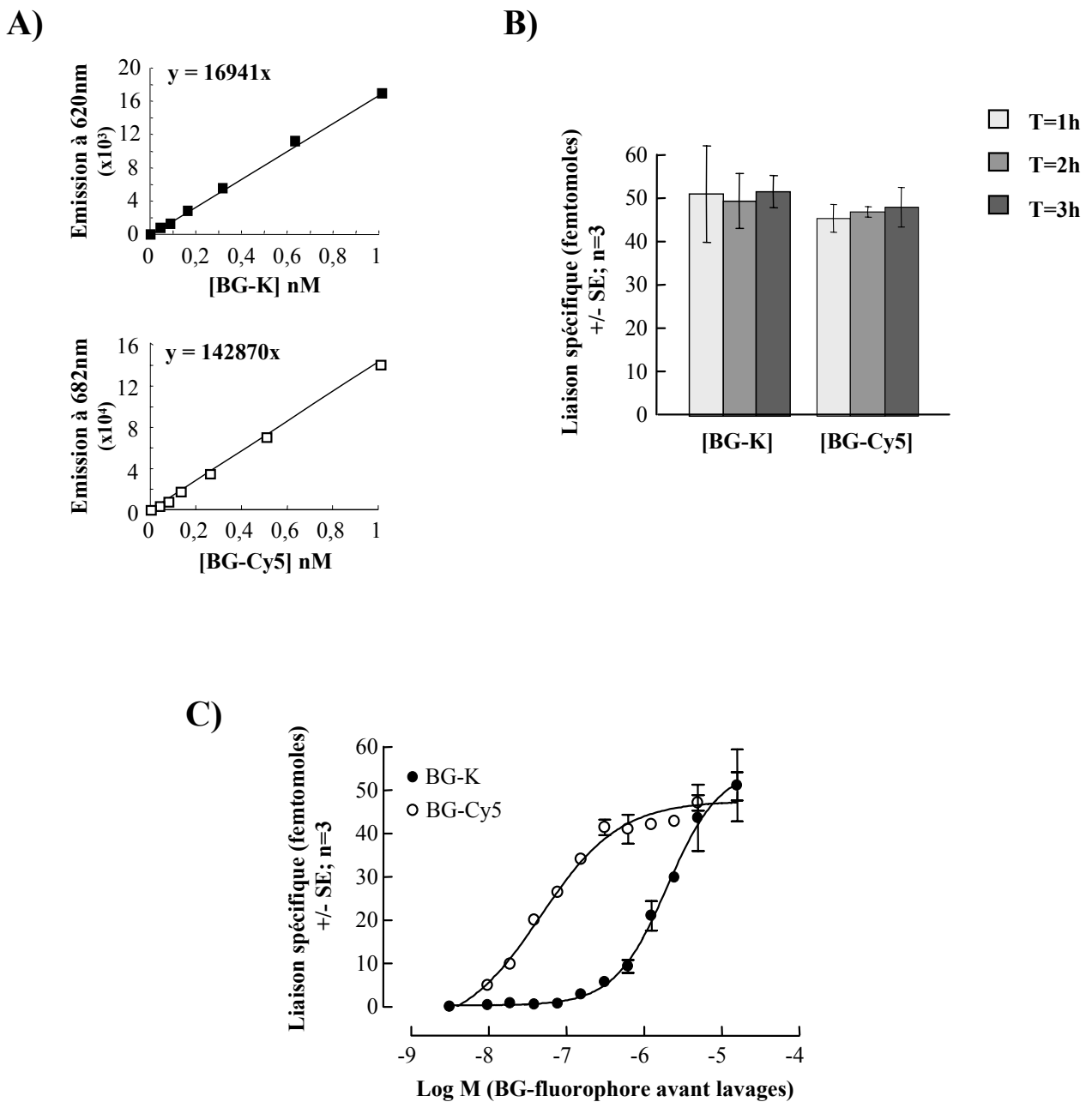


Figure VII.9 : Mise au point des conditions de marquage. A) Les réactifs BG-K et BG-Cy5 ont été dilués à différentes concentrations et le signal de fluorescence correspondant déterminé à 620 nm et 682 nm respectivement. **B)** Variation du temps d'incubation des cellules en présence de 5µM de BG-K ou BG-Cy5. **C)** Les cellules COS-7 ont été co-transfectées avec les sous-unités HA-ST-GB1a et Flag-GB2. Après une heure d'incubation en présence de différentes concentrations de fluorophores, les cellules ont été lavées et l'émission de fluorescence spécifique mesurée. A partir des gammes étalons (A), la fluorescence spécifique a pu être convertie en nombre de moles de fluorophores liés au ST.

de GB2. La co-transfection des fusions ST-GB1 et ST-GB2 donne les mêmes résultats (non montrés).

2) Détermination des conditions de marquage.

Le temps d'incubation des Benzyl Guanine-fluorophores (BG = substrats) ainsi que leurs concentrations, sont deux paramètres essentiels pour l'optimisation des conditions de marquage des ST (enzymes). Dans une première série d'expériences, 100.000 cellules COS-7 exprimant l'hétérodimère HA-ST-GB1a/Flag-GB2 ont été incubées pendant 1h, 2h ou 3h avec 5µM de fluorophores non perméants (BG-K (Benzyl Guanine – cryptate d'europium-PBP) ou BG-Cy5). Après trois lavages, l'émission de la fluorescence provenant des fluorophores spécifiquement liés au ST a été déterminée. Connaissant la relation entre l'intensité de fluorescence (à 620 nm pour le K et 682 nm pour le Cy5) et la concentration correspondante en fluorophores **(Figure VII.9.A),** il nous a été possible de déterminer le nombre de fluorophores fixés (~ 50 femtomoles) **(Figure VII.9.B)**. Aucune amélioration du marquage n'est observée pour des incubations supérieures à une heure. L'ensemble des récepteurs susceptibles de fixer un fluorophore sont donc bien marqués au bout de la première heure. Ce temps d'incubation sera utilisé pour l'ensemble des expériences suivantes.

Afin de déterminer la concentration efficace en BG-fluorophore pour marquer les récepteurs présents à la surface cellulaire, les cellules ont été incubées avec des concentrations croissantes de fluorophores (BG-K ou BG-Cy5). Le plateau atteint pour chacune des courbes correspond à la concentration optimale en fluorophores pour le marquage des récepteurs de surface **(Figure VII.9.C)**. Cette concentration est de 0.5µM pour le BG-Cy5 et de 20µM pour le BG-K. L'analyse des valeurs d'EC_{50} (0.05µM pour le BG-Cy5 et 2µM pour le BG-K) révèle un décalage qui est certainement la conséquence d'une différence dans l'efficacité de la réaction enzymatique. Cette activité enzymatique peut, en effet, être affectée par la nature du fluorophore utilisé, la longueur du bras carboné reliant le fluorophore au groupement benzyl-guanine (BG) ou par la position de couplage de la molécule fluorescente au niveau du BG. Il faudrait, pour caractériser cette différence, définir les paramètres qui ont une influence sur la reconnaissance et sur le transfert du groupement benzyl-fluorophore au niveau de la cystéine réactive de l'enzyme.

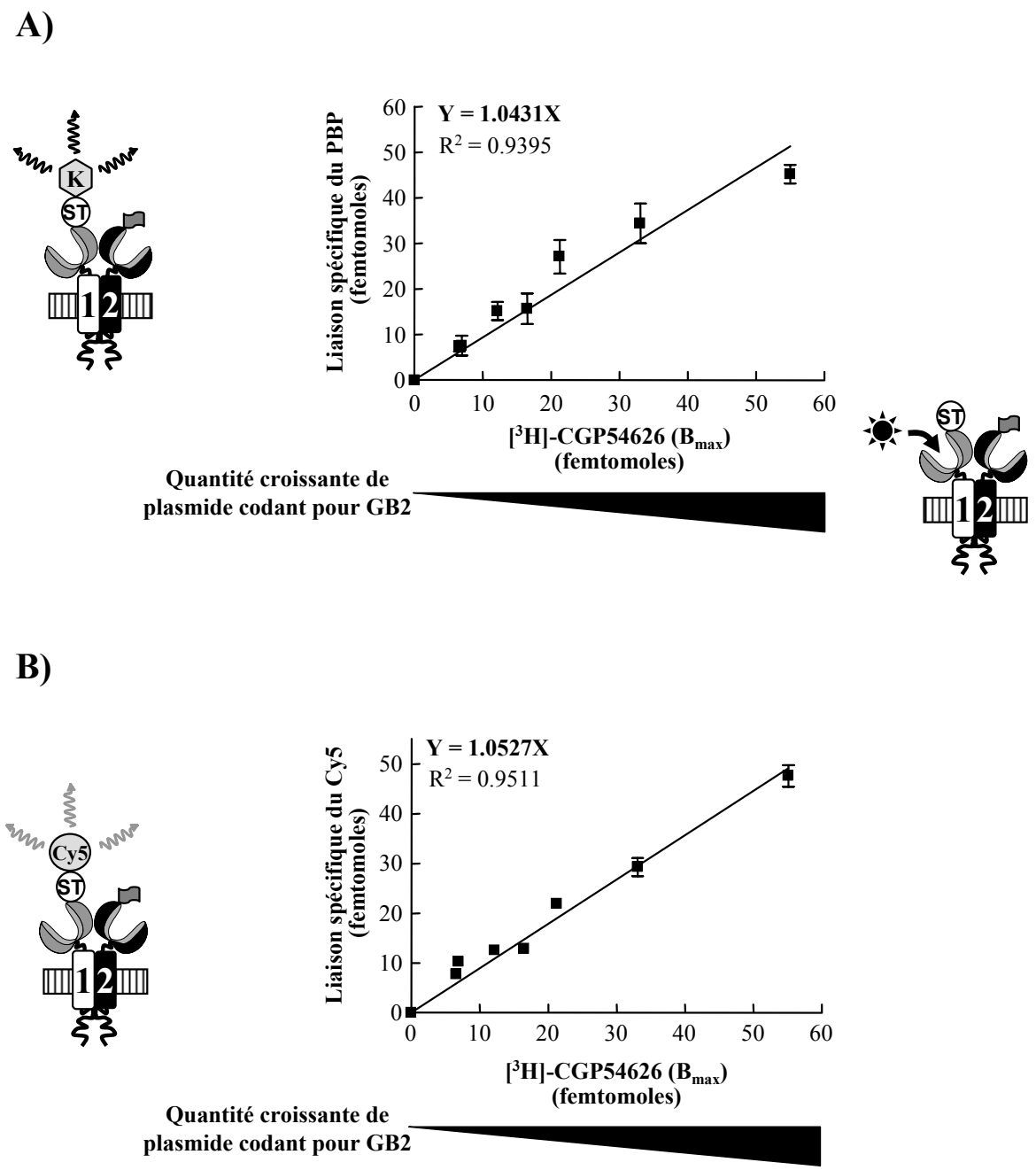


Figure VII.10 : Rendement de marquage des protéines de fusion. Les cellules COS-7 ont été co-transfectées avec une quantité fixe de HA-ST-GB1a et une gamme de Flag-GB2. Pour chaque transfection, le nombre total de récepteurs a été déterminé par la liaison à l'équilibre de l'antagoniste non perméant, le [^{3}H]-CGP54626, et comparé au nombre de récepteurs marqués avec un fluorophore. Représentation mole à mole du nombre total de récepteurs par rapport au nombre de récepteurs marqués au K **(A)** ou au Cy5 **(B)**.

3) Détermination du rendement de marquage.

L'optimisation des conditions de marquage réalisées, il nous fallait déterminer le rendement de marquage. Il correspond au rapport du nombre de récepteurs marqué avec les fluorophores sur le nombre de récepteurs totaux. Le nombre de récepteurs totaux est évalué par des expériences de saturation à l'aide d'un antagoniste radioactif, le [H^3]-CGP54626, alors que le nombre de récepteurs marqués est estimé par la mesure de la fluorescence (cf. conditions de marquage). Ces quantifications ont été réalisées pour différentes densités de récepteurs. Comme la sous-unité GB1 (qui fixe le ligand) est envoyée en surface uniquement en présence de la sous-unité GB2, les cellules ont été transfectées avec une gamme croissante de Flag-GB2 et une quantité fixe de HA-ST-GB1a. Pour chacune des transfections, la quantité d'hétérodimères à la surface cellulaire a été estimée par la liaison de l'antagoniste au niveau de GB1 (Méthode de Scatchard) et par la liaison des fluorophores sur le ST selon les conditions établies précédemment. La représentation mole à mole de ces deux méthodes de quantification donne une parfaite corrélation linéaire avec l'obtention d'une pente de 1 **(Figure VII.10)**. Ceci indique qu'à une mole d'antagoniste tritié lié à GB1 correspond une mole de fluorophore greffé au niveau du ST. Il est possible de conclure que toutes les sous-unités GB1 occupées par l'antagoniste radioactif sont marquées au niveau du ST par le fluorophore. Cette analyse du signal confirme la parfaite compatibilité de l'approche SNAP-tag pour un marquage efficace de l'ensemble des récepteurs exprimés à la surface cellulaire.

4) Détection du signal de FRET.

- <u>FRET entre un fluorophore lié au ST et un anticorps couplé à des fluorophores</u>.

Une fois les conditions de marquage établies, nous avons voulu mesurer un tranfert d'énergie au sein de l'hétérodimère GB1/GB2. Pour cela, les cellules ont été co-transfectées avec une quantité fixe de HA-ST-GB1a et une gamme de Flag-GB2. Après avoir marqué les ST avec les fluorophores donneurs (K) ou accepteurs (Cy5), des anticorps dirigés contre l'étiquette Flag de GB2 ont été ajoutés. En utilisant des anticorps couplés à des fluorophores donneurs ou accepteurs pour les molécules fluorescentes liées au ST, il a été ainsi possible de détecter un transfert d'énergie révélant l'interaction GB1/GB2. Ce FRET, directement proportionnel au niveau d'expression des récepteurs, est détectable pour des densités de

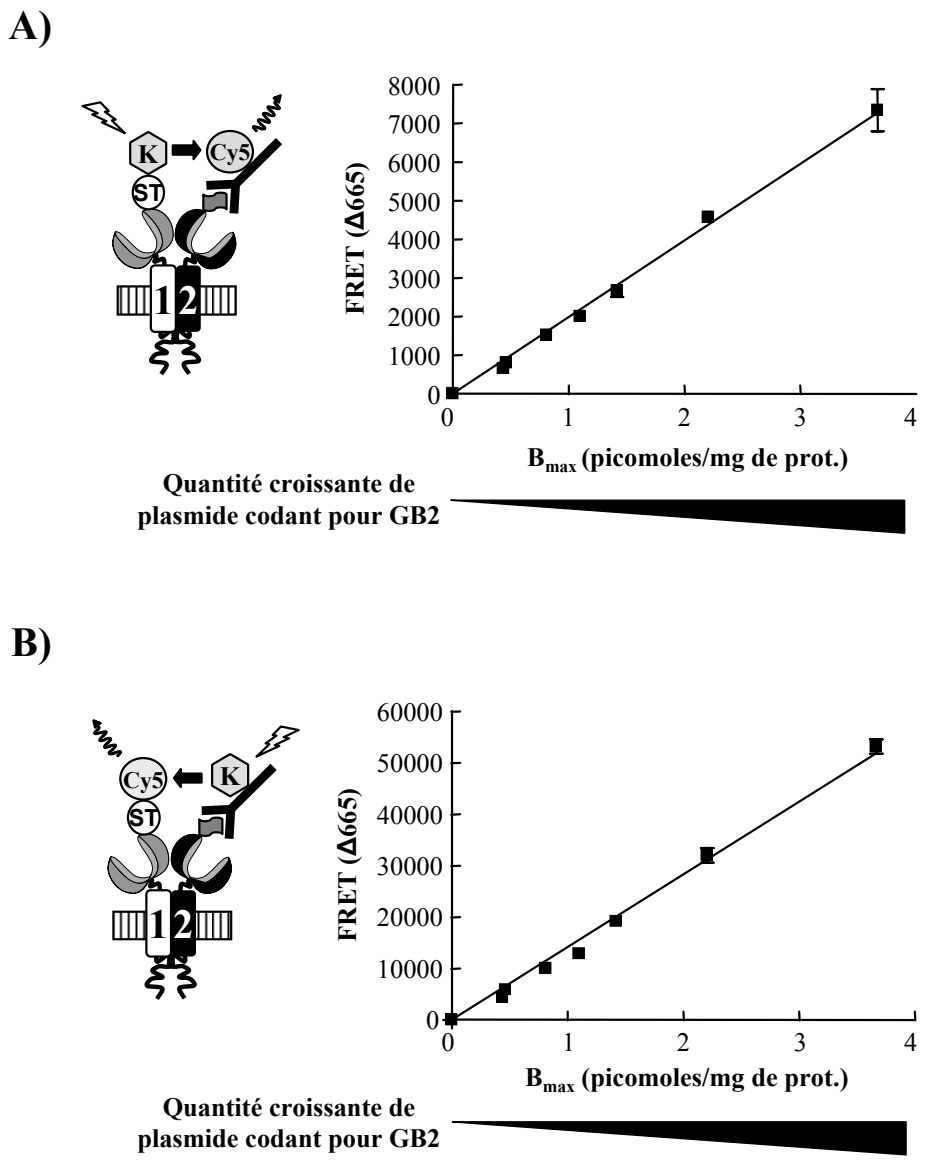


Figure VII.11 : FRET entre un SNAP-tag (ST) et un anticorps. Les cellules COS-7 ont été co-transfectées avec une quantité fixe de HA-ST-GB1a et une quantité variable de Flag-GB2. Après marquage des ST avec les BG-K ou BG-Cy5, des conjugués anticorps dirigés contre la sous-unité GB2 ont été ajoutés. Pour chacune des transfections le signal de FRET a été déterminé et représenté en Δ665. Une parfaite corrélation linéaire est observée entre la densité de récepteurs à la surface cellulaire et le signal de FRET pour les couples ST-K/anticorps-Cy5 **(A)** et ST-Cy5/anticorps-K **(B)**.

récepteurs inférieures à 500 femtomoles/mg de protéines soit environ 200.000 récepteurs par cellule COS-7 **(Figure VII.11)**.

- FRET entre deux ST.

Afin de s'affranchir totalement de l'utilisation des anticorps, un marquage simultané des sous-unités HA-ST-GB1a et Flag-ST-GB2 a été réalisé via l'utilisation d'une paire de BG fluorescents. Dans ce type de configuration on s'attend statistiquement à avoir 50% des dimères avec un donneur et un accepteur permettant un transfert d'énergie, 25% avec deux donneurs et 25% avec deux accepteurs intradimères. Il a fallu d'abord déterminer, du fait de la différence d'EC_{50} de fixation des deux fluorophores, le rapport de concentration en BG-K et BG-Cy5 pour obtenir un FRET optimal au sein de l'hétérodimère GB1/GB2. A cette fin, une gamme de BG-Cy5 a été appliquée en présence d'une concentration constante de BG-K sur des cellules co-exprimant les deux protéines de fusion **(Figure VII.12.A)**. La courbe obtenue présente une allure en cloche et révèle un excellent transfert d'énergie pour un rapport de 0.2µM de BG-Cy5 pour 5µM de BG-K. En dessous ou au dessus de cette concentration en BG-Cy5, la proportion de dimères portant exclusivement soit deux K soit deux Cy5 augmente ce qui réduit le signal de FRET. Après avoir défini le rapport de concentration donneur/accepteur optimal, il était essentiel de déterminer la limite de détection du signal. Pour cela, nous avons mesuré le FRET sur des populations de cellules exprimant des densités variables de récepteurs allant de 0.25 à 3 picomoles/mg de protéines **(Figure VII.12.B)**. Le signal de FRET est détectable pour de faibles niveaux d'expression, inférieurs à 500 femtomoles de récepteurs/mg de protéines (200.000 récepteurs par cellules COS-7).

❖ Oligomérisation du récepteur $GABA_B$.

Afin d'aborder la question de l'oligomérisation concernant le récepteur $GABA_B$, nous avons voulu mettre en évidence d'éventuelles interactions entre les hétérodimères à la surface cellulaire. Pour cela, la détection d'un transfert d'énergie entre des sous-unités présentes dans des dimères distincts serait un bon indicateur d'une organisation oligomérique de ce récepteur. Pour tenter de répondre à cette interrogation, les sous-unités HA-ST-GB1a et Flag-ST-GB2 ont été transfectées respectivement avec les sous-unités GB2 et GB1. Ainsi, au sein d'un hétérodimère, seule une des deux sous-unités peut être marquée par un fluorophore. En appliquant simultanément un mélange de BG-K et BG-Cy5, nous avons pu évaluer l'intensité du signal de FRET en fonction des niveaux d'expression des récepteurs **(Figure VII.13)**. De

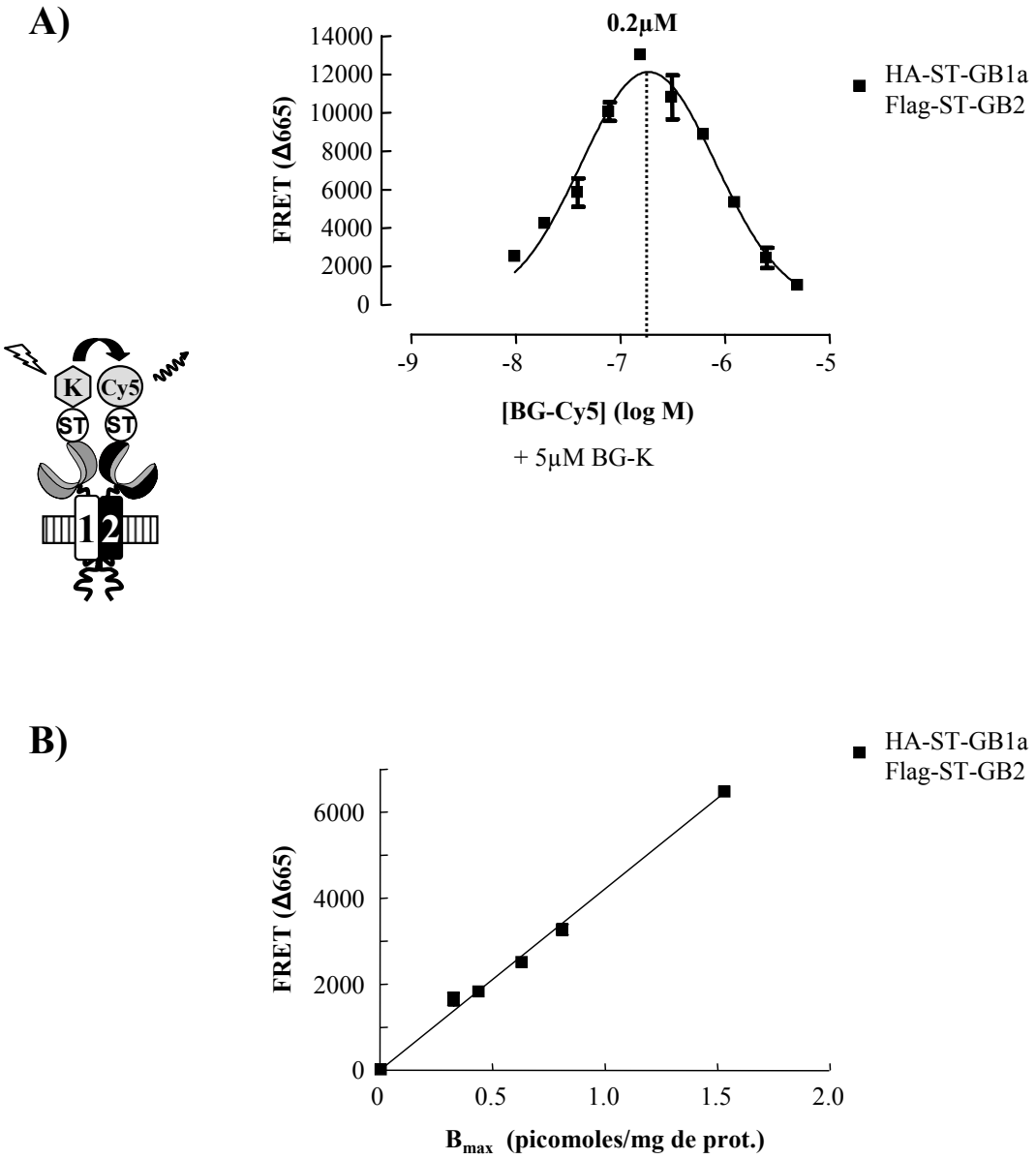


Figure VII.12 : FRET entre deux SNAP-tag (ST). A) Les cellules COS-7 ont été co-transfectées avec les sous-unités GB1 et GB2 toutes deux fusionnées au ST. 24h après transfection les cellules ont été incubées avec une gamme de BG-Cy5 en présence d'une concentration constante de BG-K (5µM). Le signal de FRET spécifique a été déterminé à 665 nm après avoir soustrait le signal non spécifique obtenu sur des cellules Mock. **B)** Evolution du signal de FRET en fonction de la densité de récepteurs à la surface cellulaire.

manière assez surprenante, alors que le FRET entre deux hétérodimères via les sous-unités GB2 est relativement faible, un FRET beaucoup plus important est détecté entre les sous-unités GB1. Le FRET observé entre les GB1 est conforté par les données obtenues avec le mutant $GB1_{ASA}$. En effet, la mutation de la séquence de rétention RSR en ASA permet à cette sous-unité d'être adressée à la surface cellulaire en l'absence de GB2. Les données de FRET obtenues sur ce mutant exprimé seul révèlent qu'un important transfert d'énergie est détectable **(Figure VII.14.A)**. Concernant la sous-unité GB2, la faible intensité du signal n'est pas la conséquence d'une incapacité de cette sous-unité à s'associer avec elle-même. En effet, il apparaît que la sous-unité GB2 exprimée seule, est capable de former des homodimères à la surface cellulaire **(Figure VII.14.B)** (Maurel et al., 2004; Villemure et al., 2005).

1) Influence des domaines sushi de GB1a sur le FRET.

La présence de deux domaines sushi en N-terminal de la sous-unité GB1a pourrait avoir un impact sur le signal de FRET mesuré. Ces domaines, absents de GB2, pourraient être impliqués dans une éventuelle interaction des sous-unités GB1a ou induire un rapprochement des fluorophores alors que les protéines de fusion ne sont pas en interaction. Pour tester ces hypothèses, nous avons comparé le transfert d'énergie entre deux dimères via la co-transfection de Flag-ST-GB2 avec la forme HA-ST-GB1a ou la forme HA-ST-GB1b ne possédant pas de domaines sushi. Aucune différence de FRET inter-dimère n'est observée entre ces deux variants ce qui permet d'exclure l'implication des domaines sushi dans l'association des hétérodimères via la sous-unité GB1 **(Figure VII.15).**

2) Effet de l'activation de l'hétérodimère sur le FRET.

D'après la structure cristallographique du domaine de liaison du récepteur mGlu1 (Kunishima et al., 2000) un changement de positionnement relatif des deux DEC du récepteur $GABA_B$ est attendu suite à la liaison du GABA au niveau de la sous-unité GB1. Cette modification pourrait être révélée par une variation du signal de FRET résultant d'une différence de distance et/ou d'orientation relative des fluorophores. Toutefois, avec notre approche, aucun changement dans le transfert d'énergie existant entre les deux sous-unités GB1/GB2 à l'état basal n'a pu être mis en évidence après l'ajout de GABA **(Figure VII.16)**. De même, aucun changement dans le transfert d'énergie inter-dimère via les sous-unités GB1 ou GB2 n'a pu être détecté.

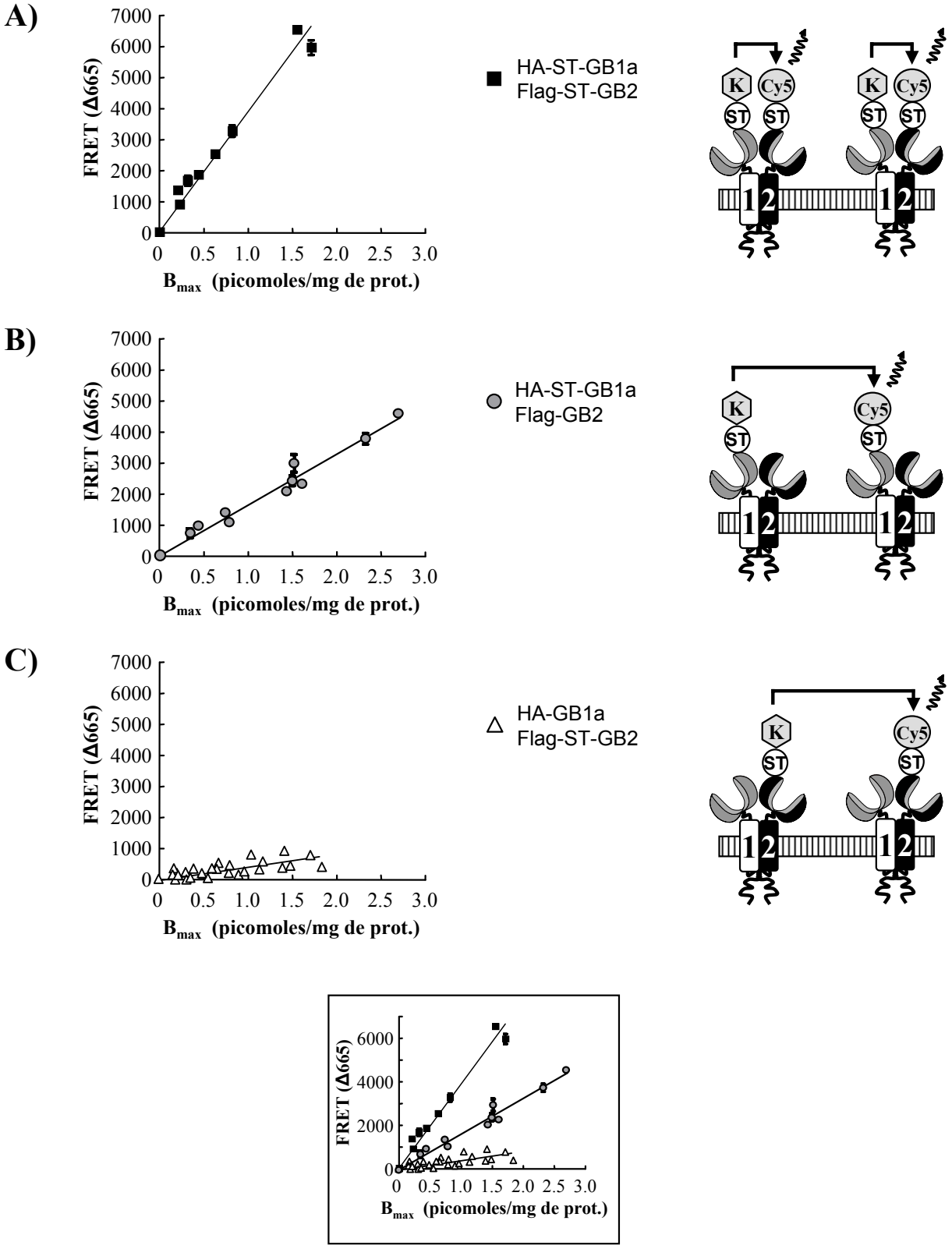


Figure VII.13 : Oligomérisation du récepteur $GABA_B$. Les cellules COS-7 ont été co-transfectées avec les sous-unités GB1 et GB2 fusionnées ou non au ST comme indiqué. Pour chaque combinaison, des gammes d'expression ont été réalisées en co-transfectant une quantité fixe de GB1 avec une gamme de GB2. 24h après transfection un mélange de BG-K et BG-Cy5 a été appliqué sur les cellules (Matériels et Méthodes). Après élimination de l'excès de fluorophores libres, le signal de FRET spécifique a été déterminé à 665 nm pour chaque population de cellules.

