



# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Université Toulouse III - Paul Sabatier*  
Discipline ou spécialité : *Innovation Pharmacologique*

---

Présentée et soutenue par

**Rémi MAGNAN**

*Le 19 janvier 2011*

**Titre : Mécanismes de l'internalisation du récepteur CCK2 :  
bases pharmacologiques et structurales**

---

### JURY

*Président : Pr Philippe VALET, Professeur des Universités, INSERM U858, Toulouse*  
*Rapporteur : Dr Ralf JOCKERS, Directeur de Recherche, INSERM U1016 Paris*  
*Rapporteur : Dr Bernard BUCHER, Directeur de Recherche, CNRS/UMR7213, Illkirch*  
*Rapporteur : Dr Philippe RONDARD, Chargé de Recherche, INSERM U661, Montpellier*  
*Directeur de thèse: Dr Daniel Fourmy, Directeur de Recherche, INSERM U858, Toulouse*

---

**Ecole doctorale :** *Biologie-Santé-Biotechnologies*

**Unité de recherche :** *Unité 858*

**Directeur(s) de Thèse :** *Dr Daniel Fourmy*

**Rapporteurs :** *Dr R. Jockers, Dr B. Bucher, Dr P. Rondard*







## Résumé

Le récepteur CCK2 est un récepteur couplé aux protéines G (RCPG) possédant deux ligands naturels, la cholécystokinine et la gastrine, retrouvées au niveau du système nerveux central et du système gastro-intestinal. Le récepteur CCK2 est impliqué dans de nombreux processus physiologiques et physiopathologiques dont les cancers.

La présence membranaire des RCPG est hautement régulée notamment par le mécanisme d'internalisation après stimulation par un agoniste. Les  $\beta$ -arrestines initient l'internalisation de nombreux RCPG et sont également capables d'agir comme des protéines d'échafaudage permettant aux récepteurs d'émettre un signal indépendamment des protéines G. De plus, des ligands dits « biaisés » sont capables d'activer sélectivement les voies de transductions du signal dépendantes des protéines G ou dépendantes des  $\beta$ -arrestines.

Les mécanismes de l'internalisation du récepteur CCK2 n'étaient pas connus et nos objectifs ont été, dans un premier temps, de caractériser ces mécanismes, puis de montrer que des ligands synthétiques du RCCK2 possèdent une activité « biaisée » et enfin de caractériser la conformation du récepteur CCK2 recrutant les  $\beta$ -arrestines.

Dans ce travail, nous rapportons que l'internalisation du récepteur CCK2 est un phénomène faisant intervenir les  $\beta$ -arrestines, la clathrine et la dynamine. Nous localisons la zone d'interaction des  $\beta$ -arrestines sur le récepteur CCK2, en identifiant un groupe de sérine-thréonine située dans la partie distale de l'extrémité C-terminale du récepteur. Cependant, l'utilisation de mutants du récepteur présentant un recrutement  $\beta$ -arrestines défectueux ou de cellules invalidées pour les deux  $\beta$ -arrestines montre que le récepteur CCK2 est toujours capable de s'internaliser, suggérant la présence d'un mécanisme alternatif.

Nous identifions des ligands synthétiques du récepteur CCK2 avec une activité « biaisée » capables d'activer des voies de transduction dépendantes des protéines G mais ne recrutant pas les  $\beta$ -arrestines. De plus, un ligand, le GV150,013X n'est pas capable d'inhiber le recrutement des  $\beta$ -arrestines induit par la CCK alors qu'il inhibe la production d'inositol phosphate de façon compétitive. La mutation d'acides aminés suffit pour diminuer le recrutement des  $\beta$ -arrestines au RCCK2 sans altérer sa capacité à activer la PLC. Ces résultats sont les premiers à montrer l'existence d'une conformation moléculaire d'un RCPG recrutant les  $\beta$ -arrestines distincte de celle activant la voie dépendante de la protéine G.

Les résultats de cette étude apportent des informations quant à la régulation pharmacologique de l'internalisation du récepteur CCK2 et supportent le concept de sélectivité fonctionnelle des RCPG.



## Abstract

The CCK2 receptor (CCK2R) is a G-protein coupled receptor (GPCR) and binds to two different natural ligands, cholecystokinin and gastrin, which are mostly localized in the gastro-intestinal tract and the central nervous system. The CCK2 receptor is involved in various physiological and pathological processes including cancers.

The localization of GPCR at the cell membrane is highly regulated notably by internalization of the receptors following agonist stimulation. The  $\beta$ -arrestins initiate internalization of many GPCR and act as scaffolding proteins leading GPCR to trigger G-protein independent signal transduction. Recently, biased ligands have been discovered that selectively activates either G-protein or  $\beta$ -arrestins mediated signaling pathways.

The mechanisms of CCK2R internalization were not known and the purpose of our study was first to characterize these mechanisms and then to show that synthetic ligands of CCK2R may have a biased activity towards  $\beta$ -arrestins recruitment. Finally, we aimed at characterizing a conformational state of the CCK2R recruiting  $\beta$ -arrestins distinct from the state activating G-proteins.

In this work, we report that internalization of CCK2R is a process involving both  $\beta$ -arrestin1 and 2 as well as clathrin and dynamin. We characterized the binding site of  $\beta$ -arrestin on CCK2R, by identifying a cluster of serine/threonine in the distal part of the receptor C-terminus. However, CCK2R mutants lacking this region or receptors expressed in cells deleted of both  $\beta$ -arrestins still displayed strong internalization of receptors suggesting the existence of an alternative mechanism that does not require  $\beta$ -arrestins.

We also identified synthetic ligands of CCK2R that display biased activity, by activating G-protein mediated signaling pathways without recruiting  $\beta$ -arrestins. Furthermore, a CCK2R ligand, GV150,013X was not able to inhibit CCK-induced  $\beta$ -arrestins recruitment whereas it acts as a potent competitive antagonist on CCK-induced inositol phosphates production. Else, the mutation of specific single amino acid into the binding site of CCK2R was sufficient to significantly reduce  $\beta$ -arrestins recruitment without altering CCK-induced G-protein mediated signaling pathways. To our knowledge, these results show for the first time, that a GPCR conformational state recruiting  $\beta$ -arrestins is different from a state activating G-proteins.

This study brings new insights into the pharmacological regulation of CCK2R internalization and strongly supports the concept of "functional selectivity".





# Table des Matières

<b>Introduction Générale</b> .....	11
------------------------------------	----

<b>Introduction Bibliographique</b> .....	15
---	----

<b>Chapitre I - Les récepteurs couplés aux protéines G</b> .....	17
--	----

<b>A] Généralités</b> .....	20
-----------------------------	----

A.1. Découverte des RCPG .....	20
--------------------------------	----

A.2. Structure des Récepteurs couplés aux protéines G .....	21
---	----

A.3. Classification des RCPG .....	24
------------------------------------	----

A.3.1. La famille A: « Rhodopsin-like » .....	24
---	----

A.3.2. La classe B : « Secretin-Like » .....	26
--	----

A.3.3. La famille C : « Metabotrope-glutamate/pheromone » .....	27
---	----

A.3.4. Les autres familles : D ; E ; F .....	28
--	----

A.4 Modélisation moléculaire des RCPG.....	28
--	----

A.4.1 Modélisation moléculaire par homologie .....	29
--	----

A.4.2 Modélisation moléculaire <i>de novo</i> .....	33
---	----

<b>B] Transduction du signal par les protéines G</b> .....	34
--	----

B.1 Historique .....	34
----------------------	----

B.2 Les différentes protéines G .....	35
---------------------------------------	----

B.3 Le couplage des protéines G aux récepteurs.....	36
---	----

B.3.1 Généralités.....	36
------------------------	----

B.3.2 Sélectivité moléculaire du couplage des protéines G .....	36
---	----

B.3.2.a La seconde boucle intracellulaire (ICL2).....	37
---	----

B.3.2.b La troisième boucle intracellulaire (ILC3).....	38
---	----

B.3.2.c L'extrémité C-terminale .....	38
B.3.2.d Du domaine unique vers la combinaison des domaines .....	39
<b>B.4 Activation des protéines G.....</b>	<b>41</b>
B.4.1 Localisation cellulaire des sous-unités .....	41
B.4.2. Liaison des protéines G aux récepteurs .....	41
B.4.3 Mécanismes d'activation des protéines G .....	43
B.4.3.a Libération du GDP par la sous-unité $G\alpha$ .....	44
B.4.3.b Liaison du GTP et dissociation du complexe trimérique.....	46
<b>B.5 Effecteurs des protéines G.....</b>	<b>47</b>
B.5.1 Les effecteurs activés par la sous-unité $G\alpha$ .....	47
B.5.2 Les effecteurs activés par la sous-unité $G\beta\gamma$ .....	49
B.5.3. Les protéines RGS : Regulator of G protein Signalling.....	50
<b>C] Internalisation des Récepteurs couplés aux protéines G .....</b>	<b>50</b>
C.1. Généralités sur l'endocytose des RCPG .....	51
C.2 Désensibilisation des RCPG.....	51
C.2.1 Les protéines kinases dépendantes des seconds messagers.....	53
C.2.2 Le tandem GRK – $\beta$ -arrestines.....	53
C.2.2.a Classification des GRK .....	53
C.2.2.b Structure des GRK .....	54
C.2.2.c Mode d'action des GRK et $\beta$ -arrestines.....	54
C.2.2.d Régulation des GRK.....	55
C.2.2.e Autres rôles des GRK .....	56
C.2.3 Autres kinases impliquées dans la désensibilisation .....	57
C.2.4. Mise à jour du modèle classique de désensibilisation .....	57
C.3 Les mécanismes de l'internalisation des RCPG dépendants des $\beta$ -arrestines .....	59
C.3.1 Vue générale de l'internalisation des RCPG utilisant les $\beta$ -arrestines .....	59
C.3.1.a Internalisation dépendante du ligand .....	59
C.3.1.b Internalisation constitutive des RCPG.....	61
C.3.2 Rôle des $\beta$ -arrestines comme adaptateur endocytique.....	61
C.3.2.a Interaction des $\beta$ -arrestines avec la clathrine .....	61
C.3.2.b Interaction des $\beta$ -arrestines avec l'adaptateur de la clathrine, AP-2 .....	62
C.3.2.c Adressage des RCPG aux puits recouverts de clathrine.....	64
C.3.2.d Rôle des $\beta$ -arrestines dans de nouveaux mécanismes endocytiques.....	65
C.3.2.d Récepteurs de classe A versus récepteurs de classe B .....	66
C.3.2.e L'ubiquitinylation régule l'action des $\beta$ -arrestines.....	68
C.4 Les mécanismes de l'internalisation des RCPG indépendants des $\beta$ -arrestines. ....	70

C.4.1 Interaction directe du complexe AP-2 avec l'extrémité C-terminale des RCPG .....	70
C.4.2. Mécanismes d'internalisation des RCPG indépendants de la clathrine. ....	72
C.4.2.a Mécanismes dépendants des cavéoles.....	72
C.5. Devenir des RCPG internalisés .....	74
C.5.1 Impact de l'extrémité C-terminale et des $\beta$ -arrestines .....	75
C.5.2 Le tri des RCPG vers les voies de dégradation .....	76
C.5.2.a Ubiquitinylation des RCPG et machinerie ESCRT .....	76
C.5.2.b Les GASP (G-protein coupled receptor associated sorting protein).....	79
C.5.2.c La protéine SNX1 (Sorting Nexin-1).....	80
C.5.3 Le tri des RCPG vers les voies de recyclage .....	81
C.5.3.a Diversité des séquences de recyclage des RCPG.....	81
C.5.3.b Protéines impliquées dans les mécanismes de recyclage des RCPG .....	82
C.5.3.c Un ou plusieurs mécanismes de recyclage des RCPG ? .....	83
C.5.4 Marqueurs et acteurs du tri intracellulaire, la famille des protéines Rab .....	84
C.5.4.a Rôle des Rab5 dans la régulation de l'endocytose des RCPG .....	86
C.5.4.b Rôle des protéines Rab4 et Rab11 dans le recyclage .....	87
C.5.4.c Rôle des protéines Rab7 dans l'adressage des RCPG aux lysosomes.....	87
C.5.5 Tri des RCPG à partir des cavéoles .....	88
<b>D] Transduction du signal indépendante des protéines G : Rôle des <math>\beta</math>-arrestines .....</b>	<b>88</b>
D.1. Découverte et structure des $\beta$ -arrestines.....	89
D.1.1 Découverte et classification des arrestines .....	89
D.1.2. Structure des arrestines .....	89
D.1.3. Base structurale de l'interaction des arrestines avec les RCPG .....	91
D.1.4. Dimérisation des $\beta$ -arrestines.....	93
D.2. Rôle des $\beta$ -arrestines dans la signalisation des RCPG .....	93
D.2.1. Les $\beta$ -arrestines et la famille des protéines kinases Src.....	95
D.2.2. Interaction des $\beta$ -arrestines avec les protéines ERK1/2 .....	96
D.2.3. Interaction des $\beta$ -arrestines avec la c-Jun terminal Kinase 3.....	99
D.2.4. Interaction des $\beta$ -arrestines avec PP2A-Akt-GSK3 $\beta$ .....	100
D.2.5. Implication des $\beta$ -arrestines dans la voie NF- $\kappa$ B .....	100
D.2.6. $\beta$ -arrestines interagissent avec des phosphodiesterase de l'AMPc et des DAG kinases .....	101
D.2.7. $\beta$ -arrestines et régulation de la transcription.....	101
D.2.8. Autres cibles des $\beta$ -arrestines .....	102
D.3. Rôles physiologiques des $\beta$ -arrestines .....	103
D.3.1. Rôle des $\beta$ -arrestines dans le développement .....	103
D.3.2. Arrestines, fonction photoréceptrice et dégénération rétinale .....	105

D.3.3. Implications des $\beta$ -arrestines dans la signalisation dopaminergique et impact sur le comportement.....	105
D.3.4. Rôle cardiovasculaire des $\beta$ -arrestines .....	106
D.3.4.a Hypertrophie cardiaque et insuffisance cardiaque .....	106
D.3.4.b Hypertrophie du muscle vasculaire lisse et hyperplasie.....	107
D.3.4.c Tonicité et réactivité vasculaire .....	107
D.3.5. Rôle des $\beta$ -arrestines dans le remodelage squelettique .....	108
D.3.6 Implications des $\beta$ -arrestines dans la réponse immunitaire et la chimiotactie .....	108
D.3.7. Implications des $\beta$ -arrestines dans la croissance tumorale et la migration cellulaire.....	109
D.3.8. Implication des $\beta$ -arrestines dans la régulation du métabolisme.....	110
D.4. Autres voies de signalisation indépendantes des protéines G .....	111
D.4.1 Les protéines Homer.....	111
D.4.2. Les protéines Shank .....	112
D.4.3. Autres protéines.....	112
E] Transduction du signal dépendant des protéines G par des RCPG internalisés.....	113

## **Chapitre II - Pharmacologie des RCPG** ..... 117

### **A] Mécanismes théoriques d'activation des RCPG**..... 120

A.1. Le complexe ternaire .....	120
A.2. Le complexe ternaire étendu CTE.....	120
A.3. Le complexe ternaire cubique (CTC) .....	121
A.4. Du modèle à deux états vers un modèle multi-états.....	123

### **B] Modulation de l'activation des RCPG**..... 124

B.1. Les agonistes.....	124
B.1.1. Les agonistes pleins et partiels .....	126
B.1.2. Les agonistes inverses.....	127
B.2. Les antagonistes neutres .....	128
B.3. Agonistes protéens et ligands bifonctionnels .....	128
B.3.1. Agonistes protéens .....	128
B.3.2 Ligands bi-fonctionnels.....	129
B.4. Ligands allostériques .....	130
B.5. Dimérisation des RCPG.....	131

### **C] Le concept de sélectivité fonctionnelle ou d'agonisme biaisé** ..... 133

C.1 Concept de sélectivité fonctionnelle .....	133
C.2. Les ligands biaisés.....	134

C.3. De l'agonisme biaisé aux récepteurs biaisés .....	137
<b>Chapitre III: Le récepteur de la CCK et de la Gastrine .....</b>	<b>141</b>
<b>A] Les ligands: la Cholécystokinine (CCK) et la Gastrine.....</b>	<b>143</b>
A.1. Découverte des ligands naturels, CCK et Gastrine .....	143
A.2. Biosynthèse de la CCK et de la Gastrine .....	145
A.2.1. Structure et maturation de la CCK et de la Gastrine .....	145
A.2.2. Cellules endocrines sécrétant la CCK et la Gastrine .....	146
A.3. Effets physiologiques de la CCK et de la Gastrine .....	146
A.3.1. Effets physiologiques de la CCK .....	146
A.3.1.a Au niveau du tractus gastro-intestinal .....	146
A.3.1.b Au niveau du système nerveux périphérique.....	147
A.3.1.c Au niveau du système nerveux central .....	147
A.3.2. Effets physiologiques de la Gastrine .....	148
A.3.2.a Rôle de la Gastrine dans la digestion.....	148
A.3.2.b Action trophique de la Gastrine .....	149
A.4. Les ligands synthétiques du récepteur CCK2 .....	149
A.4.1 Les dérivés de benzodiazépines .....	151
A.4.1 Les dérivés du 1,5-benzodiazépines .....	151
A.4.2. Dipeptoides.....	152
A.4.3. Les dérivés di-benzo-bi-cyclo [2.2.2]octane et bi-cyclique hétéroaromatique .....	152
<b>B] Le récepteur CCK2 .....</b>	<b>153</b>
B.1. Clonage et structure du RCCK2 .....	155
B.1.1. Caractéristiques structurales du RCCK2 .....	155
B.1.2. Les variants d'épissage.....	156
B.2. Transduction du signal du RCCK2 .....	157
B.2.1. La voie de la phospholipase C .....	157
B.2.2. La voie des MAPKinases .....	157
B.2.3. La voie de la phosphatidylinositol 3-kinase.....	159
B.2.4. La voie JAK/STAT .....	159
B.3 Implications physio-pathologiques du RCCK2 .....	160
B.3.1. Effets physiologiques dépendants du RCCK2 .....	160
B.3.2. Le récepteur CCK2 et les pathologies associées .....	160
B.3.2.a Le récepteur CCK2 dans les cancers.....	160
B.3.2.b Le récepteur CCK2 dans les pathologies du système nerveux .....	161
<b>C] Mécanismes d'activation du RCCK2 .....</b>	<b>162</b>
C.1. Acides aminés impliqués dans le site de liaison du RCCK2.....	162

C.1.1. Au niveau des boucles extracellulaires .....	162
C.1.2. Au niveau des domaines transmembranaires .....	163
C.2. Acides aminés et changements conformationnels impliqués dans l'activation du RCCK2.....	164
C.3. Modulation de l'activité du RCCK2.....	166
C.3.1. L'internalisation du RCCK2 .....	166
C.3.2 Dimérisation du RCCK2.....	166
C.3.3. Interaction du RCCK2 avec RGS .....	167
<b>Résultats Expérimentaux.....</b>	<b>169</b>
<b>Article I.....</b>	<b>171</b>
<b>Article II.....</b>	<b>211</b>
<b>Résultats supplémentaires .....</b>	<b>247</b>
<b>A] Implication des <math>\beta</math>-arrestines dans le signal MAPKinase induit     par le RCCK2 .....</b>	<b>249</b>
A.1 Génération des cellules MEF invalidées pour les $\beta$ -arrestines exprimant le RCCK2 .....	249
A.2 Implication des $\beta$ -arrestines dans l'activation des ERK1/2 par le RCCK2252	
<b>B] Internalisation d'un RCPG indépendante des <math>\beta</math>-arrestines, le     cas du récepteur GIP .....</b>	<b>257</b>
B.1 Brève introduction bibliographique : le GIP et son récepteur, le RGIP.....	257
B.2 Etude de l'internalisation du récepteur GIP: Approches expérimentales .	259
B.3 Résultats préliminaires .....	262
B.4. Conclusion et poursuite de l'étude .....	267
<b>Conclusions Générales et Perspectives.....</b>	<b>269</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>279</b>

## **LISTE DES ABBREVIATIONS :**

Å	Angström
AC	Adénylate cyclase
AMPC	Adénosine MonoPhosphate cyclique
AP-2	Adaptator protein complex 2
ARF	ADP-ribosylation factor
ATP	Adénosine Tri-phosphate
BCO	dibenzo-bicyclo [2.2.2]octane
BRET	Bioluminescence Resonance Energy Transfer
CCK	Cholécystokinine
CFRT	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CXCR2-4	C-X-C chemokine receptor type 2 or 4
DAG	Di-Acyl-Glycérol
DGK	Diacylglycerol kinase
DOI	Delta-opoid receptor
E3MDM2	E3 murine double minute 2
ECL	ExtraCellular Loop
EGF	Epidermal Growth Factor
eNOS	Endothelial Nitric Oxide Synthase
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase
ESCRT	endosomal sorting complex required for transport
ETa/b	Endothelin receptor a/b
FAK	Focal Adhesion Kinase
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
GABA	Acide gamma-aminobutyrique
GAP	G-protein Associated protein
GDP	Guanine di-Phosphate
GEF	G-protein Exchange Factor
GFP	Green Fluorescent protein
Ggly	Glycine extended Gastrin
GHRH	Growth-hormone-releasing hormone
GIP	Glucose-dependent insulintropic polypeptide
GIRK	G-protein activated Inwardly Rectifying K <sup>+</sup> current
GIT	G-protein Receptor Kinase-interactor
GLP-1	Glucagon-like peptide
GMPc	Guanine Mono-Phosphate
GPCR	G-protein Coupled Receptor
GRK	G-protein Receptor Kinase
GSK3 $\beta$	Glycogen synthase kinase 3 beta
GTP	Guanine tri-Phosphate
HB-EGF	Heparin-binding EGF-like growth factor
HDC	histidine décarboxylase
ICL	IntraCellular loop
IKB $\alpha$	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha
IP3	Insitol 1,4,5-triphosphate
IRS-1	Insulin receptor substrate 1
ITAC	interferon inducible T-cell alpha chemoattractant
JAK	Janus kinase

