

THESE

Présentée en vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PAUL SABATIER

Spécialité:
Pharmacologie moléculaire et cellulaire

Par
Céline GALES



**CARACTERISATION
DES DETERMINANTS MOLECULAIRES
DU RECEPTEUR CCK2
IMPLIQUES
DANS LE SITE DE LIAISON DE LA CCK
ET L'ACTIVATION DU RECEPTEUR**

Soutenue le 14 Septembre 2001 devant le jury composé de:



Mr P. VALET , Professeur d'Université, INSERM U317, Toulouse	<i>Président</i>
Mr J.P. PIN , Directeur de Recherche, CNRS-UPR 9023, Montpellier	<i>Rapporteur</i>
Mr P. ROBBERECHT , Professeur d'Université, Bruxelles, Belgique	<i>Rapporteur</i>
Mr D. FOURMY , Directeur de Recherche, INSERM U531, Toulouse	<i>Examineur</i>
Mr L. PRADAYROL , Directeur de Recherche, INSERM U531, Toulouse	<i>Examineur</i>
Mme S. SILVENTE-POIROT , Chargée de Recherche, INSERM U531, Toulouse	<i>Directeur de thèse</i>

PREMIERE PARTIE

Introduction bibliographique

CHOLECYSTOKININE – GASTRINE	p1
--	----

I-STRUCTURE/LOCALISATION DE LA CHOLECYSTOKININE ET DE LA GASTRINE..... p2

I.1 <u>Structure de la cholecystokinine et de la gastrine</u>	p2
---	----

I.2 <u>Localisation de cholecystokinine et de la gastrine</u>	p3
---	----

- *Appareil digestif*
- *Système nerveux*
- *Autres tissus*

II-RECEPTEURS DE LA CHOLECYSTOKININE ET DE LA GASTRINE..... p6

II.1 <u>Identification des récepteurs de la CCK et de la gastrine</u>	p7
---	----

II.2 <u>Clonage</u>	p8
---------------------------	----

II.3 <u>Structure protéique</u>	p8
---------------------------------------	----

- *polymorphisme des récepteurs de la CCK / Altérations des affinités et activités des drogues*

II.4 <u>Structure génique</u>	p12
-------------------------------------	-----

II.5 <u>Localisation / fonctions physiologiques des récepteurs de la CCK et de la gastrine</u>	p14
--	-----

II.5.a récepteur CCKB/G (R-CCKB).....	p14
---------------------------------------	-----

- *Système gastrointestinal*
- *Système immunitaire*
- *Rein*
- *Système nerveux central*

II.5.b Récepteur CCKA (R-CCKA)	p21
--------------------------------------	-----

- *Système gastrointestinal*
- *Système nerveux central*

II.6 <u>Voies de signalisation intracellulaires / Couplage aux protéines G</u>	p25
--	-----

II.6.a Signalisation intracellulaire associée au récepteur CCKB.....	p25
--	-----

II.6.b Signalisation intracellulaire associée au récepteur CCKA.....	p28
--	-----

II.7 <u>Conception de ligands spécifiques des récepteurs CCKA et CCKB/G à visée thérapeutique</u>	p29
---	-----

DEUXIEME PARTIE

Introduction bibliographique

STRUCTURE / FONCTIONS DES RECEPTEURS COUPLES AUX PROTEINES G.....p32

I-DOMAINES DE LIAISON DES LIGANDS DES RECEPTEURS COUPLES AUX PROTEINES G.....p34

I.1 Méthodologie / Site de liaison des différents ligands des RCPG.....p34

I.2 Connaissance actuelle des sites de liaison des peptides agonistes des récepteurs

CCKA et CCKB/G.....p39

I.2.a Régions du récepteur CCKB/G impliquées dans la liaison de l'agoniste gastrine.....p39

I.2.b Régions du récepteur CCKB/G impliquées dans la liaison de l'agoniste CCK.....p42

I.2.c Régions du récepteur CCKA impliquées dans la liaison de l'agoniste CCK.....p44