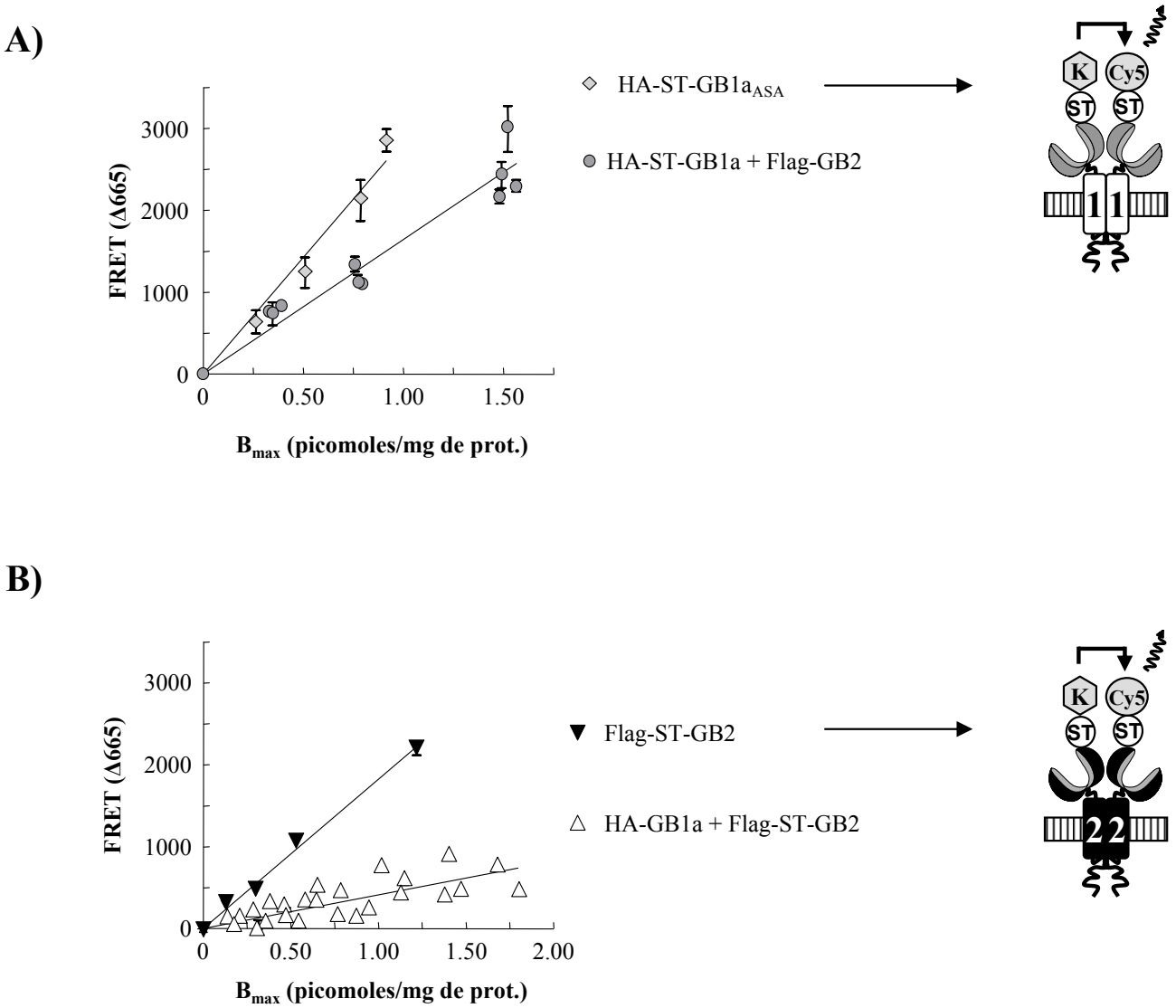


Figure VII.14 : Homodimérisation des sous-unités HA-ST-GB1a$_{ASA}$ et Flag-ST-GB2. Les cellules COS-7 ont été transfectées avec la sous-unité HA-ST-GB1a$_{ASA}$ **(A)** ou avec la sous-unité Flag-ST-GB2 **(B)**. Des gammes d'expression ont été réalisées et 24h après transfection un mélange de BG-K et BG-Cy5 a été appliqué sur les cellules. Après élimination de l'excès de fluorophores libres, le signal de FRET spécifique a été déterminé à 665 nm pour chaque population de cellules. La quantification de Flag-ST-GB2 **(B)** à la surface cellulaire n'est qu'une estimation car il a été impossible de réaliser de la liaison sur cette sous-unité (pas de ligands connus). Pour cela, nous avons corrélé les signaux d'ELISA Flag avec de la liaison sur la co-transfection GB1/Flag-ST-GB2. Ainsi, dans la même expérience, cette corrélation nous a permis d'estimer la densité de Flag-ST-GB2 exprimé seul à la surface cellulaire à partir des signaux de luminescence obtenus en ELISA.

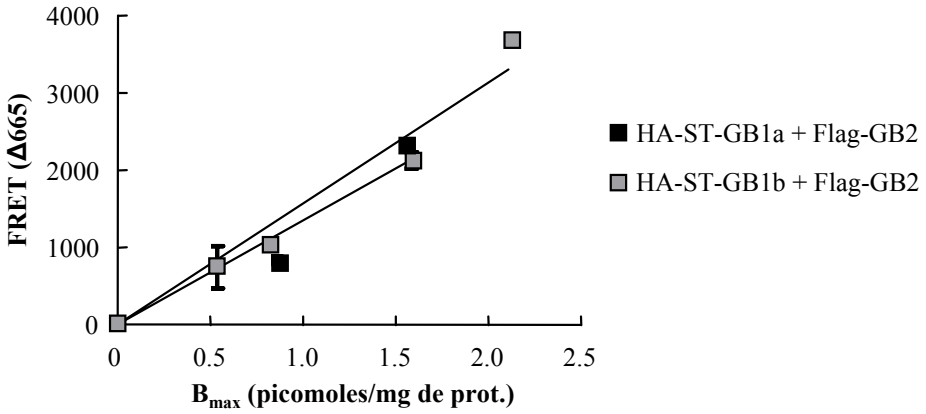


Figure VII.15 : Influence des domaines sushi de GB1a sur l'oligomérisation du récepteur $GABA_B$. Les cellules COS-7 ont été co-transfectées avec une gamme croissante de Flag-GB2 et une quantité fixe de HA-ST-GB1a ou de HA-ST-GB1b. 24h après transfection un mélange de BG-K et BG-Cy5 a été appliqué sur les cellules. Après lavages, le signal de FRET spécifique a été déterminé à 665 nm pour chaque population de cellules.

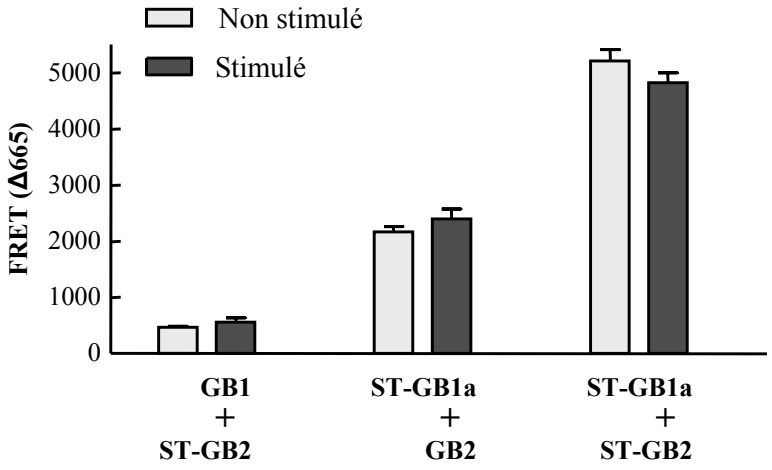


Figure VII.16 : Effet du GABA sur le FRET. Les cellules COS-7 ont été co-transfectées avec les sous-unités GB1 et GB2 comme indiqué. Après avoir marqué les récepteurs avec les BG-K et BG-Cy5, le signal de FRET a été analysé à 665 nm sur des cellules préalablement traitées ou non pendant 5 minutes au GABA (1mM). Les signaux représentés correspondent à 1.5 picomoles de récepteurs/mg de protéines. Les mêmes données ont été obtenues pour des densités de récepteurs allant de 0.5 picomoles à 3 picomoles /mg de protéines.

VII-C.4) Eléments de discussion.

Dans cette étude, nous avons utilisé l'approche SNAP-tag pour marquer les sous-unités GB1 et GB2 du récepteur $GABA_B$ avec des fluorophores favorables à une analyse de FRET en temps résolu (TR-FRET). Cette approche nous a permis de démontrer que l'hétérodimère obligatoire $GABA_B$ est capable de former des oligomères à la surface de cellules COS-7. Cet état oligomérique semble passer par des contacts entre les sous-unités GB1 alors que celles-ci sont présentes dans des hétérodimères différents. Concernant les sous-unités GB2, il est difficile de confirmer pour l'instant leur implication dans l'oligomérisation du récepteur $GABA_B$. En effet, les données obtenues indiquent soit que la distance séparant ces sous-unités est plus grande que pour les GB1, soit que l'orientation relative des fluorophores n'est pas favorable à un transfert d'énergie efficace. Ces deux facteurs peuvent être concomitants.

La technologie SNAP-tag a constitué la base méthodologique de ce travail. Cette technologie, qui a principalement trouvé des applications en microscopie, est basée sur une réaction enzymatique. Cette réaction permet de lier de manière covalente et unique, une molécule fluorescente au niveau d'une enzyme modifiée (ST), préalablement fusionnée à la protéine d'intérêt (Juillerat et al., 2003; Juillerat et al., 2005; Keppler et al., 2004). Ce marquage peut s'appliquer pour des protéines intracellulaires dans le cas de fluorophores perméants mais aussi pour des protéines exclusivement de surface via l'utilisation de fluorophores imperméants. Pour pouvoir tirer profit de cette technologie dans le cadre de ce projet, nous avons mis au point les conditions de marquage des sous-unités GB1 et GB2 du récepteur $GABA_B$ fusionnées au niveau de leur domaine N-terminal avec le ST. L'interêt d'utiliser les fluorophores cryptate de terre rare et Cy5 pour réaliser ce marquage est double. Tout d'abord, de part leur nature chimique, ces fluorophores ne peuvent traverser la membrane plasmique (résultats non montrés). Par conséquent, seules les sous-unités exprimées à la surface cellulaire sont marquées et détectées. Aucun signal parasite provenant des sous-unités intracellulaires en cours de synthèse ne peut donc venir interférer avec le signal des récepteurs de surface. D'autre part, les propriétés photophysiques de cette paire de fluorophores permettent d'envisager la mesure d'un FRET en temps résolu si la distance séparant ces deux molécules ainsi que leur orientation sont appropriées. L'intérêt d'un tel système de détection est de pouvoir analyser le signal de FRET en atténuant considérablement le bruit de fond ce qui a pour effet d'améliorer la sensibilité de la détection (Mathis, 1999). Sur la base de ces deux critères nous avons donc optimisé les conditions de marquage du

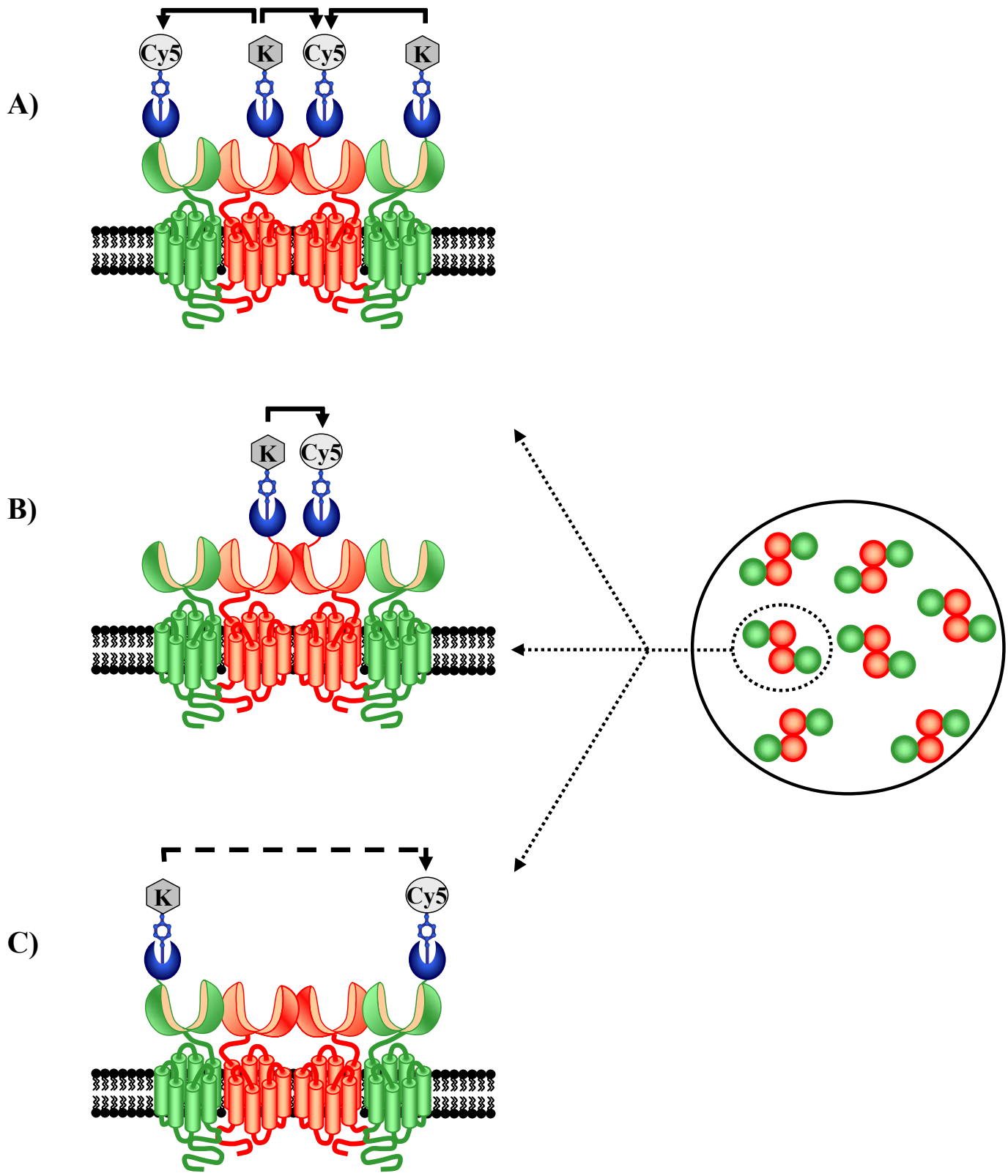


Figure VII.17 : Modélisation de l'oligomérisation du récepteur $GABA_B$.

récepteur $GABA_B$ dans un format 96 puits, sur des cellules exprimant les sous-unités HA-ST-GB1a/Flag-GB2. Nous avons ainsi déterminé des conditions permettant d'assurer un marquage de plus de 90% des sous-unités GB1 exprimées à la surface cellulaire. Ce marquage peut être réalisé aussi bien avec du cryptate de terre rare qu'avec du Cy5. La facilité de mise en œuvre du marquage, associée à la courte durée d'incubation des réactifs et à la miniaturisation du test au format 96 voir 384 puits sont les atouts de cette technologie.

Dans une deuxième série d'expériences nous avons co-transfecté les sous-unités GB1 et GB2 toutes deux fusionnées au ST. En appliquant simultanément sur ces cellules un mélange de fluorophores donneur et accepteur selon un rapport de concentration préalablement optimisé, nous avons été capables de détecter un TR-FRET au sein de l'hétérodimère GB1/GB2. Ce FRET, directement proportionnel à la quantité d'hétérodimères à la surface cellulaire, est détectable pour des niveaux d'expression inférieurs à 500 femtomoles de récepteurs/mg de protéines. Ceci démontre la sensibilité de cette méthode. En effet, dans des conditions physiologiques le niveau d'expression du récepteur $GABA_B$ est estimé sur des membranes totales de cerveau à 3 picomoles/mg de protéines membranaires (Bischoff et al., 1999). Il est donc possible d'écarter des phénomènes aléatoires de transfert d'énergie par simple proximité pouvant être due à la surexpression des récepteurs.

La question de l'oligomérisation du récepteur $GABA_B$ étant l'objet de ce travail, nous avons souhaité déterminer si des interactions entre hétérodimères peuvent être révélées par cette approche. Les résultats obtenus montrent qu'un signal de FRET est détectable entre les sous-unités GB1 alors qu'un signal de faible intensité est observé entre les sous-unités GB2. Parallèlement, nous avons démontré qu'un signal de FRET est aussi détectable entre les sous-unités $GB1a_{ASA}$ ou GB2 exprimées seules à la surface cellulaire. Ce dernier point est tout à fait en accord avec nos données obtenues précédemment par l'approche anticorps (Maurel et al., 2004) et avec les résultats obtenus par Villemure et coll. (Villemure et al., 2005). L'ensemble de ces résultats permet de proposer un modèle d'oligomérisation du récepteur $GABA_B$ où la sous-unité GB1a, présente dans des dimères distincts, participe à l'organisation des hétérodimères **(Figure VII.17)**. L'homodimérisation de la forme $GB1a_{ASA}$, mutée au niveau du site de rétention RSR, confirme l'association en homodimères de cette sous-unité. Nos données montrent de plus, que les domaines sushi de cette sous-unité ne sont pas impliqués. Concernant la sous-unité GB2, différentes hypothèses peuvent être avancées pour expliquer le faible signal de FRET inter-dimères. La première se base sur une distance entre

les sous-unités GB2 plus importante que celle séparant les sous-unités GB1. Le signal détecté entre les GB2 pourrait résulter d'une proximité plutôt que d'une véritable interaction. En effet, pour des mêmes niveaux d'expression, alors que le FRET inter-dimère via les GB2 est faible, un signal de FRET plus important est observable entre les sous-unités GB2 exprimées seules. Cette observation confirme donc la possibilité de détecter un FRET entre les GB2 lorsque ces sous-unités sont associées à la surface cellulaire en homodimères.

L'ensemble de ces données suggère aussi que le transfert d'énergie mesuré entre les GB1 n'est pas le résultat d'une forte concentration des récepteurs dans des microdomaines. En effet, si les hétérodimères étaient accumulés dans des microdomaines, alors le FRET entre les GB2 devrait être proche en intensité du FRET détecté entre les GB1. Pourtant il n'en est rien. Il apparaît en fait que les sous-unités GB1 présentent une association ordonnée que l'on ne retrouve pas entre les GB2. Il n'est pas permis d'exclure par contre que des sous-unités GB2 sous formes homodimériques, non associées à GB1, soient responsables du signal de FRET détecté.

Une deuxième hypothèse est que l'orientation des fluorophores sur la sous-unité GB2 n'est pas favorable à un transfert d'énergie efficace entre les hétérodimères. Même si cette hypothèse est envisageable, elle semble toutefois peu probable. En effet, le ST a peu de risque d'être contraint dans une orientation donnée du fait de son insertion directement en N-terminal de la sous-unité GB2. De plus, le fluorophore qui est attaché par une liaison covalente dispose d'une certaine liberté de rotation. La révélation en FRET de l'homodimérisation de GB2 exprimé seul est d'ailleurs un argument en faveur de ces remarques.

Afin de mettre en évidence une éventuelle dynamique de ces oligomères, nous avons testé l'effet d'agonistes sur les différentes interactions détectées. Les données obtenues révèlent que le signal de FRET mesuré au sein de l'hétérodimère et entre les dimères n'est pas affecté par la liaison du GABA. L'absence d'effet ne permet cependant pas d'exclure l'existence de changements conformationnels au cours du processus d'activation. Il est en effet possible que le R_0 du couple de fluorophores utilisés ($R_0 \sim 65$Å) ne soit pas compatible avec la détection de petites variations de distance.

Dans la perspective de ce travail il reste à confirmer à la fois l'interaction directe des sous-unités GB1 et l'absence d'association des sous-unités GB2. Concernant les sous-unités GB1, il serait intéressant de perturber l'association GB1/GB1 en insérant par exemple des sites de glycosylation en différentes positions des domaines extracellulaires de cette sous-unité. Cette stratégie a été utilisée avec succès au laboratoire dans l'identification de l'interface de contact GB1/GB2 (Rondard et coll., en cours de rédaction). La perte de signal de FRET entre les sous-unités GB1 à la surface cellulaire, serait un argument fort en faveur d'une interaction directe. Les éventuels effets de cette rupture pourraient être analysés au niveau de la liaison des ligands (modification d'affinité) ou au niveau des réponses intracellulaires. En effet, un contact entre les hétérodimères via les sous-unités GB1 pourrait avoir un effet allostérique sur la liaison des ligands ou un impact sur le couplage aux protéines G. Par la suite, les différentes zones de contact potentiellement impliquées pourraient être analysées. Pour cela, notre approche de TR-FRET devrait permettre de regarder séparément (via la réalisation de différentes constructions) si les domaines extracellulaires, les domaines heptahélices et les sous-unités tronquées de leur domaine C-terminal sont toujours capables de former des homodimères.

Concernant les sous-unités GB2, un moyen de confirmer que ces sous-unités ne sont pas en interaction serait de forcer un rapprochement des hétérodimères via l'utilisation d'anticorps bivalents. En effet, si ces sous-unités ne sont pas associées, l'ajout d'anticorps bivalents capables de contacter deux GB2 ensembles pourrait permettre de réticuler les récepteurs et donc d'augmenter le signal de FRET mesuré entre ces sous-unités. Des résultats préliminaires vont dans ce sens (non montrés).

L'ensemble de ces données suggère pour la première fois, que le récepteur $GABA_B$, connu pour être un hétérodimère obligatoire, est capable de s'organiser à la surface cellulaire en oligomères. Dans cette structure oligomérique, la sous-unité GB1pourrait avoir un rôle clé dans l'association des hétérodimères. Toutefois, le rôle physiologique d'une telle organisation pour ce type de récepteur reste encore à déterminer.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La technologie HTRF est une méthode de détection principalement axée sur le développement de tests de dosage de petites molécules intracellulaires. Ces systèmes de dosage par compétition impliquent une lyse des cellules. Les travaux rapportés dans cette thèse avaient pour objectif d'adapter cette technologique à la détection d'interactions protéiques dans un format moins destructif pour la cellule.

En tirant profit du modèle $GABA_B$, nous avons mis en évidence la dimérisation de RCPG à la surface cellulaire mais également identifié différents processus d'interaction au sein même de ce récepteur et dans son environnement protéique de proximité. Ainsi, l'homo- et l'hétérodimérisation des sous-unités de ce récepteur à la surface cellulaire ont été clairement mises en évidence par cette technologie. Les principaux atouts de cette méthode sont de pouvoir cibler les protéines uniquement de surface grâce à l'utilisation d'anticorps marqués avec des fluorophores tout en bénéficiant d'une sensibilité de détection suffisante pour travailler en phase homogène (sans étapes de lavages). Afin d'élargir le domaine d'application de cette approche nous avons par la suite mis en évidence des interactions intracellulaires après perméabilisation des cellules. Ainsi, il est possible de détecter des oligomères de la sous-unité GB1 retenue dans les compartiments intracellulaires.

Dans le but d'analyser le plus précisément possible ces interactions entre sous-unités, nous avons mis au point une deuxième méthode de marquage des protéines de surface. En effet, la méthode anticorps présente deux limites que sont la taille des complexes, de l'ordre de 150 kDa, et la présence de plusieurs fluorophores par anticorps. Pour pallier ces contraintes, la technologie SNAP-tag nous a semblé une méthode intéressante car offrant la possibilité de marquer irréversiblement les protéines d'intérêt exprimées à la surface cellulaire avec un seul fluorophore. De plus, la sonde (AGT modifiée de 21 kDa) greffée au niveau de la protéine cible est plus petite qu'un anticorps ou qu'une GFP et Luciférase classiquement utilisées dans les techniques FRET et BRET. Après avoir mis au point les conditions de marquage des sous-unités GB1 et GB2 du récepteur $GABA_B$, nous avons été capables de détecter un transfert d'énergie au sein même de l'hétérodimère entre deux fluorophores spécifiquement greffés sur chacune des sous-unités. Cette approche nous a permis ensuite d'analyser précisément en

FRET les interactions intervenant entre des sous-unités présentes dans des hétérodimères différents. La détection d'un transfert d'énergie entre des hétérodimères est, en effet, un argument fort en faveur d'une oligomérisation de ce récepteur. Cette question de l'oligomérisation des RCPG a déjà été abordée pour la rhodopsine avec notamment les travaux réalisés par l'équipe de Palczewski. Toutefois, il n'existe à ce jour qu'une seule démonstration de l'existence d'oligomérisation supérieure au dimère dans des conditions cellulaires non invasives (Milligan et al., 2006). Nos résultats obtenus en cellules vivantes révèlent la capacité du récepteur $GABA_B$ à s'organiser à la surface cellulaire en structures oligomériques supérieures au dimère. Il apparaît ainsi clairement que la sous-unité GB1 joue un rôle charnière dans l'association et l'organisation des hétérodimères. Le rôle d'une telle organisation n'est toutefois pas élucidé pour ce récepteur.

En perspective, nous souhaitons confirmer l'oligomérisation du récepteur $GABA_B$ par des expériences complémentaires de cross-correlation (CC) de fluorescence. En effet, l'approche SNAP-tag offre la possibilité de marquer les récepteurs avec deux fluorophores différents. Ainsi, après avoir greffé spécifiquement ces molécules fluorescentes au niveau de la sous-unité GB1 il devrait être possible d'analyser la diffusion des hétérodimères dans la membrane plasmique. La co-diffusion de différents hétérodimères indiquerait l'appartenance de sous-unités GB1 à un même complexe moléculaire. Ceci serait un argument supplémentaire en faveur d'une oligomérisation de ce récepteur.

La combinaison de ces deux méthodes (FRET et CC) permettrait aussi d'envisager l'analyse de la stabilité de ces complexes à la surface cellulaire. En effet, nous disposons au laboratoire de stratégies originales permettant d'aborder ce type de question. La stratégie consisterait à co-transfecter dans les mêmes cellules deux populations d'hétérodimères différentes. Une première population correspondant à des hétérodimères fusionnés au niveau de la sous-unité GB1 avec un SNAP-tag permettrait de détecter un FRET inter-dimères après marquage. Une deuxième population d'hétérodimères non marqués portant un système d'adressage inductible « drogue-dépendant » pourrait être envoyée ensuite à la surface cellulaire. Ce système a été mis au point au laboratoire et permet, suite à l'application d'une drogue sur les cellules, d'envoyer en une heure, les hétérodimères modifiés au niveau de leur domaine C-terminal à la surface cellulaire. Un échange entre les récepteurs marqués et non marqués au sein de ces complexes devrait entraîner une baisse du signal de FRET et/ou du signal de CC. En revanche, si les complexes oligomériques sont stables à la surface cellulaire,

la surexpression d'hétérodimères non marqués ne devrait pas affecter le FRET et/ou l'amplitude du signal de CC.

Enfin, si le rôle de l'oligomérisation reste ouvert à débat, il est cependant essentiel de comprendre comment ces complexes interagissent et activent les protéines G. Certains auteurs supposent que le monomère (Chabre and le Maire, 2005) ou le dimère (Liang et al., 2003) seraient la forme capable d'activer les protéines G. D'autres auteurs suggèrent un modèle d'ancrage de la transducine sous un oligomère de rhodopsine (Gαt sous un dimère de rhodopsine) (Filipek et al., 2004; Park et al., 2004). Ce dernier modèle propose une éventuelle oligomérisation sous-membranaire de la tranducine qui serait le miroir de l'oligomérisation membranaire de la rhodopsine. Cette stœchiométrie d'assemblage entre le récepteur et la protéine G pourrait expliquer par exemple, pourquoi la capacité de liaison maximale des protéines Gt ne représente que 25% des rhodopsines actives. A la lumière des connaissances actuelles, il n'est pas possible de se prononcer sur la pertinence des différents modèles proposés.

La technologie SNAP-tag est un outil utilisable en TR-FRET pour distinguer une éventuelle oligomérisation des protéines G. En effet, cette approche offre la possibilité de marquer les protéines intracellulaires. Nous avons validé un système de FRET intracellulaire entre les domaines C-terminaux des sous-unités GB1 et GB2 par cette méthode (non montré). La fusion du SNAP-tag au niveau des protéines Gi/Go couplées au récepteur $GABA_B$ pourrait être une approche judicieuse pour analyser en TR-FRET une éventuelle oligomérisation de ces protéines. L'oligomérisation des sous-unités Gt, $G\alpha_i$, $G\alpha_o$ et $G\alpha_s$ a été proposée à la suite d'expériences de pontage chimique et d'observations de coopérativité positive entre protéines hétérotrimériques (Coulter and Rodbell, 1992; Hingorani et al., 1988; Wessling-Resnick and Johnson, 1989; Willardson et al., 1993).

Enfin, l'idée selon laquelle les récepteurs membranaires, les protéines G et les effecteurs seraient des entités isolées se déplaçant « au grè des courants » dans la membrane plasmique, semble inappropriée. Les modèles proposés actuellement tendent plutôt vers la description de complexes protéiques pouvant être localisés dans des domaines particuliers de la membrane plasmique. Cette idée de complexes protéiques est renforcée notamment par des données obtenues en FRET et BRET sur un éventuel pré-assemblage des protéines G aux récepteurs (Gales et al., 2005; Gales et al., 2006; Nobles et al., 2005). Les interconnections entre les

récepteurs, les protéines G et les effecteurs dans de tels complexes, n'ont toutefois pas encore été caractérisées.

Dans le contexte actuel de recherche de molécules actives et sélectives pour un type de récepteur, il est indispensable de pouvoir identifier d'une part tous les partenaires impliqués à la suite de la modulation d'un récepteur par un type de ligand, et d'autre part de bien appréhender les mécanismes moléculaires régissant cet échafaudage protéique. Ainsi des réponses technologiques sont indispensables pour révéler ces défis et repousser les limites actuelles de détection de partenaires ou de certaines interactions protéine-protéine. Le développement de sondes fluorescentes ou de procédés permettant des marquages de ces sondes sur des protéines d'intérêt a permis de découvrir de nouvelles facettes dans la régulation de la signalisation cellulaire. L'utilisation future des nanotechnologies couplée à des avancées dans le domaine résolutif de l'imagerie devraient permettre de progresser encore dans notre compréhension de la signalisation cellulaire.

ANNEXE I : MATERIELS ET METHODES

Culture cellulaire et transfections

Les cellules COS7 sont cultivées à 37°C, 5% de CO_2 dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Invitrogen) supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (FCS, Invitrogen) et des antibiotiques (streptomycine et pénicilline, 100 U/mL final). L'électroporation des cellules est réalisée dans un volume de 150 µL avec 5µg d'ADN total (quantité variable d'ADN codant pour les sous-unités GB1 et GB2, complétée avec du vecteur pRK6) et 5 millions de cellules reprises dans du tampon d'électroporation (50mM KH_2PO_4, 20mM CH_3COOK et 20mM de KOH, pH 7.4). Après électroporation (270 V, 0.5mF, Bio-Rad Gene Pulser electroporator ; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) les cellules sont resuspendues dans du DMEM complet puis déposées dans une plaque 96 puits à raison de 100.000 cellules/puits.