JNK	c-Jun N-terminal kinases
Kd	Constante de dissociation
LGR	Leucine-Rich Repeat-Containing G Protein-Coupled Receptors
LH	Luteinizing Hormone
LPA	Lysophosphatidic Acid
M	Molaire
MAPKinase	Mitogen Activated Protein Kinase
MAPKKK	Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase
MEK	MAP kinase/Erk kinase kinase
mGu1a	Group Ia metabotropic glutamate
MKK4	Mitogen-activated protein kinase kinase 4
Mnk1	Mknk1 MAP kinase interacting kinase 1
MVB	Multi Vesicular Body
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor-KappaB
NHERF1	Na/H exchange regulatory factor-1
NPY	Neuropeptide Y
NSF	N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein
ODC	Ornithine décarboxylase
P2Y-R	Purinergic Receptors
PACAP	Pituitary adénylate cyclase-activating polypeptide
PAR	Protease Activated Receptor
PDE	Phosphodiesterase
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDZ	Post Synaptic Density Protein/Disc Large Zonula/Occludens-1
PH	Pleckstrin homology domain
PIP2	Phosphatidyl-inositol-diphosphate
PKA	Protéine Kinase A
PKC	Protéine Kinase C
PLC	Phospholipase C
PSD	Post Synaptic Density protein
PTH1	Parathyroïde Hormon
PTHrP	Parathyroid hormone-related protein
PZ	pancréozymine
Rab	Ras related brain protein
RCCK	Récepteur Cholécystokinine
RCPG	Récepteur couplés aux protéines G
RGS	Regulator of G-protein signaling
RING	Really interesting new gene
Rluc	Renilla Luciferase
Shc	Src-homology 2 domain containing
SHP2	Src homology 2 (SH2) domain-containing protein tyrosine phosphatase 2
SNX1	Sorting Nexin Domain
SP/NK1	Substance P/Neurokinin
SST2	Somatostatin receptor 2
SST3	Somatostatin receptor 3
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor $\beta$
TM	Domaine transmembranaire
TRH	Thyrotropin releasing hormon
TSHR	Thyrotropin stimulating hormon



USP33	Ubiquitin specific peptidase 33
VIP	Vasoactive Intestinal peptide
Vsp4	Vacuolar sorting protein 4
YFP	Yellow Fluorescent protein

### **ACIDES AMINES :**

A	Ala	Alanine	M	Met	Methionine
C	Cys	Cystéine	N	Asn	Asparagine
D	Asp	Acide Aspartique	Q	Pro	Proline
E	Glu	Acide Glutamique	R	Arg	Arginine
F	Phe	Phénylalanine	S	Ser	Sérine
G	Gly	Glycine	T	Thr	Thréonine
H	His	Histidine	V	Val	Valine
I	Ile	Isoleucine	W	Trp	Tryptophane
K	Lys	Lysine	Y	Tyr	Tyrosine
L	Leu	Leucine			



*Introduction*

*Générale*



Le récepteur de la cholécystokinine et de la gastrine, le RCCK2 est impliqué dans de nombreuses fonctions en participant notamment à la régulation de la digestion, de la prise alimentaire ou encore de l'effet anti-nociceptif des opioïdes. Il est aussi impliqué dans des pathologies humaines comme les cancers, les ulcères d'estomac et certains troubles nerveux. Le RCCK2 est donc une cible pharmacologique et il a suscité l'intérêt de nombreux laboratoires pour la synthèse de molécules ciblant ce récepteur. Aujourd'hui, de nombreux ligands synthétiques du RCCK2 sont disponibles, dont certains ont fait l'objet d'études antérieures dans l'équipe.

Le RCCK2 est un récepteur couplé aux protéines G (RCPG). Les RCPG sont impliqués, directement ou indirectement, dans tous les processus physiologiques et constituent la cible d'environ 30% des médicaments actuellement sur le marché. La présence des RCPG à la membrane est finement régulée, notamment par le processus d'internalisation à la suite de la stimulation par un agoniste. Pour une majorité de RCPG étudiés, ce processus d'internalisation fait intervenir deux protéines cytoplasmiques, les  $\beta$ -arrestines qui jouent le rôle de protéines d'échafaudage en connectant les récepteurs à la machinerie d'endocytose de la cellule. Il a été découvert récemment que les  $\beta$ -arrestines sont aussi capables de recruter un grand nombre de protéines de la signalisation permettant aux récepteurs d'émettre un signal indépendamment des protéines G. La découverte de ligands dits « biaisés » capables d'activer sélectivement les voies de signalisation dépendantes des protéines G ou des  $\beta$ -arrestines a ouvert de nouvelles perspectives dans le domaine de la pharmacologie des RCPG et du développement de nouvelles molécules thérapeutiques.

Le RCCK2 est le sujet d'étude principal de notre équipe et différentes études ont déjà eu lieu notamment pour déterminer le site de liaison de ligands naturels et de ligands synthétiques dans le récepteur ainsi que pour déterminer le mécanisme moléculaire d'activation du récepteur. Cependant, bien que l'internalisation du RCCK2 ait été décrite, les mécanismes régissant ce phénomène restent inconnus.

L'objectif de notre travail a été de déterminer les mécanismes de l'internalisation du RCCK2 ainsi que de montrer l'existence de ligands biaisés au RCCK2 et d'une conformation spécifique du récepteur recrutant les  $\beta$ -arrestines distincte de celle activant les protéines G.

En préambule de la présentation des résultats expérimentaux, l'introduction bibliographique de ce manuscrit sera consacrée à décrire les données actuelles relatives aux RCPG et particulièrement les mécanismes généraux d'internalisation de ces récepteurs, la pharmacologie de ces récepteurs et enfin l'état des lieux de la recherche sur la CCK, la gastrine et le RCCK2.



*Introduction*  
*Bibliographique*

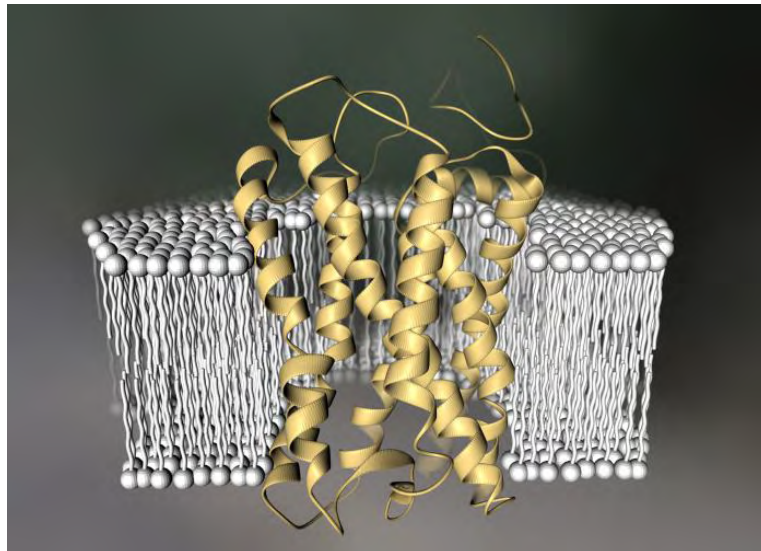






# Premier Chapitre :

## Les récepteurs couplés aux protéines G





# **I. Les récepteurs couplés aux protéines G (ou récepteurs à sept domaines transmembranaires)**

La cellule, est l'unité structurale et fonctionnelle constituant tout être vivant (à l'exception des virus). Chez les organismes pluricellulaires, tels que les mammifères, les cellules de même type forment des tissus, eux-mêmes organisés en organes. Au sein d'un organisme, la communication entre les différents organes permet le maintien de l'homéostasie, c'est à dire l'ensemble des paramètres physico-chimiques de l'organisme qui doivent rester constants (glycémie, température, taux de sel dans le sang, ...). Les cellules sont donc en communication permanente au sein d'un même organe et entre cellules de différents organes. Cette communication entre cellules repose sur la capacité des cellules émettrices à générer un signal et sur la capacité des cellules cibles à recevoir et interpréter ce signal. Les signaux échangés tels que les hormones, neurotransmetteurs, ou facteurs de croissance sont reçus et interprétés grâce à des protéines présentes à la membrane plasmique des cellules. Ces « récepteurs » membranaires permettent de traduire les différents stimuli du milieu extracellulaire en signaux intracellulaires via l'activation de différents effecteurs tels que des enzymes, canaux ioniques, facteurs de transcription. Ces signaux intracellulaires déclenchent l'expression de gènes provoquant ainsi une réponse biologique de la cellule cible (migration, sécrétion, mitose, ...).

Les récepteurs représentent donc l'interface de la cellule avec son milieu extérieur et jouent un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie. Ils existent plusieurs types de récepteurs membranaires différenciés en fonction de leur structure et de leur mode d'action, notamment les récepteurs de type canaux ioniques (récepteurs ionotropiques) et les récepteurs associés à une activité enzymatique (récepteurs métabotropiques). Les récepteurs métabotropes sont eux-mêmes subdivisés en deux grandes classes de récepteurs selon le type d'enzymes associées, les récepteurs tyrosine kinases et les récepteurs couplés aux protéines G. Dans ce chapitre, nous nous intéresserons spécifiquement aux récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) aussi appelés récepteurs à sept domaines transmembranaires.

## A] Généralités

Les récepteurs couplés aux protéines G constituent l'une des familles de gènes qui est la plus grande et la plus étudiée du génome des mammifères (plus de 1% du génome humain). Les RCPG partagent tous une unité fonctionnelle commune qui forme sept domaines transmembranaires en forme d'hélices ; cependant les RCPG comportent également des domaines fonctionnels variés notamment au niveau de leur extrémité extracellulaire (extrémité N-terminale) et intracellulaire (extrémité C-terminale). Ces récepteurs sont retrouvés dans tous types de tissus, et sont impliqués dans la plupart des processus physiologiques et physiopathologiques ce qui en a fait une cible de choix pour la découverte de médicaments. En effet, à l'heure actuelle on estime qu'environ 30% des médicaments commercialisés ciblent des RCPG. Cependant, ces médicaments ne ciblent qu'une trentaine de RCPG, ce qui laisse un potentiel important de découverte de nouveaux médicaments agissant sur les autres RCPG.

### A.1. Découverte des RCPG

Jusqu'à la seconde moitié du 19<sup>ème</sup> siècle, l'efficacité et la spécificité de l'action de molécules telles que la morphine ou la quinine, demeurent vaguement expliquées, notamment par la puissance chimique et l'affinité pour certains organes ou tissus. C'est seulement à partir de 1860 que la relation entre la structure chimique d'une molécule et son effet pharmacologique est étudiée systématiquement. Paul Ehrlich, immunologiste Berlinoise a été l'un des premiers à développer une théorie autour de l'idée de récepteur. En effet, en 1878 Ehrlich suggère qu'il existe une entité chimique spécifique de la cellule responsable du marquage sélectif des colorants cellulaires [1]. En 1897, il développe la « théorie des chaînes latérales » (side-chain theory) des toxines, indiquant que des « chaînes latérales » de la cellule pourraient lier certaines toxines [2]. Par la suite, Ehrlich postule l'existence de nombreuses chaînes latérales et introduit le terme de « récepteur » en remplacement du terme « chaîne latérale » [3]. En 1905, le physiologiste britannique John Newport Langley décrit une « substance réceptive » lors de son travail sur l'action de la nicotine et du curare sur la contraction musculaire [4]. A la fin des années 1930, le pharmacologiste Alfred Joseph Clark pose les bases de l'analyse pharmacologique moderne en apportant une approche quantitative à l'effet des drogues. En effet, de par des calculs de taille moléculaire et de surface cellulaire, Clark déduit que des drogues comme l'adrénaline et l'acétylcholine se lient avec certains récepteurs spécifiques mais minoritairement exprimés à la surface des cellules

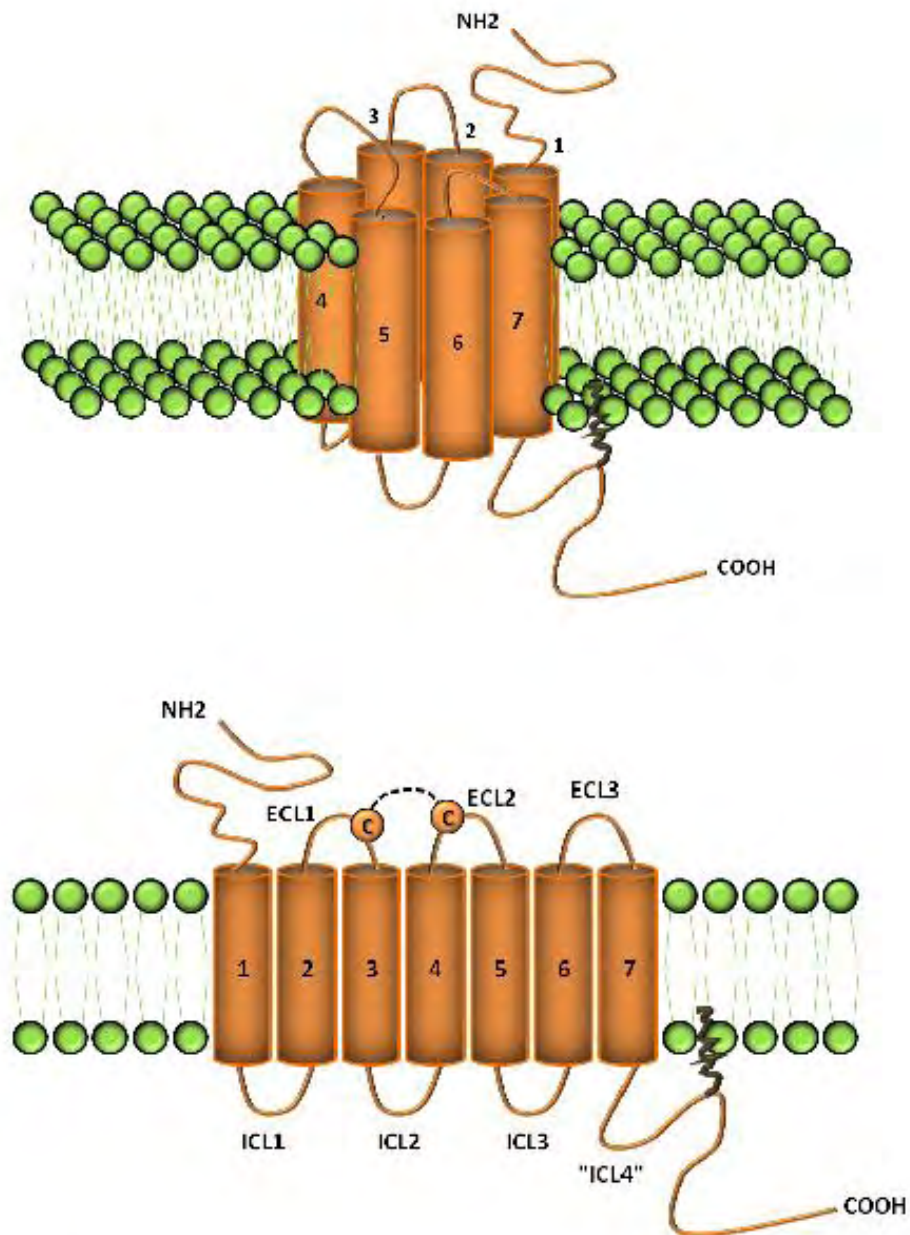
cardiaques. Ces études conduiront Clark à conclure que l'action pharmacologique d'un composé est directement proportionnelle au nombre de récepteurs occupés [5]. L'introduction des ligands radio-marqués, durant les années 1970, ouvre la porte de l'ère moléculaire de la recherche sur les récepteurs en apportant des données sur la régulation du nombre de récepteurs ainsi que sur le mode de liaison du ligand au récepteur.

Cependant, la découverte matérielle des récepteurs n'intervient qu'en 1979 grâce au groupe de Robert J. Lefkowitz qui purifia le récepteur  $\beta$ 2-adrénergique par chromatographie d'affinité [6]. Quelques années plus tard en 1986, l'équipe de Lefkowitz réussira, en collaboration avec des chercheurs de Merck, à cloner le gène et l'ADNc du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique [7]. L'analyse de la séquence du récepteur  $\beta$ 2-adrenergique révèle de nombreuses similarités avec une autre protéine, la rhodopsine bovine qui constitue, à l'époque, le modèle d'étude des protéines membranaires. Cette homologie de séquence entre le récepteur  $\beta$ 2-adrenergique et la rhodopsine bovine suggère que ces deux protéines partagent une structure très similaire et fait ainsi naître l'idée d'une famille de gène codant pour des récepteurs membranaires. Cette découverte marque le début de la recherche sur les RCPG et sera suivie par le clonage de nombreux autres gènes codant pour ces récepteurs, renforçant l'idée de l'existence d'une superfamille de gènes codant pour les RCPG.

Aujourd'hui, des études récentes ont montré qu'il existe environ 900 gènes codant pour des RCPG dont 400 seraient des récepteurs capables de lier des ligands endogènes et 500 des récepteurs gustatifs et olfactifs [8]. Cependant, on estime, à l'heure actuelle, à une centaine le nombre de RCPG toujours sans ligand associé, appelés RCPG orphelins [9]. La découverte incessante de nouveaux peptides et l'existence de nombreux récepteurs orphelins semblent prometteuses de découvertes à venir importantes dans le domaine des RCPG.

## **A.2. Structure des Récepteurs couplés aux protéines G**

A partir des années 1950, la rhodopsine bovine fut l'un des RCPG les plus étudiés. Présente en très grande concentration dans la rétine des bovins, la rhodopsine bovine a pu être isolée et a donné lieu à un nombre important d'études ayant pour but de déterminer sa structure. En 1977, des expériences de dichroïsme circulaire permettent de mettre en évidence que la rhodopsine est composée d'environ 30% d'hélice  $\alpha$ . Les extrémités N-terminale et C-terminale se situent de part et d'autre de la membrane plasmique et la majeure partie de la Rhodopsine apparaît comme une protéine insérée dans la membrane



**Figure 1: Structure schématique générale des récepteurs couplés aux protéines G**

Les 7 segments transmembranaires antiparrallèles hydrophobes (1-7), qui caractérisent les RCPG, sont reliés par 3 boucles intracellulaires (ICL1 à 3) et 3 boucles extracellulaires (ECL1 à 3). Un pont disulfure relie ECL1 à ECL2. L'extrémité N-terminale NH<sub>2</sub> est extracellulaire alors que l'extrémité C-terminale COOH est intracellulaire. Un ancrage lipidique dans la membrane peut se former au niveau de l'extrémité C-terminale, créant une 4<sup>ème</sup> boucle intracellulaire.

grâce à sept hélices transmembranaires [10]. L'isolement et l'analyse de la séquence du gène de la rhodopsine bovine interviennent en 1983 et permettent de construire la carte d'hydrophobicité de la protéine montrant six domaines hydrophobes transmembranaires [11]. Le rapprochement est fait avec la structure à sept domaines transmembranaires de la bactériorhodopsine qui avait été cristallisée à une résolution de 7Å, en 1975 par l'équipe d'Unwin [12]. Dans les années 1990, les premiers cristaux en deux dimensions de la rhodopsine bovine sont disponibles et, grâce à l'application de la microscopie électronique à ces cristaux, la structure en sept domaines transmembranaire est identifiée en créant une projection de la protéine dans une bicouche lipidique. Un véritable bond en avant est réalisé en 2000 avec l'obtention du cristal en trois dimensions avec une forte résolution (2,8Å) de la rhodopsine bovine par Palczewski [13]. Il faudra attendre 2007, pour que les groupes de Kobilka et Stevens réussissent à obtenir le cristal du premier RCPG non visuel, le récepteur  $\beta$ 2-adrénérique avec une résolution de 3,4Å-3,7Å. Les auteurs notent une différence structurale entre le  $\beta$ 2-adrénérique et la rhodopsine principalement au niveau de l'interaction entre l'extrémité cytoplasmique des domaines transmembranaires 3 et 6 et de la seconde boucle extracellulaire [14]. Un an plus tard, deux autres cristaux de RCPG seront obtenus : le récepteur  $\beta$ 1-adrénérique et le récepteur adénosine A2A [15, 16]. La cristallisation, ces dernières années, de récepteurs autres que la rhodopsine a permis de conforter les données indirectes d'ores et déjà obtenues et a considérablement amélioré la compréhension des mécanismes d'activation des RCPG ainsi que des modes de liaison des ligands aux récepteurs.

La comparaison des séquences des RCPG révèle une topologie membranaire commune : sept segments hydrophobes transmembranaires en hélice  $\alpha$ , particulièrement bien conservés et composé chacun d'environ 25 à 35 acides aminés. Ces segments transmembranaires sont reliés entre eux par trois boucles cytoplasmiques et trois boucles extracellulaires. Les extrémités N-terminale et C-terminale se situent respectivement du côté extracellulaire et intracellulaire. Les boucles extracellulaires 1 et 2 présentent toutes deux une cystéine, qui peut former un pont disulfure. L'extrémité carboxy-terminale possède un site possible de palmitoylation après la courte hélice 8 située directement à la sortie du domaine transmembranaire 7. Ce site de modification post-traductionnel représente un ancrage lipidique dans la membrane, pouvant, ainsi, créer une quatrième boucle intracellulaire (Figure 1).

Des variations de taille importantes dans la longueur des extrémités amino-terminale et carboxy-terminale ainsi que des boucles permettent de différencier les RCPG constituant un des critères qui a permis de caractériser les différentes familles de RCPG.

### A.3. Classification des RCPG

La superfamille des RCPG est découpée en sous-groupes ou familles. Il existe différentes classifications basées sur des critères variés tels que la séquence, le mode de liaison du ligand, la structure, la phylogénie ou encore la composition en acides aminés [17]. La classification la plus répandue, encore à l'heure actuelle, est celle établie par Kolakowski en 1994, qui détermine sept classes de A à F et O, basée sur la recherche de similarité entre RCPG connus de vertébrés ou d'invertébrés [18]. Cette classification servira de base par la suite pour créer la base de données des RCPG dans les années 2000, appelée GPCRDB [19]. Une autre classification importante, proposée par Joël Bockaert et Jean-Philippe Pin, répertorie les RCPG dans cinq classes sur la base de critères structuraux et du mode de liaison du ligand [20]. Plus récemment, après le séquençage du génome humain, l'analyse phylogénétique des RCPG conduit à la création du système GRAFS séparant les RCPG en cinq groupes distincts : G pour Glutamate, R pour Rhodopsine, A pour Adhésion, F pour Frizzled/Taste et S pour Sécrétine [8].