II-ACTIVATION DES RECEPTEURS COUPLES AUX PROTEINES G.....p46

II.1 Mécanismes d'activation intramoléculaires.....p46

II.1.a Récepteurs constitutivement actifs.....p47

• *Modèles théoriques d'activation des récepteurs*.....p47

• *Récepteurs constitutivement actifs
provenant de mutations artificielles*.....p49

• *Récepteurs constitutivement actifs natifs*.....p52

• *Récepteurs constitutivement actifs et pathologies associées*.....p53

• *Agonistes inverses*.....p55

II.1.b La protonation, un événement clé pour l'activation des RCPG.....p57

• *Modèle d'activation potentiel du récepteur $\alpha 1B$ -adrénergique*.....p58

• *Modèle d'activation potentiel du récepteur de la rhodopsine*.....p60

II.1.c Interactions moléculaires stabilisant les RCPG dans une conformation inactive /

Changements conformationnels impliqués dans l'activation des RCPG.....p61

• *Contraintes moléculaires stabilisant le récepteur dans un état inactif*.....p61

• *Changements conformationnels associés à l'activation du récepteur*.....p67

• *Changements conformationnels des boucles intracellulaires
associés à l'activation de la protéine G*.....p72

II.2 Mécanismes d'activation intermoléculaires: dimérisation des RCPG / Interactions des récepteurs avec des protéines accessoires.....p76

II.2.a Dimérisation des RCPG.....p76

II.2.b Interactions des RCPG avec des protéines altérant la pharmacologie et l'activation de ces récepteurs.....p78

• *Protéines RAMP*.....p78

• *Protéines Homer*.....p79

TROISIEME PARTIE

Résultats expérimentaux.....p81

INTRODUCTION des TRAVAUX de THESE.....p82

I- ETUDE du SITE de LIAISON de la CCK dans le RECEPTEUR CCKB/G.....p84

• **ARTICLE 1**.....p85

CONCLUSION ARTICLE 1.....p86

• **ARTICLE 2** (en préparation).....p87

CONCLUSION ARTICLE 2.....p96

• **CONCLUSION SITE de LIAISON AGONISTE CCK du RECEPTEUR CCKB/G**.....p98

II- CARACTERISATION des RESIDUS du RECEPTEUR CCKB/G IMPLIQUES dans son

ACTIVATION.....p101

• **ARTICLE 3**.....p102

CONCLUSION ARTICLE 3.....p103

• **ARTICLE 4** (soumis).....p105

CONCLUSION ARTICLE 4.....p106

• **ARTICLE 5** (en préparation).....p107

PERSPECTIVES ARTICLE 5.....p108

• **RESULTATS COMPLEMENTAIRES**.....p109

CONCLUSION.....p120

• **CONCLUSION CARACTERISATION des RESIDUS du RECEPTEUR CCKB/G
IMPLIQUES dans son ACTIVATION**.....p121

CONCLUSION GENERALE / PERSPECTIVES.....p123

BIBLIOGRAPHIE.....p126

RESUME

Le récepteur de la cholecystokinine CCK2 (CCKB/Gastrine) est un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé aux protéines G (RCPG). Il joue un rôle physiologique important dans la sphère gastrointestinale et le système nerveux central ce qui en fait une cible pharmacologique importante pour le développement de drogues spécifiques en vue d'une utilisation thérapeutique. Or, jusqu'à présent les molécules découvertes par screening aléatoire se heurtent à des problèmes de biodisponibilité, de spécificité ou d'effets secondaires. Dans ce cadre, l'étude structurale du récepteur ouvrirait de nouvelles voies de recherche sur le design rationnel de drogues thérapeutiques ciblant ce récepteur. Dans l'équipe, nous avons donc entrepris l'étude structure / fonction du récepteur CCK2 (R-CCK2), et plus particulièrement, j'ai cherché à identifier les résidus du récepteur impliqués dans le site de liaison de la CCK et l'activation du récepteur, en utilisant des techniques de mutagenèse dirigée couplée à des études de pharmacochimie et de modélisation moléculaire.