Test fonctionnel : mesure de la libération de Ca^{2+} intracellulaire

Les cellules COS7 sont transfectées avec les vecteurs codant pour les sous-unités GB1 et GB2 fusionnées ou non au SNAP-tag (ST) et avec une sous-unité Gqi9 chimérique. Vingt-quatre heures après la transfection, les cellules sont lavées avec du tampon HBSS (20mM Hépès, 1mM $MgSO_4$, 3.3mM Na_2CO_3, 1.3mM $CaCl_2$, 0.1% BSA, 2.5 probenecid) et incubées pendant une heure à 37°C avec le Fluo-4 AM (Molecular Probes), un composé fluorescent sensible aux ions calcium. Après lavage avec du tampon HBSS, les signaux de fluorescence à 525 nm (excitation à 485 nm) sont mesurés sur un lecteur de plaques de type Flexstation (Molecular Device). Le signal de fluorescence est mesuré pendant 60 secondes, l'activation du récepteur $GABA_B$ étant effectuée après 20 secondes d'enregistrement par ajout de 1mM de GABA. Les données (moyenne des valeurs Max-Min +/- SE) sont analysées à l'aide du logiciel Soft Max Pro.

ELISA

Les sous-unités étiquetées au niveau N-terminal avec une séquence HA (haemaglutinine) ou Flag sont quantifiées à la surface cellulaire par ELISA. Vingt-quatre heures après

transfection, les cellules sont fixées avec 4 % de paraformaldéhyde pendant cinq minutes à température ambiante. Après deux lavages avec du PBS les sites non spécifiques sont saturés avec une solution de PBS contenant 1 % de SVF pendant 30 minutes à température ambiante. Les cellules sont ensuite incubées pendant 30 minutes avec un anticorps monoclonal de rat anti-HA (clone 3F10, Roche) directement couplé à la péroxydase (HRP). Après quatre lavages avec du PBS 1% FCS suivis de quatre lavages avec du PBS, les anticorps liés sont détectés et quantifiés par chimioluminescence (Supersignal West Femto, Pierce) sur un compteur Wallac Victor (Molecular Devices).

Liaison à l'équilibre (Scatchard)

Pour les expériences de saturation, les cellules sont incubées avec une concentration croissante de traceur radioactif (0.48 nM à 10 nM de [H^3]-CGP54626, un antagoniste du récepteur $GABA_B$) pendant quatre heures à 4°C sous un volume total de 100µL/puit (96 puits). Pour chaque concentration de traceur, la liaison non spécifique est déterminée par l'ajout d'un excès de GABA non marqué (C_f = 1mM). Après incubation, les cellules sont lavées trois fois dans du tampon Tris-KREBS (20 mM Tris pH 7.4, 118 mM NaCl, 5.6 mM Glucose, 1.2 mM KH_2PO_4, 1.2 mM $MgSO_4$, 4.7mM KCl, 1.8mM $CaCl_2$) afin d'éliminer l'excès de ligand tritié libre. Les cellules sont ensuite lysées avec 100µL de NaOH 0.1 M pendant 10 minutes à température ambiante puis le lysat est récupéré dans des fioles (un puit = une fiole) en présence de 5mL de scintillant (OptiPhase Supermix, Perkin Elmer). La radioactivité est déterminée sur un compteur Béta Cobra (Hewlett Packard) et les données analysées sur le logiciel GraphPad Prism. A partir des données obtenues, les courbes ont été tracées en utilisant l'équation B = Bmax [L] / ([L] + Kd) où Bmax correspond à la liaison maximale (nombre de sites), L la concentration en ligand marqué et Kd la constante de dissociation du ligand marqué.

Marquage des SNAP-tag (ST)

Les récepteurs sont marqués pendant 1h à 37°C avec 5µM de BG-K ou 0.5µM de BG-Cy5 dilués dans du DMEM 10% SVF sous un volume de 100µL. L'efficacité du marquage dans ces conditions est supérieure à 90%. Après trois lavages dans du tampon Tris-KREBS, BSA 0.5% l'émission de la fluorescence provenant du cryptate de terre rare (K) est mesurée à 620 nm sur un lecteur de plaque Rubystar (BMG Labtechnologies) et l'émission du Cy5 à 682 nm

sur un lecteur de plaque Analyst (Molecular Devices). Pour chacun des fluorophores, le marquage spécifique est déterminé en soustrayant le signal provenant de la fixation non spécifique sur des cellules Mock, au marquage total obtenu sur les cellules exprimant les sous-unités fusionnées au ST.

Mesure de FRET en temps résolu

Suite au marquage des SNAP-tag avec un fluorophore (K ou Cy5), les cellules sont incubées avec 2nM d'anticorps anti-Flag (M2) pendant une nuit à 4°C sous un volume de 100µL. En fonction du marquage réalisé sur le ST, les anticorps sont soit couplés à des fluorophores K, soit à des fluorophores Cy5. L'acquisition du signal de FRET est effectuée à 665 nm sur un lecteur Rubystar et le signal exprimé en Delta665 :

Delta665 = (signal à 665 nm de l'échantillon – signal à 665 n m du négatif).

Il représente le signal d'émission de l'accepteur engagé dans un transfert d'énergie. Quel que soit le système utilisé, le contrôle négatif correspond toujours à l'incubation du fluorophore donneur seul sur les cellules. Ainsi, lorsque le Cy5 est fixé sur le ST, le contrôle négatif correspond à l'anticorps-K seul. En revanche, dans le système inverse, le K sur le ST représente le contrôle négatif (en l'absence d'anticorps-Cy5).

Pour réaliser un marquage deux couleurs des ST, un mélange de 5µM de BG-K et 0.2µM de BG-Cy5 est appliqué sur les cellules et ceci dans les mêmes conditions de marquage que précédemment. Dans ce format de détection le contrôle négatif qui permet de déterminer le Delta665 correspond à un mélange de 5µM de BG-K et de 0.2µM de BG froid.

FRET sur cellules fixées

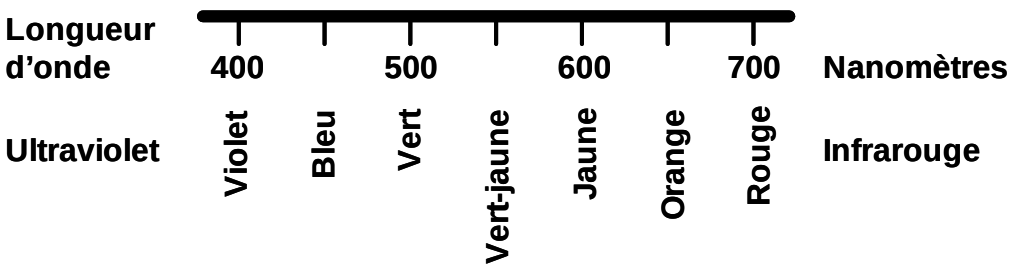
Les cellules COS-7 sont transitoirement transfectées puis cultivées pendant 24 heures dans des plaques 96 puits noires (Greiner) à raison de 100.000 cellules/puit. Les cellules sont ensuite fixées avec 4 % de paraformaldéhyde pendant cinq minutes à température ambiante. Après deux lavages avec du PBS, les cellules sont perméabilisées avec une solution de PBS, 0.05% triton pendant 5 minutes à température ambiante. Après deux lavages avec du PBS, les sites non spécifiques sont saturés avec une solution de PBS contenant 1 % de SVF pendant 30

minutes à température ambiante. Les cellules sont ensuite incubées une nuit à 4°C avec 1nM d'anticorps anti-Flag-K et 3nM d'anticorps anti-Myc-A647 dans du tampon intracellulaire (120 mM KCl, 10 mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$, 5 mM Hepes, 1 mM $CaCl_2$, 11 mM EGTA, pH 7.4) 1% SVF. Le signal de FRET est détecté sur un lecteur de plaque Rubystar (BMG Labtechnologies).

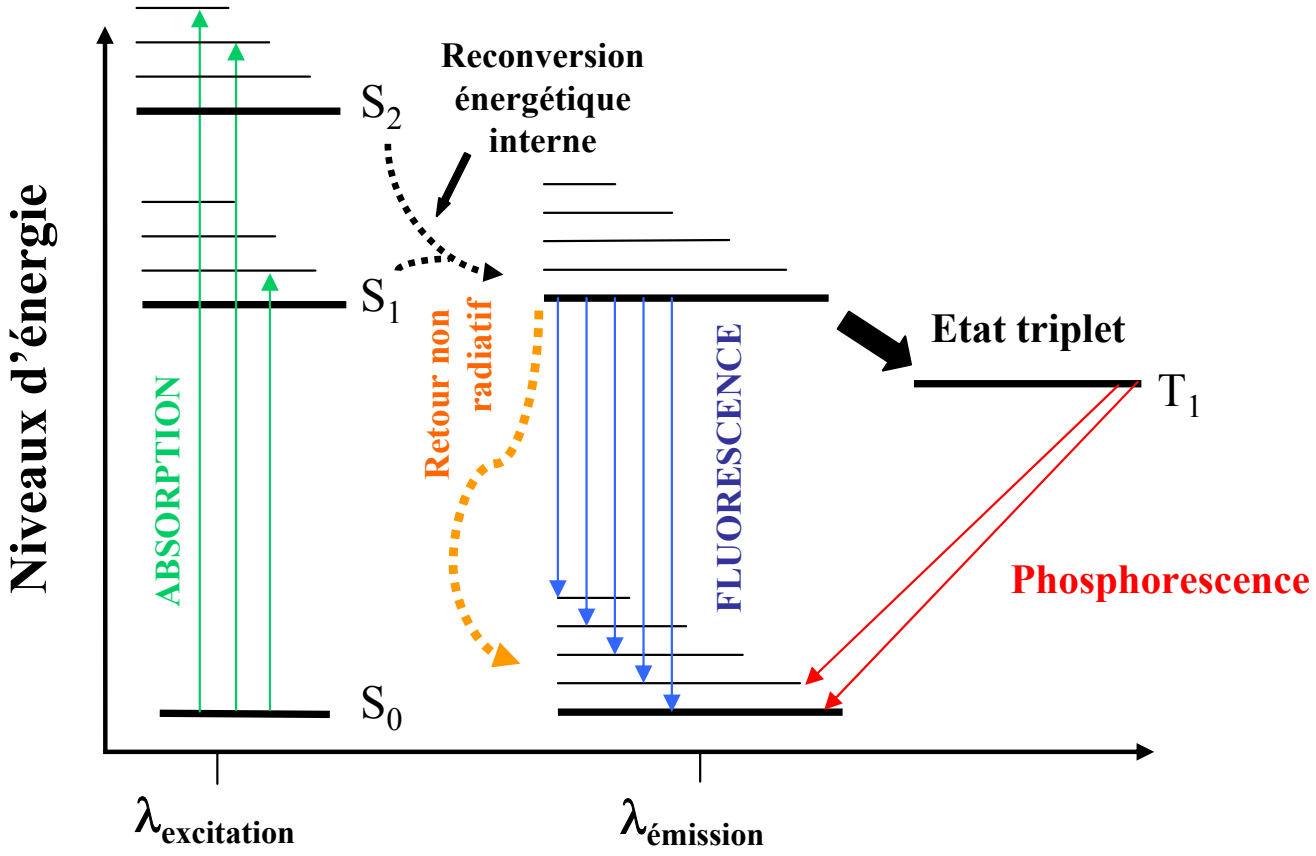
FRET sur lyse ménagée

Les cellules sont directement incubées, 24 heures après transfection, avec 1nM d'anticorps anti-Flag-K et 3nM d'anticorps anti-Myc-A647 dans du tampon Tris-KREBS ou dans du milieu intracellulaire en présence de triton ou saponine (préparés extemporanément). Après une nuit d'incubation à 4°C, le signal de FRET est détecté sur un lecteur de plaque Rubystar (BMG Labtechnologies).

ANNEXE II : Spectres des couleurs



Désignation	Couleur	Longueur d'onde (nm)
Rouge		~ 625 – 740
Orange		~ 590 - 625
Jaune		~ 565 - 590
Vert		~ 520 - 565
Cyan		~ 500 - 520
Bleu		~ 450 - 500
Indigo		~ 430 - 450
Violet		~ 380 - 430



Représentation des phénomènes de fluorescence et de phosphorescence dans le diagramme de Jablonski

ANNEXE III : Notions théoriques de la fluorescence

La photoluminescence

La luminescence caractérise la capacité d'une molécule à restituer sous forme de lumière (photons) une partie de l'énergie absorbée au cours d'une excitation d'origine lumineuse (photoluminescence), chimique (chimioluminescence) ou enzymatique (bioluminescence). Il s'agit donc de la désactivation d'une molécule excitée vers un état de moindre énergie. Selon la vitesse de désexcitation des électrons, suite à une excitation lumineuse, on distinguera deux phénomènes de photoluminescence que sont la fluorescence et la phosphorescence.

Le diagramme de Jablonski propose une représentation des différents niveaux d'énergie et des sauts entre ces niveaux qui sont associés à ces deux phénomènes. Lorsqu'une molécule (fluorophore) absorbe un photon d'énergie $h\upsilon$, elle change de niveau d'énergie électronique passant d'un état dit fondamental (S_0) vers un état de plus haute énergie (S_1, S_2). Chacun des niveaux énergétiques, qu'il s'agisse de l'état stable S_0 ou des états excités supérieurs S_1, S_2, comprend différents sous niveaux d'énergie dits vibrationnels et rotationnels. Suite à des phénomènes très rapides de désexcitation non radiative (conversion énergétique interne/vibration) l'électron excité à un niveau élevé (S_2) peut redescendre au niveau excité S_1 pour finalement retourner à son état d'énergie initial S_0. Ce retour de l'état S_1 vers l'état S_0 peut se produire selon différentes voies :

1) si le retour vers les différents niveaux vibrationnels de l'état fondamental S_0 se fait directement avec émission d'un photon, il s'agit d'une émission de fluorescence (0.1 à 10ns).

2) si le retour vers l'état fondamental S_0 passe par un état intermédiaire dit état triplet T_1, l'émission d'un photon qui accompagne le passage $T_1 \rightarrow S_0$ est appelée phosphorescence. L'état triplet T_1 étant relativement stable, le phénomène de désexcitation par émission d'un photon est plus lent (de 0.1ms à quelques secondes).

3) le retour vers l'état fondamental S_0 peut se faire sans émission de photons. Ces transitions non radiatives vont dépendre de différents paramètres liés à l'environnement de la molécule (échange d'énergie avec d'autres molécules par collision…) et à la présence éventuelle de molécules dites extinctrices (la plus connue étant l'oxygène).

Spectres d'absorption et d'émission, déplacement de Stokes

Une molécule peut être caractérisée par des spectres d'absorption et d'émission qui lui sont propres. Ces spectres représentent la signature de la structure énergétique de la molécule. A chaque saut énergétique, faisant passer une molécule de son état fondamental vers des niveaux vibrationnels de plus haute énergie, correspond une longueur d'onde de la lumière d'excitation :

$$\Delta E = \frac{hc}{\lambda}$$

où ΔE représente la différence entre deux niveaux énergétiques, h la constante de Planck, c la vitesse de la lumière dans le vide et λ la longueur d'onde du rayonnement.

Généralement, le spectre d'émission de fluorescence correspond à l'image miroir du spectre d'absorption avec un décalage vers le rouge (plus grandes longueurs d'ondes). Ce décalage correspond à la perte d'énergie entre photon absorbé et photon émis. Cet effet est connu sous le nom de déplacement de Stokes. Il définit généralement la distance entre les maxima d'excitation et d'émission pour une molécule donnée (λ_{max} excitation < λ_{max} émission). On notera que le spectre d'émission conserve sa forme indépendamment de la partie du spectre d'excitation exploitée par la source lumineuse.

Le rendement quantique

Le rendement quantique de fluorescence (Φ) correspond au rapport du nombre de photons émis sur le nombre de photons absorbés par une molécule. Il est donc compris entre 0 et 1. Comme nous l'avons vu précédemment une molécule à l'état excité peut revenir à son état fondamental de plus basse énergie par différentes voies non radiatives (conversion interne, collision, extinction de fluorescence…) et/ou radiative (émission de photons). Le rendement quantique rend compte de la compétition entre ces différents phénomènes de désexcitation qui vont finalement dépeupler l'état excité.

En tenant compte des constantes de désactivation non radiatives et radiatives, l'expression du rendement quantique peut s'écrire :

$$\Phi = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}}$$

où Φ représente le rendement quantique, k_r la constante désactivation radiative et k_{nr} la constante de désactivation non radiative.

Durée de vie de fluorescence

La durée de vie de fluorescence (τ) peut se définir comme le temps moyen pendant lequel une molécule reste à l'état excité avant de revenir à son état fondamental. Ce temps sera d'autant plus court que les vitesses de désexcitation seront rapides :

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}}$$

En pratique, la durée de vie de fluorescence d'une molécule est déterminée par celle d'une population de molécules. Bien qu'il soit difficile de mesurer le nombre de molécules à l'état excité il est toutefois possible d'avoir accès à la valeur de τ en mesurant le déclin de fluorescence après une courte excitation laser. La décroissance temporelle du signal de fluorescence s'écrit :

$$I(t) = I_o.e^{-t/\tau}$$

où I (t) représente le déclin d'intensité de fluorescence, I_o l'intensité de fluorescence mesurée au temps 0 et τ la durée de vie de fluorescence.

Les molécules n'étant pas synchrones, la fluorescence émise après désexcitation suit une décroissance monoexponentielle au cours du temps. La pente de la droite donnée par la représentation du déclin de fluorescence à l'échelle logarithmique en fonction du temps

correspond à la somme des vitesses de désactivation. Il est ainsi possible de déterminer τ qui correspond à l'inverse de ces vitesses.

Intensité de fluorescence

L'intensité de fluorescence d'une solution dépend de plusieurs paramètres :

$$F = I_a \times \phi$$

où F représente l'intensité de fluorescence, I_a l'intensité de lumière absorbée et ϕ le rendement quantique.

Pour des faibles concentrations de fluorophores (D.O < 0.1), d'après la loi de Beer-Lambert, on a :

$$I_a = I_o \times 2.3 \times \varepsilon \times l \times c$$

où I_o représente l'intensité de la source lumineuse, ε le coefficient d'extinction molaire et C la concentration en fluorophore dans l'échantillon.

$$F = Io \times \varepsilon \times l \times c \times \phi$$

L'intensité de fluorescence est donc proportionnelle à l'intensité de la source lumineuse, à la concentration du fluorophore, à son coefficient d'extinction molaire et au rendement quantique qui va dépendre de l'environnement du fluorophore.

ANNEXE IV : publications

Article 1 : J. Kniazeff, A.S. Bessis, **D. Maurel**, H. Ansanay, L. Prézeau, J.P. Pin, Closed state of both binding domains of homodimeric mGlu receptors is required for full activity, ***Nature Structural and Molecular Biology*** **(2004)** 11 (8) : 706-13.

Article 2 : J. Liu, D**. Maurel**, S. Etzol, I. Brabet, H. Ansanay, J.P. Pin, P. Rondard, Molecular determinants involved in the allosteric control of agonist affinity in the $GABA_B$ receptor by the $GABA_{B2}$ subunit, ***The Journal of Biological Chemistry*** **(2004)** 279(16) : 15824-30.

nature structural & molecular biology

Closed state of both binding domains of homodimeric mGlu receptors is required for full activity

Julie Kniazeff[1], Anne-Sophie Bessis[1,3], Damien Maurel[1,2], Hervé Ansanay[2], Laurent Prézeau[1] & Jean-Philippe Pin[1]

Membrane receptors, key components in signal transduction, often function as dimers. These include some G protein–coupled receptors such as metabotropic glutamate (mGlu) receptors that have large extracellular domains (ECDs) where agonists bind. How agonist binding in dimeric ECDs activates the effector domains remains largely unknown. The structure of the dimeric ECDs of $mGlu_1$ solved in the presence of agonist revealed two specific conformations in which either one or both protomers are in an agonist-stabilized closed form. Here we examined whether both conformations correspond to an active form of the full-length receptor. Using a system that allows the formation of dimers made of a wild-type and a mutant subunit, we show that the closure of one ECD per dimer is sufficient to activate the receptor, but the closure of both ECDs is required for full activity.

© 2004 Nature Publishing Group http://www.nature.com/nsmb

Cell surface receptors play major roles in signal transduction. Many of them exist as dimers, but the precise conformational changes leading to their activation remain largely unknown. Some of these receptors have a large ECD that is involved in agonist binding. Conformational changes in ECDs resulting from agonist binding have to affect the conformation of the effector domain for the signal to be transduced inside the cell.

The structures of dimeric ECDs of many membrane receptors, including some tyrosine kinase[1–4], guanylate cyclase[5–7] and G-protein coupled receptors (GPCRs)[8–11], have been solved by X-ray crystallography in the absence or presence of agonists. Accordingly, initial steps leading to receptor activation have been proposed, but they remain to be confirmed in full-length receptors.

The $mGlu_1$ receptor is one of the dimeric receptors for which important information has been obtained by X-ray crystallography[8,9]. This receptor belongs to class C of GPCRs, which includes the eight mGlu receptors, the γ-aminobutyric acid type B ($GABA_B$) receptor, the Ca^{2+} sensing receptor and some taste and pheromone receptors[12]. In addition to the heptahelical domain (HD) common to all GPCRs, class C receptors have a large ECD composed of a Venus flytrap domain (VFT) where agonists bind and a cysteine-rich domain (CRD).

The resolution of the structure of $mGlu_1$ VFT[8,9], expressed as a soluble protein, confirmed several features suggested previously[13,14]: (i) this domain is structurally similar to some bacterial periplasmic proteins and is composed of two lobes separated by a cleft where ligand binds; (ii) the VFT, in an open conformation in the absence of ligand or with bound antagonist, can adopt a closed conformation upon agonist binding; (iii) these soluble VFTs are associated in homodimers at the level of their lobe I by hydrophobic interactions and a disulfide bridge.

The most notably observation is the existence of two possible relative orientations of the VFTs within the dimer. The first orientation is observed in the absence of agonist or in the presence of an antagonist, and is therefore called 'resting.' In this case, both VFTs are open (Roo) and the lobes in the two ligand-binding domains that connect the HD (lobe II) are far apart (**Fig. 1**). The second orientation is observed in the presence of agonists, and is therefore called 'active.' In this case, either one (Aco) or both (Acc) VFTs are in a closed state and the lobes II become closer and directly contact each other (**Fig. 1**). Moreover, binding of a cation like Gd^{3+}, which is an $mGlu_1$ potentiator, at the lobe II interface has been proposed to favor the Acc conformation[8].

We have previously shown that, in full-length receptors, agonists act by stabilizing a closed state in at least one VFT whereas antagonists prevent such closure. Indeed, the insertion of two cysteines expected to close the VFT of the $GABA_{B1}$ receptor lead to a constitutively fully active receptor[15]. Moreover, mutation of residues that prevent the closure of the $mGlu_8$ VFT upon binding of two distinct antagonists allows these molecules to act as full agonists[16]. However, it is still unknown whether both Acc and Aco conformations of the dimer of VFTs correspond to active receptor conformations. It is also unclear whether binding of two agonists per dimer is required for activation of class C GPCRs. In the case of the heterodimeric $GABA_B$ receptor, which is composed of the $GABA_{B1}$ and $GABA_{B2}$ subunits, it has been shown that agonist binding occurs in the $GABA_{B1}$ VFT only[17], but what about homodimeric mGlu receptors?

In the present study we examined whether the binding of one or two agonists is required to activate homodimeric mGlu receptors. We also examined whether the Aco conformation of the dimer of VFTs corresponds to a fully active receptor. To that aim, we developed a system that allows the surface expression of dimeric combinations composed

[1]Laboratory of Functional Genomics, Department of Molecular Pharmacology, Centre National de la Recherche Scientifique, Unite Propre de Recherche 2580, 141 rue de la Cardonille, 34094 Montpellier Cedex 5, France. [2]Cis Bio International, BP 175, F 30203 Bagnols sur Ceze, France. [3]Present address: Addex Pharmaceuticals SA, 12, Chemin Des Aulx, CH-1228 Plan les Ouates, Geneva, Switzerland. Correspondence should be addressed to J.P.P. (jppin@ccipe.cnrs.fr).

Published online 4 July 2004; doi:10.1038/nsmb794

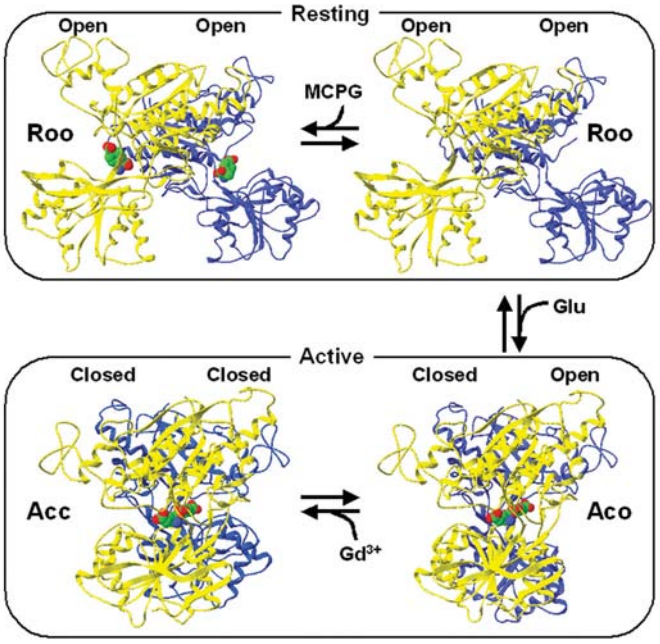


Figure 1 Different conformations of the $mGlu_1$ VFT dimer determined by X-ray crystallography. The different conformations observed under various crystallization conditions are represented in the same orientation: lobes I of both protomers on top and lobes II on bottom. Chain A (yellow) is in front and chain B (blue) is in back. Top panel, structures in the 'resting' open-open orientation (Roo), either unliganded (right; PDB entry 1EWT) or in the presence of a competitive antagonist, MCPG (left; PDB entry 1ISS). Bottom panel, structures in the 'active' orientation, closed-open (Aco) in the presence of glutamate (right; PDB entry 1EWK), and closed-closed (Acc) in the presence of both glutamate and Gd^{3+} (left; PDB entry 1ISR)). The Aco structure has also been observed without ligand (PDB entry 1EWV).

of two defined subunits, with or without specific mutations. Here we show that although binding of a single agonist is sufficient to activate $mGlu_5$ receptor, a second is required for full activity. Our data also show that only the Acc conformation leads to full activity and that the Aco conformation corresponds to a partially active state of the dimer.

RESULTS

Generation of 'heterodimeric' $mGlu_5$ receptor

To examine the specific role and possible conformation of each VFT in a dimeric mGlu receptor, it is necessary to have access to dimeric receptors composed of two defined subunits, one with and one without mutations affecting ligand recognition.

To that aim, we took advantage of the quality control system of the $GABA_B$ receptor[18–20]. We first replaced the C-terminal tail of $mGlu_5$ by that of the $GABA_{B1}$ subunit containing the endoplasmic reticulum (ER) retention signal RSRR (**Fig. 2a**). As expected, the mG5C1 chimera was not targeted to the cell surface as shown by both immunofluorescence and ELISA experiments conducted on intact cells (**Fig. 2b,c**). Mutation of the ER retention signal into ASAR[19] allowed the receptor to reach the cell surface and to activate phospholipase C (PLC) (quisqualate $EC_{50} = 56 \pm 10$ nM), demonstrating that the C-terminal tail of $GABA_{B1}$ does not prevent coupling to Gq (**Fig. 2d**).

A second $mGlu_5$ chimera was generated in which the C-terminal tail was replaced by that of $GABA_{B2}$ (**Fig. 2a**). This C-terminal tail had a determinant that can mask the ER retention signal of $GABA_{B1}$ in $GABA_{B1}$–$GABA_{B2}$ heterodimers[18,19]. When expressed alone, this mG5C2 chimera is correctly targeted to the cell surface and is still functional (**Fig. 2b–d**) (quisqualate $EC_{50} = 69 \pm 16$ nM).

When HA-mG5C1 was coexpressed with myc-mG5C2, HA-mG5C1 reached the cell surface (**Fig. 2b,c**), demonstrating that $GABA_{B2}$ tail exerts its action even in the $mGlu_5$ environment. Because $mGlu_5$ dimers are linked by a disulfide bridge[14,21,22], it is likely that the dimers formed in the ER are stable even at the cell surface. As such, in cells expressing both mG5C1 and mG5C2, one would expect that mG5C1 homodimers would be retained in the ER, whereas mG5C2 homodimers as well as mG5C1–mG5C2 heterodimers would reach the cell surface (**Fig. 3a**).

In agreement with this proposal, the presence of mG5C1–mG5C2 heterodimers at the cell surface was firmly established on intact cells using HTRF (homogeneous time-resolved fluorescence resonance energy transfer (FRET))[23]. To that aim, we used anti-HA and

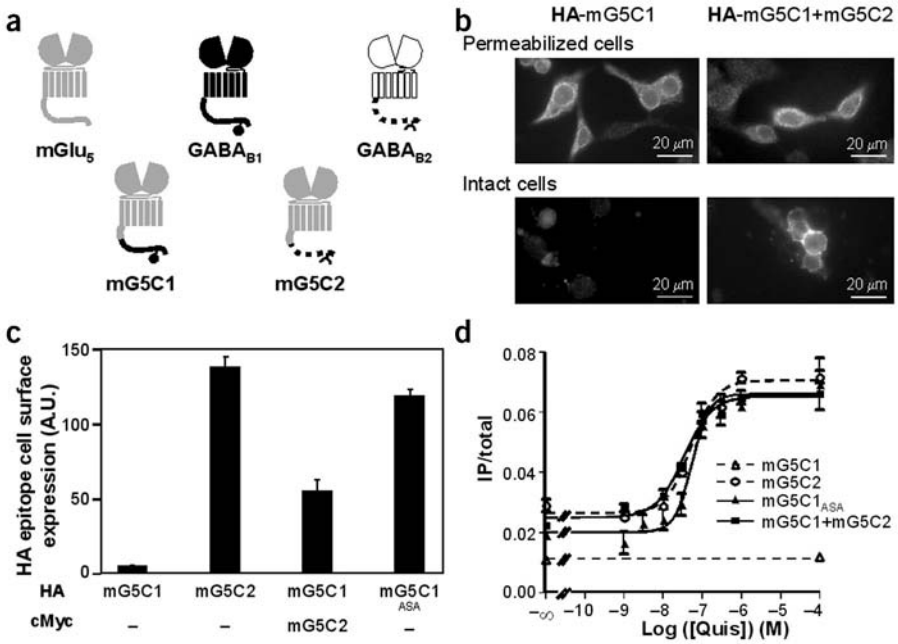


Figure 2 Cellular localization and function of mG5C1 and mG5C2 chimeras. (**a**) Schematic representation of wild-type and chimeric subunits. (**b**) Immunofluorescence staining of HA epitope on permeabilized (top) or intact cells (bottom) expressing either HA-mG5C1 alone or together with the untagged mG5C2. The tags are inserted at the N terminus of the proteins and are therefore accessible to antibodies in intact cells only if the receptor is at the cell surface. (**c**) Quantification of cell surface expression of HA-tagged subunits by ELISA on intact cells transfected with indicated subunits. (**d**) Inositol phosphate production measurement upon stimulation with increasing concentrations of quisqualate on cells expressing the indicated chimeras. As expected, cells expressing intracellular mG5C1 are not activated, whereas the expression of either $mG5C1_{ASA}$ or mG5C2 leads to a dose-dependent stimulation.