Dans ce chapitre nous ne détaillerons que la classification de Kolakowski, du fait de son utilisation prédominante. Celle-ci attribue une lettre à chaque famille de RCPG, A pour Rhodopsin-like, B pour Secretin-like, C pour Metabotrope-glutamate/phéromone, D pour fungal pheromone, E pour AMP cyclique, et enfin F pour Frizzled/smoothened.

#### A.3.1. La famille A: « Rhodopsin-like »

La famille A est la mieux caractérisée et aussi celle qui comporte le plus grand nombre de récepteurs avec plus de 80% des RCPG. Elle inclut la rhodopsine et le récepteur  $\beta$ 2-adrénérique et cette classe de récepteurs lie particulièrement des hormones, des polypeptides de petites et grandes tailles, des amines biogènes, des photons ou encore des substances apparentées aux lipides. La moitié des récepteurs de cette famille serait impliquée dans la reconnaissance de stimuli olfactifs, gustatifs ou de la lumière et ont été surnommés récepteurs sensoriels. Cette classe est divisée en trois sous-groupes : la sous-classe A.a comprenant des récepteurs de petites molécules, la sous-classe A.b comprenant des récepteurs des neuropeptides et la sous-classe A.c ou « LGR » (leucine rich repeats containing GPCR) comprenant des récepteurs d'hormones glycoprotéines.

Structurellement, les RCPG de cette famille présentent une extrémité N-terminale relativement courte. Ceux-ci possèdent aussi des séquences consensus, dont le motif E/DRY à l'extrémité cytoplasmique du domaine transmembranaire 3 (TM3), deux cystéines



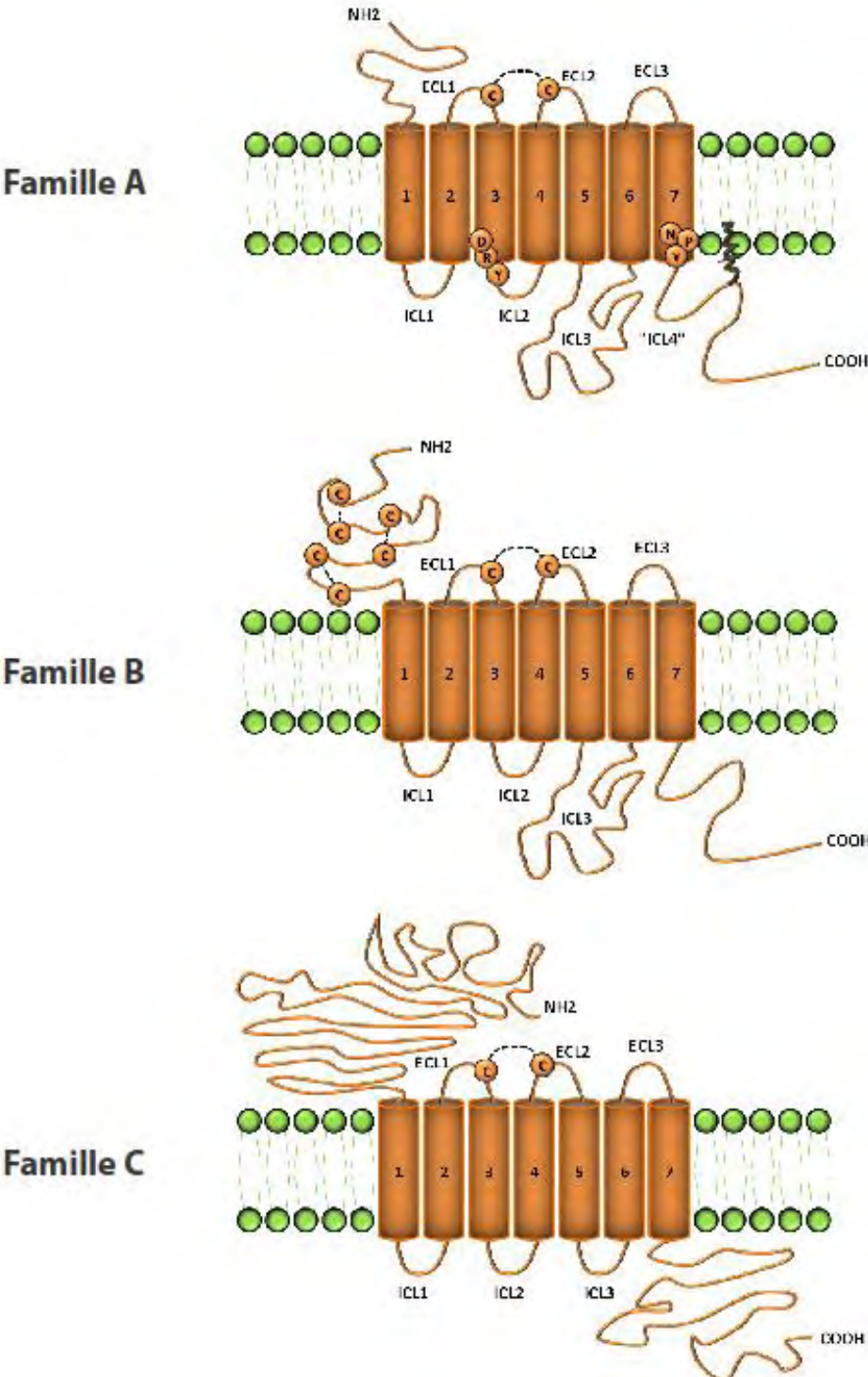


Figure 2: Les 3 principales familles de RCPG

qui forment un pont disulfure sur les deux premières boucles intracellulaires (ICL1 et ICL2) et le motif NPXXY dans le domaine transmembranaire 7 (TM7) [21]. On note également la présence d'un acide aminé aspartate très conservé dans le TM2 dont le rôle serait la reconnaissance du ligand et le couplage à la protéine G [22]. Une cystéine palmitoylée est retrouvée dans la partie C-terminale permettant la formation d'une quatrième boucle intracellulaire (ICL4).

Parmi ces séquences consensus, le motif E/DRY a fait l'objet d'une multitude d'études, notamment sur le rôle de ce motif dans l'activation des RCPG de la classe A [21]. Des trois acides aminés qui composent ce motif, l'arginine est la mieux conservée avec 97% des RCPG de cette famille possédant une arginine ou une lysine ; vient ensuite l'asparagine qui est conservée en tant que acide aminé acide (pouvant être substitué par un acide glutamique) dans 86% des récepteurs. Enfin, la tyrosine est la moins conservée (67%) et certaines études suggèrent que celle-ci n'est pas nécessaire pour la fonction du motif E/DRY [23] (Figure 2).

Le site de liaison des récepteurs de cette famille est essentiellement formé par une cavité dessinée par les domaines transmembranaires où peut aller se glisser le ligand, à l'inverse des récepteurs des autres classes où l'extrémité N-terminale semble fortement impliquée [21]. Des exceptions ont cependant été remarquées comme les récepteurs de la LH, FSH et TSH appartenant à la sous-classe A.c ou « LGR » [8].

### **A.3.2. La classe B : « Secretin-Like »**

La classe B des RCPG ne présente qu'une faible homologie avec la classe A, puisque les membres de ces classes partagent seulement 12% d'homologie de séquence. Cette famille regroupe des récepteurs structurellement proches du récepteur à la sécrétine. On y retrouve notamment le récepteur du glucagon, du GIP (gastric inhibitory polypeptide), du GLP-1R et GLP2-R (glucagon like peptide-1/2), le récepteur de l'hormone parathyroïdienne (PTH), le récepteur à la calcitonin (CT), le récepteur à la GHRH (growth hormone releasing hormone) les récepteurs au VIP (vasoactive intestinal polypeptide) et du PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide).

Cette famille de RCPG se lie avec des peptides relativement grands tels que des hormones et neuropeptides présentant un pharmacophore diffus. Une des différences importantes avec la classe A est la taille de l'extrémité N-terminale, beaucoup plus longue chez la classe B, pouvant aller jusqu'à 300 acides aminés. Dans cette extrémité N-terminale se trouvent six acides aminés cystéines très conservés qui exercent des

contraintes conformationnelles sur l'extrémité N-terminale du récepteur de par les ponts disulfures créés entre ces acides aminés.

L'extrémité N-terminale confère aux récepteurs de la classe B, un mécanisme d'activation particulier et très différent de la classe A. En effet, l'extrémité N-terminale apparaît comme très importante pour la liaison avec le ligand, ce qui autorise une autre partie du ligand, non impliquée dans l'interaction avec l'extrémité N-terminale du récepteur, à interagir avec le cœur du récepteur entraînant l'activation de ce dernier [24] (Figure 2). Cependant, d'autres mécanismes d'activation des RCPG de classe B ont été proposés.

### **A.3.3. La famille C : « Metabotrope-glutamate/pheromone »**

La famille C des RCPG regroupe les récepteurs métabotropiques du glutamate, les récepteurs au calcium, les récepteurs GABA<sub>B</sub>, les récepteurs du goût, les RAIG (retinoic acid-inducible orphan GPCR) et des récepteurs aux phéromones.

Ces RCPG ont la particularité de présenter une extrémité N-terminale particulièrement longue d'environ 500 acides aminés. Le repliement de l'extrémité N-terminale donne lieu à la formation de deux lobes qui constituent le site de liaison de l'agoniste. Il existe, pour cette classe de RCPG, de nombreux ligands allostériques capables de moduler l'activité, des récepteurs en se liant à site différent du site orthostérique. Certains acides aminés sont conservés dans la classe C et également au sein de la classe A suggérant l'existence d'un ancêtre commun. Une autre particularité de la classe C réside dans la taille de la troisième boucle intracellulaire qui est très courte et très conservée. L'extrémité C-terminale forme la partie la moins conservée [25] (Figure 2).

D'un point de vue de l'activation des récepteurs de la famille C, la dimérisation entre deux récepteurs identiques (homodimérisation) ou entre deux récepteurs différents (hétérodimérisation) est un élément crucial dans le processus d'activation. Le rôle de la dimérisation dans l'activation des récepteurs de cette famille a été particulièrement étudié et suggère qu'une seule molécule est suffisante pour activer un dimère de récepteur [25].

Le clonage d'un certain nombre de gènes codant pour des récepteurs aux phéromones, exprimés dans des neurones de l'organe voméronasal (organe situé sous la surface intérieure du nez), et co-exprimés avec la protéine Go (récepteurs VR et GoVN) a conduit à intégrer ces protéines dans la classe C des RCPG [26].

### **A.3.4. Les autres familles : D ; E ; F**

La famille D. Cette famille est constituée de récepteurs aux phéromones principalement exprimés dans l'organe voméronasal, avec la protéine G de type  $G_{i2}$ . Les récepteurs aux phéromones ou OR (olfactory receptor) comportent une soixantaine de gènes chez les insectes [27]. Elle inclut également des récepteurs de phéromones de levures, tels que les récepteurs des facteurs  $\alpha$  et  $a$  (STE2 et STE3) [28].

La famille E. Cette famille est formée par les quatre récepteurs à l'AMPc (cAR 1–4), et d'autres récepteurs « cAMP receptor-like » caractérisés chez *Dictyostelium discoideum* (moisissures). A ce jour, aucun homologue n'a été trouvé chez les vertébrés ce qui en fait une famille minoritaire, mais unique, de RCPG. Ces récepteurs sont exprimés par *Dictyostelium discoideum* lors des étapes précoces de son développement où ils participent au système de signal chimiotactique. Plus tard dans le développement, ils interviennent dans la différenciation cellulaire et dans le contrôle du cycle cellulaire [29]

La famille F. Cette famille de récepteurs rassemble des récepteurs homologues aux protéines « frizzled » et « smoothed ». Les récepteurs de type « frizzled » jouent un rôle important dans le développement embryonnaire et plus particulièrement dans le contrôle de la prolifération et la polarité cellulaire, en se liant avec Wnt et en activant le signal Hedgehog. Ils sont également impliqués dans les processus de différenciation cellulaire et d'apoptose [30]. Chez les mammifères, dix récepteurs “frizzled” et un récepteur smoothed sont identifiés. Leurs boucles intracellulaires sont parmi les plus courtes des RCPG, et la longueur de la partie C-terminale varie d'une vingtaine à plus de 200 acides aminés chez l'homme. Ces récepteurs présentent une homologie de séquence faible mais significative avec la famille B [31].

## **A.4 Modélisation moléculaire des RCPG**

Alors que l'unité structurale commune à tous les RCPG est depuis quelques années parfaitement reconnue comme étant sept hélices transmembranaires connectées par trois boucles extracellulaires et trois boucles intracellulaires, la structure atomique des RCPG reste inconnue pour la grande majorité d'entre eux. A ce jour, quatre RCPG ont été cristallisés, la rhodopsine, les récepteurs beta-adrénergiques et le récepteur adénosine A2A. Cependant, l'analyse structurale haute résolution des RCPG reste difficile pour deux

raisons : d'une part, la dénaturation des RCPG, lorsqu'ils sont sortis de leur environnement lipidique, nécessite de trouver un moyen de les stabiliser. D'autre part, la faible expression naturelle de ces récepteurs et la difficulté à produire et purifier des grosses quantités de protéines recombinantes, représentent un frein important à l'utilisation des techniques expérimentales telles que la cristallisation.

Les techniques de modélisation moléculaire qui consistent à modéliser virtuellement un RCPG en trois dimensions, sont vite apparues comme un très bon moyen alternatif d'obtenir des renseignements sur la structure tridimensionnelle des RCPG. De plus, même en cas d'obtention expérimentale de la structure tridimensionnelle, les modèles permettent d'émettre des hypothèses quant aux détails moléculaires de la fonction et/ou activation des RCPG. La modélisation moléculaire peut donc être utilisée conjointement avec des études de mutagenèse dirigée ou d'autres méthodes, afin d'investiguer les structures des RCPG. Cette technologie est aussi utilisée pour réaliser des « screening » virtuels de banques de molécules dans le but de rechercher des agonistes/antagonistes d'un RCPG donné.

#### **A.4.1 Modélisation moléculaire par homologie**

Cette méthode de modélisation permet l'obtention d'un modèle tridimensionnel d'une protéine de structure inconnue, construit par homologie à partir d'un modèle de protéine connue. Cette méthode de modélisation nécessite un alignement correct entre la séquence peptidique de la protéine à modéliser et celle de la protéine modèle, appelée *template*. Les domaines transmembranaires des RCPG sont construits sur la base de l'homologie topologique des deux protéines. Les extrémités et boucles extra- et intracellulaires sont plus difficiles à construire compte tenu de l'absence de *template* spécifique et de la plus grande flexibilité moléculaire de ces domaines. Cependant, les données issues de techniques de cristallisation ou de spectroscopie comme la RMN (résonance magnétique nucléaire) permettent de visualiser le repliement de certaines parties de ces boucles et extrémités N- ou C-terminale.

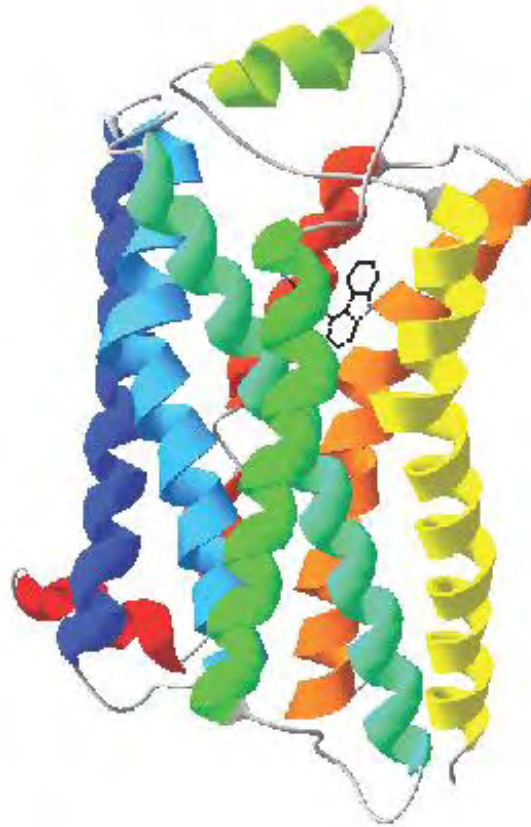
*Le modèle de base : la bactériorhodopsine* : Les premiers modèles de RCPG de la famille A ont été modélisés par homologie en prenant la structure des hélices transmembranaires de la bactériorhodopsine cristallisée par Henderson, comme *template* [12]. Cependant, la bactériorhodopsine n'est pas un récepteur couplé aux protéines G et ne présente qu'environ 20% d'homologie de séquence avec ces récepteurs. De ce fait, des variations importantes dans les alignements de séquence entre bactériorhodopsine et RCPG à modéliser, ont conduit à la création de plusieurs modèles différents pour un même RCPG.

*Le modèle rhodopsine* : La cristallisation de la rhodopsine bovine, en 2000, a révolutionné la modélisation par homologie, puisque pour la première fois le *template* pour modéliser d'autres RCPG est un véritable RCPG lui-même. La structure cristalline de la rhodopsine a donc servi de base pour de nombreux modèles de RCPG. Cependant, la rhodopsine demeure un RCPG particulier puisque c'est un récepteur de lumière (photons) ayant un agoniste inverse comme ligand, le 11-cis-rétinal, lié par liaison covalente avec la rhodopsine. L'isomérisation du 11-cis-rétinal induite par un photon entraîne l'activation de la rhodopsine, mécanisme d'activation qui diffère totalement des autres RCPG pour lesquels le récepteur est activé par l'interaction avec un agoniste. De plus, la faible homologie de séquence entre la rhodopsine et les autres RCPG pourrait ne pas faire de la rhodopsine un modèle de choix pour prédire de manière systématique la structure d'un RCPG. D'après les résultats d'études de modélisation, la rhodopsine pourrait être utilisée comme *template* pour modéliser la structure de certains RCPG mais pour d'autres, les divergences structurales avec la rhodopsine pourraient être trop importantes [32].

Les modèles basés sur la rhodopsine ont pu être optimisés, en générant des modèles de complexes ligand-récepteur en utilisant des agonistes ou des antagonistes connus [33, 34]. Toutefois, les auteurs pointent que cette méthode reste basée sur l'homologie de structure avec la rhodopsine et donc ne semble pas être adaptée à certains récepteurs.

Dans le contexte des études structure-fonction, une technique de simulation moléculaire dynamique permet de simuler le passage de l'état inactif d'un RCPG à l'état actif en calculant les états transitoires nécessaires à l'évolution du modèle moléculaire du RCPG inactif vers le modèle moléculaire du RCPG actif. Au sein de notre laboratoire, cette technique de simulation moléculaire dynamique a permis de décrire le passage de l'état inactif à l'état actif du récepteur CCK2 [35].

*Les modèles récents : récepteurs  $\beta 1$  et  $\beta 2$  adrénergiques et adénosine A2A* : Les premières structures du récepteur  $\beta 2$ -adrénergiques ont été rendues publiques en automne 2007 par les groupes de Kolbilka et Schertler après la cristallisation de ce récepteur en complexe avec un agoniste inverse de ce récepteur, le carazolol, et avec un fragment Fab (Fragment antibody binding) reconnaissant la troisième boucle intracellulaire [14, 36]. Peu de temps après, une structure de plus haute résolution est obtenue en utilisant une protéine de fusion où la troisième boucle intracellulaire a été substituée par le lysozyme T4, une protéine facilement cristallisable [37, 38]. Il ressort de la structure tridimensionnelle du  $\beta 2$ -adrénergique, la confirmation de la présence des sept domaines transmembranaires dans une disposition très proche de celle des domaines transmembranaires de la Rhodopsine. D'un point de vue de la poche de liaison, la comparaison entre la rhodopsine et le  $\beta 2$ -adrénergique révèle une superposition du rétinol avec le carazolol. Cependant, une



**Figure 3: Image du modèle moléculaire du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique**

Modèle moléculaire réalisé par S. Jähnichen à partir de la structure du cristal du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique, stabilisé par un agoniste inverse (carazolol), obtenu par le groupe de Brian Kobilka. Bleu: TM1 ; Bleu clair: TM2 ; Cyan: TM3 ; Vert: TM4 ; Vert clair: hélice dans l'ECL2 ; Jaune: TM5 ; Orange: TM6 ; Rouge-Orange: TM7 ; Rouge: hélice 8 ou ICL4.

différence majeure a été observée au niveau de la seconde boucle extracellulaire. En effet chez la rhodopsine, cette boucle forme un feuillet  $\beta$  très proche de la poche de liaison qui ferme l'accès de cette poche à d'éventuels ligands. Chez le récepteur  $\beta$ 2-adrénergique, on trouve une disposition très différente avec un court segment en hélice  $\alpha$  qui rend la poche de liaison ouverte et accessible aux ligands (Figure 3).

Une seconde structure a été publiée par le groupe de Schertler, la structure du récepteur  $\beta$ 1-adrénergique stabilisé par plusieurs mutations, en complexe avec un antagoniste, le cyanopindolol. Le récepteur  $\beta$ 1-adrénergique et le récepteur  $\beta$ 2-adrénergique partagent plus de 64% d'homologie de séquence, et leur structure est remarquablement similaire à l'exception de la seconde boucle extracellulaire qui présente une hélice  $\alpha$  chez le récepteur  $\beta$ 2-adrénergique alors que cette structure en hélice est absente dans la boucle du récepteur  $\beta$ 1-adrénergique [15].

Au cours du printemps 2008, un quatrième récepteur, le récepteur adénosine A2A en complexe avec un antagoniste, le ZM241385, a été cristallisé, vérifiant une fois de plus l'homologie structurale des RCPG, en particulier la structure des sept domaines transmembranaires. La structure de ce récepteur a aussi confirmé l'idée que la topologie de la seconde boucle extracellulaire est probablement propre à chaque récepteur. Dans le cas du récepteur adénosine A2A, cette boucle possède une conformation différente de celle de la rhodopsine ou du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique sans toutefois bloquer l'accès du ligand au site de liaison comme c'est le cas pour la rhodopsine.