Des travaux antérieurs avaient permis d'identifier 6 résidus du R-CCK2 impliqués dans la liaison de la CCK. J'ai donc recherché avec quelle fonction de la CCK interagissait l'un de ces résidus, l'histidine 207 dont la mutation diminuait plus de 300 fois la liaison de la CCK. Ainsi, en utilisant des peptides modifiés sur chaque résidu de la CCK, nous avons montré que l'histidine 207 du récepteur interagit directement et spécifiquement avec l'acide aspartique C-terminal de la CCK. L'identification de cette interaction nous a ensuite permis de positionner la CCK dans un modèle tridimensionnel du R-CCK2. Ce modèle a révélé trois domaines transmembranaires (TM) très importants pour la liaison de la CCK: les TM 3, 6 et 7. Nous avons alors essayé de confirmer expérimentalement certaines de ces interactions. Notamment, en adoptant une stratégie identique à celle utilisée pour l'histidine 207, nous avons pu démontrer l'interaction du résidu asparagine 358 (TM6) du R-CCK2 avec l'amide C-terminale de la CCK, une fonction essentielle pour l'activité biologique de la CCK.

En parallèle, nous avons recherché les résidus du R-CCK2 impliqués spécifiquement dans son activation. Pour cela, nous avons entrepris la mutation de tous les résidus conservés dans la famille des RCPG et également présents dans le R-CCK2 car ces résidus sont connus pour être essentiels à leur activation. Aussi, par cette stratégie, j'ai pu montrer que le résidu Asparagine 391, au niveau du TM7, est essentiel pour l'activation du R-CCK2. En effet, la mutation de ce résidu (Asn391) situé dans le motif très conservé dans les RCPG, NPXXY, induit une **inactivation totale** de ce récepteur sur différentes voies de signalisation (PLC et MAPK) sans affecter sa haute affinité pour la CCK. Par une stratégie d'immunoprécipitation du récepteur, suivie d'un western blot à l'aide d'anticorps anti-G α q, nous avons montré que la sous-unité G α q était coimmunoprécipitée avec le récepteur muté après stimulation des cellules par la CCK. Ceci suggère que la haute affinité du récepteur muté pour la CCK résulte de son couplage à la protéine Gq et que le résidu Asn391 est spécifiquement impliqué dans l'activation de la protéine Gq. De façon plus générale, il semble donc qu'il y ait des résidus des récepteurs à 7 domaines transmembranaires qui soient spécifiquement impliqués dans l'association du récepteur avec la protéine G alors que d'autres résidus interviendraient plus particulièrement dans l'activation de la protéine G.

A l'opposé, au niveau du TM3, nous avons identifié l'acide glutamique E151, situé dans le motif très conservé ERY, dont la mutation rend le récepteur **constitutivement actif**. L'étude plus approfondie de ce résidu a permis de mettre en évidence que ce récepteur muté n'active que certaines voies de signalisation associées au R-CCK2. Par ailleurs, nous avons pu montrer que ce récepteur constitutif était très stable et très bien exprimé, ce qui est une caractéristique atypique comparée à celles des autres récepteurs constitutifs. Nous avons également observé des changements morphologiques importants (de type Ras transformé) dans différentes lignées cellulaires exprimant de façon stable ce récepteur constitutif; ces différences semblent associées à l'activation spécifique de certaines protéines du cytosquelette. De plus, nous avons démontré que ce récepteur induit une prolifération spontanée et accrue des cellules NIH3T3 et est tumorigène après injection de ces cellules dans des souris *nude*, ce qui suggère le potentiel oncogène du récepteur CCK2.

Tous ces résultats, à la fois sur les résidus impliqués dans le site de liaison de la CCK et ceux impliqués dans l'activation du récepteur permettront de mieux comprendre les bases moléculaires du récepteur CCK2 qui régissent le passage de son état inactif vers l'état actif. Ceci devrait nous permettre de conceptualiser des molécules à activités agonistes ou antagonistes ciblant le récepteur CCK2 en vue d'une utilisation en thérapeutique.