© 2004 Nature Publishing Group http://www.nature.com/nsmb

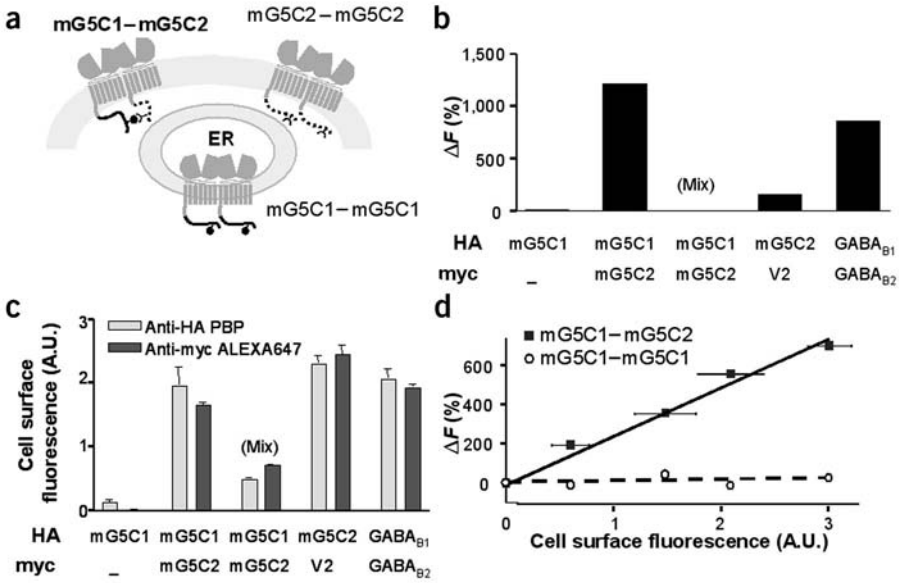


Figure 3 Dimerization of mG5C1 and mG5C2 chimeras at the cell surface. (**a**) Schematic representation of the different dimeric combinations and their localization in cells expressing mG5C1 and mG5C2. (**b**) Representation of FRET signal (ΔF in %) detected on intact cells expressing the indicated epitope-tagged subunits using Eu^{3+}-Cryptate PBP–labeled anti-HA and AlexaFluor 647 anti-myc. In the 'mix' condition, cells coexpressing HA-mG5C1 and myc-mG5C2 were separately labeled with either donor-labeled anti-HA or acceptor-labeled anti-myc and mixed just before measuring the signal. (**c**) The expression level of each subunit at the cell surface in the same cells as in **b** was determined by measuring the fluorescence remaining after washing of free antibodies. (**d**) FRET signals (ΔF in %) measured between HA and myc epitopes (■) or between two HA epitopes (°) are represented as a function of cell surface expression of HA-mG5C1 coexpressed with myc-mG5C2.

© 2004 Nature Publishing Group http://www.nature.com/nsmb

anti-myc labeled with donor and acceptor fluorophores, respectively[24] (see Methods). A clear FRET signal was observed with HA-mG5C1 and myc-mG5C2, similar to the signal measured with HA-GABA$_{B1}$ and myc-GABA$_{B2}$ (**Fig. 3b**). At an equivalent expression level (**Fig. 3c**), no such signal was observed when the two tagged proteins were independently labeled in different cells or when HA-mG5C2 was coexpressed with myc-V2 vasopressin receptors (**Fig. 3b**). The FRET signal of mG5C1–mG5C2 is directly proportional to the amount of mG5C1 at the cell surface. Furthermore, in these same cells, no significant FRET signal could be measured between two HA-mG5C1 when using a mixture of anti-HA labeled with either fluorescent donor or acceptor molecules (**Fig. 3d**), demonstrating that HA-mG5C1 homodimers (or tetramers composed of two mG5C1–mG5C2 heterodimers) were not present at the cell surface. By contrast, a clear signal was measured using the same anti-HA in cells expressing HA-mGlu$_5$ homodimers[24].

mGlu$_5$ mutants insensitive to agonists

We next aimed to generate mGlu$_5$ mutants that could no longer be activated by agonists to produce dimers with a single wild-type agonist–binding site. Accordingly, mutations were introduced either in lobe II (Y222A D304A), or in lobe I (S151A T174A or Y64A T174A) based on a three-dimensional model of the mGlu$_5$ VFT generated as described[16] (**Fig. 4a**). These three mutants were called mGlu$_5$-YADA, SATA and YATA, respectively. These mutations were also introduced into both the HA- and the myc-mG5C2 chimeras. Cells expressing any of these mutants were not able to produce inositol phosphates even upon stimulation with 10 mM glutamate or quisqualate, a highly potent mGlu$_1$-mGlu$_5$ selective agonist (**Fig. 4b**). This is most likely due to the inability of these agonists to activate the receptor because all mutant receptors were found at the cell surface at a density similar to the nonmutated controls, as revealed by ELISA (data not shown).

One agonist per dimer is sufficient for activation

According to the data described above, any measured response in cells expressing mG5C1 and mG5C2-YADA would be generated by the heterodimer mG5C1–mG5C2-YADA (**Fig. 5a**). A biphasic dose-response curve was observed (**Fig. 5b**). The first response occurred with an EC_{50L} of 304 ± 152 nM, higher than that measured on the control dimer (48 ± 8 nM), and plateaued at 25–30% of the maximal response of the control dimer. This is consistent with a three-fold decrease in coupling efficacy as the inositol phosphate response was previously shown to be directly proportional to the amount of mGlu$_5$ receptors at the cell surface[25]. A second response occurred at higher concentrations of quisqualate (EC_{50H} = 208 ± 32 μM) and reached a maximum of ~80% of that measured with the control receptor. A similar biphasic response was also obtained when the intracellular Ca^{2+} signal was measured instead of inositol phosphate production (**Fig. 5c**). Because the EC_{50L} is close to that measured on the wild-type receptor, it is likely that the first component of this response results from quisqualate binding in the wild-type subunit only.

A second agonist provides maximal activity

The second phase of the response measured with the mG5C1–mG5C2-YADA heterodimer is probably due to quisqualate activation of the second mutated VFT, an effect made possible by the agonist-occupied wild-type VFT. In agreement with this proposal, the EC_{50L} of quisqualate did not depend on the mutations introduced in the mutated subunit (304 ± 152, 301 ± 115 and 218 ± 80 nM for the combinations containing mG5C2-YADA, YATA and SATA,

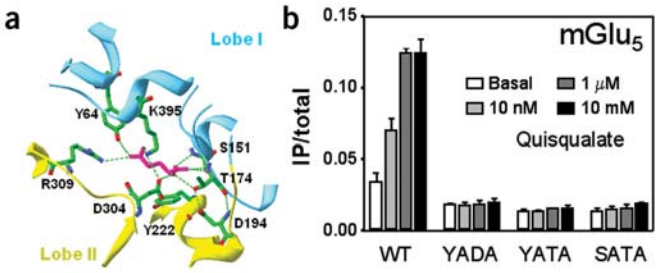


Figure 4 Mutation of the mGlu$_5$ binding site. (**a**) Close-up view on the binding site of a three-dimensional model of the mGlu$_5$ VFT in a closed conformation with docked glutamate. Residues directly contacting glutamate are shown. (**b**) Inositol phosphate (IP) production in cells expressing the indicated mGlu$_5$ mutant after stimulation with various concentrations of quisqualate.

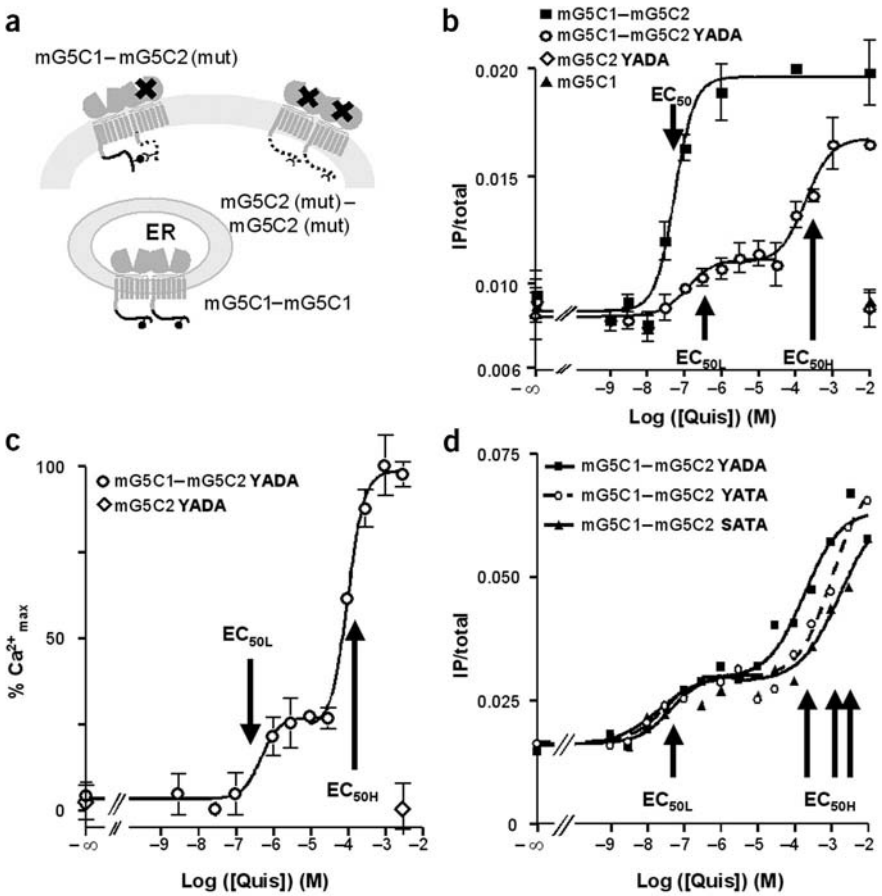


Figure 5 Biphasic dose-response curves of 'heterodimeric' $mGlu_5$ receptor. (**a**) Schematic representation and localization of the receptor combinations in cells coexpressing mG5C1 and mG5C2 mutated at its binding site (mG5C2 (mut)). The only potentially functional combination is the heterodimer mG5C1–mG5C2 (mut). (**b**,**c**) Inositol phosphate (IP) production (**b**) and Ca^{2+} release measurement (**c**) are plotted as a function of quisqualate concentration in cells expressing mG5C1, mG5C2-YADA, mG5C1 and mG5C2, or mG5C1 and mG5C2-YADA. (**d**) IP production in cells coexpressing mG5C1 and mG5C2-YADA, mG5C2-YATA or mG5C2-SATA after stimulation with increasing concentrations of quisqualate.

respectively), but EC_{50H} largely varies depending on the mutant subunit used (208 ± 32, 972 ± 108 and 1,576 ± 246 μM for mG5C2-YADA, YATA and SATA, respectively) (**Fig. 5d**).

Accordingly, although one ligand seemed sufficient to activate the receptor, the activation was partial, and only binding of two agonists could maximally activate such dimeric receptors.

The Aco conformation is partially active

There are two possibilities to explain the observation that one ligand per dimer partially activates the receptor assuming the bound VFT is in a closed state. The first is that the Aco conformation is sufficient to partially activate the receptor. The second is that the closed liganded VFT can in turn favor the closure of the second unliganded VFT leading to a certain proportion of the monoliganded receptors in the active Acc state.

To examine whether the Aco state is sufficient to activate the receptor, we generated a mGlu dimer in which one VFT can be stabilized in a closed state by an agonist, and the second VFT can be maintained open by an antagonist. To that aim, we generated a subunit composed of the $mGlu_2$ VFT, the HD of $mGlu_5$ and the C terminus of $GABA_{B2}$ (mG2/5C2, **Fig. 6a**). Such a chimeric receptor can reach the cell surface, be activated by the selective $mGlu_2$ agonist DCG-IV, and be antagonized by the selective $mGlu_2$ antagonists PCCG-IV, MCCG-I and LY341495 (ref. 26). Moreover, this chimera is insensitive to the $mGlu_5$ agonist quisqualate and brings mG5C1 to the cell surface (data not shown).

Quisqualate activates the mG5C1–mG2/5C2 heterodimers (EC_{50} = 251 ± 109 nM), an effect that is not altered by $mGlu_2$ selective antagonists (**Fig. 6**) (quisqualate EC_{50} = 251 ± 109; 219 ± 53; 275 ± 105 and 209 ± 7 nM under control conditions and in the presence of PCCG-IV, MCCG-I or LY341495, respectively). As shown below, this is not due to the inability of these antagonists to act in mG2/5C2 within such a heterodimer. Assuming the antagonist prevents the closure of the mG2/5C2 VFT, this demonstrates that the Aco state of the VFT dimer is sufficient to partially activate the receptor.

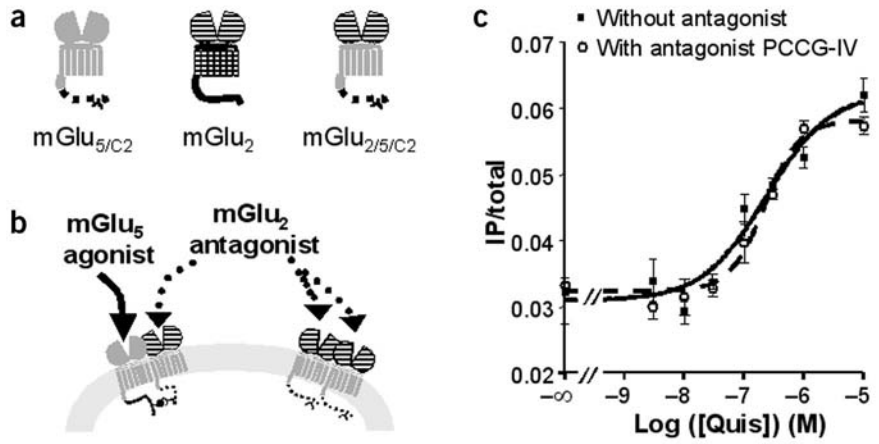


Figure 6 Active efficacy of the Aco conformation of the dimer of VFTs. (**a**) Schematic representation of wild-type and chimeric subunits. mG2/5C2 is composed of VFT of $mGlu_2$ (hatched), CRD and HD of $mGlu_5$ (gray) and $GABA_{B2}$ C terminus (dotted line). (**b**) Representation of combination present in the plasma membrane of cells expressing mG5C1 and mG2/5C2. The mG2/5C2 homodimers present at the cell surface were inactive in the absence of $mGlu_2$ agonist and in the presence of a $mGlu_2$ antagonist. (**c**) Inositol phosphate production obtained upon stimulation with increasing concentrations of quisqualate in the presence or absence of the $mGlu_2$ antagonist PCCG-IV. Similar results were obtained with other $mGlu_2$ specific antagonists (data not shown).

© 2004 Nature Publishing Group http://www.nature.com/nsmb

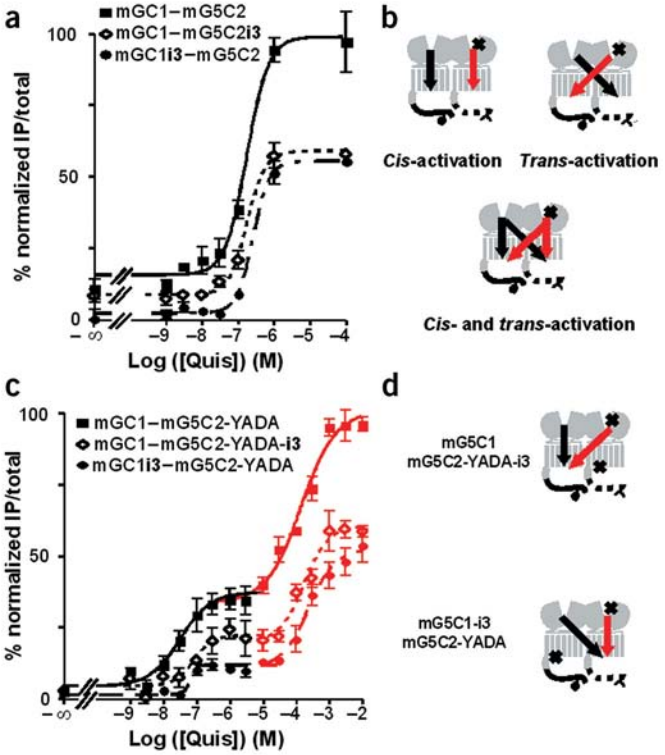


Figure 7 *Cis*- and *trans*-activation in mGlu receptors. (**a**) Inositol phosphate (IP) production in cells expressing mG5C1 and mG5C2 bearing either no mutation, or an i3 loop mutation in mG5C1 or in mG5C2 upon application of various concentration of quisqualate. Values were normalized using the ELISA signal obtained with the same cells in the same experiment and expressed as percent of the maximal effect obtained with the control receptor combination. (**b**) Representation of different signal transduction possibilities within the dimer: activation of one VFT may activate the underlying (*cis*-activation) or the adjacent (*trans*-activation) HD. (**c**) Similar experiment to that in **a** but with cells expressing wild-type or mutated mG5C1 and mG5C2-YADA. Both the first (black) and the second (red) components of the response were still present but were decreased when one subunit had the i3 mutation. (**d**) Signal transduction in combinations used in **c**: black and red arrows correspond to the HD activation produced by ligand binding in the wild-type or mutated VFT, respectively.

Signal transduction within the 'heterodimer'

In a homodimeric receptor, both HDs are identical and potentially share the same capacity to activate G proteins. Accordingly, and in agreement with previous studies[27], dimers in which one HD only was mutated in its i3 loop (F767S) to prevent G-protein coupling[28,29] (mG5C1-i3 + mG5C2 or mG5C1 + mG5C2-i3) are still functional but the maximal stimulation is decreased by ~50% despite a similar expression level of all combinations (**Fig. 7a**).

Accordingly, one possible interpretation for the partial activity of the dimer is that an agonist-liganded VFT leads to the activation of either the HD of the same subunit (*cis*-activation, **Fig. 7b**) or that of the other subunit (*trans*-activation, **Fig. 7b**). Then, full activity can only be obtained upon agonist binding in both VFTs.

To determine which mechanism occurs during the activation process, we examined the effect of the i3 loop mutation in either HD within the heterodimer mG5C1–mG5C2-YADA. Indeed, in the case of *cis*-activation, the i3 mutation introduced into mG5C1 should prevent the first component of the agonist dose-response curve only. The second component should remain intact. In contrast, in the case of *trans*-activation, such a mutation would be expected to suppress the second phase only. The reverse would be expected if the i3 mutation were introduced into mG5C2-YADA. Whether the i3 mutation was introduced in mG5C1 or in mG5C2-YADA, a decrease in the maximal response of both the first and the second phase was observed despite a similar expression level of the different constructs (**Fig. 7c**). This indicates that both HDs contribute to the two activated states of the receptor. Accordingly, a single agonist-occupied VFT can activate either HDs (or both), consistent with both *cis*- and *trans*-activation occurring in these dimeric receptors (**Fig. 7d**).

The Acc conformation is required for full activity

Our data demonstrate that two agonists are required for full activation of mGlu receptors, suggesting that both VFTs must reach a closed state. To support this, we further examined the properties of the mG5C1–mG2/5C2 heterodimer. However, when these two subunits are coexpressed, part of the response mediated by glutamate that activates both $mGlu_2$ and $mGlu_5$ VFTs may result from the activation of mG2/5C2 homodimers (**Fig. 8**). To avoid this possibility, the mG2/5C2 subunit was mutated in its i3 loop. The $mGlu_5$ selective agonist quisqualate stimulated inositol phosphate formation but its maximal effect was about half of that obtained with the nonselective agonist glutamate (**Fig. 8a**). Because inositol phosphate formation has previously been shown to be proportional to the amount of receptors at the cell surface[25], this finding indicates that selective activation of mG5C1 leads to a two-fold lower coupling efficacy. Further addition of a

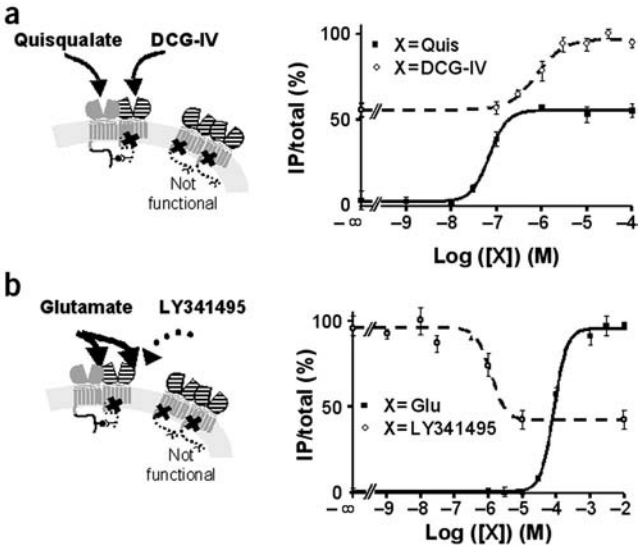


Figure 8 Comparison of the active efficacy of Aco and Acc conformations. (**a**) Left, schematic representation of combinations present at the surface of cells coexpressing mG5C1 and mG2/5C2-i3. Homodimers of mG2/5C2-i3 were inactive because they did not couple to G proteins. Quisqualate activated mG5C1 VFT only, whereas the $mGlu_2$ specific agonist (DCG-IV) activated mG2/5C2-i3 VFT only. Right, inositol phosphate (IP) production in cells coexpressing mG5C1 and mG2/5C2-i3 upon stimulation with increasing concentrations of quisqualate (Quis) or DCG-IV in the presence of quisqualate (10^{-4} M). (**b**) Similar experiment to that in **a**, but with glutamate, which activates both VFT, and LY341495, an $mGlu_2$ antagonist. Right, IP production in cells coexpressing mG5C1 and mG2/5C2-i3 upon stimulation with increasing concentrations of LY341495 in the presence of 3×10^{-3} M glutamate, or with increasing concentrations of glutamate.

© 2004 Nature Publishing Group http://www.nature.com/nsmb

$mGlu_2$ agonist (LY354740 or DCG-IV) increased the maximal quisqualate effect to reach the response obtained with glutamate (**Fig. 8a**). Moreover, the effect of glutamate was inhibited by 50% by LY341495, which would be expected to prevent the closure of the $mGlu_2$ VFT (**Fig. 8b**), further demonstrating that the closed state of both VFTs is required for full activity.

Notably, $mGlu_2$ selective agonists (≤1 mM) did not activate this receptor combination on their own, suggesting that the closure of the $mGlu_2$ VFT cannot *trans*-activate the HD of mG5C1. This is in contrast to the clear *trans*-activation we observed with the mG5C1–mG5C2-YADA dimer (**Fig. 7c**). This is probably due to the chimeric nature of the dimer of VFTs in the mG5C1-mG2/5C2-i3 combination. It is possible that the Aco dimer in which the $mGlu_2$ VFT is closed is not as stable as that in which the $mGlu_5$ VFT is closed, owing to the asymmetry of the lobe-II interface in this heterodimer.

To further document that the Acc conformation is required for full activity, we examined the effect of Gd^{3+} on glutamate dose-response studies carried out on the mG5C1–mG5C2-YADA heterodimer. It has been proposed that a cation such as Gd^{3+} stabilizes the Acc conformation[8] (**Fig. 1**). We observed an increase in quisqualate potency in generating the second phase of the response in the presence of Gd^{3+} (EC_{50H} = 51 ± 5 μM and 208 ± 32 μM, in the presence and absence of Gd^{3+}, respectively), but no change in EC_{50L} (442 ± 201 nM). This further suggests that the second phase of the dose-response curve results from the Acc conformation of the VFT dimer.

DISCUSSION

The present study was aimed at determining which of the agonist-occupied conformations of the dimer of mGlu VFTs, the Aco and Acc conformations[8], corresponds to the active state of full-length receptor. Our data show that the Aco and Acc conformations correspond to a partially and fully active state of the dimer, respectively.

Controlling subunit composition of the dimeric receptor

To examine the specific role of each VFT in a homodimeric mGlu receptor, we first developed a system allowing cell surface expression of functional dimeric receptors composed of two defined subunits, each bearing or not bearing specific mutations. Indeed, we show that the quality control system of the $GABA_B$ receptor[18–20] can be transferred to the $mGlu_5$ receptor. Thus, in cells coexpressing mG5C1 and mG5C2 chimeras that have the C-terminal tail of $GABA_{B1}$ and $GABA_{B2}$, respectively, we demonstrate the existence of mG5C1–mG5C2 heterodimers at the cell surface. We also show that mG5C1 homodimers do not reach the cell surface. Finally, although mG5C2 homodimers reach the cell surface, the function of these receptors can easily be abolished by specific mutations. Accordingly, in cells expressing these two types of subunits, only the heterodimer is functional. Such a system may well be adapted to other membrane proteins for which the functional significance of dimer formation is still unknown, such as rhodopsin-like GPCRs.

One agonist is sufficient but two are better

Using this system we show that binding of a single agonist is sufficient to activate $mGlu_5$ dimers. This is illustrated by the first component of the agonist dose-response curve in mG5C1–mG5C2 in which mutations have been introduced in the mG5C2 binding site. Agonist potency in generating this response is six times lower than that observed with the wild-type dimer. Whether this reflects a positive allostery between the two VFTs controlling agonist affinity remains to be studied in binding experiments. That a single agonist is sufficient to activate the dimer is also confirmed by the effect of a selective $mGlu_5$ agonist on the mG5C1–mG2/5C2-i3 heterodimer. However, the activation was partial and only when a second agonist bound to the associated subunit was the receptor fully active. Notably, in heterodimers containing a subunit mutated in the binding site, the application of agonists seems to activate the mutated subunit at a concentration at which no effect was seen on homodimeric mutated receptors. Accordingly, agonist binding to the wild-type VFT either largely increases agonist affinity to the open state of mutated VFT, and/or allows the agonist binding to stabilize the closed state of the mutated subunit by decreasing the energy required for isomerization.

Only the Acc conformation is fully active

Our data indicate that the partial activity measured with a mono-liganded dimer corresponds to the Aco conformation of the dimer of VFTs. Indeed, agonists are known to stabilize the closed conformation of the VFT, whereas antagonists prevent such a closure[8,9,15,16]. Therefore, a receptor in which an agonist occupies one VFT and an antagonist is bound to the other would be expected to have one VFT in the closed state and the other in the open state. As shown with the mG5C1–mG2/5C2 response measured in the presence of an mG5C1 agonist and an mG2/5C2 antagonist, such a liganded dimer shows the same partial activity as a receptor activated by a single agonist. Several arguments are also consistent with the fully active receptor corresponding to the Acc conformation. In the case of the mG5C1–mG2/5C2 heterodimer, where agonist occupation of both VFTs is required for full activity, this activity is only partly inhibited in the presence of an antagonist acting selectively on mG2/5C2. Moreover, the second phase of the quisqualate response observed with mG5C1–mG5C2-YADA dimer is sensitive to Gd^{3+}, as would be expected according to the proposed stabilization of the Acc conformation by these cations (**Fig. 1**)[8].

Signal transduction within the mGlu dimer

Partial activity of mono-liganded dimeric receptors in the Aco conformation may well result from the activation of a single HD. However, our data clearly indicate that this is not the case, because even when they are activated by a single agonist, both HDs contribute to the activation of PLC. Accordingly, the closure of one VFT can turn on either its associated HD and/or that of the other subunit. This conclusion agrees well with the proposal that the change in the relative orientation of the VFTs observed between the resting and the two active states (**Fig. 1**) forces the HDs to interact differently, leading to their activation.

The Aco and Acc conformations of the dimer of mGlu1 VFTs have both been proposed to correspond to an active state of the receptor[9], on the basis of the similar relative position of the C-terminal ends of these VFTs in both conformations of the dimer. Indeed, these C-terminal ends are connected to the HD via a CRD. So, why is the full activity observed only with the Acc conformation? The relative positions between the areas of the VFTs that probably face the HDs are different in the Aco and Acc conformations. Therefore, the Aco conformation could be sufficient for the dimer of HDs to reach a fully active state, but this state would not be well stabilized. Alternatively, the Aco conformation could stabilize another conformation of the dimer of HDs corresponding to a partially active state.

Comparison with the $GABA_B$ receptor

Like mGlu receptors, the $GABA_B$ receptor is a heterodimer and each subunit is composed of a VFT and an HD[17,30–32]. Our actual knowledge of the activation mechanism of this receptor agrees well with the proposed activation mode of mGlu receptors. Indeed, GABA only binds in the $GABA_{B1}$ VFT[17], and the closure of this domain is

© 2004 Nature Publishing Group http://www.nature.com/nsmb

sufficient to activate the receptor[15]. In this case, full activity is obtained with a single agonist, in contrast to mGlu receptors. However, we still don't know if the $GABA_{B2}$ VFT closes upon $GABA_{B1}$ VFT closure. In contrast to the mGlu receptors, in which both HDs play an equivalent role in G-protein activation, the $GABA_{B2}$ HD plays a prominent role regardless of whether this HD is associated with the $GABA_{B2}$ or $GABA_{B1}$ VFT[32,33]. However, as observed with mGlu receptors, in a $GABA_B$ receptor combination in which both subunits have the $GABA_{B2}$ HD, both HDs play an equivalent role in G-protein coupling[27].

Two agonists to activate mGlu receptors

In contrast to the $GABA_B$ receptor, in which a single agonist is sufficient to activate the dimer, two glutamates are required to fully activate homodimeric mGlu receptors. What could be the advantage, if any, of such a complex stoichiometry? This may be the consequence of the maintenance during evolution of homodimer formation in this family of receptors, and therefore the direct consequence of symmetry. However, many mGlu receptors play a critical role in the fast modulation of synaptic transmission[34]. According to the proposed model for receptor activation, the binding of a first agonist is sufficient to partially activate the receptor, therefore rapidly leading to the fully active receptor. This may increase the probability that the receptor is activated by low concentrations of agonist. Another possibility is that as the activation system becomes more complex, it has more possibilities of regulation. For example, controlling the Aco-Acc equilibrium would have direct consequences on receptor activity. Ca^{2+} seems to be a good candidate for such a role, although its action is difficult to analyze owing to the multiple cellular consequences of its removal, and also because other cations such as Mg^{2+} may have a similar effect. Of interest however, Ca^{2+} has been proposed either to directly activate $mGlu_1$ receptors or to act as a positive modulator[35].

The T1 taste receptors are very similar to the mGlu receptors; like the $GABA_B$ receptor, they also form heterodimers. Whereas the T1R2–T1R3 heterodimer as well as the T1R3 homodimers are responsible for detecting sweetness[36–38], the T1R1-T1R3 combination is responsible for umami taste detection[37,39]. It is not known where the sweet and amino acid compounds bind in these receptors, but several lines of evidence suggest that they bind in the VFTs. In such receptor heterodimers, the existence of natural ligands interacting specifically with each subunits may offer a physiological role for the mechanism proposed here, allowing synergy between the effects of these taste molecules.

METHODS

Materials. L-Glutamic acid was purchased from Sigma. L-Quisqualic acid, MCCG-I ((2*S*,3*S*,4*S*)-2-2methyl-2-(carbxycyclopropyl)glycine), DCG-IV ((2*S*,2′*R*,3′*R*)-2-(2′,3′- dicarboxycyclopropyl)glycine) and LY491395 ((2*S*)-2-amino-2-[(1*S*,2*S*)-2-carboxycycloprop-1-yl]-3-(xanth-9-yl) propanoic acid) were purchased from Tocris Cookson. PCCG-IV ((2*S*,1′*S*,2′*S*,3′*R*)-2-(2″-carboxy-3′-phenylcyclopropyl)glycine) was a gift from R. Pellicciari (University of Perugia, Perugia, Italy). Glutamate-pyruvate transaminase (GPT) was purchased from Roche. Culture medium, FCS and other products used for cell culture were purchased from GIBCO-BRL-Life Technologies. [^{3}H]myo-inositol (23.4 Ci mol^{-1}) was purchased from Amersham.

Plasmids and site-directed mutagenesis. Plasmids encoding the wild-type $mGlu_5$ subunits epitope-tagged at their N-terminal ends either with HA or cMyc, under the control of a CMV promoter, were described[40]. To obtain mG5C1 and mG5C2, the C terminus of HA- or Myc-$mGlu_{5a}$ (His845–Stop1172) was replaced by that of $GABA_{B1a}$ (Thr872–Stop961) and $GABA_{B2}$ (Phe760–Stop941), respectively, amplified by PCR and subcloned between the *Sph*I and *Xba*I sites. Mutant subunits, carrying single or multiple mutations, were obtained using QuikChange (Stratagene). The mG2/5C2 chimera was obtained by introducing a *Pst*I restriction site in both pRK-mG5C2 (before Cys510) and pRK-$mGlu_2$ (after Ser498) using QuikChange and then by substitution of $mGlu_2$ *Pst*I-*Pst*I fragment by that of mG5C2. All constructions were verified by DNA sequencing (Genaxis).