La comparaison des quatre structures de RCPG actuellement disponibles confirme l'existence d'une structure commune de sept domaines transmembranaires tout en soulignant que chaque récepteur a ses propres caractéristiques.

La comparaison entre le modèle moléculaire du  $\beta$ 2-adrénergique basé sur la structure de la rhodopsine et le cristal obtenu par le groupe de Brian Kobilka, valide la stratégie de modélisation moléculaire des RCPG ainsi que son application dans des expériences de mutagénèse dirigée et dans la recherche de nouveaux médicaments [39]. Il est important de comprendre que les modèles obtenus avec cette méthode de modélisation par homologie peuvent être fortement optimisés : par exemple, en appliquant des contraintes sur la structure du modèle en fonction des données expérimentales, mais aussi en plaçant le modèle dans un environnement plus apte à mimer la réalité (insérer le modèle dans une bicouche lipidique, recréer la concentration en sels du milieu environnant).



### **A.4.2 Modélisation moléculaire *de novo***

Au début des années 2000, une nouvelle technologie de modélisation moléculaire de RCPG est apparue, nommée PREDICT. Cette technologie pourrait permettre de prédire la structure tridimensionnelle de n'importe quel RCPG. Elle s'appuie sur la séquence en acides aminés de la protéine à modéliser comme unique donnée de départ et n'est pas basée sur les informations structurales des RCPG déjà cristallisés. Cette technologie repose sur l'utilisation des propriétés physico-chimiques de la séquence d'acides aminés et des contraintes imposées par l'environnement membranaire, elle est donc très différente des autres approches de modélisation basées sur l'homologie avec des structures connues ou sur des alignements de séquences multiples. L'algorithme PREDICT optimise des milliers de conformations différentes du récepteur de façon simultanée, et recherche ensuite la conformation tridimensionnelle des domaines transmembranaires la plus stable, dans son environnement membranaire. Le modèle final est accepté que s'il est significativement plus stable que la majorité des autres conformations optimisées [40].

L'utilisation de la technique PREDICT a été validée par la création d'un modèle de la rhodopsine assez proche de la structure de la rhodopsine cristallisée par Palczewski. Cette technique a permis de modéliser la structure tridimensionnelle des récepteurs 5-HT1A et 5-HT4 de la sérotonine, du récepteur Y1 au NPY, et du récepteur D2 de la dopamine, en étant en accord avec les résultats expérimentaux acquis pour ces récepteurs [41]. En 2006, le groupe de Noiman publie une étude sur le développement d'un agoniste du récepteur 5-HT1A, PRX-00023, en phase clinique III qui a été découvert et optimisé grâce à la méthode PREDICT [42]. Cependant, les modèles créés avec PREDICT ne prennent pas en compte les boucles et les extrémités extra/intracellulaires, difficiles à modéliser du fait de leur grande flexibilité. Ainsi, PREDICT est plutôt adapté à l'identification de ligands de petites tailles qui interagissent totalement ou partiellement avec les domaines transmembranaires.

*La modélisation moléculaire est donc un outil essentiel à la compréhension des mécanismes de liaison et d'activation des RCPG. Les modèles moléculaires d'abord relativement théoriques peuvent être optimisés en incorporant des données expérimentales. Une fois le modèle raffiné, il permettra de générer des hypothèses qui seront testées expérimentalement, et les données issues des expérimentations seront à leur tour incorporées dans le modèle. Cependant, la plupart des modèles actuels sont basés sur la rhodopsine et les trois autres RCPG cristallisés qui appartiennent tous les quatre à la classe A des RCPG. Ainsi, les structures tridimensionnelles, des RCPG des autres familles demeurent encore inconnus alors que les modes de liaison et d'activation de ces récepteurs sont significativement différents [43]. Aussi, les modèles établis jusqu'à maintenant pour des*

*récepteurs de la classe A devront être « adaptés » pour modéliser les RCPG des autres classes, en incorporant les données expérimentales obtenues sur ces récepteurs.*

## **B] Transduction du signal par les protéines G**

Une fois le ligand lié à son récepteur, le RCPG engage une cascade d'activation protéique à l'intérieur de la cellule qui aboutit le plus souvent à la transcription de gènes. Le récepteur activé subit des changements conformationnels qui par extension active la protéine G couplé au récepteur. La protéine G activée peut alors initier la transduction du signal intracellulaire induite par le récepteur.

### **B.1 Historique**

C'est au début des années 1960 et 70 que la biochimie commença à fusionner avec la pharmacologie. En effet, ce sont des biochimistes qui se sont les premiers intéressés aux bases moléculaires de l'action des hormones et des médicaments. Earl W. Sutherland, Junior découvre en 1971, l'adénosine 3'-5'-monophosphate cyclique (AMPc) et l'enzyme responsable de sa synthèse l'adénylate cyclase (prix Nobel 1971)[44]. Parallèlement à ce travail, Edwin G. Krebs découvre la protéine kinase dépendante de l'AMPc, qui est le premier effecteur de l'AMPc, aujourd'hui communément appelée protéine kinase A (PKA)(prix Nobel 1992) [45]. En 1971, Martin Rodbell propose l'existence d'une protéine intermédiaire qui régulerait les nucléotides guanines faisant le lien entre le récepteur du glucagon et l'adénylate cyclase [46]. Alfred G. Gilman démontre l'existence de cette protéine intermédiaire en 1977 avant de la nommer protéine Gs [47, 48]. C'est en 1980, que la protéine Gs est purifié et que l'on décrit la structure hétérotrimérique des protéines G[49]. La découverte de la protéine Gs par Rodbell et Gilman leur valut le prix Nobel de Physiologie et de Médecine en 1994. Ces différents biochimistes ont été les pionniers de la recherche moderne sur la transduction du signal. Ils ont introduit des techniques de mesures biochimiques de l'activité d'un récepteur à une échelle cellulaire, contrairement aux précédentes études qui, jusque là, étaient réalisées sur des systèmes physiologiques plus intégrés (organes entiers ou morceaux d'organes). Plus tard, les autres protéines G ont été découvertes, en reconnaissant leur rôle d'hydrolyse du GTP, connectant ainsi les récepteurs à la régulation de l'adénylate cyclase, de la phospholipase C, aux canaux ioniques et d'autres effecteurs intracellulaires.

Les RCPG exercent donc leurs effets biologiques via l'activation de ces protéines G hétérotrimériques. Certains RCPG sont connus pour être couplés à une seule protéine G, d'autres récepteurs à plusieurs protéines G différentes, enfin pour des récepteurs avec une structure à sept domaines transmembranaires considérés comme des RCPG, aucun couplage à une protéine G n'a pu être formellement établi. Il existe des voies de transduction du signal indépendantes des protéines G mais ce thème sera abordé dans la partie « transduction du signal dépendant des  $\beta$ -arrestines ».

## B.2 Les différentes protéines G

Les protéines G sont des protéines hétérotrimériques composées de sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Lorsque la protéine G est activée par le récepteur, elle se dissocie en deux parties indépendantes, la sous-unité  $\alpha$  et le complexe  $\beta\gamma$  qui vont l'un et l'autre interagir avec des protéines effectrices intracellulaires afin de moduler leur fonction [50].

L'existence de nombreuses sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  différentes, a été rapportée. Le clonage par homologie a permis l'identification de 35 gènes codant pour les différentes sous-unités des protéines G, 16 codant pour les  $\alpha$ , 5 pour les  $\beta$  et 14 pour les  $\gamma$  [51].

Les sous-unités  $\alpha$  présentent la plus haute diversité, elles se subdivisent en quatre sous-groupes, basés sur des similarités de leur séquence primaire, mais présentent toutes une activité GTP-ase :  $G_s\alpha$  (4 sous-types) pour activateur de l'AMPc,  $G_{i/o}\alpha$  (6 sous-types),  $G_{q/11}\alpha$  (5 sous-types) et  $G_{12/13}\alpha$  (2 sous types). Cinq sous-unités  $\beta$  et douze sous-unités  $\gamma$  sont décrites à ce jour. Les sous-unités  $\beta$  sont assez similaires entre elles d'un point de vue structural alors que les sous-unités  $\gamma$  présentent une variation plus importante.

Un degré de diversité supplémentaire s'ajoute à la diversité des sous-unités elles-mêmes, de par l'assemblage croisé de ces trois sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , entraînant ainsi une multitude de combinaisons possibles. Cette grande diversité de structure et d'assemblage contribue probablement à l'exceptionnelle variété des réponses biologiques associées au RCPG.

## B.3 Le couplage des protéines G aux récepteurs

### B.3.1 Généralités

Les premières données conduisant à déterminer quelle protéine G est couplée à un RCPG donné, ont été obtenues au moyen d'expériences utilisant des toxines. Par exemple, la toxine pertussique (PTX) permet d'inhiber spécifiquement les protéines de la famille  $G_{i/o}$ . Une autre toxine, la toxine cholérique a été montrée comme inactivant les protéines  $G_s$ . Ces toxines catalysent l'ADP-ribosylation des protéines G et empêchent leur adressage à la membrane. Diverses techniques ont été utilisées pour déterminer la spécificité de couplage des protéines G aux récepteurs, telles que la co-immunoprécipitation, la mutagénèse dirigée, le BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer), la co-expression d'un RCPG avec différentes protéines G, ou encore l'utilisation de modèles cellulaires ou animaux « knock-out » pour certaines protéines ou sous-unités.

Ces études font ressortir l'idée qu'un RCPG est capable d'interagir non pas avec une seule protéine G mais avec plusieurs protéines G qui ne sont pas nécessairement de la même famille [52]. Un exemple de cette sélectivité multiple a été montré par le groupe de Hillhouse en 2001, avec le récepteur de la CRH (corticotrophin-releasing hormon) capable d'être couplé à 5 protéines G différentes dont  $G_s$ ,  $G_{q/11}$ ,  $G_o$ , et avec une efficacité réduite  $G_{i/2}$  et  $G_z$  [53].

Cependant, tous les RCPG ne sont apparemment pas capables d'activer plus d'une classe de protéines G. En effet, on estime que seulement 11% des RCPG peuvent activer plusieurs types de protéines G avec diverses efficacités, les autres RCPG seraient sélectifs d'une seule classe de protéine G avec environ 43% couplés à  $G_{i/o}$ , 33% couplés à  $G_{q/11}$  et 25% préférentiellement couplés à  $G_s$  [54].

### B.3.2 Sélectivité moléculaire du couplage des protéines G

La spécificité de couplage des protéines G aux récepteurs a fait l'objet de nombreuses études. En effet, la disponibilité cellulaire des différentes protéines G pour un récepteur donné ne peut expliquer que partiellement un degré de spécificité aussi important. Des études se sont intéressées à localiser les déterminants moléculaires impliqués dans le couplage et l'activation des protéines G. Pour la plupart des RCPG, ces études incriminent les régions intracellulaires des récepteurs en particulier les deuxième et troisième boucles intracellulaires ainsi que la partie C-terminale. Néanmoins, si la communauté scientifique

s'accorde sur l'implication de ces régions intracellulaires dans le couplage des protéines G, aucune séquence consensus n'a, à ce jour, été clairement identifiée [52].

### **B.3.2.a La seconde boucle intracellulaire (ICL2)**

La seconde boucle intracellulaire (ICL2) est l'un des domaines les mieux conservés au sein de la famille des RCPG. Plusieurs études font état de la présence de déterminants impliqués dans la spécificité du couplage des protéines G au récepteur [55].

L'ICL2 semble plus particulièrement être responsable du couplage lui-même puisque sa délétion sur le récepteur du glucagon affecte fortement la capacité de ce récepteur déficient à transduire un signal alors que son affinité pour le glucagon s'en trouve augmentée [56].

Dans le récepteur cholinergique muscarinique humain (M1), un acide aminé lipophile, la leucine 131 a été impliquée dans le couplage du récepteur à  $G_{q/11}$ . Cet acide aminé est très conservé dans le motif de l'ICL2 : DRYXXV(I)XXPL. Ainsi, des acides aminés équivalents ont été identifiés dans le récepteur muscarinique M3 (leucine 174) et dans le récepteur  $\beta$ 2-adrénérique (phénylalanine 139) pour leur rôle dans le couplage de ces récepteurs à  $G_{\alpha_q}$  ou  $G_{\alpha_s}$ , ce couplage étant fortement inhibé lorsque ces acides aminés sont substitués par une alanine [57].

En 1998, le groupe de Brann propose, en se basant sur l'analyse phénotypique de multiples mutants aléatoires de l'ICL2 du récepteur muscarinique M5, que les acides aminés constituant l'ICL2 feraient office de commutateurs pour le couplage à la protéine G. Brann suggère que les acides aminés nécessaires au couplage des protéines G et ceux nécessaires au maintien de l'état inactif du récepteur seraient spatialement séparés, en étant situés de part et d'autre de l'hélice formée par cette partie de l'ICL2. Ces données renforcent la théorie selon laquelle le domaine transmembranaire 3 (TM3) subit des changements conformationnels après l'activation du récepteur par son ligand, changements qui se répercutent sur la conformation de l'ICL2, lui conférant ainsi un rôle d'interrupteur du couplage aux protéines G [58].

Une étude sur les récepteurs muscariniques M2 et M4 et  $\alpha$ 2-adrénérique a permis de mettre en évidence une séquence polypeptidique caractérisée par la présence d'au moins deux acides aminés basiques, impliquée dans la sélection et l'activation de  $G_{i/o}$  [59].

Plus récemment, une étude sur les récepteurs cannabinoïdes CB1 démontre que la mutation d'une Leucine (L222) en alanine ou proline au niveau de l'ICL2 du récepteur provoque un changement de couplage de la protéine  $G_s$  au profit de la protéine  $G_i$ , alors que ce récepteur se couple naturellement à ces deux protéines G. En revanche, cette même

leucine mutée en isoleucine ou valine permet de retrouver un couplage équilibré entre Gs et Gi [60].

### **B.3.2.b La troisième boucle intracellulaire (ICL3)**

L'implication de la troisième boucle intracellulaire (ICL3) a également été mise en évidence grâce à des expériences de mutagenèse dirigée et à l'utilisation de récepteurs chimériques. La substitution de la partie N-terminale de l'ICL3 du récepteur muscarinique M2, produisant un signal sensible à la toxine pertussique, par la partie N-terminale de l'ICL3 du récepteur muscarinique M3, produisant un signal résistant à cette même toxine, permet au récepteur M2 chimérique de produire un signal résistant à cette toxine, signe d'un découplage de la protéine Gi pour une autre protéine G. Les auteurs concluent que la portion proximale de l'ICL3 semble suffisante pour la sélectivité de couplage de ce récepteur mais qu'elle n'en constitue probablement pas le seul déterminant [61].

Cependant, la région de l'ICL3 impliquée dans la spécificité de couplage semble varier selon les récepteurs. En effet, pour les récepteurs  $\beta$ -adrénergique et de l'angiotensine AT<sub>1A</sub> c'est la région distale de l'ICL3 qui apparaît comme responsable du couplage alors que pour les récepteurs muscariniques et des catécholamines, ce sont les deux extrémités de l'ICL3 qui semblent contenir les déterminants nécessaires au couplage et à l'activation [62] [63]. L'importance de l'ICL3 est aussi avérée pour les récepteurs  $\alpha$ 2-adrénergiques, D2 et D3 dopaminergiques, des RCPG structurellement proches. De plus, une étude récente a décrit l'effet activateur des protéines G d'un peptide, D2N, dérivé de la portion N-terminale de l'ICL3 du récepteur dopaminergique D2 [54, 64].

### **B.3.2.c L'extrémité C-terminale**

La partie C-terminale des RCPG peut présenter un site de palmitoylation constitué d'une ou de plusieurs cystéines. Cette modification post-traductionnelle constitue un point d'ancrage de cette extrémité C-terminale à la membrane, contribuant à créer une quatrième boucle intracellulaire ICL4 (aussi appelée hélice 8) [13]. La suppression totale ou quasi-totale de l'ICL4 par troncature, produit des récepteurs fonctionnellement inactifs [65]. La mutation supprimant l'ICL4 du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique diminue significativement sa capacité à activer G<sub>s</sub>. Cette même mutation, chez le récepteur dopaminergique, ne montre, néanmoins, aucun effet. Les études indiquent que selon le récepteur considéré, la suppression de l'ICL4 peut influencer ou non le couplage à la protéine G [66, 67]. Une étude récente sur l'ICL4 du récepteur cannabinoïde CB1 montre qu'un seul acide aminé dans cette boucle contribue à la spécificité de couplage de ce récepteur à G $\alpha_{oA}$ , G $\alpha_{i1}$ , G $\alpha_{i2}$  and G $\alpha_{i3}$  [68].

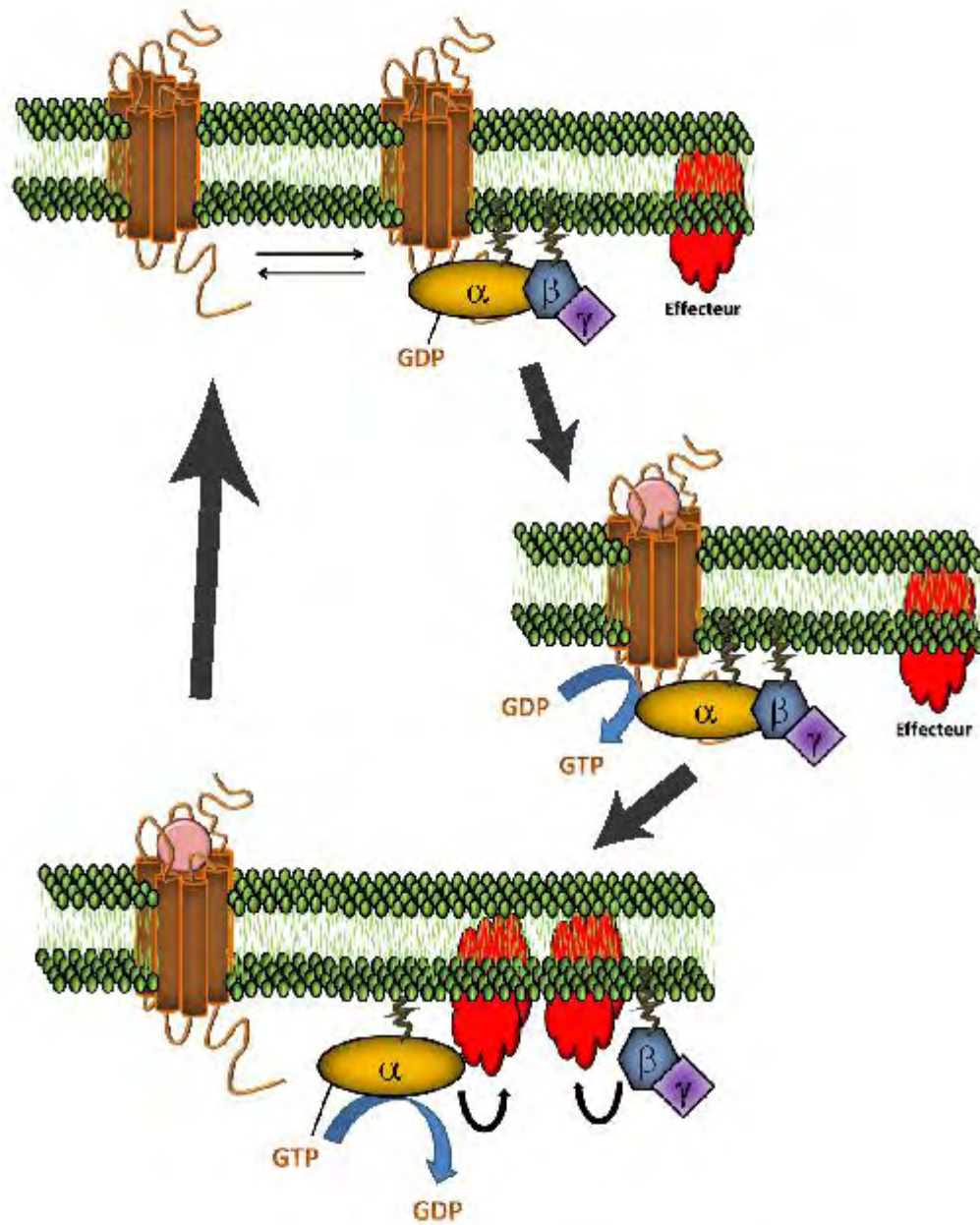
Pour les récepteurs A1 de l'adénosine et de l'histamine H2, des études montrent que la partie distale des RCPG peut jouer un rôle dans le couplage avec les protéines G, elle appliquerait une contrainte inhibitrice sur l'accès de la protéine G au récepteur, du fait d'un repliement vers la partie proximale de l'extrémité C-terminale [69, 70]. Pour le récepteur de la prostaglandine EP3, il existe des variants d'épissage naturels de la partie C-terminale du récepteur. Ces variants présentent des sélectivités de couplages différents :  $G_{i/o}$ ,  $G_s$  et/ou  $G_q$ .

#### **B.3.2.d Du domaine unique vers la combinaison des domaines**

Les différentes données expérimentales décrivent plusieurs sites d'interaction potentiels de couplage des protéines G aux récepteurs [71]. Ceci, a rapidement conduit à considérer, non plus une seule région, mais un ensemble de régions qui formerait un domaine « activateur » des protéines G avec une région plus particulièrement spécialisée dans la sélectivité de ce couplage.

En effet, des mutations ponctuelles en dehors des régions intracellulaires des RCPG provoquent des modifications de la sélectivité de couplage des protéines G aux récepteurs, comme c'est le cas pour le récepteur  $\alpha 2$ -adrénergique et le récepteur de l'hormone responsable de la sécrétion de l'hormone lutéinisante (LH/RH). Ceci, indique que la sélectivité de couplage est probablement modifiée indirectement par le changement conformationnel des régions intracellulaires du récepteur, induits, à distance par la mutation [54].

*En résumé, la sélectivité de couplage de la protéine G est régulée par de multiples domaines intracellulaires du RCPG. Cette idée, d'un domaine conformationnel constitué de différentes régions intracellulaires, est aussi corroborée par le fait, que jusqu'à présent, aucune séquence consensus de couplage n'ait pu être mise en évidence.*



**Figure 4: Cycle d'activation des protéines G**

A l'état basal, la protéine G est hétérotrimérique et peut être précouplé à un RCPG. L'activation d'un RCPG par un agoniste va induire des changements conformationnels dans la protéine G. Ceux-ci permettent l'échange de GDP en GTP, réaction catalysée par le récepteur, et conduit à l'activation de la protéine G. La protéine G liée au GTP se dissocie en deux parties, la sous-unité  $\alpha$  liée au GTP et le complexe  $\beta\gamma$ . Ces deux parties vont agir sur des effecteurs cellulaires. L'hydrolyse du GTP lié à la sous-unité  $\alpha$  favorise le retour à l'état basal de la protéine G.



## B.4 Activation des protéines G

### B.4.1 Localisation cellulaire des sous-unités

Une étude récente a montré que les protéines G sont organisées en hétérotrimères préformés et déjà couplés au récepteur [72]. L'hétérotrimère  $\alpha\beta\gamma$  présente donc une localisation à proximité de la membrane. Cette proximité est due à la présence de différents motifs sur les sous-unités de la protéine G. Sur les protéines  $G\alpha_i$ , un motif consensus de N-myristoylation est présent, en plus d'une cystéine conservée en position 3. Sur les protéines  $G\alpha_s$  cette cystéine est thio-acétylée. Chez les protéines  $G\alpha_q$  et  $11$ , on retrouve deux cystéines en position 9 et 10, qui sont palmitoylées. D'autre part, le motif responsable de l'ancrage du complexe  $\beta\gamma$  à la membrane, est un motif Cys-A-A-X retrouvé en C-terminal des sous-unités  $G\gamma$  (Figure 4)[51].

### B.4.2. Liaison des protéines G aux récepteurs

*Précouplage du complexe protéine G-récepteur.* Deux modèles opposés ont été présentés pour expliquer comment les protéines G sont associées aux récepteurs activés. Dans le premier, le modèle collisionnel, les interactions sont la conséquence d'une diffusion latérale libre au sein de la membrane plasmique où les protéines G ne se lient qu'aux récepteurs activés [73]. Le second modèle, conformationnel, suggère que les protéines G peuvent interagir avec le récepteur avant que celui-ci ne se lie à son ligand, donnant ainsi un complexe récepteur-protéine G précouplé avant l'activation [72]. Dans ce modèle, l'activation relèverait d'un changement conformationnel au niveau de la protéine G hétérotrimérique. Pour étayer ce modèle conformationnel, des études de F.R.E.T (Fluorescence Resonance Energy Transfert) montrent qu'il existe une interaction basale entre le récepteur  $\alpha_2$ -adrénergique possédant une activité basale très faible et  $G\alpha_{i1}\beta_1\gamma_2$  [74]. Il est également rapporté que des changements conformationnels ont lieu entre les sous-unités de la protéine G lors de son activation. Ce modèle donne beaucoup d'importance à la disponibilité des différents sous-types de protéines G, plus ou moins représentés selon les types cellulaires. En effet, la spécificité et l'amplitude du signal activé par la protéine G seraient dépendants de la proportion de récepteur pré-complexé avec une combinaison spécifique de sous-unité  $G\alpha\beta\gamma$ . Cependant, bien que des résultats in-vitro suggèrent l'existence de récepteurs précouplés, ce modèle conformationnel ne suffit pas pour expliquer tous les paramètres d'activation comme par exemple la commutation du couplage de la protéine  $G_s$  à un

couplage à la protéine  $G_i$  par le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique lorsqu'il active la voie MAPKinase [75, 76].

*Domaines d'interaction de la protéine G au récepteur activé.* L'activation du RCPG ouvre une poche du côté cytoplasmique du récepteur pour permettre une interaction avec la partie C-terminale de la sous-unité  $G\alpha$ , qui est à ce jour le site de contact dans la protéine G le mieux caractérisé [75, 77]. En effet, l'utilisation de peptides mutés de la partie C-terminale de  $G\alpha$  a révélé l'importance de cette région dans l'interaction. De plus, certaines mutations de cette partie C-terminale de la sous-unité  $G\alpha$  provoquent le découplage de la protéine G. Dans le cas de la protéine  $G\alpha_s$ , de telles mutations sont associées avec une ostéodystrophie héréditaire d'Albright [78].

D'autres régions de  $G\alpha$ , ont été impliquées grâce à des études de mutagenèse dirigée (alanine scan), des constructions chimériques et des études de « cross-linking ». On trouve, la boucle  $\alpha_3$ - $\beta_5$  ainsi que l'hélice  $\alpha$ N-terminale [75].

Enfin, les mêmes approches expérimentales ont permis de mettre en évidence le rôle de la sous-unité  $G\beta\gamma$  requise pour stabiliser l'interaction  $G\alpha$ -récepteur.

Toutes ces études ont délimité une région d'interaction de la protéine G avec le récepteur. Cependant cette région moléculaire apparaît trop grande pour n'interagir qu'avec une seule molécule de récepteur. Cette observation est en faveur d'un rôle de la dimérisation de récepteur et/ou un mécanisme d'interaction séquentielle du récepteur avec les différentes régions d'interactions sur la protéine G conduisant à son activation.

*Spécificité de l'interaction protéine G-récepteur.* Chaque membre de la famille des protéines G doit être capable d'interagir avec un grand nombre de récepteurs différents. Néanmoins, peu de types de protéines G existent pour transmettre le signal d'une grande variété de RCPG, et beaucoup de RCPG sont capables d'activer de multiples voies de signalisation dépendantes des protéines G. Ainsi, des déterminants moléculaires sont probablement présents permettant de « guider » l'interaction d'une protéine G donnée avec un récepteur particulier. Nous avons parlé précédemment (cf partie B.3.2) des déterminants présents sur les RCPG ; c'est pourquoi nous considérerons ici uniquement les déterminants moléculaires identifiés sur les protéines G.

Toutes les régions de la protéine G impliquées dans l'interaction avec le récepteur sont également impliquées dans la spécificité du couplage. Des chimères de la partie C-terminale de la sous-unité  $G\alpha$  ont été utilisées fréquemment pour intervertir le couplage d'un certain récepteur à un effecteur donné. Par exemple, le remplacement de l'extrémité C-terminale de  $G\alpha_i$  par celle de  $G\alpha_q$  résulte en l'activation d'une protéine  $G_q$  chimérique par un récepteur couplé normalement à  $G_i$  mais qui stimule la voie phospholipase C (effecteur d'une

protéine  $G_q$ ). Des mutations ont aussi montré des altérations du couplage protéine G-récepteur [75].

D'autres déterminants moléculaires dans  $G\alpha$  sont la partie N-terminale, précisément la boucle  $\alpha N$ - $\beta 1$ , la boucle  $\alpha 2$ - $\beta 4$  et la boucle  $\alpha 3$ - $\beta 5$ . Des études suggèrent que la spécificité de couplage implique une interaction coopérative et subtile de ces différents domaines de la partie N-terminale de  $G\alpha$ . Cependant, des données indiquent que ces déterminants moléculaires seraient différents selon la famille de protéines G considérée. De plus, il a été rapporté l'existence d'un site distant du lieu d'interaction protéine G-récepteur important dans le contrôle du couplage [75, 79].

La sous-unité  $G\alpha$  n'est pourtant pas seule à déterminer la spécificité du couplage, des données démontrent que des isoformes de  $G\beta$  interagissent préférentiellement avec certains récepteurs. En effet, dans une étude mesurant la capacité du récepteur  $\beta 1$ -adrénergique et adénosine A2A à coupler les cinq dimères  $G\beta\gamma_2$ , les auteurs rapportent que  $G\beta_4$  présente le couplage le plus robuste alors que  $G\beta_5$  n'est que très peu capable de se coupler. De manière intéressante,  $G\beta_1$  a la même capacité de couplage au  $\beta 1$ -adrénergique que  $G\beta_4$ , alors que sa capacité de couplage est vingt fois moins forte lorsqu'il s'agit du récepteur adénosine A2A [80].

La sous-unité  $G\gamma$  joue aussi un rôle dans la spécificité de couplage récepteur-protéine G. Par exemple, le récepteur muscarinique M2 n'interagit pas avec la protéine  $G\alpha_o$  contenant le dimère  $G\beta_1\gamma_2$  alors que ce récepteur peut interagir avec  $G\beta_1\gamma_5$  et  $G\beta_1\gamma_7$  [81]. Il est rapporté que le déterminant principal de la spécificité de  $G\gamma$  est contenu dans la partie C-terminale de  $G\gamma$  [82].

En résumé, les protéines G seraient à l'état basal déjà précouplés au RCPG, et leur activation résulterait de changement conformationnel de la protéine G induit par les changements conformationnel du RCPG. Il existe plusieurs sites d'interaction des protéines G avec le récepteur mais un des mieux caractérisé est l'extrémité C-terminale de la sous-unité  $G\alpha$ . La spécificité de l'interaction protéine G-récepteur est dépendante de nombreuses régions moléculaires de la sous-unité  $G\alpha$  mais aussi de  $G\beta$ .

### **B.4.3 Mécanismes d'activation des protéines G**

L'activation des protéines G par les RCPG se fait par un mécanisme double qui implique des changements conformationnels au niveau des sous-unités de la protéine G et l'échange de GDP par du GTP. Le récepteur, une fois activé, agit comme catalyseur de la

réaction d'échange de GDP par du GTP au niveau de la protéine G, on dit que le récepteur est une protéine GEF (Guanine Exchange Factor). L'échange de GDP par du GTP se fait au niveau du site actif de la sous-unité  $\alpha$ . Le processus moléculaire de l'échange se fait donc en deux étapes, d'une part la libération du GDP lié à l'état basal à la sous-unité  $\alpha$  suivie de la liaison du GTP entraînant la séparation du complexe hétérotrimérique en  $G\alpha$  lié au GTP d'un côté et le dimère  $\beta\gamma$  de l'autre. La sous-unité  $G\alpha$  et le dimère  $\beta\gamma$  vont ensuite activer des effecteurs spécifiques. La sous-unité  $G\alpha$ -GTP active ses effecteurs en hydrolysant le GTP grâce à son domaine GTPase se retrouvant à l'état inactif lié au GDP. Ce retour à l'état inactif de  $G\alpha$  lié au GDP, permettant la reconstitution du complexe trimérique, est accéléré par l'action de protéines appelés RGS (Regulator of G-protein signaling), ces mécanismes seront détaillés dans la partie « C.4 Désensibilisation des RCPG ». L'étape limitante dans l'activation de la protéine G est donc la dissociation du GDP de la sous-unité  $\alpha$ . Ceci a donné lieu à de nombreux travaux ayant pour but de comprendre les mécanismes moléculaires régissant la libération du GDP par  $G\alpha$  (Figure 4).

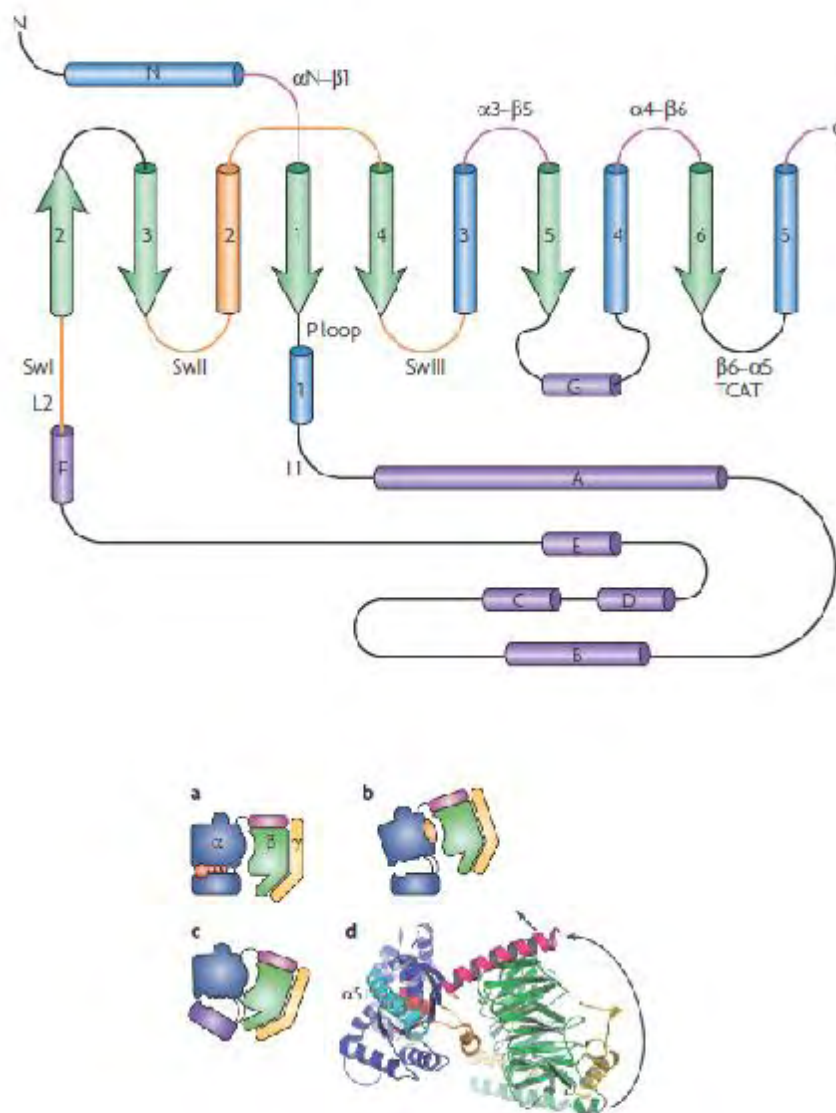
#### B.4.3.a Libération du GDP par la sous-unité $G\alpha$

Les récepteurs activés catalysent la dissociation du GDP de la sous-unité  $G\alpha$ , et jusqu'à ce que le GTP se lie, un complexe de haute affinité est formé entre le récepteur et la protéine G. Les modèles courants montrent que la poche de liaison du GDP de  $G\alpha$  est à une distance d'environ 30Å du site de contact du récepteur le plus proche [83]. Ces données ont permis de déduire que le récepteur doit probablement induire à distance un changement conformationnel dans la protéine G provoquant la libération du GDP (Figure 5).

Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer comment le récepteur modifie l'orientation relative des sous-unités  $G\alpha$  et  $G\beta\gamma$  pour provoquer la libération du GDP de  $G\alpha$ .

Le modèle en bras de levier « lever arm model » : Dans ce modèle, le récepteur utilise l'hélice  $\alpha N$  (en rose sur le schéma) comme levier pour éloigner la sous-unité  $G\beta\gamma$  de  $G\alpha$ . Ceci a pour conséquence d'écarter les boucles Switch I et Switch II (orange sur schéma) de  $G\alpha$ , par rapport à la poche de liaison du GDP permettant ainsi sa libération. Une étude montre que la délétion de 4 acides aminés dans la partie C-terminale de l'hélice  $\alpha N$ , visant à mimer l'orientation de cette hélice induite par le récepteur, permet à  $G\beta\gamma$  de se comporter comme un facteur d'échange (GEF) pour  $G\alpha$  (Figure 5) [84].

Le « gear shift » modèle : Ce modèle suggère non pas un éloignement mais un rapprochement de  $G\beta\gamma$  par rapport à  $G\alpha$ . En effet, il est proposé que le récepteur utilise l'hélice  $\alpha N$  de  $G\alpha$  pour « pousser » la sous-unité  $\beta\gamma$  proche de  $G\alpha$ . Ceci autorise la partie N-



**Figure 5: Structure secondaire de la sous-unité  $G\alpha$  et modèle de libération du GDP par la sous-unité  $G\alpha$**

En haut, structure secondaire de la sous-unité  $G\alpha$ . En bas, modèle de libération du GDP par la sous-unité  $\alpha$  lors de l'activation de la protéine G. a) Etat basal b) Modèle du bras de levier c) Modèle "Gear Shift" d) Modèle alternatif rotatif - Bleu : sous-unité  $\alpha$  ; Vert : sous-unité  $\beta$  ; Jaune : sous-unité  $\gamma$ . (D'après Oldham et al. 2008)

terminale (jaune sur le schéma) de  $G\gamma$  à s'engager dans le domaine en hélice de  $G\alpha$  (en violet sur le schéma). Cette interaction provoquerait l'ouverture de l'interdomaine vide entre le domaine en hélice et le domaine GTPase de  $G\alpha$ , aboutissant à la libération du GDP (Figure 5) [85].

Cependant une troisième alternative semblerait également possible. Il apparaîtrait que  $G\beta\gamma$  pourrait tourner autour d'un axe perpendiculaire au plan de la membrane plasmique (flèche courbée sur le schéma) pendant la formation du complexe récepteur-protéine G. Ce modèle est supporté par des approches de « site-directed spin labeling » (SDSL). Réalisées grâce à l'intégration de chaînes latérales nitroxyde dans les boucles Switch I et Switch II de la sous-unité  $G\alpha$ , suivie d'une analyse de spectroscopie EPR (Electron Paramagnetic Resonance), ces études montrent une grande mobilité de la boucle Switch I et une mobilité très réduite de la boucle Switch II suggérant un mouvement rotatoire (Figure 5) [86, 87].

#### **B.4.3.b Liaison du GTP et dissociation du complexe trimérique**

Physiologiquement, l'état récepteur activé en complexe avec la protéine G est un état très transitoire du fait de la liaison rapide du GTP qui est en large excès par rapport au GDP dans le milieu cellulaire. La liaison du GTP à la sous-unité  $G\alpha$  entraîne un réarrangement structural du  $G\alpha$ -GTP, de  $G\beta\gamma$  et du récepteur, ce qui permet la dissociation du récepteur et l'interaction avec des effecteurs. Une comparaison entre les cristaux du complexe hétérotrimérique à l'état basal et de la sous-unité  $G\alpha$  liée à un analogue non hydrolysable du GTP, le  $GTP\gamma S$ , révèle que des changements conformationnels au niveau des trois régions Switch de  $G\alpha$  éliminent la région d'interaction avec  $G\beta\gamma$ , provoquant ainsi la séparation du complexe. Cependant, la similarité de structure entre ces deux cristaux suggère que la séparation de la protéine G du récepteur est probablement causée par un retour à la conformation initiale après des changements conformationnels dans le sens inverse de ceux qui ont conduit à la libération du GDP [75].

Le GDP peut aussi provoquer la dissociation du complexe et partage la même affinité que le GTP pour le site de liaison de  $G\alpha$ . Ainsi, l'activation de la protéine G est possible grâce à la concentration cellulaire de GTP nettement supérieur à celle du GDP et à un réarrangement structural de  $G\alpha$  et  $G\beta\gamma$  suivant la liaison du GTP qui « verrouille » le processus d'activation [46, 88].

Il est important de noter que la dissociation de la protéine G du récepteur n'est pas un événement obligatoire pour l'activation d'effecteurs selon le récepteur considéré. En effet, dans des systèmes cellulaires, le récepteur activé et certaines sous-unités des protéines G

restent associés pour activer des effecteurs intracellulaires alors que d'autres sous-unités se dissocient du récepteur [89, 90].

*Il ressort de ces études que l'activation des protéines G nécessite des changements conformationnels de la protéine G qui permettent séquentiellement la libération du GDP par la sous-unité  $G\alpha$  puis la liaison du GTP à cette sous-unité. Cette dernière étape aboutit la plupart du temps à la dissociation des sous-unités  $G\alpha$  et  $G\beta\gamma$  qui activent alors des effecteurs.*

## **B.5 Effecteurs des protéines G**

L'activation de la protéine G hétérotrimérique donne lieu à la dissociation dans certains cas, ou à un réarrangement conformationnel dans d'autres cas, du trimère  $\alpha\beta\gamma$ . Les premières études sur l'activation d'effecteurs ont laissé penser que seule la sous-unité  $G\alpha$  était capable d'activer des effecteurs intracellulaires. Maintenant, il est bien reconnu qu'aussi bien  $G\alpha$  et le dimère  $G\beta\gamma$  sont capables d'activer des effecteurs intracellulaires spécifiques.

### **B.5.1 Les effecteurs activés par la sous-unité $G\alpha$**

#### *L'adénylate-cyclase (AC)*

Cet effecteur est probablement l'un des mieux connus, à l'heure actuelle. L'adénylate-cyclase est une enzyme, stimuable par la forskoline, qui synthétise de l'AMP cyclique à partir de l'ATP. La réaction nécessite du magnésium ( $Mg^{2+}$ ) et provoque la libération de pyrophosphate. L'AMPc devient à son tour activateur de la protéine kinase A (PKA). L'adénylate cyclase est activée spécifiquement par la sous-unité  $G\alpha_s$  liée au GTP alors qu'elle est inhibée spécifiquement par la protéine  $G\alpha_i$ -GTP. Dans un système cellulaire, l'activité des sous-unités  $G\alpha_s$  et  $G\alpha_i$  est quantifiée grâce à la mesure d'AMPc nouvellement synthétisé, notamment au moyen d'AMPc tritié. Plus récemment, un autre système de mesure a été mis au point, en utilisant un biosenseur de l'activation de l'AMPc. Ce biosenseur est la protéine Epac, cible de l'AMPc via la PKA, flanqué d'une YFP (yellow fluorescent protein) et d'une Rluc (Renilla Luciferase) en C- et N-terminal de la protéine. Quand le biosenseur est à l'état basal, la YFP et la Rluc sont proches et un transfert d'énergie (B.R.E.T.) se produit en présence du substrat de la luciférase. Quand la protéine Epac est activée, un changement conformationnel éloigne la YFP de la Rluc, entraînant ainsi, une disparition du signal B.R.E.T.