Cell culture, transfection and immunofluorescence. HEK293 cells were cultured in DMEM supplemented with 10% (v/v) FCS and transfected by electroporation as described elsewhere[41]. The immunofluorescence assay was carried out as described[40].

Cell surface quantification by ELISA was conducted as described[15]. At 24 h after transfection, cells were washed, fixed with 4% (w/v) paraformaldehyde and labeled with an anti-HA rat monoclonal antibody conjugated to peroxydase (clone 3F10; Roche) (0.5 μg ml^{-1}). Antibody was detected and quantified by chemiluminescence using Supersignal West Femto (Pierce) and a Wallac Victor^2 luminescence counter (PerkinElmer Life and Analytical Science).

Inositol phosphate determination. Measurement of inositol phosphate accumulation in transfected cells was carried out in 96-well microplates as described[25]. Briefly, after overnight labeling with [^{3}H]myo-inositol, cells were stimulated for 30 min in the presence of 10 mM LiCl, with or without indicated compounds. The reaction was stopped with 0.1 M formic acid and inositol phosphates produced were purified in 96-well plates by ion-exchange chromatography. Radioactivity was measured using a Wallac 1450 MicroBeta microplate liquid scintillation counter (PerkinElmer Life and Analytical Science). Results are expressed as the ratio between inositol phosphate and the total radioactivity present in the membranes.

Time-resolved FRET experiments. Time-resolved FRET experiments were conducted as described[24]. This methodology is based on the nonradiative energy transfer between rare earth cryptates such as europium (Eu^{3+}) cryptates and acceptor fluorophores such as AlexaFluor 647 (Molecular Probes). Briefly, cells expressing the indicated tagged receptor subunits were labeled with monoclonal anti-HA (12CA5) and/or anti-myc (9E10; American Type Culture Collection no. CRL-1729) carrying either Eu^{3+}-Cryptate PBP or AlexaFluor 647 (provided by Cis Bio International Research). After washing, total Eu^{3+} cryptate fluorescence and FRET signal were measured at 620 and 665 nm, respectively, 50 μs after excitation at 337 nm with a nitrogen laser using a RubyStar spectrofluorimeter (BMG LabTechnologies). The ratio $R = (F_{665} / F_{620}) \times 10^4$, where F is the fluorescence signal measured at the indicated wavelength, was computed. The specific signal over background called ΔF was calculated using the following formula: $\Delta F = (R_{pos} - R_{neg}) / (R_{neg})$. R_{neg} corresponds to the ratio for the negative energy transfer control where excess unlabeled anti-myc monoclonal antibodies were added whereas R_{pos} corresponds to the ratio for the positive energy transfer control. Total fluorescence emitted by the bound AlexaFluor 647 conjugated antibodies was measured at 682 nm after excitation at 640 nm using an Analyst plate reader (Molecular Devices).

Intracellular calcium measurements. Measurement of intracellular Ca^{2+} signal in transfected cells was carried out in 96-well microplates as described[25] using the Ca^{2+}-sensitive fluorescent dye Fluo-4AM (Molecular Probes). Fluorescence signals (excitation, 485 nm; emission, 525 nm) were measured using the fluorescence microplate reader Flexstation (Molecular Devices). The effect of added compounds was examined after 20 s of recording.

Data analysis. The dose-response curves were fitted using GraphPad Prism and the following equation for monophasic dose-response curves: $y = [(y_{max} - y_{min}) / 1 + (x / EC_{50})n_H] + y_{min}$, where EC_{50} is the concentration of the compound necessary to obtain 50% of the maximal effect, and n_H is the Hill coefficient. For biphasic dose-response curves, the following equation was used: $y = [(y_{pl} - y_{min}) / 1 + (x / EC_{50L})n_{HL}] + [(y_{max} - y_{pl}) / 1 + (x / EC_{50H})n_{HH}] + y_{min}$, where y_{pl} represents the plateaued value, L indicates the first component and H indicates the second component of the curve.

All data represented correspond to means ± s.e.m. of one representative experiment, out of three independent experiments performed in triplicate.

Molecular modeling. The three-dimensional model of the liganded $mGlu_5$ VFT was generated using the coordinates of the liganded closed form of mGlu1

© 2004 Nature Publishing Group http://www.nature.com/nsmb

VFT (PDB entry 1EWK) using MODELER 5.00 (Insight-II version 2000, Accelrys), as described[16]. Figures displaying structures were prepared using SwissPdbViewer (v3.7)[42].

ACKNOWLEDGMENTS
We thank V. Binet, C. Goudet, P. Rondard (Montpellier), C. Hatton, J. Neyton and P. Paoletti (Paris) for constructive discussions and critical reading of manuscript. We also to thank Cis Bio International Research group for the supply of labeled antibodies, and G. Mathis and E. Trinquet from Cis Bio International for their strong support. This work was supported by grants from the Centre National de Recherche Scientifique (CNRS), the action initiative Molécules et Cibles Thérapeutiques from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, CNRS and the French government, Addex Pharmaceuticals, Fondation Paul Hamel, Comité Parkinson of the Fondation de France and the European Community (grant LSHB-CT-200-503337). J.K. was supported by a CNRS fellowship.

COMPETING INTERESTS STATEMENT
The authors declare that they have no competing financial interests.

Received 11 March; accepted 14 June 2004
Published online at http://www.nature.com/nsmb/

1. Cho, H.S. & Leahy, D.J. Structure of the extracellular region of HER3 reveals an interdomain tether. *Science* **297**, 1330–1333 (2002).
2. Cho, H.S. *et al.* Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature* **421**, 756–760 (2003).
3. Ogiso, H. *et al.* Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell* **110**, 775–787 (2002).
4. Ferguson, K.M. *et al.* EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. *Mol. Cell* **11**, 507–517 (2003).
5. He, X.-L., Chow, D.-C., Martick, M.M. & Garcia, K.C. Allosteric activation of a spring-loaded natriuretic peptide receptor dimer by hormone. *Science* **293**, 1657–1662 (2001).
6. van den Akker, F. *et al.* Structure of the dimerized hormone-binding domain of a guanylyl-cyclase-coupled receptor. *Nature* **406**, 101–104 (2000).
7. van den Akker, F. Structural insights into the ligand binding domains of membrane bound guanylyl cyclases and natriuretic peptide receptors. *J. Mol. Biol.* **311**, 923–937 (2001).
8. Tsuchiya, D., Kunishima, N., Kamiya, N., Jingami, H. & Morikawa, K. Structural views of the ligand-binding cores of a metabotropic glutamate receptor complexed with an antagonist and both glutamate and Gd^{3+}. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 2660–2665 (2002).
9. Kunishima, N. *et al.* Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature* **407**, 971–977 (2000).
10. Dann, C.E. *et al.* Insights into Wnt binding and signalling from the structures of two Frizzled cysteine-rich domains. *Nature* **412**, 86–90 (2001).
11. West, A.P., Jr., Llamas, L.L., Snow, P.M., Benzer, S. & Bjorkman, P.J. Crystal structure of the ectodomain of Methuselah, a *Drosophila* G protein-coupled receptor associated with extended lifespan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 3744–3749 (2001).
12. Pin, J.P., Galvez, T. & Prezeau, L. Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors. *Pharmacol. Ther.* **98**, 325–354 (2003).
13. O'Hara, P.J. *et al.* The ligand-binding domain in metabotropic glutamate receptors is related to bacterial periplasmic binding proteins. *Neuron* **11**, 41–52 (1993).
14. Romano, C., Yang, W.L. & O'Malley, K.L. Metabotropic glutamate receptor 5 is a disulfide-linked dimer. *J. Biol. Chem.* **271**, 28612–28616 (1996).
15. Kniazeff, J. *et al.* Locking the dimeric $GABA_B$ G-protein-coupled receptor in its active state. *J. Neurosci.* **24**, 370–377 (2004).
16. Bessis, A.S. *et al.* Closure of the Venus flytrap module of mGlu8 receptor and the activation process: Insights from mutations converting antagonists into agonists. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 11097–11102 (2002).
17. Kniazeff, J., Galvez, T., Labesse, G. & Pin, J.P. No ligand binding in the GB2 subunit of the $GABA_B$ receptor is required for activation and allosteric interaction between the subunits. *J. Neurosci.* **22**, 7352–7361 (2002).
18. Margeta-Mitrovic, M., Jan, Y.N. & Jan, L.Y. A trafficking checkpoint controls $GABA_B$ receptor heterodimerization. *Neuron* **27**, 97–106 (2000).
19. Pagano, A. *et al.* C-terminal interaction is essential for surface trafficking but not for heteromeric assembly of $GABA_B$ receptors. *J. Neurosci.* **21**, 1189–1202 (2001).
20. Couve, A. *et al.* Intracellular retention of recombinant $GABA_B$ receptors. *J. Biol. Chem.* **273**, 26361–26367 (1998).
21. Ray, K. & Hauschild, B.C. Cys-140 Is critical for metabotropic glutamate receptor-1 (mGluR-1) dimerization. *J. Biol. Chem.* **275**, 34245–34251 (2000).
22. Tsuji, Y. *et al.* Cryptic dimer interface and domain organization of the extracellular region of metabotropic glutamate receptor subtype 1. *J. Biol. Chem.* **275**, 28144–28151 (2000).
23. Bazin, H., Trinquet, E. & Mathis, G. Time resolved amplification of cryptate emission: a versatile technology to trace biomolecular interactions. *Rev. Mol. Biotech.* **82**, 233–250 (2002).
24. Maurel, D. *et al.* Cell surface detection of membrane protein interaction with HTRF technology. *Anal. Biochem.* **329**, 253–262 (2004).
25. Goudet, C. *et al.* Heptahelical domain of metabotropic glutamate receptor 5 behaves like rhodopsin-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 378–383 (2004).
26. Pin, J.-P. & Acher, F. The metabotropic glutamate receptors: structure, activation mechanism and pharmacology. *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.* **1**, 297–317 (2002).
27. Havlickova, M. *et al.* The intracellular loops of the GB2 subunit are crucial for G-protein coupling of the heteromeric γ-aminobutyrate B receptor. *Mol. Pharmacol.* **62**, 343–350 (2002).
28. Chang, W., Chen, T.H., Pratt, S. & Shoback, D. Amino acids in the second and third intracellular loops of the parathyroid Ca^{2+}-sensing receptor mediate efficient coupling to phospholipase C. *J. Biol. Chem.* **275**, 19955–19963 (2000).
29. Francesconi, A. & Duvoisin, R.M. Role of the second and third intracellular loops of metabotropic glutamate receptors in mediating dual signal transduction activation. *J. Biol. Chem.* **273**, 5615–5624 (1998).
30. Galvez, T. *et al.* Mapping the agonist binding site of $GABA_B$ type 1 subunit sheds light on the activation process of $GABA_B$ receptors. *J. Biol. Chem.* **275**, 41166–41174 (2000).
31. Marshall, F.H., Jones, K.A., Kaupmann, K. & Bettler, B. $GABA_B$ receptors—the first 7TM heterodimers. *Trends Pharmacol. Sci.* **20**, 396–399 (1999).
32. Galvez, T. *et al.* Allosteric interactions between GB1 and GB2 subunits are required for optimal $GABA_B$ receptor function. *EMBO J.* **20**, 2152–2159 (2001).
33. Duthey, B. *et al.* A single subunit (GB2) is required for G-protein activation by the heterodimeric $GABA_B$ receptor. *J. Biol. Chem.* **277**, 3236–3241 (2002).
34. Pin, J.-P. & Bockaert, J. Part IV: type III family of GPCRs—metabotropic glutamate receptors. In *Structure-Function of G-protein Coupled Receptors in the CNS* (eds. Pangalos, M. & Davies, C.) 586–616 (Oxford Univ. Press, Oxford, 2002).
35. Kubo, Y., Miyashita, T. & Murata, Y. Structural basis for a Ca^{2+}-sensing function of the metabotropic glutamate receptors. *Science* **279**, 1722–1725 (1998).
36. Nelson, G. *et al.* Mammalian sweet taste receptors. *Cell* **106**, 381–390 (2001).
37. Li, X. *et al.* Human receptors for sweet and umami taste. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 4692–4696 (2002).
38. Zhao, G.Q. *et al.* The receptors for mammalian sweet and umami taste. *Cell* **115**, 255–266 (2003).
39. Nelson, G. *et al.* An amino-acid taste receptor. *Nature* **416**, 199–202 (2002).
40. Ango, F. *et al.* A simple method to transfer plasmid DNA into neuronal primary cultures: functional expression of the mGlu5 receptor in cerebellar granule cells. *Neuropharmacology* **38**, 793–803 (1999).
41. Brabet, I. *et al.* Comparative effect of L-CCG-I, DCG-IV and γ-carboxy-L-glutamate on all cloned metabotropic glutamate receptor subtypes. *Neuropharmacology* **37**, 1043–1051 (1998).
42. Guex, N. & Peitsch, M.C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**, 2714–2723 (1997).

© 2004 Nature Publishing Group http://www.nature.com/nsmb

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY
Vol. 279, No. 16, Issue of April 16, pp. 15824–15830, 2004
Printed in U.S.A.
© 2004 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

Molecular Determinants Involved in the Allosteric Control of Agonist Affinity in the $GABA_B$ Receptor by the $GABA_{B2}$ Subunit*

Received for publication, December 12, 2003, and in revised form, January 21, 2004
Published, JBC Papers in Press, January 21, 2004, DOI 10.1074/jbc.M313639200

Jianfeng Liu‡§, Damien Maurel‡¶, Sébastien Etzol‡, Isabelle Brabet‡, Hervé Ansanay¶, Jean-Philippe Pin‡, and Philippe Rondard‡‖

From the ‡Department of Molecular Pharmacology, Laboratory of Functional Genomics, CNRS UPR2580, 141, rue de la Cardonille, F-34094 Montpellier, Cedex 5, France, ¶Cis Bio International, Bagnols-sur-Cèze 30204, France, and the §Institute of Biophysics and Biochemistry, Huazhong University of Science and Technology, 1037 Luoyu Avenue, Wuhan, 430074 Hubei, China

The γ-aminobutyric acid type B ($GABA_B$) receptor is an allosteric complex made of two subunits, $GABA_{B1}$ (GB1) and $GABA_{B2}$ (GB2). Both subunits are composed of an extracellular Venus flytrap domain (VFT) and a heptahelical domain (HD). GB1 binds GABA, and GB2 plays a major role in G-protein activation as well as in the high agonist affinity state of GB1. How agonist affinity in GB1 is regulated in the receptor remains unknown. Here, we demonstrate that GB2 VFT is a major molecular determinant involved in this control. We show that isolated versions of GB1 and GB2 VFTs in the absence of the HD and C-terminal tail can form hetero-oligomers as shown by time-resolved fluorescence resonance energy transfer (based on HTRF® technology). GB2 VFT and its association with GB1 VFT controlled agonist affinity in GB1 in two ways. First, GB2 VFT exerted a direct action on GB1 VFT, as it slightly increased agonist affinity in isolated GB1 VFT. Second and most importantly, GB2 VFT prevented inhibitory interaction between the two main domains (VFT and HD) of GB1. According to this model, we propose that GB1 HD prevents the possible natural closure of GB1 VFT. In contrast, GB2 VFT facilitates this closure. Finally, such inhibitory contacts between HD and VFT in GB1 could be similar to those important to maintain the inactive state of the receptor.

γ-Aminobutyric acid (GABA)[1] is a major inhibitory neurotransmitter in the central nervous system and activates GABA type A ligand-gated Cl^- channels as well as the G-protein-coupled receptor (GPCR) γ-aminobutyric acid type B ($GABA_B$) (1, 2). This receptor is found in either pre- or postsynaptic elements in various types of neurons. As such, $GABA_B$ receptors play important role in brain function as illustrated by the anti-spastic activity of the $GABA_B$-selective agonist baclofen (Lioresal®) and its involvement in various types of epilepsy as well as in nociception and drug addiction (2).

$GABA_B$ receptors belong to the class III GPCRs, together with metabotropic glutamate (mGlu), extracellular Ca^{2+}-sensing, and some pheromone and taste receptors (3). Each of these receptors is composed of an extracellular domain called the Venus flytrap domain (VFT), to which agonists bind, and a heptahelical domain (HD), which is responsible for the recognition and activation of heterotrimeric G-proteins. Whereas mGlu and Ca^{2+}-sensing receptors exist as homodimers, the $GABA_B$ receptor is a heterodimer composed of two homologous subunits, $GABA_{B1}$ (GB1) and $GABA_{B2}$ (GB2) (see Fig. 1*a*) (4–7).

So far, only the heterodimeric form of the $GABA_B$ receptor has been shown to activate G-proteins efficiently. Although only GB1 binds GABA, several important roles of GB2 have been identified. First, GB2 masks an intracellular retention signal of GB1 such that GB1 reaches the cell surface only when associated with GB2 (2, 8–10). Second, GB2 HD contains all the determinants required for G-protein coupling and plays a pivotal role in G-protein activation by the heterodimer (11–15). Third, GB2 increases agonist (but not antagonist) affinity in GB1 (4, 11), even though it does not appear to bind any natural ligand (16).

The ligand-binding site of GB1 has been extensively studied (17–22). Modeling and site-directed mutagenesis studies indicate that ligands bind in the cleft that separates both lobes of GB1 VFT, as observed for ligand binding in many similar protein modules (23), including mGlu1 VFT (24, 25). Antagonists are expected to prevent the closure of GB1 VFT (19), as observed in mGlu receptors (25, 26). Conversely, agonists interact with residues from both lobes of GB1 VFT, and they stabilize a closed form of this domain (16, 19). Such a domain closure of GB1 VFT has recently been shown to be sufficient to activate this heterodimeric receptor (27).

The mechanism of the allosteric control of agonist affinity in GB1 by GB2 is unknown. It is likely that GB2 controls agonist affinity by further stabilizing the closed state of GB1 VFT (28). Understanding this mechanism should have implications in the current model of $GABA_B$ receptor activation, as it may help to explain how GABA binding in GB1 VFT can activate GB2 HD. In addition, it may open new routes for the development of positive allosteric compounds known to stabilize the active conformation of the dimeric HDs and VFTs and to increase agonist affinity (29–31).

Here, we demonstrate that direct interaction between GB1

* This work was supported by grants from CNRS, the Fondation pour la Recherche Médicale, and the French Government (Action Concertée Incitative "Molécules et Cibles Thérapeutiques") (to J.-P. P.); by a grant from Aventis (to J. L.; Groupement d' Intérêt Prioritaire-Hoechst Marion Roussel to J.-P. P.); by grants from the Fondation pour la Recherche Médicale (France) and INSERM (to P. R.); by Cis Bio International (to D. M.); and by the National Science Foundation of China (Grants 30100092 and 30270666 to J. L.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "*advertisement*" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

‖ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33-4-6714-2912; Fax: 33-4-6754-2432; E-mail: prondard@ccipe.cnrs.fr.

[1] The abbreviations used are: GABA, γ-aminobutyric acid; $GABA_B$, γ-aminobutyric acid type B; GPCR, G-protein-coupled receptor; mGlu, metabotropic glutamate; VFT, Venus flytrap domain; HD, heptahelical domain; GB1, $GABA_{B1}$ subunit; GB2, $GABA_{B2}$ subunit; HA, hemagglutinin; GPI, glycosylphosphatidylinositol; HEK, human embryonic kidney; PBS, phosphate-buffered saline; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; TR-FRET, time-resolved fluorescence resonance energy transfer; TM1, transmembrane helix-1; ASA, replacement of the RSRR endoplasmic reticulum signal with ASAR.

This paper is available on line at http://www.jbc.org

and GB2 VFTs is responsible for the increase in agonist affinity in two ways. First, it prevents GB1 HD from decreasing agonist affinity; and second, the interaction between the two VFTs by itself further increases agonist affinity in GB1 VFT.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials—GABA was obtained from Sigma. CGP64213 was a gift from Drs. W. Froestl and K. Kaupmann (Novartis Pharma, Basel, Switzerland). [^{125}I]CGP64213 was purchased from Anawa (Zurich, Switzerland). Culture media, fetal bovine serum, and other solutions used for cell culture were from Invitrogen.

Contruction of GB1 and GB2 Mutants—pRK5 plasmids encoding wild-type GB1a, $GB1_{ASA}$, and GB2 tagged with a hemagglutinin (HA) or c-Myc epitope at their N-terminal ends under the control of a cytomegalovirus promotor were described previously (10, 11). Truncated versions of GB1 and GB2 (ΔGB1 and ΔGB2) were generated by replacing codons for Ile^{621} of GB1 and Leu^{511} of GB2 with a stop codon using the QuikChange mutagenesis protocol (Stratagene, La Jolla, CA). The glycosylphosphatidylinositol-anchored VFT module of GB1 ($GB1_{GPI}$) was constructed by subcloning a synthetic gene fragment encoding the GPI anchor signal peptide of mouse PrPc (mouse cellular prion protein) (32) after the entire coding sequence of GB1 VFT (MluI-PshAI fragment). The PshAI-XbaI fragment of pRK-GB1a-HA, encoding the HD and C-terminal domain of GB1, was replaced with a synthetic gene fragment created by hybridization of two complementary oligonucleotides (5′-TGG TCA GAA GAT CCA GCA GCA CCG TGC TTT TCT CCT CCC CTC CTG TCA TCC TCC TCA TCT CCT TCC TCA TCT TCC TGA TCG TGG GAT AAT-3′ and 5′-CTA GAT TAT CCC ACG ATC AGG AAG ATG AGG AAG GAG ATG AGG AGG ATG ACA GGA GGG GAG GAG AAA AGC ACG GTG CTG CTG GAT CTT CTG ACCA-3′), resulting in the addition of sequence RRSSSTVLFSSPPVILLISFLIFLIVG after Val^{579} of GB1. Post-translationally, the GPI anchor signal peptide is cleaved after the second serine residue of the tripeptide SSS (underlined), and a GPI modification is added to it (33). The GPI-anchored VFT module of GB2 ($GB2_{GPI}$) was generated by PCR and subcloned into plasmid pRK5-$GB1_{GPI}$, replacing the MluI-PshAI fragment encoding GB1 VFT. In $GB2_{GPI}$, the GPI anchor signal peptide was added after Gln^{473} of GB2, followed by Thr-Leu-Val due to the PshAI site. A truncated version of the mGlu5 receptor (ΔmG5) in the first intracellular loop (after Arg^{614}) was generated by PCR from the mGlu5 receptor expression vector described previously (34) and subcloned into pRK5-GB1-HA or pRK5-GB1-c-Myc, replacing the MluI-XbaI fragment encoding the entire sequence of GB1. Mutation S246A was introduced in ΔGB1 by subcloning the ApaI-PshAI fragment of pRK5-$GB1_{S246A}$ (19) into pRK5-ΔGB1.

Cell Culture and Transfection—Human embryonic kidney (HEK) 293 and COS-7 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum and transfected by electroporation as described (35). Cells (10×10^6) were transfected with plasmid DNA containing $GB1_{ASA}$ (2 μg), GB2 (2 μg), ΔGB1 (4 μg), ΔGB2 (4 μg), $GB1_{GPI}$ (4 μg), $GB2_{GPI}$ (4 μg), ΔmG5 (4 μg), $\Delta GB1_{S246A}$ (4 μg), or the V2 vasopressin receptor (165 ng) and completed to a total amount of 10 μg of plasmid DNA with the pRK5 empty vector.

Western Blotting—Twenty hours after transfection, HEK-293 cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS; Ca^{2+}- and Mg^{2+}-free) and harvested. The membranes were prepared as described previously (26). For each sample, 50 μg of total protein was subjected to SDS-PAGE using 10% polyacrylamide gels, transferred to nitrocellulose membrane (Hybond-C, Amersham Biosciences), and probed with mouse anti-HA monoclonal antibody 12CA5 (Roche Applied Science) at 0.1 μg/ml. Proteins were visualized by chemiluminescence (West Pico, Pierce).

Cell-surface Quantification by Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)—Twenty hours after transfection with HA-tagged versions of the constructs, HEK-293 cells were washed twice with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde in PBS, and then blocked with PBS plus 5% fetal bovine serum. After a 30-min reaction with primary antibody (anti-HA monoclonal antibody 3F10, Roche Applied Science) at 0.5 μg/ml in the same buffer, goat anti-rat antibody coupled to horseradish peroxidase (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA) was applied for 30 min at 1 μg/ml. After intense washes with PBS, secondary antibody was detected and quantified instantaneously by chemiluminescence (Supersignal West Femto, Pierce) using a Wallac Victor^2 luminescence counter (Perkin-Elmer, Courtaboeuf, France).

Ligand Binding Assay—Ligand binding assay with intact HEK-293 cells was performed as described previously (11) using 0.1 nM [^{125}I]CGP64213. Displacement curves were made with at least seven different concentrations of the displacer, and the curves were fitted according to the following equation: $y = ((y_{max} - y_{min})/(1 + (x/IC_{50})^{n_H})) + y_{min}$, where IC_{50} is the concentration of the compound that inhibits 50% of bound radioligand, and n_H is the Hill coefficient. K_i values were calculated according to the following equation: $IC_{50} = K_i(1 + [RL]/K_d)$, where [RL] and K_d are the concentration and dissociation constant of the radioligand, respectively. K_d was determined assuming $K_i = K_d$ in the case of CGP64213.

Time-resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer (TR-FRET) Measurements—TR-FRET experiments were conducted as described (36). This methodology is based on the transfer of energy between rare earth cryptates such as europium cryptates and acceptor fluorophores such as an allophycocyanin protein (XL665) as described in the HTRF® technology (homogeneous TR-FRET) (37, 38). After transfection, COS-7 cells were dispatched into a black 96-well assay plate (Costar Corp.) at 1.5×10^5 cells/well in 200 μl of Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum. Twenty hours later, cells were rinsed with 100 μl of Tris/Krebs buffer (20 mM Tris-Cl (pH 7.4), 118 mM NaCl, 5.6 mM glucose, 1.2 mM KH_2PO_4, 1.2 mM $MgSO_4$, 4.7 mM KCl, and 1.8 mM $CaCl_2$) supplemented with 0.1% bovine serum albumin. Cells were then incubated in 100 μl of the same buffer containing 3 nM anti-HA monoclonal antibody 12CA5 labeled with a fluorescence donor molecule (europium cryptate-pyridine bipyridine used in the HTRF® assay) (36) and 9 nM anti-c-Myc monoclonal antibody 9E10 labeled with a fluorescence acceptor molecule (Alexa Fluor® 647, Molecular Probes, Inc.) (these two antibodies were kind gifts of Cis Bio International). As a negative control, 1 μM unlabeled anti-c-Myc antibody 9E10 was added to the two labeled antibodies to displace the FRET signal, or COS-7 cells were incubated with only the fluorescence donor-labeled antibody. After a 4-h incubation at 4 °C, cells were rinsed with Tris/Krebs buffer to remove unbound antibodies, and fluorescence emissions were monitored both at 620 and 665 nm with a RubyStar spectrofluorometer equipped with a nitrogen laser as the excitation source (337 nm) (BMG LabTechnologies, Champigny-sur-Marne, France). A 400-μs reading was used after a 50-μs delay to allow for decay of short-lived endogenous fluorescence signals. Fluorescence collected at 620 nm is the total europium cryptate signal, and fluorescence collected at 665 nm is the FRET signal. The ratio $R = (F_{665\ nm}/F_{620\ nm}) \times 10^4$ was computed. The FRET signal was expressed by ΔF, calculated using the following equation: $\Delta F = (R_{pos} - R_{neg})/(R_{neg})$, where R_{pos} is the ratio for the positive energy transfer measured in wells incubated with both donor- and acceptor-labeled antibodies, and R_{neg} is the ratio for the negative energy transfer control. The total fluorescence emitted at 682 nm by the Alexa Fluor® 647 conjugates after excitation at 640 nm was measured using an Analyst™ reader (Molecular Devices) equipped with the appropriate filter set (XF47, Omega Optical Inc.).

RESULTS

GB2 Increases Agonist (but Not Antagonist) Affinity in GB1—Although GB1 binds any known $GABA_B$ ligands, agonist affinities are ~100 times lower than those measured in native receptors (39). This is due partly to GB2 because its coexpression with GB1 results in a 10-fold increase in agonist affinity (4). This effect of GB2 does not result from the targeting of GB1 to the cell surface and so to a mature glycosylation state because a GB1 mutant able to reach the cell surface alone ($GB1_{ASA}$, in which the endoplasmic reticulum retention signal RSRR is mutated into ASAR) still displayed low agonist affinity at the cell surface (Fig. 1*b* and Table I). A direct association between GB1 and GB2 appears therefore necessary to control agonist affinity in this receptor. Coexpression of GB1 with GB2/1, a chimeric subunit composed of GB2 VFT and GB1 HD, or the replacement of GB1 HD with GB2 HD in chimeric GB1/2 also resulted in increased GABA affinity (Fig. 1*b* and Table I). These observations suggest that both GB2 VFT and GB1 HD control agonist affinity in GB1.

VFT Module Constructs for GB1 and GB2—To elucidate the mechanism leading both GB2 VFT and GB1 HD to allosterically control agonist affinity in GB1, isolated GB1 and GB2 VFTs were prepared by removing the HD and C-terminal domain of each subunit. These constructs were generated to examine the possible direct interaction between GB1 and GB2 VFTs and the consequence on GABA affinity, regardless the

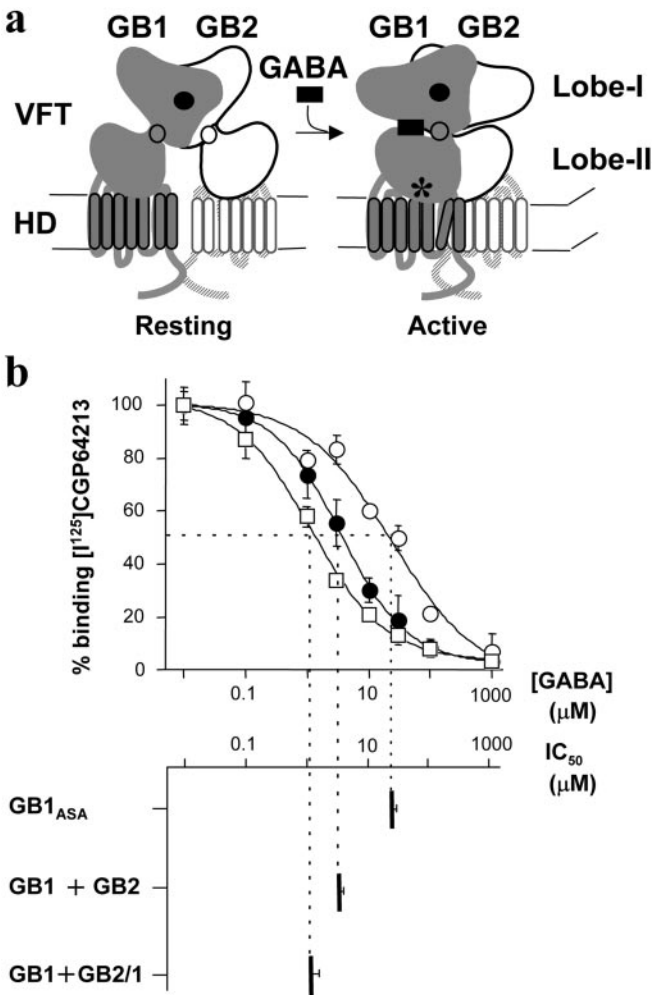


FIG. 1. **GB2 VFT module and GB1 or GB2 HD control agonist affinity in GB1.** *a*, the schemes depict a GABA$_B$ dimeric receptor according to our actual view of the "resting" (*left*) and "active" (*right*) states. GB1 and GB2 are shown in *dark gray* and *white*, respectively. In their resting orientation, both VFT modules in the dimer are in the open state, as observed in the crystal structure of the empty form of the mGlu1 receptor (Protein Data Bank code 1ewt). One VFT is in the front plane (*dark gray*), whereas the other is in the back plane (*white*). The axis for the rotation of one VFT relative to the other is indicated with a *closed circle*, and the axis in each VFT responsible for its closure is indicated with an *open circle*. GABA (*black box*) binds in the cleft that separates both lobes of GB1 VFT and induces their closure, leading to the active state. Each HD of GB1 and GB2 is composed of seven transmembrane helices (*ovals*) connected by extra- and intracellular loops, and the C-terminal regions of the two subunits are associated (*thick gray lines*). The *asterisk* shows lobe II of GB1, which is believed to interact with GB1 HD and to be responsible of the inhibitory contact in GB1. *b*, displacement curves of [^{125}I]CGP64213 by GABA in cells expressing GB1$_{ASA}$ (○), GB1 + GB2 (●), and GB1 + GB2/1 (□), where GB2/1 is a chimeric subunit composed of GB2 VFT and GB1 HD. The percentage of bound radioligand for each concentration of GABA is plotted. The inhibitory concentration of GABA corresponding to the displacement of 50% of the initial bound radioligand (IC$_{50}$) is plotted for the three receptors. Values are means ± S.E. of at least three experiments performed in triplicate.

other regions of the subunits. To express either GB1 or GB2 VFT at the cell surface, two series of constructs were prepared. The first constructs (ΔGB1 and ΔGB2) were generated by introducing a stop codon at the end of the first intracellular loop of GB1 and GB2, respectively. As such, the VFTs were anchored in the plasma membrane by transmembrane helix-1 (TM1) of these subunits (Fig. 2*a*). For the second constructs (GB1$_{GPI}$ and GB2$_{GPI}$), the entire HD and C-terminal tail were replaced with the GPI anchor signal peptide of the mouse cellular prion protein (see "Experimental Procedures") (Fig. 2*a*). In all cases, these constructs contained an N-terminal epitope, either c-Myc or HA inserted after a signal peptide, allowing their easy detection at the cell surface. Previous studies demonstrated that such epitopes affect neither the pharmacology nor the function of these subunits (10, 11).

TABLE I
GABA and CGP64213 affinity in GB1 and ΔGB1 alone and in combination with different constructs

The K_i values for GABA and CGP64213 were determined from displacement of [^{125}I]CGP64213 binding in intact cells expressing the indicated subunit combinations as described under "Experimental Procedures." Values are means ± S.E. of at least three independent determinations.

	K_i	
	GABA	CGP64213
	μM	nM
GB1	22.3 ± 1.9[a]	1.4 ± 0.2[a]
GB1/2	8.2 ± 0.9[b]	4.0 ± 1.2[b]
GB1 + GB2	3.3 ± 0.6[b]	2.9 ± 0.2[b]
GB1$_{ASA}$	16.0 ± 1.4	2.5 ± 0.2
GB1$_{ASA}$ + GB2	3.2 ± 0.3	2.8 ± 0.3
GB1$_{ASA}$ + GB2/1$_{ASA}$	1.2 ± 0.4[b]	3.6 ± 0.6[b]
GB1$_{ASA}$ + ΔGB2	1.0 ± 0.1	2.1 ± 0.6
GB1$_{ASA}$ + ΔmG5	14.2 ± 1.4	1.8 ± 0.3
GB1$_{ASA}$ + ΔGB1$_{S246A}$	18.3 ± 0.2	2.0 ± 0.1
ΔGB1	1.0 ± 0.2	2.1 ± 0.4
ΔGB1 + GB2	0.3 ± 0.1	1.5 ± 0.3
ΔGB1 + ΔGB2	0.4 ± 0.1	1.8 ± 0.2
GB1$_{GPI}$	0.7 ± 0.1	2.5 ± 0.3

[a] Binding experiments were performed with crude membranes (data from Ref. 19).
[b] Values were taken from Ref. 11.

All constructs were correctly expressed in HEK-293 cells and displayed the expected molecular mass as shown in Western blot experiments (Fig. 2*b*). All constructs except GB2$_{GPI}$ were found at the cell surface, but at a density 2–10 times lower than GB1$_{ASA}$ as revealed by an anti-HA ELISA performed with intact cells (Fig. 2*c*). Finally, ΔGB1 and GB1$_{GPI}$ bound a competitive and membrane non-permeant radiolabeled antagonist ([^{125}I]CGP64213), and this binding could be displaced by GABA, demonstrating that these constructs retained their ability to bind GABA$_B$ ligands (Fig. 2*d* and Table I). All together, these results show that ΔGB1, ΔGB2, and GB1$_{GPI}$ were correctly expressed at the cell surface and that ΔGB1 and GB1$_{GPI}$ were correctly folded.

To examine whether an interaction between GB1 and GB2 VFTs could be detected, the above-described truncated GB1 and GB2 subunits as well as the wild-type subunits were coexpressed. GB2 and ΔGB2 increased the expression of ΔGB1 and GB1$_{GPI}$ at the cell surface. Binding experiments showed that the total amount of radioligand bound to ΔGB1 at the cell surface was increased in the presence of ΔGB2 (Fig. 3*a*). A higher increase was observed when ΔGB1 was coexpressed with full-length GB2 (Fig. 3*a*). Similarly, the amount of [^{125}I]CGP64213 bound to GB1$_{GPI}$ at the cell surface was also increased when this construct was coexpressed with either ΔGB2 or GB2 (Fig. 3*a*). Because neither GB2 nor ΔGB2 changed CGP64213 affinity in these GB1 constructs (Table I), these data show that GB2 and ΔGB2 increased the number of [^{125}I]CGP64213-binding sites at the cell surface. We further confirmed that GB2 and ΔGB2 increased the amount of the truncated GB1 constructs at the cell surface by ELISA with intact cells. The amount of HA-ΔGB1 at the cell surface was increased after coexpression with c-Myc-ΔGB2 or c-Myc-GB2 (Fig. 3*b*). Thus, GB2 VFT either stabilized ΔGB1 and GB1$_{GPI}$ at the cell surface or facilitated their targeting to the plasma membrane.

GB1 and GB2 VFT Modules Assemble into Heterodimeric Complexes in the Absence of HD—To demonstrate more directly

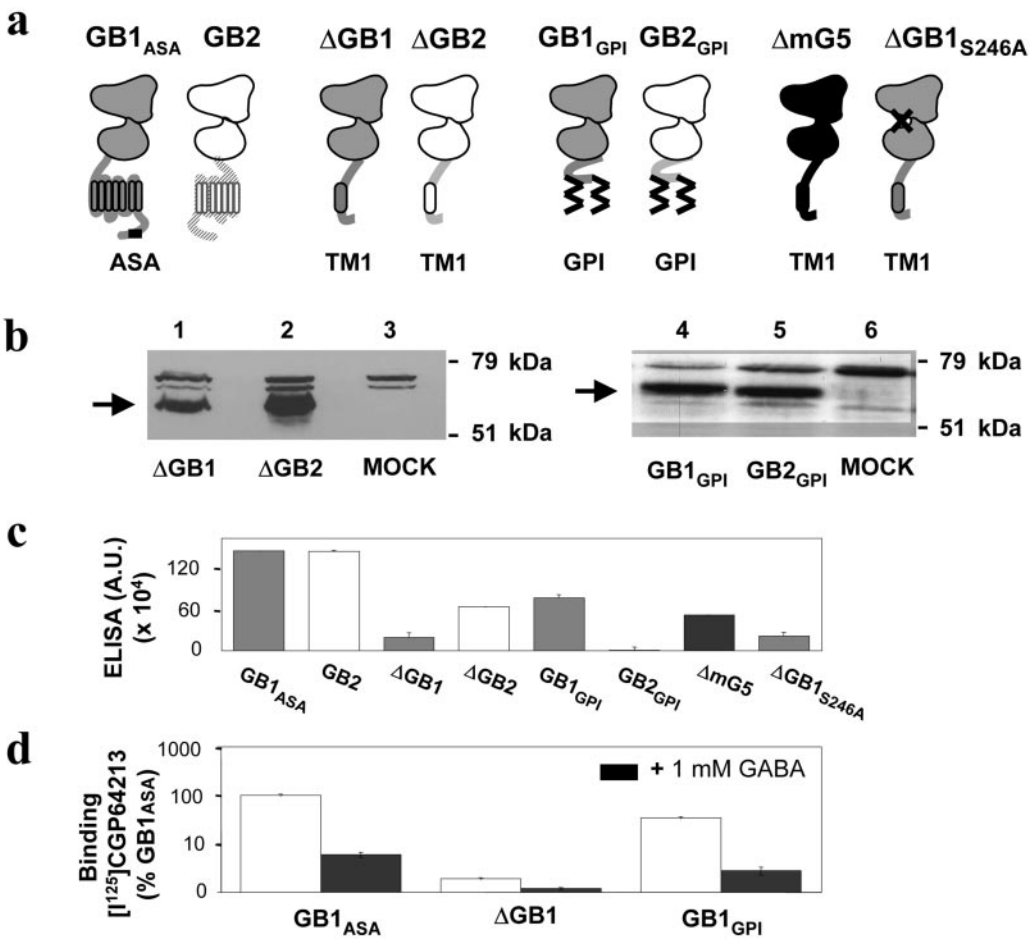


FIG. 2. **VFT module constructs for GB1 and GB2.** *a*, shown are schemes of each individual construct. GB1 VFT (*dark gray*) and GB2 VFT (*white*) were expressed with TM1 of GB1 HD (*dark gray ovals*) and GB2 (*white ovals*), respectively, or with a GPI anchor sequence (*thick broken lines*). mGlu5 VFT (*black*; ΔmG5) and GB1 VFT harboring mutation S246A (ΔGB1$_{S246A}$) were expressed using TM1 from their own receptors. *b*, shown are the results from Western blot analysis of the GB1 and GB2 constructs. The *arrows* indicate bands corresponding to ΔGB1 (*lane 1*), ΔGB2 (*lane 2*), GB1$_{GPI}$ (*lane 4*), and GB2$_{GPI}$ (*lane 5*), and these bands were absent in mock-transfected cells (*lanes 3* and *6*). The constructs have an apparent molecular mass close to 60 kDa, as expected. *c*, the cell-surface expression of each individual HA-tagged construct was measured by ELISA. Values are means ± S.E. of triplicates from a typical experiment, and they are shown in arbitrary units (*A.U.*). Although the total expression of GB2$_{GPI}$ is similar to that of GB1$_{GPI}$, GB2$_{GPI}$ failed to reach the cell surface. *d*, the binding of [^{125}I]CGP64213 to ΔGB1 and GB1$_{GPI}$ constructs is expressed as a percentage of GB1$_{ASA}$ (*white bars*). Specific binding is shown by radioligand displacement by 1 mM GABA (*black bars*). Data are means ± S.E. of at least three experiments performed in triplicate.

that GB1 and GB2 VFTs interact with each other, co-immunoprecipitation experiments were performed. Unfortunately, no interaction between GB1 and GB2 VFTs was detected (data not shown), possibly because such complexes are not stable enough and not resistant to sample preparation. Indeed, although deletion of the C-terminal coiled-coil domains of GB1 and GB2 does not prevent heterodimer formation, as shown by the normal functioning of the receptor, it largely decreases the amount of GB2 that coprecipitates with GB1 (9). This shows that the coil-coiled domains in the C-terminal tails of these subunits strongly stabilize the heterodimer.

We therefore conducted TR-FRET experiments as described previously (40). In this assay, a FRET signal is measured at the surface of intact COS-7 cells between a donor molecule (europium cryptate-pyridine bipyridine) linked to an anti-HA monoclonal antibody and an acceptor molecule (Alexa Fluor® 647) linked to an anti-c-Myc monoclonal antibody (Fig. 4*a*, *inset*). In this assay, the HA-tagged versions of ΔGB1 and GB1$_{GPI}$ and the c-Myc-tagged versions of ΔGB2 and GB2 (or other control constructs) were used. As shown in Figs. 4*a* and 5*a*, a FRET signal was measured at 665 nm (the emission wavelength of Alexa Fluor® 647) after excitation of europium cryptate-pyridine bipyridine at 337 nm in cells expressing either HA-ΔGB1 or HA-GB1$_{GPI}$ together with c-Myc-ΔGB2. To better compare the association efficiency of the different partners, the FRET signal was normalized with regard to c-Myc-tagged construct expression (Figs. 4*c* and 5*c*). This signal was significantly higher than that measured in mock-transfected cells. Moreover, such a FRET signal was not detected when ΔGB1 and GB1$_{GPI}$ were coexpressed with the c-Myc-tagged V2 vasopressin receptor, a class I GPCR (Figs. 4*a* and 5*a*). As shown in Figs. 4*b* and 5*b*, this did not result from the low expression of the c-Myc-tagged partners at the cell surface. However, a significant FRET signal was measured between ΔGB1 and ΔmG5 (the VFT of the mGlu5 receptor anchored to the plasma membrane via the first transmembrane helix) and to a lower extent between ΔGB1 and the V2 vasopressin receptor (Fig. 4*a*). However, such signals were not observed with GB1$_{GPI}$ (Fig. 5*a*), suggesting that ΔGB1 TM1 is likely involved in a nonspecific interaction with other transmembrane helix-containing proteins. This may be because the transmembrane helix used to anchor ΔGB1 at the cell surface (GB1 TM1) is usually associated with other transmembrane helices in GB1 HD.

During these experiments, we also noticed that GB1 and GB2 VFT modules formed homomeric complexes, as previously reported for both full-length GB1 and GB2 (36). Indeed, a FRET signal could be measured in cells expressing both HA-GB1$_{GPI}$ and c-Myc-ΔGB1. This signal was similar to that ob-

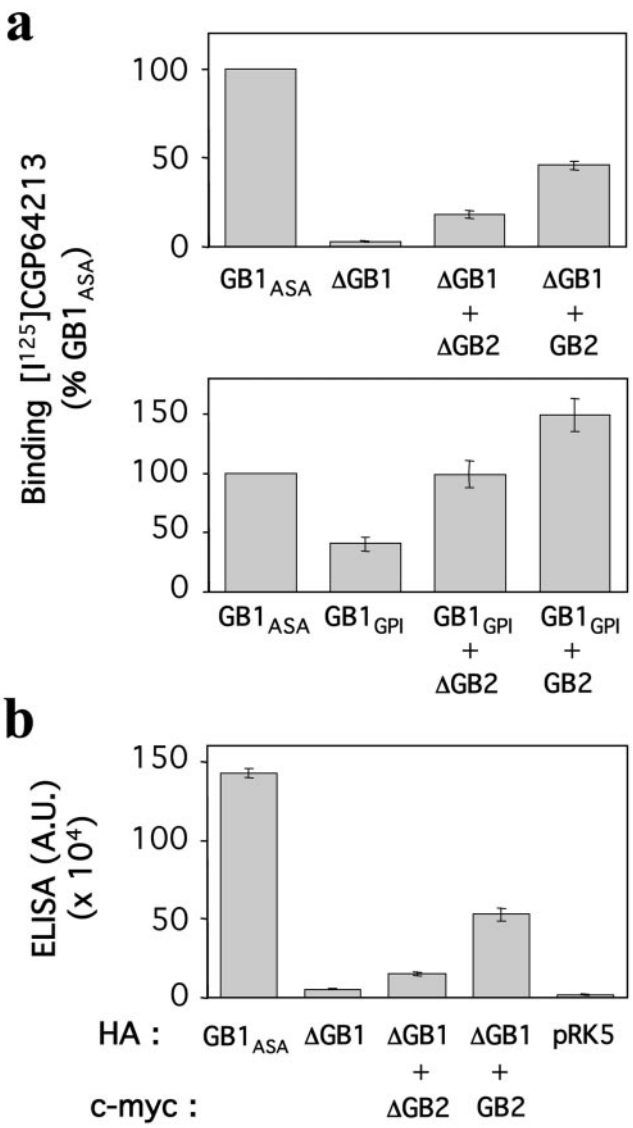


FIG. 3. **Cell-surface expression of ΔGB1 and GB1$_{GPI}$ is increased by ΔGB2 and GB2.** *a*, binding of radioligand to ΔGB1 and GB1$_{GPI}$ expressed alone or in combination with ΔGB2 or GB2. Data are means ± S.E. of at least three experiments performed in triplicate and are expressed as a percentage of the specific binding measured in cells expressing GB1$_{ASA}$. *b*, amount at the cell surface of ΔGB1 expressed alone or in combination with ΔGB2, GB2, or GB1$_{ASA}$ as measured by ELISA. Values are means ± S.E. of triplicates from a typical experiment, and they are shown in arbitrary units (*A.U.*).

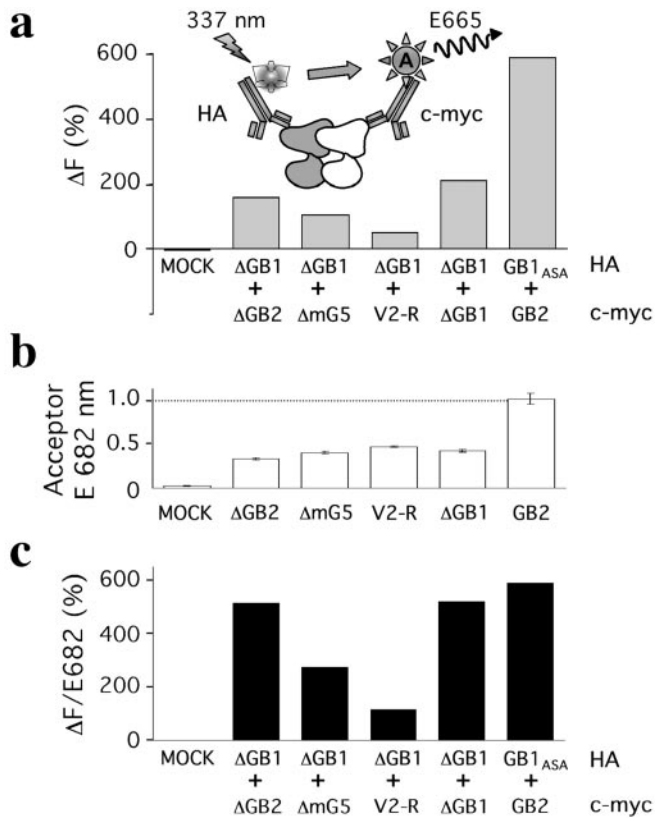


FIG. 4. **Association between VFT modules of ΔGB1 and ΔGB2 in time-resolved FRET experiments.** *a*, amount of FRET signal between coexpressed HA-ΔGB1 and c-Myc-tagged constructs. FRET signals are shown as Δ*F* (see "Experimental Procedures"). *Inset*, the scheme depicts the experimental system in which VFT modules of GB1 (*dark gray*) and GB2 (*white*) are bound to a donor molecule (europium cryptate-pyridine bipyridine) linked to an anti-HA monoclonal antibody and to an acceptor molecule (Alexa Fluor® 647) linked to an anti-c-Myc monoclonal antibody, respectively. The FRET signal between the two antibodies was measured at 665 nm (*E665*) after excitation at 337 nm. *b*, amount of c-Myc-tagged constructs as measured by the fluorescence of the Alexa Fluor® 647-linked antibody at 682 nm (*E 682 nm*). Signal intensities were normalized relative to GB2. Values are means ± S.E. of triplicates from a typical experiment. *c*, the FRET signal (Δ*F*) was normalized relative to the amount of c-Myc-tagged constructs expressed at the cell surface. Experiments were done at least three times.

tained with HA-ΔGB1 and c-Myc-ΔGB2 or HA-GB1$_{GPI}$ and c-Myc-ΔGB2 (Figs. 4*a* and 5*a*), consistent with GB1 VFT being able to oligomerize. A similar FRET signal between ΔGB1 expressed alone and GB1$_{GPI}$ coexpressed with ΔGB1 suggests that ΔGB1 TM1 is not responsible for GB1 VFT homomerization. Moreover, we found that GB2 VFT could also form homo-oligomers in similar FRET experiments (data not shown).

Association between GB1 and GB2 VFT Modules Increases Agonist Affinity in GB1—We then examined the possible influence of GB1-GB2 VFT interaction on agonist affinity. GABA affinity was measured by displacement of the radioligand [^{125}I]CGP64213 in intact cells expressing the above-described constructs alone or in combination (Table I). In contrast to the agonist, we verified that the antagonist CGP64213 displaced with a similar potency the radioligand in every combination examined, indicating that none of the constructs coexpressed with GB1 affected antagonist affinity (Table I).

As shown in Fig. 6*a*, ΔGB2 increased GABA affinity in GB1$_{ASA}$ by a factor 16 (K_i = 16.0 ± 1.4 and 1.0 ± 0.2 μM for GB1$_{ASA}$ expressed alone or with ΔGB2, respectively). This effect was specific because no change in GABA affinity was observed when GB1$_{ASA}$ was coexpressed with ΔmG5 or ΔGB1$_{S246A}$, a GB1 construct unable to bind GABA$_B$ ligands (19). Association between GB1$_{ASA}$ and ΔGB2 or ΔGB1$_{S246A}$ was confirmed by measuring the FRET signal between the coexpressed constructs (Fig. 6*a*, *inset*). These results further confirm that ΔGB2 associated with GB1$_{ASA}$ and show that this interaction increased GABA affinity in GB1.

Of interest and as previously reported (22), GABA affinity in the isolated VFT of GB1 (either ΔGB1 or GB1$_{GPI}$) was close to that measured when GB1 was coexpressed with GB2 (K_i = 1.0 ± 0.2, 0.7 ± 0.1, and 3.2 ± 0.2 μM, respectively) and 10–20 times higher than that in GB1$_{ASA}$ (Fig. 6 and Table I). This indicates that GB1 HD exerted an inhibitory action on agonist affinity. GABA affinity in these truncated GB1 constructs could still be further increased, although to a lower extent, after coexpression with either GB2 or ΔGB2 (3- and 2.5-fold, respectively) (Fig. 6*b* and Table I). Indeed, the K_i values for GABA affinity in ΔGB1 decreased from 1.0 ± 0.2 to 0.3 ± 0.1 and 0.4 ± 0.2 μM in the presence of GB2 and ΔGB2, respectively. This shows that most of the increased agonist affinity resulting from

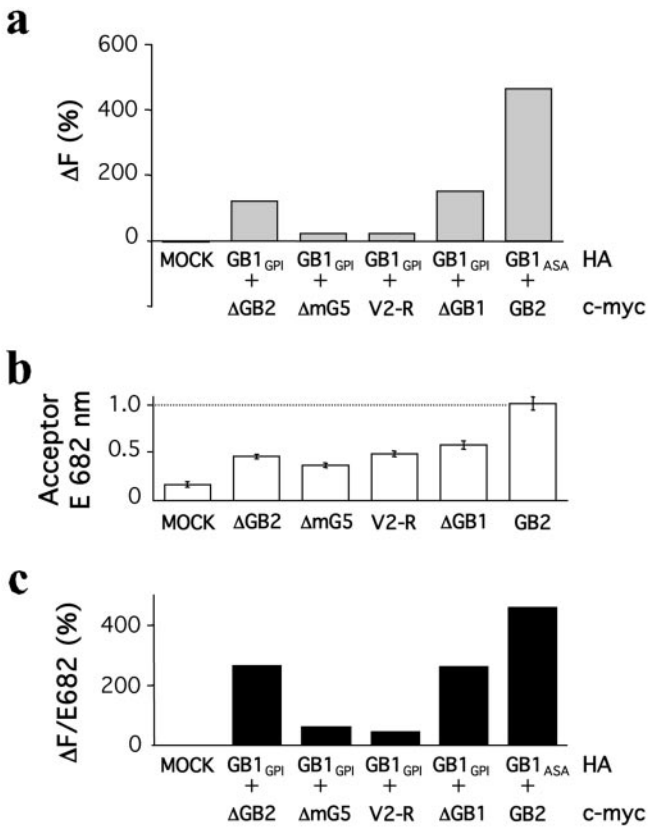


FIG. 5. **GB1$_{GPI}$ and ΔGB2 interact together specifically in time-resolved FRET experiments.** *a*, amount of FRET signal (Δ*F*) between coexpressed HA-GB1$_{GPI}$ and c-Myc-tagged constructs (see Fig. 4). *b*, amount of c-Myc-tagged constructs as measured by the fluorescence emission of the Alexa Fluor® 647-linked antibody at 682 nm (*E 682 nm*). Signal intensities were normalized relative to GB2. *c*, the FRET signal (Δ*F*) was normalized relative to the amount of c-Myc-tagged constructs expressed at the cell surface. Experiments were done at least three times. *V2-R*, V2 vasopressin receptor.

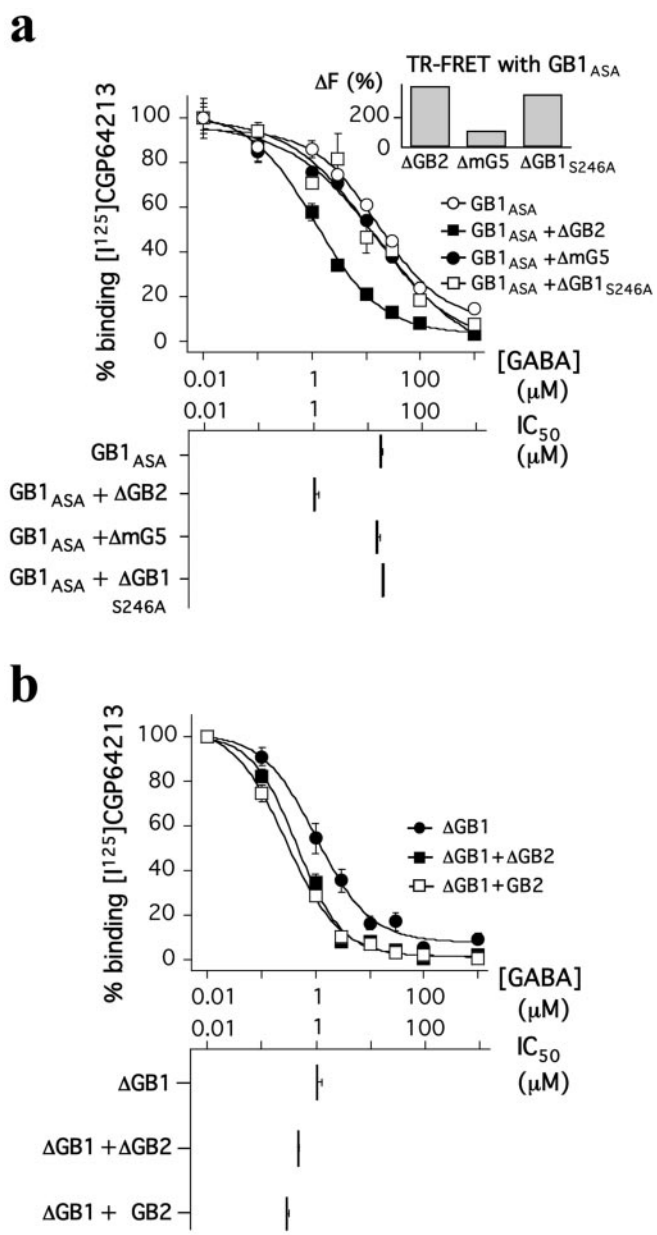


FIG. 6. **Association between VFT modules of GB1 and GB2 increases agonist affinity in GB1.** *a*, displacement curves of [^{125}I]CGP64213 by GABA in cells expressing GB1$_{ASA}$ alone (○) or in combination with ΔGB2 (■), ΔmG5 (●), or ΔGB1$_{S246A}$ (□) as a percentage of bound radioligand (*upper panel*). IC$_{50}$ values were plotted from the displacement curves (*lower panel*). Values are means ± S.E. of at least three experiments performed in triplicate. *Upper panel inset*, the association between HA-GB1$_{ASA}$ and c-Myc-tagged ΔGB2, ΔmG5, or ΔGB1$_{S246A}$ was measured in TR-FRET experiments. *b*, displacement curves of the radioligand by GABA in cells expressing ΔGB1 alone (●) or in combination with ΔGB2 (■) or GB2 (□) (*upper panel*) and the corresponding GABA IC$_{50}$ values (*lower panel*).

GB1-GB2 association was due to GB2 VFT preventing GB1 HD from decreasing agonist affinity, rather than a direct effect of GB2 VFT on GB1 VFT closure.

DISCUSSION

In this study, we have shown how the association between the VFTs of GABA$_B$ receptor subunits GB1 and GB2 can allosterically influence agonist affinity. GB2 VFT controls GB1 affinity for GABA in two ways. First, it exerts a direct action on GB1 VFT, as GB2 VFT slightly increases agonist affinity in the isolated VFT of GB1. Second and most importantly, GB2 VFT prevents inhibitory interaction between the two main domains (VFT and HD) of GB1.

Negative Allostery within GB1—Inhibitory contacts that maintain GB1 alone in a low affinity state may have several origins. One possibility is that the direct interaction between HD and VFT in GB1 constrains the VFT in a low agonist affinity state. Alternatively, GB1 can exist as a homodimer, and interactions between the GB1 VFTs in the homodimer could stabilize a low agonist affinity state. We have excluded this latter possibility because the isolated VFT of GB1 (both ΔGB1 and GB1$_{GPI}$) adopts a high agonist affinity state even though it is able to homodimerize. Accordingly, a direct interaction between HD and VFT in GB1 is likely responsible for the low agonist affinity state. Such an interaction has already been proposed by others (22, 41), but has never been demonstrated. Such a negative effect of HD on agonist affinity in VFT has also been reported for other class III GPCRs, the mGlu4 and mGlu8 receptors, using a similar approach (42, 43).

Negative allostery within GB1 is controlled by GB2 VFT, and such a process is probably not a specificity of the expression of this subunit in heterologous cells. Indeed, only a high agonist affinity GABA$_B$ receptor is found in the brain. Moreover, GB1 needs to be associated with GB2 to reach the cell surface in the central nervous system, and neither GB1-GB1 nor GB2-GB2 homodimers couple efficiently to G-proteins (4, 6).

How Is Agonist Affinity Controlled?—Both GB1 and GB2 VFTs are structurally related to the VFT of the mGlu1 receptor and to bacterial periplasmic binding proteins, as suggested by modeling studies (16, 17, 19, 21). Such domains are well known

to adopt either an open conformation (VFT_o) stabilized by antagonists (25, 26) or a closed conformation (VFT_c) stabilized by agonists (24, 26, 27). VFT can oscillate between the VFT_o and VFT_c states with an equilibrium constant of $K_1 = VFT_c/VFT_o$. A bound ligand will affect K_1 by factor of $\alpha > 1$ in the case of an agonist that stabilizes VFT_c and by factor of $\alpha < 1$ in the case of an antagonist that stabilizes VFT_o or prevents VFT from reaching the VFT_c state (28).

Accordingly, ligand affinity in VFT (K_d) depends on the affinity of the ligand in VFT_o (K_L), K_1, and α: $K_d = K_L(1 + K_1)/(1 + \alpha K_1)$. According to this model, an increase in K_1 (the receptor has a greater tendency to reach the closed state in the absence of ligand) results in a large increase in agonist affinity (28). Moreover and as observed in the case of the $GABA_B$ receptor, changing K_1 results in minor changes in antagonist affinity (28). We therefore propose that, in the absence of GB2, GB1 HD decreases K_1 (favoring the VFT_o state), an effect that is prevented when GB2 VFT associates with GB1 VFT. In addition, GB1-GB2 VFT association may further increase K_1 (favoring the VFT_c state) and thus agonist affinity.

Implications for Receptor Activation—GB2 VFT and its association with GB1 VFT appear to play a crucial role in $GABA_B$ receptor activation. In the absence of GABA, GB2 VFT constrains the receptor in an inactive state, whereas in the presence of agonist, it facilitates receptor activation. Indeed, the presence of both GB1 and GB2 VFTs in the dimeric receptor is necessary for agonist stimulation. A dimeric receptor composed of GB1 and GB2 HDs but possessing two identical VFTs (either GB1 or GB2) displays a large constitutive activity that cannot be further stimulated by agonists (11).