### *La phosphodiesterase (PDE)*

La phosphodiesterase est une enzyme qui hydrolyse le GMPc en 5'-GMP. Ce type d'enzyme est notamment présent dans la rétine. Une photo-excitation de la rhodopsine, entraîne l'activation de la sous-unité  $G\alpha_t$  ( $G\alpha$  transducine). Cette sous-unité  $G\alpha_t$  va ensuite activer à son tour la phosphodiesterase présente dans les cellules photo-réceptrices. Le GMPc a pour fonction de maintenir ouverts les canaux sodiques à l'origine de la dépolarisation du nerf optique. L'hydrolyse du GMPc par la PDE entraîne la fermeture des canaux et une hyperpolarisation de la membrane plasmique. Il existe plusieurs types de phosphodiesterases (GMPc ou AMPc phosphodiesterases). Certaines d'entre elles peuvent être activées par la sous-unité  $G\alpha_t$ .

### *La phospholipase C (PLC)*

L'activation de la phospholipase C par les sous-unités de la classe  $G\alpha_q$  aboutit à la synthèse du diacylglycérol (DAG) qui reste au contact de la membrane lipidique et d'inositol 1,4,5 triphosphate ( $IP_3$ ) qui diffusent dans le cytoplasme à partir du phosphatidylinositol 4,5-biphosphate ( $PIP_2$ ) membranaire. Des phospho-inositol kinases régénèrent le  $PIP_2$  à partir de l' $IP_3$ . L' $IP_3$  diffuse dans le cytoplasme et va agir sur les canaux calciques afin de provoquer la libération de calcium contenu dans les réservoirs du réticulum endoplasmique. L'élévation du calcium libre intracytoplasmique entraîne l'activation d'un certain nombre de processus dépendants du calcium et notamment une protéine prenant en charge le calcium, la calmoduline. Le complexe calcium-calmoduline peut activer d'autres enzymes telles que l'AMPc phosphodiesterase, la GMPc phosphodiesterase, la phospholipase A2. Le DAG est un activateur de la protéine kinase C (PKC) membranaire. La PKC catalyse, en présence obligatoire de calcium, la phosphorylation d'un grand nombre de substrats intervenant dans la différenciation cellulaire, la mitose, l'exocytose, et d'autres processus cellulaires.

### *Les protéines RhoGEF*

Les protéines RhoGEF sont des facteurs d'échange de nucléotides des RhoGTPases. Les RhoGEF sont au nombre de quatre et jouent le rôle de RGS pour la famille  $G_{12/13}$ . En effet, elles fonctionnent comme des GAP (GTPase-activating protein) pour les protéines  $G_{12/13}$  et la liaison à ce type de protéines G stimulent leur activité GEF (guanine exchange factor) ce qui contribue à l'activation de voies de signalisation dépendantes des RhoGTPases. Les RhoGTPases, telles que RhoA, sont notamment impliquées dans les processus de remodelage du cytosquelette, de contrôle de la forme de la cellule, de migration cellulaire, d'adhérence, de mitose et d'autres processus pour la plupart en relation avec le cytosquelette [91].



*Autres effecteurs des sous-unités  $G\alpha$* 

D'autres types de phospholipases telles que les phospholipases D et A2 peuvent également être activées par des sous-unités  $G\alpha$ . La GMP cyclase est également un effecteur des protéines G. De plus, certains canaux ioniques notamment à conductance potassique ou calcique voient leur activité modulée par certaines sous-unités de la classe  $G_i\alpha$ .

**B.5.2 Les effecteurs activés par la sous-unité  $G\beta\gamma$** 

Le complexe  $G\beta\gamma$  ne voit pas sa conformation évoluer lorsqu'il est dissocié de  $G\alpha$ . Ce complexe  $\beta\gamma$  a d'abord été considéré comme un point d'ancrage à la membrane pour la sous-unité  $G\alpha$ . En fait, le dimère  $\beta\gamma$  est capable d'activer une multitude d'effecteurs. En effet, il agit directement sur des canaux à courant potassique (GIRK) donnant lieu à l'ouverture de ces canaux. Le complexe  $\beta\gamma$  peut aussi activer la phospholipase A2 et certaines phospholipases  $\beta$ . Ce dimère peut activer certains types d'adénylate cyclase, mais aussi la PI3Kinase et activer la voie MAPKinase par des mécanismes faisant intervenir Src [92, 93]. De manière intéressante, l'activité de GRK2 et GRK3 est augmentée par  $G\beta\gamma$ , ce qui suggère un rôle de rétrocontrôle négatif de cette sous-unité  $\beta\gamma$  en favorisant la désensibilisation (voir partie désensibilisation) [93].

Les effecteurs activés peuvent varier selon les sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  considérées. Ainsi, la phospholipase C interagit préférentiellement avec le complexe  $\beta_1\gamma_1$ , alors que la sous-unité  $\beta_5$  semble plus spécifique de la stimulation de la PLC  $\beta$  que des MAP kinases. De même,  $\beta_3$ ,  $\beta_4$ ,  $\beta_5$  diffèrent de  $\beta_1$  et  $\beta_2$  par leurs interactions avec des fragments de l'AC2 et GIRK1 dans des expériences de double hybride [94].

Les protéines G peuvent activer de nombreux effecteurs intracellulaires qui eux-mêmes activent d'autres protéines. Par conséquent, les protéines sont à l'origine de nombreuses voies de transduction ce qui explique, en partie, l'implication des RCPG dans de nombreux processus physiologiques ou physiopathologiques.

### **B.5.3. Les protéines RGS : Regulator of G protein Signalling**

Bien que les protéines G soient capables d'hydrolyser le GTP, le processus est extrêmement lent et n'est pas représentatif de la vitesse à laquelle le signal des RCPG est arrêté *in vivo*. Dans le milieu des années 1990, une famille de protéines, les RGS, a été identifiée pour sa capacité à physiologiquement réguler le signal des RCPG. Les RGS ont été identifiés pour la première fois chez *Saccharomyces cerevisiae* pour leur rôle dans l'inhibition de la fonction des protéines G. Ces protéines sont des GAP (GTPase accelerating protein) et modulent le signal des RCPG en accélérant le taux d'hydrolyse du GTP par la sous-unité  $G\alpha$ , réduisant ainsi la durée et l'amplitude du signal des RCPG dépendant des protéines G. Aujourd'hui une trentaine de RGS ont été découvertes et interagissent principalement avec les protéines  $G_q$  et  $G_{i/o}$ . A ce jour, il n'est pas fait état de protéine RGS qui se lie aux sous-unités  $G_s$  [95].

Il existe quatre familles de RGS, R4, R7, R12, et RZ. Ces familles ont été créées sur la base de l'homologie de séquence des différentes RGS. Ces protéines présentent toutes un domaine RH (RGS-Homology) qui leur confère la capacité de liaison à la sous-unité  $G\alpha$ . Cependant elles présentent aussi d'autres domaines d'interactions avec des protéines laissant penser que les RGS pourraient avoir des fonctions cellulaires bien plus importantes que le simple rôle de terminaison du signal des RCPG dépendant des protéines G. La fonction GAP des RGS peut être modulée par des phospholipides endogènes, notamment en étant palmitoylé. Les RGS sont spécifiques vis-à-vis des sous-unités  $G\alpha$  mais également vis-à-vis des récepteurs [95].

Les RGS sont donc impliqués dans de nombreuses fonctions physiologiques (cardiaques, central nervous system...) et physiopathologiques (cancers) et constituent une famille cible de choix pour le développement de nouvelles molécules à visée thérapeutique.

## **C] Internalisation des Récepteurs couplés aux protéines G**

Les récepteurs couplés aux protéines G sont, pour la plupart, rapidement internalisés après stimulation par leur ligand. L'étude de ce phénomène s'est particulièrement développée depuis une quinzaine d'années et a engendré une masse considérable d'informations. La vision des mécanismes et du rôle de l'internalisation des RCPG a grandement évolué, partant d'un simple rôle de régulation du niveau de récepteurs

membranaires et de désensibilisation du signal jusqu'à l'apparition des, très récents, concepts de signaux de transduction émis spécifiquement par des RCPG internalisés.

## **C.1. Généralités sur l'endocytose des RCPG**

L'endocytose est un processus fondamental de la vie d'une cellule ; il consiste à internaliser des portions de la membrane plasmique contenant des protéines membranaires vers des compartiments intracellulaires appelées endosomes. Parmi les protéines membranaires internalisées on retrouve des récepteurs et notamment des récepteurs couplés aux protéines G. L'endocytose peut être dépendante du ligand comme c'est le cas pour la majorité des RCPG mais également se faire de manière constitutive comme dans le cas de récepteurs impliqués dans l'approvisionnement de la cellule en nutriments. Les processus d'endocytoses sont indispensables au bon fonctionnement physiologique de la cellule mais constituent également une porte d'entrée pour de nombreux virus.

Dans le cas des récepteurs couplés aux protéines G, l'internalisation requiert une étape, appelé désensibilisation, qui initie et permet de mobiliser la machinerie d'endocytose. Cette désensibilisation consiste en la terminaison du signal transduit par les protéines G. La voie majeure d'internalisation des RCPG est la voie dite dépendante de la clathrine, qui passe par des structures spécialisées de la membrane plasmique, appelées puits recouverts de clathrine. Selon le RCPG considéré, le mécanisme par lequel cette voie clathrine est empruntée diffère et il est également reconnu que certains RCPG sont capables d'être internalisés via une autre voie d'endocytose non dépendante de la clathrine, la voie des cavéoles. Après avoir été internalisé, un RCPG peut être recyclé à la membrane ou être dégradé. Cet engagement du récepteur vers une voie de recyclage ou de dégradation est fonction du récepteur considéré, mais est également fonction du ligand.

## **C.2 Désensibilisation des RCPG**

La désensibilisation est un processus de régulation crucial pour la cellule. Il consiste à contrôler finement la durée de la stimulation cellulaire induite par un RCPG donné, empêchant une stimulation excessive. Le rôle de la désensibilisation a été montré sur des modèles cellulaires in-vitro mais aussi sur des modèles animaux dans lesquels ces voies de désensibilisation sont volontairement modifiées. La désensibilisation est un phénomène qui est aussi très connu dans le domaine thérapeutique puisque l'administration prolongée ou répétée de médicaments se traduit par une diminution importante de leur efficacité

thérapeutique. C'est notamment le cas pour les médicaments analgésiques opioïdes ou encore les bronchodilatateurs  $\beta$ -adrénergiques.

On distingue deux types de désensibilisation, la désensibilisation homologue et hétérologue. La désensibilisation homologue est la perte de réponse d'un RCPG à la suite de sa stimulation par un agoniste. La désensibilisation hétérologue est la perte de réponse d'un RCPG, à la suite de la stimulation d'autres récepteurs, notamment par l'intermédiaire des kinases activées par les seconds messagers. La désensibilisation homologue se cantonnerait à des changements adaptatifs à l'échelle du RCPG concerné, alors que la désensibilisation hétérologue peut aussi impliquer des changements de la part de composants de voies de transduction associés au RCPG.

Le rôle de la désensibilisation a longtemps été discuté, du fait qu'il apparaît comme un phénomène très intriqué avec le phénomène d'endocytose. Le processus d'endocytose a été considéré comme participant à la désensibilisation du fait de la diminution du nombre de récepteurs émettant un signal à la surface de la membrane [96]. Mais la faible contribution de l'internalisation des RCPG à la diminution du signal ne peut expliquer à elle seule, la désensibilisation. Il a donc été proposé que l'endocytose soit un élément qui limiterait la désensibilisation, puisque une partie des récepteurs internalisés sont recyclés à la membrane [97]. En réalité, la désensibilisation comprend plusieurs composantes : le découplage de la protéine G du récepteur, l'endocytose des récepteurs, la régulation négative (down-regulation) du nombre total de récepteurs dans la cellule du fait de la baisse de la synthèse d'ARNm et la dégradation des récepteurs internalisés dans les lysosomes. Cependant, l'endocytose et la « down-regulation » contribuent peu, d'une manière générale, au processus de désensibilisation rapide.

L'évènement le plus précoce, au cours de la désensibilisation, est la phosphorylation de thréonines et de sérines situées au niveau des boucles intracellulaires et de l'extrémité C-terminale des RCPG. Cette phosphorylation des RCPG démarre quelques secondes seulement après l'activation du récepteur par son agoniste [98]. Plusieurs types de protéines kinases sont responsables de la phosphorylation des RCPG activés, les protéines kinases dépendantes des seconds messagers et les protéines kinases associées au RCPG, les GRK (G protein coupled receptor kinase) [99, 100]. Ces phosphorylations peuvent avoir un effet direct sur le couplage des protéines G aux RCPG. Elles permettent également le recrutement aux récepteurs de deux protéines cytosoliques, les  $\beta$ -arrestines, qui vont provoquer le découplage des protéines G [101].

## C.2.1 Les protéines kinases dépendantes des seconds messagers

Les protéines kinases dépendantes des seconds messagers, PKA et PKC (respectivement protein kinase A et C), sont des phosphotransférases qui catalysent le transfert d'un groupe  $\gamma$ -phosphate de l'ATP à une sérine ou thréonine contenue à l'intérieur d'une séquence consensus d'une protéine donnée. Ces kinases PKA et PKC sont activées en réponse à l'augmentation intracellulaire de seconds messagers induits par un RCPG, tels que l'AMPc, le calcium, ou le DAG (diacylglycérol) et participent à la phosphorylation de protéines cibles en aval de la voie de signalisation du RCPG considéré. Cependant, ces kinases vont aussi phosphoryler les RCPG au niveau de sites consensus présents sur les boucles intracellulaires et l'extrémité C-terminale. C'est le cas du récepteur  $\beta$ 2-adrénérique dont la désensibilisation résulte de la phosphorylation par PKA d'au moins un des deux sites consensus présents dans la troisième boucle intracellulaire et dans la partie proximale de la queue C-terminale du récepteur [98]. Par ailleurs, l'activation de la PKC contrôle la phosphorylation et donc la désensibilisation de nombreux RCPG couplés aux protéines  $G_i$  et  $G_q$  [102]. Ces deux protéines kinases sont également capables de phosphoryler et donc de désensibiliser des récepteurs qui n'ont pas été activés et ne sont pas occupés par un agoniste [103].

Ces protéines kinases ont été longtemps considérées comme seules responsables de la désensibilisation des RCPG ; cependant, l'observation que le récepteur  $\beta$ 2-adrénérique pouvait être phosphorylé et désensibilisé en l'absence de PKA fonctionnelle dans un système cellulaire, a permis de suggérer l'existence d'autres protéines kinases capables de phosphoryler les RCPG [104].

## C.2.2 Le tandem GRK – $\beta$ -arrestines

### C.2.2.a Classification des GRK

L'identification de la première protéine kinase, indépendante des seconds messagers, capable de phosphoryler un RCPG activé par son agoniste a été une véritable révolution dans le domaine de la biologie des RCPG. Cette kinase a été, tout d'abord, nommée  $\beta$ -ARK ( $\beta$ -Adrenergic Receptor Kinase) pour sa capacité à phosphoryler le récepteur  $\beta$ -2 adrénérique activé [105]. La découverte d'autres protéines kinases similaires, a permis de les réunir en famille, appelée famille GRK (G protein coupled receptor kinase), la  $\beta$ -ARK étant renommée GRK2. Cette famille est en fait constituée de sept GRK différentes, qui ont été reclassées en trois sous-groupes selon leur distribution tissulaire et leur

sélectivité pour certains RCPG. Ces sous-groupes sont divisés de la manière suivante : (1) GRK1 et GRK7, respectivement les GRK de la rhodopsine et du récepteur « cone-opsin », (2) GRK2 et GRK3 exprimés de manière ubiquitaire, (3) GRK4 exprimée dans le cerveau, les reins et majoritairement dans les testicules, GRK5 et GRK6 exprimées de manière ubiquitaire. Ainsi, la majorité des RCPG sont plutôt régulés par GRK2, GRK3, GRK5 et GRK6.

### **C.2.2.b Structure des GRK**

Toutes les GRK ont une structure comprenant un domaine catalytique central très bien conservé et des domaines N-terminal et C-terminal variables. Le domaine N-terminal contient des sites de liaison à d'autres protéines et détermine la localisation intracellulaire de la GRK et ainsi sa spécificité pour un RCPG. De plus, la partie N-terminal de la GRK2 possède un domaine « RGS-like » qui lui permet d'inhiber le signal issu de l'activation d'une sous-unité  $G\alpha_q$  en séquestrant la sous-unité  $G\alpha_{q/11}$  [106]. Les GRK2 et GRK3 ont en commun un domaine C-terminal homologue à la Pleckstrine (PH) (principal substrat de la PKC dans les plaquettes) liant les sous-unités  $G\beta\gamma$  et le  $PIP_2$ . Ceci entraîne une translocation des GRK à la membrane plasmique près de leurs substrats que sont les récepteurs activés [107]. Ces deux kinases subissent donc une translocation membranaire induite par le ligand du RCPG considéré. Les GRK4, GRK5 et GRK6 ne présentent pas de domaine Pleckstrine et ne sont pas capables d'interagir avec les sous-unités  $G\beta\gamma$ . Par contre, elles utilisent un domaine d'interaction direct avec  $PIP_2$  et des acides aminés basiques qui interagissent avec les phospholipides de la membrane. Ces trois kinases sont donc présentes de manière constitutive à la membrane plasmique indépendamment de l'activation des RCPG [106].

### **C.2.2.c Mode d'action des GRK et $\beta$ -arrestines**

Les GRK phosphorylent des sérines et thréonines localisées dans les domaines intracellulaires des RCPG, notamment au niveau de la troisième boucle intracellulaire et de la queue C-terminale. Le site de phosphorylation peut varier selon le RCPG. Par exemple, les récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergique et muscarinique M2 ont une extrémité C-terminale relativement courte avec peu de sérine/thréonine, alors que leur troisième boucle intracellulaire en présente un nombre important. A l'inverse, la rhodopsine ou le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique présentent une troisième boucle intracellulaire relativement courte avec peu de motif sérine/thréonine alors que leurs extrémités C-terminale sont plus longues et riches

en sérines/thréonines. La mutation de toutes les sérines/thréonines en alanine de l'extrémité C-terminale du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique ou de la troisième boucle intracellulaire du récepteur muscarinique M2 abolit complètement la phosphorylation de ces récepteurs par les GRK [98, 108].

Une étude a montré que la phosphorylation par les GRK n'est pas suffisante pour produire une désensibilisation de la réponse d'un récepteur, suggérant l'intervention d'une protéine tiers dans le processus de désensibilisation [109]. Ceci était en accord, avec la découverte quelques années plus tôt d'une nouvelle famille de protéines régulatrices, les  $\beta$ -arrestines, capables de se lier avec une haute affinité au RCPG phosphorylés par les GRK [101]. Les  $\beta$ -arrestines sont des protéines régulatrices qui, au-delà, de leur capacité à découpler les protéines G des RCPG phosphorylés, jouent un rôle central dans l'internalisation et le trafic intracellulaire des RCPG. Les caractéristiques détaillées des  $\beta$ -arrestines et leur multiples rôles cellulaires seront abordés dans la partie suivante (mécanismes d'internalisation des RCPG dépendants des  $\beta$ -arrestines) et dans le chapitre suivant (transduction du signal indépendante des protéines G : rôle des  $\beta$ -arrestines).

Un modèle de référence de la désensibilisation potentiellement applicable à tous les RCPG a été établi. Dans ce modèle, les sérines et thréonines de la troisième boucle intracellulaires ou de l'extrémité C-terminale du RCPG activé sont les substrats des GRK qui phosphorylent ces acides aminés. La phosphorylation de ces motifs sur les RCPG, augmente l'affinité des régions phosphorylées pour les  $\beta$ -arrestines, qui se lient au RCPG et provoquent le découplage par gêne stérique de la protéine G du récepteur, entraînant ainsi la désensibilisation de la réponse [110]. Dans ce modèle, l'occupation du récepteur par un agoniste est cruciale. En effet une étude a montré, en utilisant la technique de F.R.E.T que le retrait du ligand provoque la dissociation rapide du complexe récepteur  $\beta$ 2-adrénergique- $\beta$ -arrestine [111].

#### **C.2.2.d Régulation des GRK**

Comme nous l'avons vu précédemment, les GRK occupent un rôle crucial en assurant l'initiation de la désensibilisation des RCPG. Ces protéines kinases sont fortement régulées à différents niveaux.

Régulation des GRK par interactions intramoléculaires. Des données biochimiques et de modélisation moléculaire suggèrent l'existence d'interactions intramoléculaires parmi les régions N-terminale, C-terminale et le domaine catalytique de GRK2. Celles-ci maintiendraient l'enzyme dans un état inactif. Ces contacts intramoléculaires permettraient

des changements conformationnels menant à sa translocation membranaire et à son activation [112].

Régulation des GRK par interactions avec d'autres protéines. L'association des GRK2 ou encore GRK5 avec des protéines telles que l' $\alpha$ -actinine, la clathrine, la calmoduline ou la cavéoline semble participer au contrôle de l'activité et de la distribution subcellulaire de ces kinases [112, 113].

Régulation des GRK par phosphorylation. La phosphorylation de GRK2 par différentes kinases telles que PKA, PKC ou Src provoque l'augmentation de la translocation membranaire et de l'activité de cette kinase. A l'inverse, la phosphorylation de GRK2 par ERK diminue ces deux paramètres. Cette phosphorylation de GRK2 serait un élément de régulation fine de l'interaction entre la sous-unité  $G\beta\gamma$  et cette kinase [114].

Régulation des GRK par modulation de la transcription. Peu d'exemples de régulation de l'expression des GRK existent. Le TGF- $\beta$  induit l'expression de GRK2 dans des cellules d'hépatocarcinomes ainsi que dans des cellules musculaires lisses vasculaires. A l'inverse, dans des cellules musculaires lisses aortiques, des cytokines pro-inflammatoires diminuent l'expression de GRK2 suggérant qu'il existe un contrôle fin de la transcription des GRK, probablement par des « cross talk » de différentes voies de signalisation [114].

Régulation des GRK par la dégradation protéique. La stabilité des GRK est également importante dans la régulation de ces kinases. La GRK2 est rapidement dégradée par le protéasome, et il a été montré que l'ubiquitinylation et le renouvellement de GRK2 sont augmentés par l'activation du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique. En effet, l'activation du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique provoque la phosphorylation de GRK2 par Src et des protéines kinases de la famille MAPKinases via un mécanisme dépendant des  $\beta$ -arrestines. A l'inverse, l'activation des voies PI3kinase/Akt par des agonistes comme IGF-1 augmente la stabilité de GRK2 [115].