Inhibitory contacts between HD and VFT in GB1 that control agonist affinity could be similar to those important for $GABA_B$ receptor activation. This model is supported by several pieces of data. First, the fact that GB2 VFT increases agonist (but not antagonist) affinity suggests that GB2 VFT stabilizes the active state of GB1. Second, we have shown that GB2 VFT acts by releasing inhibitory contacts between HD and VFT in GB1. Third, positive allosteric compounds of $GABA_B$ that likely bind in HD increase both the affinity and efficacy of agonists (29). Finally, similar inhibitory interactions between HD and VFT in GB2 could exist due to the allosteric nature of the $GABA_B$ receptor, and these contacts could also play a role in receptor activation.

In conclusion, our experiments emphasize the functional importance of VFT interaction in the $GABA_B$ heterodimeric receptor and potentially in other class III GPCRs. Our data show that the direct interaction between VFTs is important not only for agonist activation of the receptor, as already reported for both $GABA_B$ (11) and mGlu (44) receptors, but also for the control of agonist affinity. Indeed, a recent study showed that mutations in mGlu1 VFT that possibly prevent direct VFT interaction within the dimeric receptor largely decrease agonist affinity (44). Future goals are to identify regions of VFT and HD responsible for inhibitory contacts at both the GB1-GB2 VFT and HD-VFT interfaces.

Acknowledgments—We thank Drs. L. Prézeau, T. Durroux, F. Rassendren, J. Kniazeff, and V. Perrier for helpful discussions; Dr. T. Durroux for the generous gift of the tagged version of the V2 vasopressin receptor; and Drs. K. Kaupmann and W. Froestl for providing CGP64213. We also express special thanks to Drs. G. Mathis and E. Trinquet (Cis Bio International) for strong support.

REFERENCES

1. Bettler, B., Kaupmann, K., and Bowery, N. (1998) *Curr. Opin. Neurobiol.* **8,** 345–350
2. Couve, A., Moss, S. J., and Pangalos, M. N. (2000) *Mol. Cell. Neurosci.* **16,** 296–312
3. Pin, J.-P., Galvez, T., and Prezeau, L. (2003) *Pharmacol. Ther.* **98,** 325–354
4. 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
5. 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) *Nature* **396,** 674–679
6. 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
7. Kuner, R., Kohr, G., Grunewald, S., Eisenhardt, G., Bach, A., and Kornau, H. C. (1999) *Science* **283,** 74–77
8. Margeta-Mitrovic, M., Jan, Y. N., and Jan, L. Y. (2000) *Neuron* **27,** 97–106
9. Calver, A. R., Robbins, M. J., Cosio, C., Rice, S. Q., Babbs, A. J., Hirst, W. D., Boyfield, I., Wood, M. D., Russell, R. B., Price, G. W., Couve, A., Moss, S. J., and Pangalos, M. N. (2001) *J. Neurosci.* **21,** 1203–1210
10. Pagano, A., Rovelli, G., Mosbacher, J., Lohmann, T., Duthey, B., Stauffer, D., Ristig, D., Schuler, V., Meigel, I., Lampert, C., Stein, T., Prézeau, L., Blahos, J., Pin, J.-P., Froestl, W., Kuhn, R., Heid, J., Kaupmann, K., and Bettler, B. (2001) *J. Neurosci.* **21,** 1189–1202
11. Galvez, T., Duthey, B., Kniazeff, J., Blahos, J., Rovelli, G., Bettler, B., Prézeau, L., and Pin, J.-P. (2001) *EMBO J.* **20,** 2152–2159
12. Margeta-Mitrovic, M., Jan, Y. N., and Jan, L. Y. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98,** 14649–14654
13. Robbins, M. J., Calver, A. R., Filippov, A. K., Hirst, W. D., Russell, R. B., Wood, M. D., Nasir, S., Couve, A., Brown, D. A., Moss, S. J., and Pangalos, M. N. (2001) *J. Neurosci.* **21,** 8043–8052
14. Duthey, B., Caudron, S., Perroy, J., Bettler, B., Fagni, L., Pin, J.-P., and Prézeau, L. (2002) *J. Biol. Chem.* **277,** 3236–3241
15. Havlickova, M., Prézeau, L., Duthey, B., Bettler, B., Pin, J.-P., and Blahos, J. (2002) *Mol. Pharmacol.* **62,** 343–350
16. Kniazeff, J., Galvez, T., Labesse, G., and Pin, J.-P. (2002) *J. Neurosci.* **22,** 7352–7361
17. Galvez, T., Parmentier, M.-L., Joly, C., Malitschek, B., Kaupmann, K., Kuhn, R., Bittiger, H., Froestl, W., Bettler, B., and Pin, J.-P. (1999) *J. Biol. Chem.* **274,** 13362–13369
18. Galvez, T., Urwyler, S., Prézeau, L., Mosbacher, J., Joly, C., Malitschek, B., Heid, J., Brabet, I., Froestl, W., Bettler, B., Kaupmann, K., and Pin, J.-P. (2000) *Mol. Pharmacol.* **57,** 419–426
19. Galvez, T., Prézeau, L., Milioti, G., Franek, M., Joly, C., Froestl, W., Bettler, B., Bertrand, H.-O., Blahos, J., and Pin, J.-P. (2000) *J. Biol. Chem.* **275,** 41166–41174
20. Costantino, G., Macchiarulo, A., Entrena Guadix, A., and Pellicciari, R. (2001) *J. Med. Chem.* **44,** 1827–1832
21. Bernard, P., Guédin, D., and Hibert, M. (2001) *J. Med. Chem.* **44,** 27–35
22. Malitschek, B., Schweizer, C., Keir, M., Heid, J., Froestl, W., Mosbacher, J., Kuhn, R., Henley, J., Joly, C., Pin, J.-P., Kaupmann, K., and Bettler, B. (1999) *Mol. Pharmacol.* **56,** 448–454
23. Quiocho, F. A. (1990) *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **326,** 341–351
24. Kunishima, N., Shimada, Y., Tsuji, Y., Sato, T., Yamamoto, M., Kumasaka, T., Nakanishi, S., Jingami, H., and Morikawa, K. (2000) *Nature* **407,** 971–977
25. Tsuchiya, D., Kunishima, N., Kamiya, N., Jingami, H., and Morikawa, K. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99,** 2660–2665
26. Bessis, A.-S., Rondard, P., Gaven, F., Brabet, I., Triballeau, N., Prézeau, L., Acher, F., and Pin, J.-P. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99,** 11097–11102
27. Kniazeff, J., Saintot, P. P., Goudet, C., Liu, J., Charnet, A., Guillon, G., and Pin, J.-P. (2004) *J. Neurosci.* **24,** 370–377
28. Parmentier, M.-L., Prézeau, L., Bockaert, J., and Pin, J.-P. (2002) *Trends Pharmacol. Sci.* **23,** 268–274
29. Urwyler, S., Mosbacher, J., Lingenhoehl, K., Heid, J., Hofstetter, K., Froestl, W., Bettler, B., and Kaupmann, K. (2001) *Mol. Pharmacol.* **60,** 963–971
30. Christopoulos, A., and Kenakin, T. (2002) *Pharmacol. Rev.* **54,** 323–374
31. Pin, J.-P., Parmentier, M.-L., and Prézeau, L. (2001) *Mol. Pharmacol.* **60,** 881–884
32. Westaway, D., Goodman, P., Mirenda, C., McKinley, M., Carlson, G., and Prusiner, S. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **51,** 651–662
33. Stahl, N., Baldwin, M. A., Burlingame, A. L., and Prusiner, S. B. (1990) *Biochemistry* **29,** 8879–8884
34. Ango, F., Albani-Torregrossa, S., Joly, C., Robbe, D., Michel, J.-M., Pin, J.-P., Bockaert, J., and Fagni, L. (1999) *Neuropharmacology* **38,** 793–803
35. Franek, M., Pagano, A., Kaupmann, K., Bettler, B., Pin, J.-P., and Blahos, J., II (1999) *Neuropharmacology* **38,** 1657–1666
36. Maurel, D., Kniazeff, J., Mathis, G., Trinquet, E., Pin, J.-P., and Ansanay, H. (2004) *Anal. Biochem.*, in press
37. Mathis, G. (1995) *Clin. Chem.* **41,** 1391–1397
38. Bazin, H., Trinquet, E., and Mathis, G. (2002) *J. Biotechnol.* **82,** 233–250
39. Kaupmann, K., Huggel, K., Heid, J., Flor, P. J., Bischoff, S., Mickel, S. J., McMaster, G., Angst, C., Bittiger, H., Froestl, W., and Bettler, B. (1997) *Nature* **386,** 239–246
40. McVey, M., Ramsay, D., Kellett, E., Rees, S., Wilson, S., Pope, A. J., and Milligan, G. (2001) *J. Biol. Chem.* **276,** 14092–14099
41. Margeta-Mitrovic, M., Jan, Y. N., and Jan, L. Y. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98,** 14643–14648
42. Han, G., and Hampson, D. R. (1999) *J. Biol. Chem.* **274,** 10008–10013
43. Peltekova, V., Han, G., Soleymanlou, N., and Hampson, D. R. (2000) *Mol. Brain Res.* **76,** 180–190
44. Sato, T., Shimada, Y., Nagasawa, N., Nakanishi, S., and Jingami, H. (2003) *J. Biol. Chem.* **278,** 4314–4321

BIBLIOGRAPHIE

A

AbdAlla S, Zaki E, Lother H and Quitterer U (1999) Involvement of the amino terminus of the B(2) receptor in agonist-induced receptor dimerization. *J Biol Chem* **274**(37):26079-26084.

Albizu L, Balestre MN, Breton C, Pin JP, Manning M, Mouillac B, Barberis C and Durroux T (2006) Probing the Existence of G Protein-Coupled Receptor Dimers by Positive and Negative Ligand-Dependent Cooperative Binding. *Mol Pharmacol* **22**:22.

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**(7):3684-3689.

Avissar S, Amitai G and Sokolovsky M (1983) Oligomeric structure of muscarinic receptors is shown by photoaffinity labeling: subunit assembly may explain high- and low-affinity agonist states. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**(1):156-159.

Ayoub MA, 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**(24):21522-21528 Epub 22002 Apr 21528.

Ayoub MA, Levoye A, Delagrange P and Jockers R (2004) Preferential formation of MT1/MT2 melatonin receptor heterodimers with distinct ligand interaction properties compared with MT2 homodimers. *Mol Pharmacol* **66**(2):312-321.

Azpiazu I and Gautam N (2004) A fluorescence resonance energy transfer-based sensor indicates that receptor access to a G protein is unrestricted in a living mammalian cell. *J Biol Chem* **279**(26):27709-27718 Epub 22004 Apr 27712.

Azzi M, Charest PG, Angers S, Rousseau G, Kohout T, Bouvier M and Pineyro G (2003) Beta-arrestin-mediated activation of MAPK by inverse agonists reveals distinct active conformations for G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(20):11406-11411 Epub 12003 Sep 11417.

B

Bai M, Trivedi S and Brown EM (1998) Dimerization of the extracellular calcium-sensing receptor (CaR) on the cell surface of CaR-transfected HEK293 cells. *J Biol Chem* **273**(36):23605-23610.

Baneres JL and Parello J (2003) Structure-based analysis of GPCR function: evidence for a novel pentameric assembly between the dimeric leukotriene B4 receptor BLT1 and the G-protein. *J Mol Biol* **329**(4):815-829.

Barker EL, Westphal RS, Schmidt D and Sanders-Bush E (1994) Constitutively active 5-hydroxytryptamine2C receptors reveal novel inverse agonist activity of receptor ligands. *J Biol Chem* **269**(16):11687-11690.

Bass J, Chiu G, Argon Y and Steiner DF (1998) Folding of insulin receptor monomers is facilitated by the molecular chaperones calnexin and calreticulin and impaired by rapid dimerization. *J Cell Biol* **141**(3):637-646.

Bastiaens PI and Squire A (1999) Fluorescence lifetime imaging microscopy: spatial resolution of biochemical processes in the cell. *Trends Cell Biol* **9**(2):48-52.

Bazin H, Trinquet E and Mathis G (2002) Time resolved amplification of cryptate emission: a versatile technology to trace biomolecular interactions. *J Biotechnol* **82**(3):233-250.

Beckett D, Kovaleva E and Schatz PJ (1999) A minimal peptide substrate in biotin holoenzyme synthetase-catalyzed biotinylation. *Protein Sci* **8**(4):921-929.

Benkirane M, Jin DY, Chun RF, Koup RA and Jeang KT (1997) Mechanism of transdominant inhibition of CCR5-mediated HIV-1 infection by ccr5delta32. *J Biol Chem* **272**(49):30603-30606.

Bertrand L, Parent S, Caron M, Legault M, Joly E, Angers S, Bouvier M, Brown M, Houle B and Menard L (2002) The BRET2/arrestin assay in stable recombinant cells: a platform to screen for compounds that interact with G protein-coupled receptors (GPCRS). *J Recept Signal Transduct Res* **22**(1-4):533-541.

Bischoff S, Leonhard S, Reymann N, Schuler V, Shigemoto R, Kaupmann K and Bettler B (1999) Spatial distribution of GABA(B)R1 receptor mRNA and binding sites in the rat brain. *J Comp Neurol* **412**(1):1-16.

Bockaert J and Pin JP (1998) [Use of a G-protein-coupled receptor to communicate. An evolutionary success]. *C R Acad Sci III* **321**(7):529-551.

Bockaert J and Pin JP (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *Embo J* **18**(7):1723-1729.

Bouvier M, Hausdorff WP, De Blasi A, O'Dowd BF, Kobilka BK, Caron MG and Lefkowitz RJ (1988) Removal of phosphorylation sites from the beta 2-adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization. *Nature* **333**(6171):370-373.

Brumbaugh J, Schleifenbaum A, Gasch A, Sattler M and Schultz C (2006) A dual parameter FRET probe for measuring PKC and PKA activity in living cells. *J Am Chem Soc* **128**(1):24-25.

Bunemann M, Frank M and Lohse MJ (2003) Gi protein activation in intact cells involves subunit rearrangement rather than dissociation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(26):16077-16082 Epub 12003 Dec 16012.

C

Cabrera-Vera TM, Vanhauwe J, Thomas TO, Medkova M, Preininger A, Mazzoni MR and Hamm HE (2003) Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr Rev* **24**(6):765-781.

Cairns JS and D'Souza MP (1998) Chemokines and HIV-1 second receptors: the therapeutic connection. *Nat Med* **4**(5):563-568.

Capponi AM and Catt KJ (1980) Solubilization and characterization of adrenal and uterine angiotensin II receptors after photoaffinity labeling. *J Biol Chem* **255**(24):12081-12086.

Chabre M, Cone R and Saibil H (2003) Biophysics: is rhodopsin dimeric in native retinal rods? *Nature* **426**(6962):30-31; discussion 31.

Chabre M and le Maire M (2005) Monomeric G-protein-coupled receptor as a functional unit. *Biochemistry* **44**(27):9395-9403.

Chan SS, Arndt-Jovin DJ and Jovin TM (1979) Proximity of lectin receptors on the cell surface measured by fluorescence energy transfer in a flow system. *J Histochem Cytochem* **27**(1):56-64.

Charles AC, Mostovskaya N, Asas K, Evans CJ, Dankovich ML and Hales TG (2003) Coexpression of delta-opioid receptors with micro receptors in GH3 cells changes the functional response to micro agonists from inhibitory to excitatory. *Mol Pharmacol* **63**(1):89-95.

Chelli M and Alizon M (2001) Determinants of the trans-dominant negative effect of truncated forms of the CCR5 chemokine receptor. *J Biol Chem* **276**(50):46975-46982.

Chen I, Howarth M, Lin W and Ting AY (2005) Site-specific labeling of cell surface proteins with biophysical probes using biotin ligase. *Nat Methods* **2**(2):99-104 Epub 2005 Jan 2021.

Chidiac P, Hebert TE, Valiquette M, Dennis M and Bouvier M (1994) Inverse agonist activity of beta-adrenergic antagonists. *Mol Pharmacol* **45**(3):490-499.

Chilkoti A, Tan PH and Stayton PS (1995) Site-directed mutagenesis studies of the high-affinity streptavidin-biotin complex: contributions of tryptophan residues 79, 108, and 120. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(5):1754-1758.

Christopoulos A and Kenakin T (2002) G protein-coupled receptor allosterism and complexing. *Pharmacol Rev* **54**(2):323-374.

Clackson T, Yang W, Rozamus LW, Hatada M, Amara JF, Rollins CT, Stevenson LF, Magari SR, Wood SA, Courage NL, Lu X, Cerasoli F, Jr., Gilman M and Holt DA (1998) Redesigning an FKBP-ligand interface to generate chemical dimerizers with novel specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(18):10437-10442.

Coulter S and Rodbell M (1992) Heterotrimeric G proteins in synaptoneurosome membranes are crosslinked by p-phenylenedimaleimide, yielding structures comparable in size to crosslinked tubulin and F-actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(13):5842-5846.

Cvejic S and Devi LA (1997) Dimerization of the delta opioid receptor: implication for a role in receptor internalization. *J Biol Chem* **272**(43):26959-26964.

D

Dale RE, Eisinger J and Blumberg WE (1979) The orientational freedom of molecular probes. The orientation factor in intramolecular energy transfer. *Biophys J* **26**(2):161-193.

Damoiseaux R, Keppler A and Johnsson K (2001) Synthesis and applications of chemical probes for human O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Chembiochem* **2**(4):285-287.

Dann CE, Hsieh JC, Rattner A, Sharma D, Nathans J and Leahy DJ (2001) Insights into Wnt binding and signalling from the structures of two Frizzled cysteine-rich domains. *Nature* **412**(6842):86-90.

De Lean A, Stadel JM and Lefkowitz RJ (1980) A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled

beta-adrenergic receptor. *J Biol Chem* **255**(15):7108-7117.

De Vries L, Mousli M, Wurmser A and Farquhar MG (1995) GAIP, a protein that specifically interacts with the trimeric G protein G alpha i3, is a member of a protein family with a highly conserved core domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(25):11916-11920.

Dery O, Thoma MS, Wong H, Grady EF and Bunnett NW (1999) Trafficking of proteinase-activated receptor-2 and beta-arrestin-1 tagged with green fluorescent protein. beta-Arrestin-dependent endocytosis of a proteinase receptor. *J Biol Chem* **274**(26):18524-18535.

Dolan ME and Pegg AE (1997) O6-benzylguanine and its role in chemotherapy. *Clin Cancer Res* **3**(6):837-847.

E

El-Asmar L, Springael JY, Ballet S, Andrieu EU, Vassart G and Parmentier M (2005) Evidence for negative binding cooperativity within CCR5-CCR2b heterodimers. *Mol Pharmacol* **67**(2):460-469 Epub 2004 Oct 2027.

F

Farrar SJ, Whiting PJ, Bonnert TP and McKernan RM (1999) Stoichiometry of a ligand-gated ion channel determined by fluorescence energy transfer. *J Biol Chem* **274**(15):10100-10104.

Federman AD, Conklin BR, Schrader KA, Reed RR and Bourne HR (1992) Hormonal stimulation of adenylyl cyclase through Gi-protein beta gamma subunits. *Nature* **356**(6365):159-161.

Felder CB, Graul RC, Lee AY, Merkle HP and Sadee W (1999) The Venus flytrap of periplasmic binding proteins: an ancient protein module present in multiple drug receptors. *AAPS PharmSci* **1**(2):E2.

Ferguson SS, Barak LS, Zhang J and Caron MG (1996) G-protein-coupled receptor regulation: role of G-protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Can J Physiol Pharmacol* **74**(10):1095-1110.

Filipek S, Krzysko KA, Fotiadis D, Liang Y, Saperstein DA, Engel A and Palczewski K (2004) A concept for G protein activation by G protein-coupled receptor dimers: the transducin/rhodopsin interface. *Photochem Photobiol Sci* **3**(6):628-638 Epub 2004 Feb 2027.

Fotiadis D, Jastrzebska B, Philippsen A, Muller DJ, Palczewski K and Engel A (2006) Structure of the rhodopsin dimer: a working model for G-protein-coupled receptors. *Curr Opin Struct Biol* **16**(2):252-259 Epub 2006 Mar 2029.

Fotiadis D, Liang Y, Filipek S, Saperstein DA, Engel A and Palczewski K (2003) Atomic-force microscopy: Rhodopsin dimers in native disc membranes. *Nature* **421**(6919):127-128.

Fotiadis D, Liang Y, Filipek S, Saperstein DA, Engel A and Palczewski K (2004) The G protein-coupled receptor rhodopsin in the native membrane. *FEBS Lett* **564**(3):281-288.

Franco R, Ferre S, Agnati L, Torvinen M, Gines S, Hillion J, Casado V, Lledo P, Zoli M, Lluis C and Fuxe K (2000) Evidence for adenosine/dopamine receptor interactions: indications for heteromerization. *Neuropsychopharmacology* **23**(4 Suppl):S50-59.

Fredriksson R and Schioth HB (2005) The repertoire of G-protein-coupled receptors in fully sequenced genomes. *Mol Pharmacol* **67**(5):1414-1425.

Fukushima Y, Asano T, Saitoh T, Anai M, Funaki M, Ogihara T, Katagiri H, Matsuhashi N, Yazaki Y and Sugano K (1997) Oligomer formation of histamine H2 receptors expressed in Sf9 and COS7 cells. *FEBS Lett* **409**(2):283-286.

G

Gabriel D, Vernier M, Pfeifer MJ, Dasen B, Tenaillon L and Bouhelal R (2003) High throughput screening technologies for direct cyclic AMP measurement. *Assay Drug Dev Technol* **1**(2):291-303.

Gales C, Rebois RV, Hogue M, Trieu P, Breit A, Hebert TE and Bouvier M (2005) Real-time monitoring of receptor and G-protein interactions in living cells. *Nat Methods* **2**(3):177-184 Epub 2005 Feb 2017.

Gales C, Van Durm JJ, Schaak S, Pontier S, Percherancier Y, Audet M, Paris H and Bouvier M (2006) Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes. *Nat Struct Mol Biol* **13**(9):778-786.

Galvez T, Duthey B, Kniazeff J, Blahos J, Rovelli G, Bettler B, Prezeau L and Pin JP (2001) Allosteric interactions between GB1 and GB2 subunits are required for optimal GABA(B) receptor function. *Embo J* **20**(9):2152-2159.

Garritsen A, van Galen PJ and Simonds WF (1993) The N-terminal coiled-coil domain of beta is essential for gamma association: a model for G-protein beta gamma subunit interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(16):7706-7710.

Gazi L, Lopez-Gimenez JF, Rudiger MP and Strange PG (2003) Constitutive oligomerization of human D2 dopamine receptors expressed in Spodoptera

frugiperda 9 (Sf9) and in HEK293 cells. Analysis using co-immunoprecipitation and time-resolved fluorescence resonance energy transfer. *Eur J Biochem* **270**(19):3928-3938.

George N, Pick H, Vogel H, Johnsson N and Johnsson K (2004) Specific labeling of cell surface proteins with chemically diverse compounds. *J Am Chem Soc* **126**(29):8896-8897.

George SR, Fan T, Xie Z, Tse R, Tam V, Varghese G and O'Dowd BF (2000) Oligomerization of mu- and delta-opioid receptors. Generation of novel functional properties. *J Biol Chem* **275**(34):26128-26135.

Gershengorn MC and Osman R (2001) Minireview: Insights into G protein-coupled receptor function using molecular models. *Endocrinology* **142**(1):2-10.

Gether U and Kobilka BK (1998) G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation. *J Biol Chem* **273**(29):17979-17982.

Gilman AG (1987) G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem* **56**:615-649.

Gines S, Hillion J, Torvinen M, Le Crom S, Casado V, Canela EI, Rondin S, Lew JY, Watson S, Zoli M, Agnati LF, Verniera P, Lluis C, Ferre S, Fuxe K and Franco R (2000) Dopamine D1 and adenosine A1 receptors form functionally interacting heteromeric complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(15):8606-8611.

Goetz CA, O'Neil JJ and Farrar MA (2003) Membrane localization, oligomerization, and phosphorylation are required for optimal raf activation. *J Biol Chem* **278**(51):51184-51189.

Goldsmith PK, Fan GF, Ray K, Shiloach J, McPhie P, Rogers KV and Spiegel AM (1999) Expression, purification, and biochemical characterization of the amino-terminal extracellular domain of the human calcium receptor. *J Biol Chem* **274**(16):11303-11309.

Gomes I, Jordan BA, Gupta A, Trapaidze N, Nagy V and Devi LA (2000) Heterodimerization of mu and delta opioid receptors: A role in opiate synergy. *J Neurosci* **20**(22):RC110.

Gregan B, Jurgensen J, Papsdorf G, Furkert J, Schaefer M, Beyermann M, Rosenthal W and Oksche A (2004) Ligand-dependent differences in the internalization of endothelin A and endothelin B receptor heterodimers. *J Biol Chem* **279**(26):27679-27687 Epub 22004 Apr 27679.

Griffin BA, Adams SR and Tsien RY (1998) Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells. *Science* **281**(5374):269-272.

Guignet EG, Hovius R and Vogel H (2004) Reversible site-selective labeling of membrane proteins in live cells. *Nat Biotechnol* **22**(4):440-444 Epub 2004 Mar 2021.

Guo J, Chen H, Puhl HL, 3rd and Ikeda SR (2006) Fluorophore-assisted light inactivation produces both targeted and collateral effects on N-type calcium channel modulation in rat sympathetic neurons. *J Physiol* **576**(Pt 2):477-492.

Guo W, Shi L, Filizola M, Weinstein H and Javitch JA (2005) Crosstalk in G protein-coupled receptors: changes at the transmembrane homodimer interface determine activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(48):17495-17500 Epub 12005 Nov 17421.

H

Hague C, Uberti MA, Chen Z, Bush CF, Jones SV, Ressler KJ, Hall RA and Minneman KP (2004a) Olfactory receptor surface expression is driven by association with the beta2-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(37):13672-13676 Epub 12004 Sep 13673.

Hague C, Uberti MA, Chen Z, Hall RA and Minneman KP (2004b) Cell surface expression of alpha1D-adrenergic receptors is controlled by heterodimerization with alpha1B-adrenergic receptors. *J Biol Chem* **279**(15):15541-15549 Epub 12004 Jan 15521.

Hausdorff WP, Bouvier M, O'Dowd BF, Irons GP, Caron MG and Lefkowitz RJ (1989) Phosphorylation sites on two domains of the beta 2-adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization. *J Biol Chem* **264**(21):12657-12665.

He L, Bradrick TD, Karpova TS, Wu X, Fox MH, Fischer R, McNally JG, Knutson JR, Grammer AC and Lipsky PE (2003) Flow cytometric measurement of fluorescence (Forster) resonance energy transfer from cyan fluorescent protein to yellow fluorescent protein using single-laser excitation at 458 nm. *Cytometry A* **53**(1):39-54.

Hebert TE, Moffett S, Morello JP, Loisel TP, Bichet DG, 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**(27):16384-16392.

Hein P, Frank M, Hoffmann C, Lohse MJ and Bunemann M (2005) Dynamics of receptor/G protein coupling in living cells. *Embo J* **24**(23):4106-4114 Epub 2005 Nov 4117.

Hibert MF, Trumpp-Kallmeyer S, Bruinvels A and Hoflack J (1991) Three-dimensional models of

neurotransmitter G-binding protein-coupled receptors. *Mol Pharmacol* **40**(1):8-15.

Hillion J, Canals M, Torvinen M, Casado V, Scott R, Terasmaa A, Hansson A, Watson S, Olah ME, Mallol J, Canela EI, Zoli M, Agnati LF, Ibanez CF, Lluis C, Franco R, Ferre S and Fuxe K (2002) Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A2A receptors and dopamine D2 receptors. *J Biol Chem* **277**(20):18091-18097 Epub 12002 Feb 18028.

Hingorani VN, Tobias DT, Henderson JT and Ho YK (1988) Chemical cross-linking of bovine retinal transducin and cGMP phosphodiesterase. *J Biol Chem* **263**(14):6916-6926.

Hoffmann C, Gaietta G, Bunemann M, Adams SR, Oberdorff-Maass S, Behr B, Vilardaga JP, Tsien RY, Ellisman MH and Lohse MJ (2005) A FlAsH-based FRET approach to determine G protein-coupled receptor activation in living cells. *Nat Methods* **2**(3):171-176 Epub 2005 Feb 2017.

Howarth M, Chinnapen DJ, Gerrow K, Dorrestein PC, Grandy MR, Kelleher NL, El-Husseini A and Ting AY (2006) A monovalent streptavidin with a single femtomolar biotin binding site. *Nat Methods* **3**(4):267-273.

Howarth M, Takao K, Hayashi Y and Ting AY (2005) Targeting quantum dots to surface proteins in living cells with biotin ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(21):7583-7588 Epub 2005 May 7516.

Hynes TR, Mervine SM, Yost EA, Sabo JL and Berlot CH (2004a) Live cell imaging of Gs and the beta2-adrenergic receptor demonstrates that both alphas and beta1gamma7 internalize upon stimulation and exhibit similar trafficking patterns that differ from that of the beta2-adrenergic receptor. *J Biol Chem* **279**(42):44101-44112 Epub 42004 Aug 44105.

Hynes TR, Tang L, Mervine SM, Sabo JL, Yost EA, Devreotes PN and Berlot CH (2004b) Visualization of G protein betagamma dimers using bimolecular fluorescence complementation demonstrates roles for both beta and gamma in subcellular targeting. *J Biol Chem* **279**(29):30279-30286 Epub 32004 May 30210.

J

Janetopoulos C, Jin T and Devreotes P (2001) Receptor-mediated activation of heterotrimeric G-proteins in living cells. *Science* **291**(5512):2408-2411.

Jastrzebska B, Fotiadis D, Jang GF, Stenkamp RE, Engel A and Palczewski K (2006) Functional and structural characterization of rhodopsin oligomers. *J Biol Chem* **281**(17):11917-11922.

Jay DG (1988) Selective destruction of protein function by chromophore-assisted laser inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(15):5454-5458.

Jensen AA, Hansen JL, Sheikh SP and Brauner-Osborne H (2002) Probing intermolecular protein-protein interactions in the calcium-sensing receptor homodimer using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Eur J Biochem* **269**(20):5076-5087.

Jordan BA and Devi LA (1999) G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature* **399**(6737):697-700.

Jordan BA, Trapaidze N, Gomes I, Nivarthi R and Devi LA (2001) Oligomerization of opioid receptors with beta 2-adrenergic receptors: a role in trafficking and mitogen-activated protein kinase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(1):343-348.

Juillerat A, Gronemeyer T, Keppler A, Gendreizig S, Pick H, Vogel H and Johnsson K (2003) Directed evolution of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase for efficient labeling of fusion proteins with small molecules in vivo. *Chem Biol* **10**(4):313-317.

Juillerat A, Heinis C, Sielaff I, Barnikow J, Jaccard H, Kunz B, Terskikh A and Johnsson K (2005) Engineering substrate specificity of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase for specific protein labeling in living cells. *Chembiochem* **6**(7):1263-1269.

K

Kapanidis AN, Ebright YW and Ebright RH (2001) Site-specific incorporation of fluorescent probes into protein: hexahistidine-tag-mediated fluorescent labeling with (Ni(2+):nitrilotriacetic Acid (n)-fluorochrome conjugates. *J Am Chem Soc* **123**(48):12123-12125.

Karpa KD, Lin R, Kabbani N and Levenson R (2000) The dopamine D3 receptor interacts with itself and the truncated D3 splice variant d3nf: D3-D3nf interaction causes mislocalization of D3 receptors. *Mol Pharmacol* **58**(4):677-683.

Katz A, Wu D and Simon MI (1992) Subunits beta gamma of heterotrimeric G protein activate beta 2 isoform of phospholipase C. *Nature* **360**(6405):686-689.

Kenakin T (2002a) Drug efficacy at G protein-coupled receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **42**:349-379.

Kenakin T (2002b) Efficacy at G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Drug Discov* **1**(2):103-110.

Kenakin T (2004) Principles: receptor theory in pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* **25**(4):186-192.

Kent RS, De Lean A and Lefkowitz RJ (1980) A quantitative analysis of beta-adrenergic receptor interactions: resolution of high and low affinity states of the receptor by computer modeling of ligand binding data. *Mol Pharmacol* **17**(1):14-23.

Keppler A, Gendreizig S, Gronemeyer T, Pick H, Vogel H and Johnsson K (2003) A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules in vivo. *Nat Biotechnol* **21**(1):86-89 Epub 2002 Dec 2009.

Keppler A, Kindermann M, Gendreizig S, Pick H, Vogel H and Johnsson K (2004) Labeling of fusion proteins of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase with small molecules in vivo and in vitro. *Methods* **32**(4):437-444.

Kim D, Lewis DL, Graziadei L, Neer EJ, Bar-Sagi D and Clapham DE (1989) G-protein beta gamma-subunits activate the cardiac muscarinic K+-channel via phospholipase A2. *Nature* **337**(6207):557-560.

Kniazeff J, Bessis AS, Maurel D, Ansanay H, Prezeau L and Pin JP (2004) Closed state of both binding domains of homodimeric mGlu receptors is required for full activity. *Nat Struct Mol Biol* **11**(8):706-713 Epub 2004 Jul 2004.

Kohout TA, Nicholas SL, Perry SJ, Reinhart G, Junger S and Struthers RS (2004) Differential desensitization, receptor phosphorylation, beta-arrestin recruitment, and ERK1/2 activation by the two endogenous ligands for the CC chemokine receptor 7. *J Biol Chem* **279**(22):23214-23222 Epub 22004 Mar 23230.

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

Kroeger KM, Hanyaloglu AC, Seeber RM, Miles LE and Eidne KA (2001) Constitutive and agonist-dependent homo-oligomerization of the thyrotropin-releasing hormone receptor. Detection in living cells using bioluminescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* **276**(16):12736-12743 Epub 12001 Jan 12718.

Krueger KM, Daaka Y, Pitcher JA and Lefkowitz RJ (1997) The role of sequestration in G protein-coupled receptor resensitization. Regulation of beta2-adrenergic receptor dephosphorylation by vesicular acidification. *J Biol Chem* **272**(1):5-8.

Kuner R, Kohr G, Grunewald S, Eisenhardt G, Bach A and Kornau HC (1999) Role of heteromer formation in GABAB receptor function. *Science* **283**(5398):74-77.

Kunishima N, Shimada Y, Tsuji Y, Sato T, Yamamoto M, Kumasaka T, Nakanishi S, Jingami H and Morikawa K (2000) Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature* **407**(6807):971-977.

L

Laitinen OH, Nordlund HR, Hytonen VP, Uotila ST, Marttila AT, Savolainen J, Airenne KJ, Livnah O, Bayer EA, Wilchek M and Kulomaa MS (2003) Rational design of an active avidin monomer. *J Biol Chem* **278**(6):4010-4014 Epub 2002 Nov 4027.

Lambright DG, Sondek J, Bohm A, Skiba NP, Hamm HE and Sigler PB (1996) The 2.0 A crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature* **379**(6563):311-319.

Laporte SA, Oakley RH, Holt JA, Barak LS and Caron MG (2000) The interaction of beta-arrestin with the AP-2 adaptor is required for the clustering of beta 2-adrenergic receptor into clathrin-coated pits. *J Biol Chem* **275**(30):23120-23126.

Latif R, Graves P and Davies TF (2002) Ligand-dependent inhibition of oligomerization at the human thyrotropin receptor. *J Biol Chem* **277**(47):45059-45067 Epub 42002 Sep 45059.

Lavoie C, Mercier JF, Salahpour A, Umapathy D, Breit A, Villeneuve LR, Zhu WZ, Xiao RP, Lakatta EG, Bouvier M and Hebert TE (2002) Beta 1/beta 2-adrenergic receptor heterodimerization regulates beta 2-adrenergic receptor internalization and ERK signaling efficacy. *J Biol Chem* **277**(38):35402-35410 Epub 32002 Jul 35424.

Lee SP, So CH, Rashid AJ, Varghese G, Cheng R, Lanca AJ, O'Dowd BF and George SR (2004) Dopamine D1 and D2 receptor Co-activation generates a novel phospholipase C-mediated calcium signal. *J Biol Chem* **279**(34):35671-35678.

Lefkowitz RJ, Mullikin D and Caron MG (1976) Regulation of beta-adrenergic receptors by guanyl-5'-yl imidodiphosphate and other purine nucleotides. *J Biol Chem* **251**(15):4686-4692.

Lei Q, Jones MB, Talley EM, Schrier AD, McIntire WE, Garrison JC and Bayliss DA (2000) Activation and inhibition of G protein-coupled inwardly rectifying potassium (Kir3) channels by G protein beta gamma subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(17):9771-9776.

Lemercier G and Johnsson K (2006) Chimeric streptavidins with reduced valencies. *Nat Methods* **3**(4):247-248.

Liang Y, Fotiadis D, Filipek S, Saperstein DA, Palczewski K and Engel A (2003) Organization of the G protein-coupled receptors rhodopsin and opsin in native membranes. *J Biol Chem* **278**(24):21655-21662.

Lippincott-Schwartz J and Patterson GH (2003) Development and use of fluorescent protein markers in living cells. *Science* **300**(5616):87-91.

Lisenbee CS, Karnik SK and Trelease RN (2003) Overexpression and mislocalization of a tail-anchored GFP redefines the identity of peroxisomal ER. *Traffic* **4**(7):491-501.

Liu J, Maurel D, Etzol S, Brabet I, Ansanay H, Pin JP and Rondard P (2004) Molecular determinants involved in the allosteric control of agonist affinity in the GABAB receptor by the GABAB2 subunit. *J Biol Chem* **279**(16):15824-15830.

Lohse MJ, Benovic JL, Caron MG and Lefkowitz RJ (1990) Multiple pathways of rapid beta 2-adrenergic receptor desensitization. Delineation with specific inhibitors. *J Biol Chem* **265**(6):3202-3211.

Lohse MJ, Lefkowitz RJ, Caron MG and Benovic JL (1989) Inhibition of beta-adrenergic receptor kinase prevents rapid homologous desensitization of beta 2-adrenergic receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(9):3011-3015.

Luetje CW, Wada K, Rogers S, Abramson SN, Tsuji K, Heinemann S and Patrick J (1990) Neurotoxins distinguish between different neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit combinations. *J Neurochem* **55**(2):632-640.

M

Maggio R, Barbier P, Colelli A, Salvadori F, Demontis G and Corsini GU (1999) G protein-linked receptors: pharmacological evidence for the formation of heterodimers. *J Pharmacol Exp Ther* **291**(1):251-257.

Marks KM, Braun PD and Nolan GP (2004) A general approach for chemical labeling and rapid, spatially controlled protein inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(27):9982-9987 Epub 2004 Jun 9924.

Martin BR, Giepmans BN, Adams SR and Tsien RY (2005) Mammalian cell-based optimization of the biarsenical-binding tetracysteine motif for improved fluorescence and affinity. *Nat Biotechnol* **23**(10):1308-1314 Epub 2005 Sep 1311.

Mathis G (1993) Rare earth cryptates and homogeneous fluoroimmunoassays with human sera. *Clin Chem* **39**(9):1953-1959.

Mathis G (1995) Probing molecular interactions with homogeneous techniques based on rare earth cryptates and fluorescence energy transfer. *Clin Chem* **41**(9):1391-1397.

Mathis G (1999) HTRF(R) Technology. *J Biomol Screen* **4**(6):309-314.

Mattera R, Pitts BJ, Entman ML and Birnbaumer L (1985) Guanine nucleotide regulation of a mammalian myocardial muscarinic receptor system. Evidence for homo- and heterotropic cooperativity in ligand binding analyzed by computer-assisted curve fitting. *J Biol Chem* **260**(12):7410-7421.

Matthews JC, Hori K and Cormier MJ (1977) Purification and properties of Renilla reniformis luciferase. *Biochemistry* **16**(1):85-91.

Maurel D, Kniazeff J, Mathis G, Trinquet E, Pin JP and Ansanay H (2004) Cell surface detection of membrane protein interaction with homogeneous time-resolved fluorescence resonance energy transfer technology. *Anal Biochem* **329**(2):253-262.

McCann CM, Bareyre FM, Lichtman JW and Sanes JR (2005) Peptide tags for labeling membrane proteins in live cells with multiple fluorophores. *Biotechniques* **38**(6):945-952.

McGraw DW, Mihlbachler KA, Schwarb MR, Rahman FF, Small KM, Almoosa KF and Liggett SB (2006) Airway smooth muscle prostaglandin-EP1 receptors directly modulate beta2-adrenergic receptors within a unique heterodimeric complex. *J Clin Invest* **116**(5):1400-1409.

McVey M, Ramsay D, Kellett E, Rees S, Wilson S, Pope AJ and Milligan G (2001) Monitoring receptor oligomerization using time-resolved fluorescence resonance energy transfer and bioluminescence resonance energy transfer. The human delta -opioid receptor displays constitutive oligomerization at the cell surface, which is not regulated by receptor occupancy. *J Biol Chem* **276**(17):14092-14099 Epub 12001 Jan 14022.

Mellado M, Rodriguez-Frade JM, Manes S and Martinez AC (2001) Chemokine signaling and functional responses: the role of receptor dimerization and TK pathway activation. *Annu Rev Immunol* **19**:397-421.

Meyer BH, Segura JM, Martinez KL, Hovius R, George N, Johnsson K and Vogel H (2006) FRET imaging reveals that functional neurokinin-1 receptors are monomeric and reside in membrane microdomains of live cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(7):2138-2143 Epub 2006 Feb 2133.

Miller LW, Cai Y, Sheetz MP and Cornish VW (2005) In vivo protein labeling with trimethoprim conjugates: a flexible chemical tag. *Nat Methods* **2**(4):255-257.

Milligan G, Pediani JD, Canals M and Lopez-Gimenez JF (2006) Oligomeric structure of the alpha(1b)-adrenoceptor: Comparisons with rhodopsin. *Vision Res*.

Miyawaki A, Llopis J, Heim R, McCaffery JM, Adams JA, Ikura M and Tsien RY (1997) Fluorescent indicators for Ca2+ based on green

fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* **388**(6645):882-887.

Morise H, Shimomura O, Johnson FH and Winant J (1974) Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of Aequorea. *Biochemistry* **13**(12):2656-2662.

Morrison LE (1988) Time-resolved detection of energy transfer: theory and application to immunoassays. *Anal Biochem* **174**(1):101-120.

N

Neer EJ (1995) Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* **80**(2):249-257.

Nelson G, Chandrashekar J, Hoon MA, Feng L, Zhao G, Ryba NJ and Zuker CS (2002) An amino-acid taste receptor. *Nature* **416**(6877):199-202 Epub 2002 Feb 2024.

Nelson G, Hoon MA, Chandrashekar J, Zhang Y, Ryba NJ and Zuker CS (2001) Mammalian sweet taste receptors. *Cell* **106**(3):381-390.

Neubig RR (1994) Membrane organization in G-protein mechanisms. *Faseb J* **8**(12):939-946.

Ng GY, O'Dowd BF, Lee SP, Chung HT, Brann MR, Seeman P and George SR (1996) Dopamine D2 receptor dimers and receptor-blocking peptides. *Biochem Biophys Res Commun* **227**(1):200-204.

Nikolaev VO, Gambaryan S and Lohse MJ (2006) Fluorescent sensors for rapid monitoring of intracellular cGMP. *Nat Methods* **3**(1):23-25.

Nimchinsky EA, Hof PR, Janssen WG, Morrison JH and Schmauss C (1997) Expression of dopamine D3 receptor dimers and tetramers in brain and in transfected cells. *J Biol Chem* **272**(46):29229-29237.

Nobles M, Benians A and Tinker A (2005) Heterotrimeric G proteins precouple with G protein-coupled receptors in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(51):18706-18711 Epub 12005 Dec 18713.

O

O'Hara PJ, Sheppard PO, Thogersen H, Venezia D, Haldeman BA, McGrane V, Houamed KM, Thomsen C, Gilbert TL and Mulvihill ER (1993) The ligand-binding domain in metabotropic glutamate receptors is related to bacterial periplasmic binding proteins. *Neuron* **11**(1):41-52.

Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Caron MG and Barak LS (2000) Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J Biol Chem* **275**(22):17201-17210.

Ormo M, Cubitt AB, Kallio K, Gross LA, Tsien RY and Remington SJ (1996) Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein. *Science* **273**(5280):1392-1395.

Overton MC and Blumer KJ (2000) G-protein-coupled receptors function as oligomers in vivo. *Curr Biol* **10**(6):341-344.

Overton MC, Chinault SL and Blumer KJ (2003) Oligomerization, biogenesis, and signaling is promoted by a glycophorin A-like dimerization motif in transmembrane domain 1 of a yeast G protein-coupled receptor. *J Biol Chem* **278**(49):49369-49377 Epub 42003 Sep 49323.

P

Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M and Miyano M (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **289**(5480):739-745.

Papazian DM (1999) Potassium channels: some assembly required. *Neuron* **23**(1):7-10.

Park PS, Filipek S, Wells JW and Palczewski K (2004) Oligomerization of G protein-coupled receptors: past, present, and future. *Biochemistry* **43**(50):15643-15656.

Patel RC, Kumar U, Lamb DC, Eid JS, Rocheville M, Grant M, Rani A, Hazlett T, Patel SC, Gratton E and Patel YC (2002) Ligand binding to somatostatin receptors induces receptor-specific oligomer formation in live cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(5):3294-3299.

Peterson GL, Rosenbaum LC, Broderick DJ and Schimerlik MI (1986) Physical properties of the purified cardiac muscarinic acetylcholine receptor. *Biochemistry* **25**(11):3189-3202.

Pfeiffer M, Koch T, Schroder H, Laugsch M, Hollt V and Schulz S (2002) Heterodimerization of somatostatin and opioid receptors cross-modulates phosphorylation, internalization, and desensitization. *J Biol Chem* **277**(22):19762-19772 Epub 12002 Mar 19714.

Pierce KL, Premont RT and Lefkowitz RJ (2002) Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(9):639-650.

Pin JP and Bockaert J (1995) Get receptive to metabotropic glutamate receptors. *Curr Opin Neurobiol* **5**(3):342-349.

Pin JP, Kniazeff J, Binet V, Liu J, Maurel D, Galvez T, Duthey B, Havlickova M, Blahos J, Prezeau L and Rondard P (2004) Activation mechanism of the heterodimeric GABA(B) receptor. *Biochem Pharmacol* **68**(8):1565-1572.

Pollack A (2004) Coactivation of D1 and D2 dopamine receptors: in marriage, a case of his, hers, and theirs. *Sci STKE* **2004**(255):pe50.

Potter LT, Ballesteros LA, Bichajian LH, Ferrendelli CA, Fisher A, Hanchett HE and Zhang R (1991) Evidence of paired M2 muscarinic receptors. *Mol Pharmacol* **39**(2):211-221.

Potter LT, Ferrendelli CA, Hanchett HE, Hollifield MA and Lorenzi MV (1989) Tetrahydroaminoacridine and other allosteric antagonists of hippocampal M1 muscarine receptors. *Mol Pharmacol* **35**(5):652-660.

Q

Qureshi MH and Wong SL (2002) Design, production, and characterization of a monomeric streptavidin and its application for affinity purification of biotinylated proteins. *Protein Expr Purif* **25**(3):409-415.

R

Rabik CA, Njoku MC and Dolan ME (2006) Inactivation of O6-alkylguanine DNA alkyltransferase as a means to enhance chemotherapy. *Cancer Treat Rev* **32**(4):261-276.

Ramanoudjame G, Du M, Mankiewicz KA and Jayaraman V (2006) Allosteric mechanism in AMPA receptors: a FRET-based investigation of conformational changes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(27):10473-10478 Epub 12006 Jun 10422.

Ramsay D, Kellett E, McVey M, Rees S and Milligan G (2002) Homo- and hetero-oligomeric interactions between G-protein-coupled receptors in living cells monitored by two variants of bioluminescence resonance energy transfer (BRET): hetero-oligomers between receptor subtypes form more efficiently than between less closely related sequences. *Biochem J* **365**(Pt 2):429-440.

Reversi A, Rimoldi V, Marrocco T, Cassoni P, Bussolati G, Parenti M and Chini B (2005) The oxytocin receptor antagonist atosiban inhibits cell growth via a "biased agonist" mechanism. *J Biol Chem* **280**(16):16311-16318 Epub 12005 Feb 16310.

Rizzo MA, Springer GH, Granada B and Piston DW (2004) An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET. *Nat Biotechnol* **22**(4):445-449 Epub 2004 Feb 2029.

Rocheville M, Lange DC, Kumar U, Patel SC, Patel RC and Patel YC (2000) Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity. *Science* **288**(5463):154-157.

Rodriguez-Frade JM, Vila-Coro AJ, de Ana AM, Albar JP, Martinez AC and Mellado M (1999) The chemokine monocyte chemoattractant protein-1 induces functional responses through dimerization of its receptor CCR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(7):3628-3633.

Roess DA and Smith SM (2003) Self-association and raft localization of functional luteinizing hormone receptors. *Biol Reprod* **69**(6):1765-1770 Epub 2003 Jul 1730.

Rogers TB (1984) High affinity angiotensin II receptors in myocardial sarcolemmal membranes. Characterization of receptors and covalent linkage of 125I-angiotensin II to a membrane component of 116,000 daltons. *J Biol Chem* **259**(13):8106-8114.

Romano C, Miller JK, Hyrc K, Dikranian S, Mennerick S, Takeuchi Y, Goldberg MP and O'Malley KL (2001) Covalent and noncovalent interactions mediate metabotropic glutamate receptor mGlu5 dimerization. *Mol Pharmacol* **59**(1):46-53.

Romano C, Yang WL and O'Malley KL (1996) Metabotropic glutamate receptor 5 is a disulfide-linked dimer. *J Biol Chem* **271**(45):28612-28616.

Rondeau JJ, McNicoll N, Escher E, Meloche S, Ong H and De Lean A (1990) Hydrodynamic properties of the angiotensin II receptor from bovine adrenal zona glomerulosa. *Biochem J* **268**(2):443-448.

Roth B, Aig E, Rauckman BS, Strelitz JZ, Phillips AP, Ferone R, Bushby SR and Sigel CW (1981) 2,4-Diamino-5-benzylpyrimidines and analogues as antibacterial agents. 5. 3',5'-Dimethoxy-4'-substituted-benzyl analogues of trimethoprim. *J Med Chem* **24**(8):933-941.

S

Salahpour A, Angers S, Mercier JF, Lagace M, Marullo S and Bouvier M (2004) Homodimerization of the beta2-adrenergic receptor as a prerequisite for cell surface targeting. *J Biol Chem* **279**(32):33390-33397 Epub 32004 May 33320.

Sano T and Cantor CR (1995) Intersubunit contacts made by tryptophan 120 with biotin are essential for both strong biotin binding and biotin-induced tighter subunit association of streptavidin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(8):3180-3184.

Scherf T, Balass M, Fuchs S, Katchalski-Katzir E and Anglister J (1997) Three-dimensional solution structure of the complex of alpha-bungarotoxin with a library-derived peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(12):6059-6064.

Schertler GF (1998) Structure of rhodopsin. *Eye* **12**(Pt 3b):504-510.

Sekine-Aizawa Y and Huganir RL (2004) Imaging of receptor trafficking by using alpha-bungarotoxin-binding-site-tagged receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(49):17114-17119 Epub 12004 Nov 17124.

Selvin PR (1995) Fluorescence resonance energy transfer. *Methods Enzymol* **246**:300-334.

Selvin PR (2000) The renaissance of fluorescence resonance energy transfer. *Nat Struct Biol* **7**(9):730-734.

Selvin PR (2002) Principles and biophysical applications of lanthanide-based probes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **31**:275-302 Epub 2001 Oct 2025.

Shenoy SK, McDonald PH, Kohout TA and Lefkowitz RJ (2001) Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin. *Science* **294**(5545):1307-1313 Epub 2001 Oct 1304.

Shimomura O and Johnson FH (1969) Properties of the bioluminescent protein aequorin. *Biochemistry* **8**(10):3991-3997.

Simonds WF (1999) G protein regulation of adenylate cyclase. *Trends Pharmacol Sci* **20**(2):66-73.

Sokol DL, Zhang X, Lu P and Gewirtz AM (1998) Real time detection of DNA.RNA hybridization in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(20):11538-11543.

Sondek J, Bohm A, Lambright DG, Hamm HE and Sigler PB (1996) Crystal structure of a G-protein beta gamma dimer at 2.1A resolution. *Nature* **379**(6563):369-374.

Springael JY, Le Minh PN, Urizar E, Costagliola S, Vassart G and Parmentier M (2006) Allosteric modulation of binding properties between units of chemokine receptor homo- and hetero-oligomers. *Mol Pharmacol* **69**(5):1652-1661 Epub 2006 Feb 1657.

Stadel JM, DeLean A and Lefkowitz RJ (1980) A high affinity agonist . beta-adrenergic receptor complex is an intermediate for catecholamine stimulation of adenylate cyclase in turkey and frog erythrocyte membranes. *J Biol Chem* **255**(4):1436-1441.

Stanasila L, Perez JB, Vogel H and Cotecchia S (2003) Oligomerization of the alpha 1a- and alpha 1b-adrenergic receptor subtypes. Potential implications in receptor internalization. *J Biol Chem* **278**(41):40239-40251 Epub 42003 Jul 40229.

Storez H, Scott MG, Issafras H, Burtey A, Benmerah A, Muntaner O, Piolot T, Tramier M, Coppey-Moisan M, Bouvier M, Labbe-Jullie C and Marullo S (2005) Homo- and hetero-oligomerization of beta-arrestins in living cells. *J Biol Chem* **280**(48):40210-40215.

Stroffekova K, Proenza C and Beam KG (2001) The protein-labeling reagent FLASH-EDT2 binds not only to CCXXCC motifs but also non-specifically to endogenous cysteine-rich proteins. *Pflugers Arch* **442**(6):859-866.

Stryer L (1978) Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annu Rev Biochem* **47**:819-846.

Stryer L and Haugland RP (1967) Energy transfer: a spectroscopic ruler. *Proc Natl Acad Sci U S A* **58**(2):719-726.

T

Tairi AP, Hovius R, Pick H, Blasey H, Bernard A, Surprenant A, Lundstrom K and Vogel H (1998) Ligand binding to the serotonin 5HT3 receptor studied with a novel fluorescent ligand. *Biochemistry* **37**(45):15850-15864.

Takeda S, Kadowaki S, Haga T, Takaesu H and Mitaku S (2002) Identification of G protein-coupled receptor genes from the human genome sequence. *FEBS Lett* **520**(1-3):97-101.

Terrillon S, Durroux T, Mouillac B, Breit A, Ayoub MA, Taulan M, Jockers R, Barberis C and Bouvier M (2003) Oxytocin and vasopressin V1a and V2 receptors form constitutive homo- and heterodimers during biosynthesis. *Mol Endocrinol* **17**(4):677-691 Epub 2002 Dec 2023.

Tramier M, Gautier I, Piolot T, Ravalet S, Kemnitz K, Coppey J, Durieux C, Mignotte V and Coppey-Moisan M (2002) Picosecond-hetero-FRET microscopy to probe protein-protein interactions in live cells. *Biophys J* **83**(6):3570-3577.

Trejo J and Coughlin SR (1999) The cytoplasmic tails of protease-activated receptor-1 and substance P receptor specify sorting to lysosomes versus recycling. *J Biol Chem* **274**(4):2216-2224.

Trinquet E, Fink M, Bazin H, Grillet F, Maurin F, Bourrier E, Ansanay H, Leroy C, Michaud A, Durroux T, Maurel D, Malhaire F, Goudet C, Pin JP, Naval M, Hernout O, Chretien F, Chapleur Y and Mathis G (2006) d-myo-Inositol 1-phosphate as a surrogate of d-myo-inositol 1,4,5-tris phosphate to monitor G protein-coupled receptor activation. *Anal Biochem*.

Trinquet E, Maurin F, Preaudat M and Mathis G (2001) Allophycocyanin 1 as a near-infrared fluorescent tracer: isolation, characterization,

chemical modification, and use in a homogeneous fluorescence resonance energy transfer system. *Anal Biochem* **296**(2):232-244.

Trumpp-Kallmeyer S, Hoflack J, Bruinvels A and Hibert M (1992) Modeling of G-protein-coupled receptors: application to dopamine, adrenaline, serotonin, acetylcholine, and mammalian opsin receptors. *J Med Chem* **35**(19):3448-3462.

Tzartos SJ and Changeux JP (1983) High affinity binding of alpha-bungarotoxin to the purified alpha-subunit and to its 27,000-dalton proteolytic peptide from Torpedo marmorata acetylcholine receptor. Requirement for sodium dodecyl sulfate. *Embo J* **2**(3):381-387.

U

Uberti MA, Hall RA and Minneman KP (2003) Subtype-specific dimerization of alpha 1-adrenoceptors: effects on receptor expression and pharmacological properties. *Mol Pharmacol* **64**(6):1379-1390.

Urizar E, Montanelli L, Loy T, Bonomi M, Swillens S, Gales C, Bouvier M, Smits G, Vassart G and Costagliola S (2005) Glycoprotein hormone receptors: link between receptor homodimerization and negative cooperativity. *Embo J* **24**(11):1954-1964 Epub 2005 May 1912.

V

Vassilatis DK, Hohmann JG, Zeng H, Li F, Ranchalis JE, Mortrud MT, Brown A, Rodriguez SS, Weller JR, Wright AC, Bergmann JE and Gaitanaris GA (2003) The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(8):4903-4908 Epub 2003 Apr 4904.

Vigot R, Barbieri S, Brauner-Osborne H, Turecek R, Shigemoto R, Zhang YP, Lujan R, Jacobson LH, Biermann B, Fritschy JM, Vacher CM, Muller M, Sansig G, Guetg N, Cryan JF, Kaupmann K, Gassmann M, Oertner TG and Bettler B (2006) Differential compartmentalization and distinct functions of GABAB receptor variants. *Neuron* **50**(4):589-601.

Vilardaga JP, Bunemann M, Krasel C, Castro M and Lohse MJ (2003) Measurement of the millisecond activation switch of G protein-coupled receptors in living cells. *Nat Biotechnol* **21**(7):807-812.

Villemure JF, Adam L, Bevan NJ, Gearing K, Chenier S and Bouvier M (2005) Subcellular distribution of GABA(B) receptor homo- and hetero-dimers. *Biochem J* **388**(Pt 1):47-55.

Vivero-Pol L, George N, Krumm H, Johnsson K and Johnsson N (2005) Multicolor imaging of cell surface proteins. *J Am Chem Soc* **127**(37):12770-12771.

Vrecl M, Jorgensen R, Pogacnik A and Heding A (2004) Development of a BRET2 screening assay using beta-arrestin 2 mutants. *J Biomol Screen* **9**(4):322-333.

W

Wampler JE, Hori K, Lee JW and Cormier MJ (1971) Structured bioluminescence. Two emitters during both the in vitro and the in vivo bioluminescence of the sea pansy, Renilla. *Biochemistry* **10**(15):2903-2909.

Ward WW (2006) Biochemical and physical properties of green fluorescent protein. *Methods Biochem Anal* **47**:39-65.

Weiss JM, Morgan PH, Lutz MW and Kenakin TP (1996) The cubic ternary complex receptor-occupancy model. III. resurrecting efficacy. *J Theor Biol* **181**(4):381-397.

Wessling-Resnick M and Johnson GL (1989) Evidence for oligomeric forms of transducins alpha subunit: formation of intermolecular alpha-alpha disulfide linkages. *Biochem Biophys Res Commun* **159**(2):651-657.

White JH, Wise A, Main MJ, Green A, Fraser NJ, Disney GH, Barnes AA, Emson P, Foord SM and Marshall FH (1998) Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor. *Nature* **396**(6712):679-682.

Willardson BM, Pou B, Yoshida T and Bitensky MW (1993) Cooperative binding of the retinal rod G-protein, transducin, to light-activated rhodopsin. *J Biol Chem* **268**(9):6371-6382.

Wise A, Gearing K and Rees S (2002) Target validation of G-protein coupled receptors. *Drug Discov Today* **7**(4):235-246.

Wreggett KA and Wells JW (1995) Cooperativity manifest in the binding properties of purified cardiac muscarinic receptors. *J Biol Chem* **270**(38):22488-22499.

X

Xu J, He J, Castleberry AM, Balasubramanian S, Lau AG and Hall RA (2003) Heterodimerization of alpha 2A- and beta 1-adrenergic receptors. *J Biol Chem* **278**(12):10770-10777 Epub 12003 Jan 10715.

Y

Yao X, Parnot C, Deupi X, Ratnala VR, Swaminath G, Farrens D and Kobilka B (2006) Coupling ligand structure to specific conformational switches in the beta2-adrenoceptor. *Nat Chem Biol* **2**(8):417-422 Epub 2006 Jun 2025.

Ye H, Choi HJ, Poe J and Smithgall TE (2004) Oligomerization is required for HIV-1 Nef-induced activation of the Src family protein-tyrosine kinase, Hck. *Biochemistry* **43**(50):15775-15784.

Yi TM, Kitano H and Simon MI (2003) A quantitative characterization of the yeast heterotrimeric G protein cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(19):10764-10769 Epub 12003 Sep 10765.

Yin J, Lin AJ, Buckett PD, Wessling-Resnick M, Golan DE and Walsh CT (2005) Single-cell FRET imaging of transferrin receptor trafficking dynamics by Sfp-catalyzed, site-specific protein labeling. *Chem Biol* **12**(9):999-1006.

Yin J, Liu F, Li X and Walsh CT (2004) Labeling proteins with small molecules by site-specific posttranslational modification. *J Am Chem Soc* **126**(25):7754-7755.

Z

Zaccolo M, De Giorgi F, Cho CY, Feng L, Knapp T, Negulescu PA, Taylor SS, Tsien RY and Pozzan T (2000) A genetically encoded, fluorescent indicator for cyclic AMP in living cells. *Nat Cell Biol* **2**(1):25-29.

Zerangue N, Schwappach B, Jan YN and Jan LY (1999) A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels. *Neuron* **22**(3):537-548.

Zhang J, Ferguson SS, Barak LS, Menard L and Caron MG (1996) Dynamin and beta-arrestin reveal distinct mechanisms for G protein-coupled receptor internalization. *J Biol Chem* **271**(31):18302-18305.

Zhang Y, So MK, Loening AM, Yao H, Gambhir SS and Rao J (2006) HaloTag protein-mediated site-specific conjugation of bioluminescent proteins to quantum dots. *Angew Chem Int Ed Engl* **45**(30):4936-4940.

Zhao GQ, Zhang Y, Hoon MA, Chandrashekar J, Erlenbach I, Ryba NJ and Zuker CS (2003) The receptors for mammalian sweet and umami taste. *Cell* **115**(3):255-266.

Zheng J, Trudeau MC and Zagotta WN (2002) Rod cyclic nucleotide-gated channels have a stoichiometry of three CNGA1 subunits and one CNGB1 subunit. *Neuron* **36**(5):891-896.

Zhu X and Wess J (1998) Truncated V2 vasopressin receptors as negative regulators of wild-type V2 receptor function. *Biochemistry* **37**(45):15773-15784.