#### **C.2.2.e Autres rôles des GRK**

Des données récentes indiquent que les GRK peuvent aussi réguler des voies de signalisation induites par des récepteurs tyrosine kinases tels que le récepteur à l'insuline, PDGF, ou l'EGF [114]. En effet, l'activation du récepteur EGF peut promouvoir le recrutement de GRK2 et la phosphorylation des acides aminés tyrosines de GRK2, ce qui a pour conséquence d'augmenter son activité catalytique et d'induire la régulation négative du récepteur opoïde [116].

La GRK2 contribue à moduler la réponse cellulaire par la phosphorylation de nombreuses protéines telles que la tubuline, les synucléines, la phosphoducine, la protéine



ribosomale P2, la sous-unité  $\gamma$  inhibitrice de la GMPc phosphodiesterase, une sous-unité du canal épithélial  $\text{Na}^+$ , la protéine Ezrin de la famille ERM, la protéine de liaison au calcium DREAM,  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ , et p38 MAPKinase. Cependant la GRK2 module l'activité d'autres protéines par un mécanisme indépendant de la phosphorylation de sérines/thréonines comme c'est le cas pour la PI3kinase, la clathrine, la cavéoline, Akt, la GTPase Ra1A et APC[114].

Cet interactome de la GRK2, montre que cette kinase est au centre d'un véritable réseau de protéines de la signalisation, suggérant que le rôle des GRK est bien plus complexe que celui de simple régulateur du signal RCPG.

### **C.2.3 Autres kinases impliquées dans la désensibilisation**

Une autre kinase, la caséine kinase  $1\alpha$  est capable de phosphoryler la troisième boucle intracellulaire du récepteur muscarinique M3 après activation du récepteur par son ligand. Cette phosphorylation est bloquée par la surexpression d'un dominant négatif de la caséine kinase  $1\alpha$  et également d'un peptide mimant la séquence de la troisième boucle intracellulaire du récepteur muscarinique [117]. Une étude plus récente montre que l'invalidation du gène de la caséine kinase  $1\alpha$  provoque l'augmentation de calcium intracellulaire après l'activation du récepteur muscarinique M3 [118]. Cependant, malgré la présence de nombreux motifs consensus de phosphorylation pour la caséine kinase  $1\alpha$  dans la troisième boucle intracellulaire et l'extrémité C-terminale de plusieurs RCPG, les conséquences fonctionnelles de cette phosphorylation ne sont toujours pas élucidées.

### **C.2.4. Mise à jour du modèle classique de désensibilisation**

Le modèle classique de désensibilisation des RCPG selon lequel les  $\beta$ -arrestines viennent découpler la protéine G du récepteur en se liant à un domaine intracellulaire du récepteur phosphorylé par les GRK, nécessite probablement quelques ajustements. Un nombre grandissant de cas de désensibilisation de RCPG ne rentrent pas dans le cadre du modèle classique.

Dans le modèle classique, la phosphorylation de domaines intracellulaires par les GRK est une étape nécessaire pour le recrutement des  $\beta$ -arrestines au récepteur ; cependant, dans le cas du récepteur leukotriène B<sub>4</sub>, le recrutement  $\beta$ -arrestines se fait d'une manière dépendante de la dose de ligand mais sans phosphorylation du récepteur [119]. La phosphorylation par la PKA du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique conduit au découplage de  $G_s$  et

donc à l'arrêt de l'activation d' adénylate-cyclase, mais conduit également à commuter vers un couplage à la protéine  $G_i$ , ce qui provoque l'inhibition de l'adénylate cyclase [120]. De plus, la GRK2 et la GRK3 peuvent désensibiliser respectivement le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique et des récepteurs couplés à  $G_q$  grâce à leur domaine « RGS-like » qui leur permet de découpler les protéines G de ces récepteurs. Par ailleurs, l'idée même d'internalisation nécessaire pour la déphosphorylation et la resensibilisation a été remise en cause, sur la base de données récentes montrant que le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique peut subir une déphosphorylation tout en restant à la membrane plasmique [121]. Dans le cas du récepteur mGluR4, il n'y a pas de désensibilisation ni d'internalisation dépendantes de l'activation de ce récepteur par un ligand, mais la désensibilisation et l'internalisation se produisent lors de l'activation de la PKC [122]. De plus, la phosphorylation par la PKC pourrait permettre l'association des  $\beta$ -arrestines avec le récepteur dopamine D2 et le récepteur  $\delta$ -opioïde [123, 124]. De manière intéressante, la phosphorylation du récepteur dopamine D3 par PKC mène à la désensibilisation indépendante des GRK et des  $\beta$ -arrestines, dans un processus nécessitant une interaction du récepteur avec la filamine A, une protéine de liaison à l'actine [125].

Les deux principaux systèmes responsables de la désensibilisation produite par l'action des kinases dépendantes des seconds messagers et par les GRK sont interconnectés mais semblent avoir chacun une place bien distincte dans le fonctionnement cellulaire. En effet, il a été rapporté que les kinases dépendantes des seconds messagers et les GRK sont capables de phosphoryler et désensibiliser le même récepteur [126]. Dans le cas du récepteur  $\beta_2$ -adrénergique, il est connu que la PKA phosphoryle un motif dans la troisième boucle intracellulaire alors que les GRK phosphorylent un motif au niveau de l'extrémité C-terminale [127, 128]. Ces deux événements sont toutefois indépendants, et la seule différence est la concentration d'agoniste requise pour déclencher la phosphorylation. De faibles concentrations nanomolaires sont nécessaires pour que la PKA phosphoryle le  $\beta_2$ -adrénergique, alors que la phosphorylation par la GRK nécessite de bien plus fortes concentrations en agoniste [129]. Il est également important de garder en mémoire que la phosphorylation des GRK2 par la PKA et la PKC entraîne une augmentation de l'activité catalytique de la GRK. Ainsi il a été suggéré, que la phosphorylation par la GRK représente une forme importante de désensibilisation du récepteur  $\beta_2$ -adrénergique au niveau des terminaisons nerveuses noradrénergiques ou les récepteurs post-synaptiques sont en contact avec de fortes concentrations d'agoniste pendant des périodes de grande activité neuronale. A l'inverse, la phosphorylation du  $\beta_2$ -adrénergique par PKA, interviendrait plutôt dans les autres tissus tels que les vaisseaux sanguins périphériques ou l'occupation du

récepteur par l'adrénaline circulante est nettement inférieure aux concentrations synaptiques.

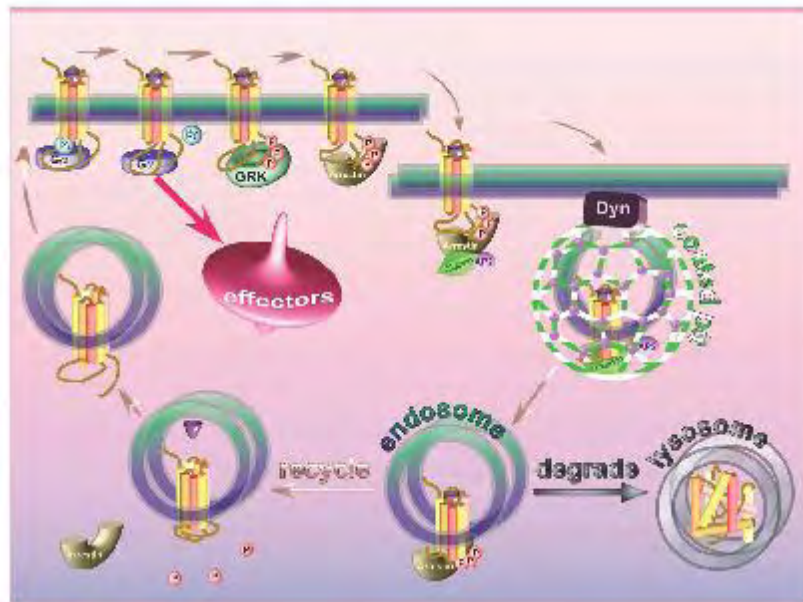
*En résumé, la désensibilisation des RCPG peut être homologue, via les GRK, ou hétérologue, via les PKA et PKC. Cependant, le modèle classique de désensibilisation est régulièrement mis à jour avec des données nouvelles qui montrent un haut degré de complexité du système de désensibilisation des RCPG. Toutefois, des précautions sont à prendre quant à l'interprétation des résultats obtenus sur un système cellulaire, puisque des données récentes montrent que les acides aminés phosphorylés RCPG varient selon le modèle cellulaire considéré [130]. Il faut également ajouter un autre niveau de complexité avec la possibilité pour chaque ligand, d'un même récepteur, d'entraîner un profil de désensibilisation spécifique du ligand : c'est le concept de « sélectivité fonctionnel » que nous aborderons dans le chapitre « Pharmacologie des RCPG ».*

### **C.3 Les mécanismes de l'internalisation des RCPG dépendants des $\beta$ -arrestines**

#### **C.3.1 Vue générale de l'internalisation des RCPG utilisant les $\beta$ -arrestines**

##### **C.3.1.a Internalisation dépendante du ligand**

Après l'étape de désensibilisation par les GRK, la liaison des  $\beta$ -arrestines au récepteur permet le découplage de la protéine G et engage le récepteur dans le processus d'endocytose. En effet, les  $\beta$ -arrestines recrutent ensuite un ensemble de partenaires, dont la clathrine et l'adaptateur AP-2, et rassemblent les récepteurs au sein de puits recouverts de clathrine. La clathrine est une protéine de structure en forme de triskèle dont les branches s'assemblent pour former une structure polyédrale, constituant ainsi un manteau recouvrant certaines vésicules de la cellule. Ces puits recouverts de clathrine vont s'invaginer vers l'intérieur de la cellule, et une petite GTPase, la dynamine, va venir assurer la fusion des membranes pour créer une vésicule d'endocytose contenant les récepteurs toujours attachés à la membrane. C'est également la dynamine qui assure la scission de la vésicule d'endocytose de la membrane. Cette vésicule nouvellement formée rejoindra le réseau vésiculaire grâce au cysquelette de la cellule, où son contenu sera trié (Figure 6) [131, 132].



**Figure 6: Modèle "classique" de l'internalisation des RCPG**

Après l'activation de la protéine G par un RCPG activé, les GRK phosphorylent l'extrémité C-terminale du récepteur. Les  $\beta$ -arrestines viennent se lier aux domaines intracellulaires phosphorylés des RCPG et recrutent des composants de la machinerie d'endocytose comme AP2 et la clathrine. Les récepteurs sont internalisés par un mécanisme dépendant de la dynamine. Les RCPG internalisés sont soit recyclés à la membrane soit dégradés dans les lysosomes.

### **C.3.1.b Internalisation constitutive des RCPG**

A l'état inactif, les RCPG subissent une internalisation constitutive en l'absence de ligand, dont le taux est relativement lent par rapport à une internalisation induite par le ligand. A titre d'exemple, on estime que le récepteur  $\beta$ 2-adrénergique subit une séquestration à la surface des cellules avec une demie vie d'environ dix minutes alors qu'en absence d'agoniste ce récepteur reste à la surface des cellules pour des temps supérieurs à une heure. Ainsi, un nombre important de récepteurs subissent une internalisation indépendante d'une stimulation par leur ligand. Citons les récepteurs  $\delta$ -opioïde,  $\alpha$ -adrénergique, angiotensine AT1, cannabinoïde CB1, chimiokines CXCR4, cholecystokinine CCK1, récepteur galanine R2, récepteur glutamate 5, muscarinique M2 [133]. En plus de contribuer à l'homéostasie cellulaire, l'internalisation constitutive des RCPG pourrait servir à maintenir une réserve interne de récepteurs pour remplacer ceux qui sont désensibilisés après une exposition aux ligands.

### **C.3.2 Rôle des $\beta$ -arrestines comme adaptateur endocytaire**

La première preuve de l'implication des  $\beta$ -arrestines dans l'endocytose des RCPG a été apportée par Ferguson en 1995, qui a montré que la surexpression des  $\beta$ -arrestines permettait de restaurer le phénotype d'un mutant du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique incapable de s'internaliser après stimulation par un agoniste [134]. En effet, ce récepteur  $\beta$ 2-adrénergique muté sur la thréonine en position 326, ne peut pas être phosphorylé par les GRK, et donc ne montre pas d'internalisation dépendante du ligand. A l'inverse, la surexpression de deux dominants négatifs des  $\beta$ -arrestines, en réalité des mutants des deux  $\beta$ -arrestines ( $\beta$ -arrestine 1 V53D et  $\beta$ -arrestine 2 V54D) provoque la séquestration membranaire du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique [135]. La translocation membranaire des  $\beta$ -arrestines aux RCPG a depuis été observée en microscopie confocale, grâce à des protéines de fusion  $\beta$ -arrestine-GFP/YFP, et a été quantifiée notamment grâce à la technique de B.R.E.T. A l'heure actuelle, l'implication des  $\beta$ -arrestines dans les processus d'internalisation a été montrée pour un grand nombre de RCPG.

#### **C.3.2.a Interaction des $\beta$ -arrestines avec la clathrine**

La voie d'endocytose dépendante de la clathrine est une des voies d'endocytose les mieux connues. Dans cette voie, les cargos transmembranaires (récepteurs, nutriments...) sont endocytés dans des puits recouverts d'un manteau de clathrine qui bourgeonne à partir

de certaines zones de la membrane plasmique enrichie en PIP<sub>2</sub>. La clathrine est une protéine hétérotrimérique stable, composée de trois chaînes lourdes et de trois chaînes légères régulatrices, formant une structure en triskèle. La clathrine est incapable d'interagir elle-même avec les lipides de la membrane plasmique et requiert l'intervention d'adaptateurs qui recrutent la clathrine au niveau de zone à haut potentiel endocytique (endocytic hot spot) et stimule l'assemblage du manteau de clathrine. Un de ces adaptateurs est le complexe AP-2.

En 1994, Von Zastrow et Kobilka proposent que l'internalisation du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique passe par un mécanisme dépendant de la clathrine. Deux années plus tard, une étude *in vitro* révèle une interaction de haute affinité entre les deux  $\beta$ -arrestines et les cages de clathrine, offrant ainsi un mécanisme moléculaire permettant d'initier le processus d'internalisation des RCPG [136]. De plus, il a été observé que le récepteur  $\beta$ 2-adrénergique, les  $\beta$ -arrestines et la clathrine colocalisent à la membrane plasmique après stimulation par un agoniste suggérant que l'interaction observée *in-vitro* est aussi présente dans un système cellulaire.

Des études de mutagenèse dirigée ont permis d'identifier des régions impliquées dans l'interaction des  $\beta$ -arrestines avec la clathrine. Les acides aminés en position 89 à 100 dans la chaîne lourde de la clathrine seraient nécessaires, avec en particulier une glutamine en position 89 (E89) et deux lysines en position 96 et 98. D'autre part, des études utilisant des mutants des  $\beta$ -arrestines ont montré que l'extrémité C-terminale des  $\beta$ -arrestines 1 et 2 est cruciale pour l'interaction avec la clathrine. La surexpression d'un mini gène de la  $\beta$ -arrestine1 exprimant le motif de liaison à la clathrine joue le rôle de dominant négatif et inhibe l'internalisation du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique [135]. Une autre étude plus récente rapporte que l'interaction entre la  $\beta$ -arrestine2 et la clathrine est régulée par des interactions intramoléculaires entre les extrémités N-terminale et C-terminale de la  $\beta$ -arrestine2 [137].

### **C.3.2.b Interaction des $\beta$ -arrestines avec l'adaptateur de la clathrine, AP-2**

AP-2 est un membre de la famille AP de complexe adaptateur hétérotetramérique. Sa structure repose sur deux grosses sous-unités (aussi appelées adaptines)  $\alpha$  et  $\beta$ 2, une chaîne moyenne  $\mu$ 2 et une petite sous-unité  $\sigma$ 2. Les deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ 2 constituent le noyau du complexe (« core ») ainsi que les domaines appendices (« appendage domain »). Ces régions sont connectées par des liens flexibles ou des régions charnières, et les deux autres sous-unités  $\sigma$ 2 et  $\mu$ 2 sont intégrées à l'intérieur du cœur (« core ») d'AP-2. En effet, ces deux sous-unités présentent des repliements  $\alpha$  et  $\beta$  et sont nichées dans les « épaules » des  $\alpha$  et  $\beta$ 2-adaptines [138].

*Rôle du complexe AP-2.* Le complexe AP-2 fait la liaison entre la clathrine et la membrane plasmique, et coordonne l'assemblage du manteau de clathrine avec la sélection de protéines membranaires cargos. Le complexe AP-2 assure le recrutement de la clathrine à la membrane à partir d'une réserve cytoplasmique de clathrine mais aussi en relocalisant de la clathrine présente à d'autres zones de la membrane. AP-2 interagit avec un grand nombre de protéines accessoires telles que les epsines, AP180/CALM, eps15, amphiphysines, AAK1, auxilline ou encore la synaptojanine, qui aident à la déformation de la membrane, la régulation de l'assemblage de la clathrine ou participent à différentes étapes de la maturation et de fission des puits recouverts de clathrine [138].

*Interaction des  $\beta$ -arrestines avec AP-2.* La découverte que la mini-  $\beta$ -arrestine2 (dominant négatif) délétée du domaine de liaison à la clathrine est toujours capable de bloquer l'internalisation du récepteur  $\beta$ -adrénergique a suggéré l'existence d'autres interactions via le C-terminal des  $\beta$ -arrestines. En utilisant un système de double hybride chez la levure, il a été montré que la  $\beta$ -arrestine2 interagit avec la  $\beta$ 2-adaptine du complexe AP-2. Un complexe fonctionnel entre le récepteur  $\beta$ 2-adrénergique, les  $\beta$ -arrestines et AP-2 a pu être détecté dans des cellules HEK 293 (Human Embryony Kidney) après stimulation par un agoniste [139]. Le même type de complexe a été mis en évidence avec le récepteur  $\mu$ -opioïde. Des expériences de mutagenèse dirigée ont permis d'identifier deux arginines R394 et R396 dans l'extrémité C-terminale de la  $\beta$ -arrestine2, responsables de l'interaction avec la  $\beta$ 2-adaptine. Ces arginines sont aussi présentes sur la  $\beta$ -arrestine1 et sont responsables de son interaction avec la  $\beta$ 2-adaptine. Enfin, d'autres études de mutagenèse dirigée ont révélé que l'arginine 834, le tryptophane 841, la glutamine 849, la tyrosine 888 et la glutamine 902 du domaine « appendice » de la  $\beta$ 2-adaptine sont impliqués dans l'interaction avec les  $\beta$ -arrestines.

*L'interaction d'AP2 aux  $\beta$ -arrestines est indépendante de la clathrine.* Une étude utilisant l'extrémité C-terminale des  $\beta$ -arrestines purifiée a montré que l'interaction avec la  $\beta$ 2-adaptine est directe et indépendante de la liaison à la clathrine. Lors de l'internalisation du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique, les  $\beta$ -arrestines subissent une translocation membranaire dans des régions ponctuées de la membrane plasmique qui coïncident avec les puits recouverts de clathrine. Cependant, un mutant de la  $\beta$ -arrestine2, R396A, incapable de se lier à AP-2, ne peut pas concentrer les récepteurs au niveau des puits recouverts de clathrine. L'interaction des  $\beta$ -arrestines avec AP-2, coordonnée avec celle de la clathrine, est donc nécessaire pour diriger les RCPG vers les puits recouvert de clathrine et donc pour l'internalisation dépendante de la clathrine, des RCPG [139-141]. D'autre part, une étude récente a montré l'importance de la phosphorylation de la  $\beta$ 2-adaptine par Src pour

l'interaction des  $\beta$ -arrestines avec AP-2 lors de l'activation du récepteur angiotensine AT1 [142].

Les  $\beta$ -arrestines sont localisées majoritairement dans le cytoplasme des cellules, ceci soulève la question de savoir comment est régulée l'association des  $\beta$ -arrestines avec les puits recouverts de clathrine. Des études montrent que les  $\beta$ -arrestines sont phosphorylées de manière constitutive, sur une sérine en position 412 pour la  $\beta$ -arrestine1 et une thréonine 382 pour la  $\beta$ -arrestine2, possédant une faible affinité pour la clathrine. Lors de la stimulation du récepteur, les  $\beta$ -arrestines sont recrutées à la membrane où elles sont déphosphorylées. Cette déphosphorylation est requise pour permettre le ciblage du complexe récepteur activé/ $\beta$ -arrestines. Ainsi, il est suggéré que la liaison des  $\beta$ -arrestines à un RCPG phosphorylé constitue le premier événement qui permet la déphosphorylation des  $\beta$ -arrestines et les changements conformationnels, qui démasquent les sites de liaison à la clathrine et AP-2 sur leur extrémité C-terminale [141].

### **C.3.2.c Adressage des RCPG aux puits recouverts de clathrine**

Deux théories existent pour le mécanisme d'endocytose et en particulier les premières étapes d'initiation du processus. La première propose que les récepteurs phosphorylés recrutent la clathrine, les différents adaptateurs et génèrent une nouvelle vésicule d'endocytose recouverte de clathrine. La seconde théorie propose que les récepteurs phosphorylés soient dirigés vers des puits recouverts de clathrine déjà préexistants dans certaines zones de la membrane. Jusqu'à présent, c'est la seconde théorie qui a reçu le plus d'arguments expérimentaux en sa faveur, en proposant que les récepteurs activés soient rassemblés dans des puits recouverts de clathrine déjà existants [143].

Les expériences de microscopie électronique et d'imagerie en temps réel sur cellules vivantes ont montré que les puits recouverts de clathrine sont homogènes et uniformes. Cependant, des données montrent que les RCPG s'internalisent via des sous-groupes de puits recouverts de clathrine, discernables par les différents adaptateurs qui connectent les récepteurs à la clathrine et également en termes de cinétiques d'internalisation [144]. Par exemple, une étude a montré que deux récepteurs purinergiques P2Y(12) et P2Y(1) s'internalisent tous les deux par un mécanisme dépendant de la clathrine mais P2Y(12) utilise une voie dépendante des GRK/ $\beta$ -arrestines alors que P2Y(1) est phosphorylé par la PKC et ne recrute pas les  $\beta$ -arrestines. Ces deux récepteurs s'excluent mutuellement alors qu'ils colocalisent tous les deux avec la clathrine, montrant qu'ils s'internalisent via des sous-groupes différents de puits recouverts de clathrine [145].



### C.3.2.d Rôle des $\beta$ -arrestines dans de nouveaux mécanismes endocytiques

*Mécanisme impliquant les protéines GIT-ARF.* En plus de leurs fonctions conventionnelles, les  $\beta$ -arrestines en tant que protéines d'échafaudages, peuvent interagir avec d'autres protéines impliquées dans l'endocytose telles que les protéines ARF (ADP Ribosylation Factor), leur GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor) et leur GAP (GTPase Accelerating Protein). Les protéines ARF (six membres) sont de petites protéines G qui font partie d'un sous-groupe de la superfamille des protéines Ras. Elles sont impliquées dans le recrutement de protéines qui forment le manteau vésiculaire, dans les processus de dynamique du cytosquelette, d'exocytose, d'adhésion, de phagocytose et de trafic endocyttaire. Ces protéines ARF possèdent des GAP associées, les GIT (GRK-interactor) qui sont capables de se lier au GRK. Les protéines ARF sont également associées à des protéines GEF telle que la protéine ARNO. Des études montrent que la surexpression de GIT1 affecte l'internalisation clathrine dépendante de récepteurs tels que le  $\beta$ 2-adrénérique,  $\mu$ -opioïde et adénosine B2. Cet effet inhibiteur serait expliqué par l'activité GAP de GIT1 sur les protéines ARF. En effet, les protéines ARF ont un rôle dans le recrutement de protéines responsables du bourgeonnement des vésicules, et des données suggèrent que les protéines ARF doivent être rapidement inactivées par leur GAP pour permettre à la vésicule de bourgeonner et de migrer vers des structures endosomales. A l'inverse, la GEF de la protéine ARF-6, appelée ARNO favorise l'internalisation du  $\beta$ 2-adrénérique [141].

Le mécanisme proposé est le suivant : après l'activation du récepteur  $\beta$ 2-adrénérique, les GRK phosphorylent le récepteur, et GIT1 est transloqué à la membrane plasmique grâce à son interaction avec les GRK. Les  $\beta$ -arrestines sont recrutées à la membrane par le récepteur phosphorylé et interagissent avec ARNO. Le complexe formé par les  $\beta$ -arrestines, ARNO et ARF-6, déjà présent à la membrane, sert à activer les protéines ARF en échangeant le GDP en GTP. Les protéines ARF liées au GTP vont activer des effecteurs spécifiques et ARF-6 est probablement rapidement inactivé par GIT1 avec l'hydrolyse du GTP [141].

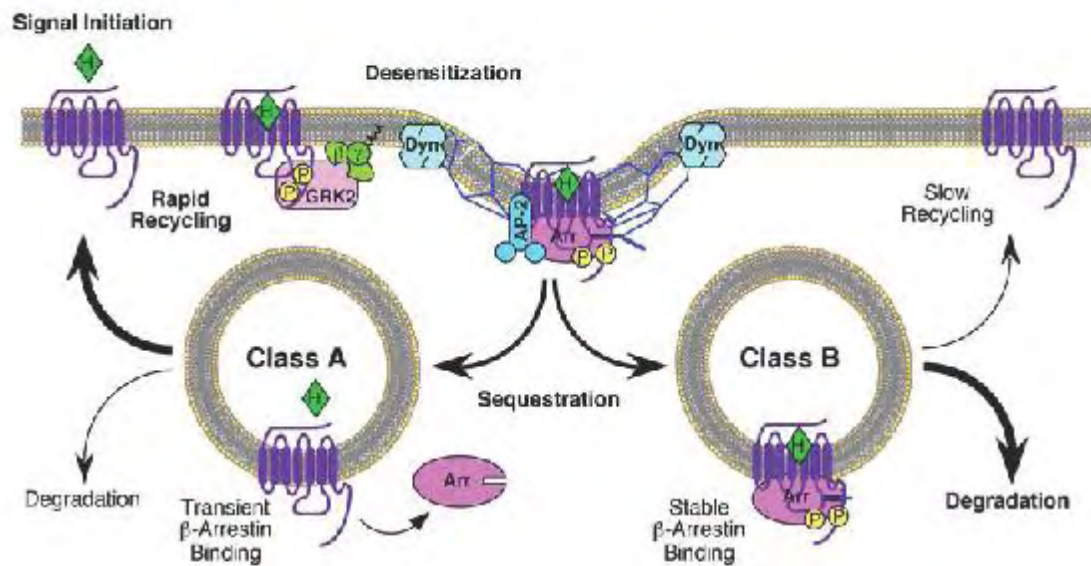
*Interaction des  $\beta$ -arrestines avec des phosphoinositides.* Les  $\beta$ -arrestines présentent un domaine de liaison de haute affinité pour des lipides de la membrane, les phosphoinositides. Ce domaine est situé sur l'extrémité C-terminale des  $\beta$ -arrestines avec, en particulier, trois acides aminés basiques, la lysine 233, l'arginine 237 et la lysine 251 sur la  $\beta$ -arrestine2. La mutation de ces trois acides aminés conduit à l'inhibition de l'internalisation du récepteur  $\beta$ 2-adrénérique, marquée par l'absence de localisation du récepteur au niveau des puits recouverts de clathrine. Cependant, la  $\beta$ -arrestine2 mutante est recrutée à la membrane et se lie toujours au récepteur et à la clathrine [146].

Les  $\beta$ -arrestines sont capables de se lier à différents phosphoinositides comme IP6, PIP3, PIP2, IP4, IP3. Curieusement alors que le PIP2 et le PIP3 sont proposés comme étant les ligands physiologiques des  $\beta$ -arrestines à la membrane plasmique, le phosphoinositide IP6 soluble possède une plus forte affinité pour les  $\beta$ -arrestines que le PIP2 et le PIP3 [146]. D'autre part, la liaison d'IP6 aux  $\beta$ -arrestines inhibe la liaison des  $\beta$ -arrestines avec la forme activée de la rhodopsine. IP6 serait capable de se lier à deux endroits différents des  $\beta$ -arrestines et ainsi pourrait favoriser l'oligomérisation des  $\beta$ -arrestines. En effet, une mutation dans l'un des deux sites de liaison à IP6 empêche l'oligomérisation des  $\beta$ -arrestines, provoquant une relocalisation des  $\beta$ -arrestines du cytoplasme, où la forme oligomérique des  $\beta$ -arrestines est majoritaire, vers le noyau de la cellule, où la forme monomérique des  $\beta$ -arrestines est majoritaire. L'interaction IP6/ $\beta$ -arrestines pourrait réguler la localisation subcellulaire des  $\beta$ -arrestines et donc réguler l'interaction des  $\beta$ -arrestines avec des composants membranaires ou nucléaires [147].

*Interactions des  $\beta$ -arrestines avec Src.* Les  $\beta$ -arrestines peuvent interagir avec la kinase Src. On observe une colocalisation du complexe récepteur  $\beta$ 2-adrénergique,  $\beta$ -arrestines et Src lors de la stimulation du récepteur par un agoniste. Après l'activation du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique, Src phosphoryle des tyrosines de la dynamine, qui est requise pour assurer la scission des vésicules de la membrane plasmique. Le blocage de la phosphorylation de la dynamine par Src, au moyen d'inhibiteur de src ou des mutants non phosphorylables de la dynamine, réduit l'internalisation du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique [148]. Ces données soulignent le rôle crucial des  $\beta$ -arrestines dans l'endocytose en recrutant des kinases à la membrane pour phosphoryler des éléments clés de la machinerie d'endocytose comme la dynamine.

#### **C.3.2.d Récepteurs de classe A versus récepteurs de classe B**

Les RCPG qui s'engagent dans des voies d'endocytose dépendantes des  $\beta$ -arrestines peuvent être classés en deux groupes distincts, les récepteurs de classe A et de classe B (différents de la classification des RCPG), selon des critères de liaison des  $\beta$ -arrestines au récepteur après activation par un agoniste. Ces deux classes ont été définies par une étude des profils de translocation membranaire des deux  $\beta$ -arrestines en microscopie confocale [149]. Les récepteurs de classe A se lient à la  $\beta$ -arrestine 2 avec une affinité supérieure à la  $\beta$ -arrestine 1. Cette classe regroupe des récepteurs tels que le  $\beta$ 2-adrénergique,  $\mu$ -opioïde, endothéline de type A, dopamine D1A ou encore le récepteur  $\alpha_{1b}$ -adrénergique. Les récepteurs de classe B se lient aux deux  $\beta$ -arrestines avec une même



**Figure 7: Représentation schématique des différences entre RCPG de classe A et de classe B**

Les RCPG de classe A, présentent une interaction transitoire avec les  $\beta$ -arrestines. Une fois le récepteur internalisé, il se dissocie des  $\beta$ -arrestines et s'engage dans des voies de recyclage rapide. Les RCPG de classe B présentent une interaction stable avec les  $\beta$ -arrestines. Une fois les récepteurs internalisés, les  $\beta$ -arrestines restent associées sur des longues périodes de temps. Les récepteurs de classe B sont dirigés vers des voies de dégradations lysosomales ou de recyclage lent. (D'après Kendall & Luttrell, 2009)

affinité et comportent des récepteurs comme le récepteur angiotensine II de type 1A (AT<sub>1A</sub>), vasopressine V2, neurotensine-1 NT1, thyrotropin-releasing hormon (TRH) ou encore de la substance P/neurokinine-1 (SP/NK1). Bien que les  $\beta$ -arrestines facilitent la désensibilisation des deux classes de récepteurs, les récepteurs de classe A se dissocient des  $\beta$ -arrestines près de la membrane plasmique alors que les récepteurs de classe B restent associées aux  $\beta$ -arrestines pour des temps importants et colocalisent dans les endosomes (Figure 7) [150]. Pour les récepteurs de classe B, tels qu'AT<sub>1A</sub>, V2, NT1, SP/NK1, cette association stable avec les  $\beta$ -arrestines implique une séquence conservée de sérine-thréonine située au niveau de l'extrémité C-terminale de ces récepteurs [151]. L'extrémité C-terminale des RCPG semble cruciale pour déterminer la classe à laquelle appartient un RCPG. En effet, le récepteur chimérique  $\beta$ 2-adrénérique assorti de l'extrémité C-terminale du récepteur vasopressine V2 se comporte comme un récepteur de classe B. Cependant, pour le récepteur  $\beta$ 2-adrénérique, l'isomère de GRK phosphorylant le récepteur est un facteur déterminant pour déterminer le type d'interaction du récepteur avec les  $\beta$ -arrestines. En effet, alors que la phosphorylation par la GRK2 conduit à un profil de récepteur de classe A, la phosphorylation par GRK5 ou GRK6 conduit à un profil de récepteur de classe B.

Il est proposé que la stabilité de l'interaction entre le récepteur et les  $\beta$ -arrestines soit un élément clé du devenir du récepteur. En effet, les récepteurs de classe A, tels que le récepteur  $\beta$ 2-adrénérique, présentant une interaction transitoire avec les  $\beta$ -arrestines sont à même d'être rapidement recyclés à la membrane plasmique après la dissociation avec les  $\beta$ -arrestines. A l'inverse, le récepteur Angiotensine II AT<sub>1A</sub> n'est pas recyclé. Il colocalise longuement avec les  $\beta$ -arrestines, et est dirigé vers des voies de recyclage lent et/ou de dégradation [133].

Cette classification est toutefois à considérer avec prudence. En effet, il existe des récepteurs de classe A qui sont dirigés vers des voies de dégradation et à l'inverse des exemples de récepteurs de classe B capables d'être rapidement recyclés [152, 153]. De plus, une étude sur un récepteur purinergique montre que selon le ligand considéré, le récepteur adopte un profil de classe A ou de classe B [154].

### **C.3.2.e L'ubiquitinylation régule l'action des $\beta$ -arrestines.**

L'ubiquitinylation est la modification post-traductionnelle consistant à la fixation d'une ubiquitine sur une lysine. Les  $\beta$ -arrestines sont retrouvées ubiquitinylées à la suite de l'activation de nombreux RCPG par leurs ligands agonistes. Lors de la stimulation du récepteur  $\beta$ 2-adrénérique par un agoniste, la protéine Mdm2 (mouse double minute2), qui est une RING (really interesting new gene) ubiquitin ligase E3, ubiquitinye la  $\beta$ -arrestine2

conduisant à l'internalisation rapide du récepteur [155]. Le profil d'ubiquitylation des  $\beta$ -arrestines est corrélé avec la stabilité de l'interaction  $\beta$ -arrestine-RCPG, l'interaction transitoire (classe A) étant associée à une ubiquitylation transitoire alors qu'une interaction persistante (classe B) étant associée à une ubiquitylation soutenue au cours du temps [156, 157]. L'expression d'une  $\beta$ -arrestine chimérique comportant une ubiquitine est suffisante pour conférer des caractéristiques de récepteurs de classe B à des récepteurs de classe A. L'échange de l'extrémité C-terminale entre des récepteurs des deux classes, inverse les profils d'interaction des récepteurs avec les  $\beta$ -arrestines et inverse aussi leurs profils d'ubiquitylation [157, 158]. L'ubiquitylation des  $\beta$ -arrestines dépendante de l'activation d'un récepteur, se fait sur des lysines spécifiques. Par exemple, l'ubiquitylation soutenue des  $\beta$ -arrestines à la suite de l'activation du récepteur angiotensine II AT1A, devient transitoire lorsque les deux lysines 11 et 12 sont mutées en arginine et le complexe endosomal initialement stable récepteur- $\beta$ -arrestines devient transitoire et présent uniquement à la membrane du fait des mutations. Une étude montre que la  $\beta$ -arrestine2 possédant les lysines 11 et 12 mutées en arginine est incapable d'augmenter la vitesse d'internalisation du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique alors qu'elle reste capable de se lier à la clathrine et à AP-2 [159].

Shenoy et collaborateurs montrent en 2009 que l'ubiquitylation des  $\beta$ -arrestines est régulée, à la fois, par l'ubiquitin ligase E3 qui assure l'ubiquitylation et par une enzyme de deubiquitylation, l'ubiquitin-specific-protease 33 (USP33) qui assure la déubiquitylation des  $\beta$ -arrestines. Ces deux enzymes régulent donc la stabilité ou labilité du complexe récepteur- $\beta$ -arrestines et ainsi la localisation subcellulaire du complexe. Ces données révèlent que les récepteurs de classe A comme le récepteur  $\beta$ 2-adrénergique, formant des complexes transitoires avec les  $\beta$ -arrestines, induisent une conformation des  $\beta$ -arrestines favorable à la liaison de USP33 alors que les récepteurs de classe B comme le récepteur vasopressine V2 induisent une conformation des  $\beta$ -arrestines favorable à la dissociation d'USP33 [160].

Ainsi, l'ubiquitylation des  $\beta$ -arrestines, dépendant de la liaison d'USP33 aux  $\beta$ -arrestines, est un facteur déterminant dans le trafic des RCPG et dans la régulation de l'interaction du complexe  $\beta$ -arrestine-récepteur, ce qui a des retombées importantes sur le signal en aval des RCPG (voir chapitre suivant).

Une autre modification chimique a été observée pour les  $\beta$ -arrestines, la S-nitrosylation. En effet, une étude rapporte que la  $\beta$ -arrestine2 est S-nitrosylée, par la S-nitrosogluthathione endogène, sur une seule cystéine et interagit avec la NO synthase endothéliale (eNOS). Cette S-nitrosylation, après une stimulation du récepteur  $\beta$ 2-

adrénergique, dissocie la  $\beta$ -arrestine de eNOS et favorise la liaison de la  $\beta$ -arrestine2 à la clathrine et AP-2, accélérant ainsi l'internalisation du récepteur [161].

*En résumé, les RCPG peuvent s'internaliser de manière constitutive ou active après stimulation par un ligand. L'internalisation dépendante du ligand fait intervenir les  $\beta$ -arrestines qui sont des protéines adaptatrices recrutant de multiples protéines impliquées dans les mécanismes d'endocytose comme la clathrine et AP-2. Les RCPG de classe A interagissent de manière transitoire et principalement avec la  $\beta$ -arrestine 2 alors que les RCPG de classe B interagissent de manière stable avec les deux  $\beta$ -arrestines. Ces deux classes A et B sont aussi caractérisées par des profils d'internalisation différents en termes de devenir du récepteur internalisé. Les  $\beta$ -arrestines sont elle-mêmes fortement régulées, notamment par ubiquitinylation.*

## **C.4 Les mécanismes de l'internalisation des RCPG indépendants des $\beta$ -arrestines.**

### **C.4.1 Interaction directe du complexe AP-2 avec l'extrémité C-terminale des RCPG**

Dans certains cas les RCPG sont capables d'interagir directement avec le complexe adaptateur AP-2. En effet, le complexe AP-2 est capable de se lier au RCPG par des interactions entre la sous-unité  $\mu$ 2 d'AP-2 et des motifs YXX $\phi$  (ou Y est une tyrosine, X n'importe quel acide aminé et  $\phi$  un acide aminé avec une grosse chaîne latérale hydrophobe) au niveau de l'extrémité C-terminale des RCPG. La phosphorylation d'AP-2 par la kinase AAK1 (AP2 associated kinase-1) accroît l'affinité de la sous-unité  $\mu$ 2 d'AP-2 pour ces motifs YXX $\phi$ . De plus, les sous-unités  $\alpha/\sigma$ 2 et peut être aussi la sous-unité  $\beta$ 2 d'AP-2 seraient capables d'interagir avec des motifs acides dileucine ([DE]XXXL[LI]) dans les régions intracellulaires de certaines RCPG.

Une étude a montré qu'AP-2 est requis pour l'internalisation constitutive du récepteur PAR1 qui se fait selon un mécanisme dépendant de la clathrine et de la dynamine mais pas des  $\beta$ -arrestines. Les auteurs expliquent que l'endocytose constitutive de PAR1 génère une réserve intracellulaire de récepteurs « naifs » qui permet de remplir la surface cellulaire après une activation du récepteur par la thrombine faisant de l'internalisation constitutive du récepteur PAR un évènement crucial pour la resensibilisation de ces récepteurs indépendamment de la synthèse *de novo* [162]. La sous-unité  $\mu$ 2 d'AP2 interagit directement

avec un motif YXXL situé sur la queue C-terminale du récepteur d'après des données de résonance plasmonique de surface. L'inhibition de cette interaction au moyen de récepteurs mutés au niveau de la tyrosine du motif, ou d'inactivation d'AP-2 par siRNA conduit à l'inhibition de l'internalisation constitutive du récepteur PAR1 et à l'impossibilité pour les cellules endothéliales de se resensibiliser après une exposition à la thrombine. De manière intéressante, l'internalisation du récepteur activé PAR1 est indépendante des  $\beta$ -arrestines mais aussi indépendante d'AP-2 suggérant des mécanismes distincts requis pour l'internalisation constitutive ou dépendante du ligand [162]. Une étude récente sur le récepteur NPY (Y1) montre qu'un récepteur NPY (Y1) tronqué des 32 derniers acides aminés de son extrémité C-terminale est capable de s'internaliser de manière constitutive alors que le récepteur sauvage ne s'internalise uniquement qu'après stimulation par un agoniste, selon une voie dépendante des  $\beta$ -arrestines. Les auteurs ont mis en évidence un motif de type YXX $\phi$  en amont de la troncature réalisée, crucial pour l'internalisation constitutive, et concluent que ce motif est probablement masqué dans le récepteur sauvage [163, 164].

Un motif proche du motif basé sur la tyrosine, ici YXXX $\phi$  existe dans l'extrémité C-terminale du récepteur TP $\beta$  (récepteur du tromboxane A<sub>2</sub>) et intervient dans un processus d'internalisation indépendant des  $\beta$ -arrestines, mais l'interaction avec AP-2 n'a pas été investiguée. De manière intéressante, le motif YXXG $\phi$  se lie au même site sur la sous-unité  $\mu$ <sub>2</sub> d'AP-2 que le motif classique YXX $\phi$  où les acides aminés Y et  $\phi$  sont insérés dans la même poche hydrophobique suggérant qu'AP-2 ait un rôle dans l'internalisation constitutive du récepteur TP $\beta$  [165].

Le récepteur chimiokine CXCR2 possède deux motifs dileucine cytoplasmique. Cependant un récepteur mutant de ces deux leucines est retrouvé lié au  $\beta$ -arrestines mais n'est pas internalisé [166]. De plus, ce motif dileucine est également présent sur le récepteur  $\beta$ <sub>2</sub>-adrénergique et le récepteur CXCR4 et joue apparemment un rôle dans l'internalisation de ces récepteurs, puisque les mutations de ce motif dileucine inhibent leur internalisation [167]. En revanche, l'impact de cette mutation sur la liaison des  $\beta$ -arrestines et d'AP-2 au récepteur n'est pas connu.

Les motifs de liaison directe d'AP-2 à l'extrémité C-terminale d'un récepteur ne sont pas systématiquement des motifs YXX $\phi$  ou dileucine. En effet, la sous-unité  $\mu$ <sub>2</sub> d'AP-2 interagit avec un motif de huit arginines dans l'extrémité C-terminale du récepteur  $\alpha$ <sub>1b</sub>-adrénergique. Un mutant de ce récepteur, où ce motif est absent, présente une incapacité à lier la sous-unité  $\mu$ <sub>2</sub> et une internalisation réduite [168]. Un autre exemple existe avec le récepteur US28 d'une chimiokine virale, qui a été décrit comme internalisant via un mécanisme indépendant des  $\beta$ -arrestines impliquant AP-2, sans toutefois identifier un motif

de reconnaissance pour AP-2 [169]. Le récepteur GABA<sub>A</sub> s'internalise via une voie dépendante de la clathrine mais indépendante des  $\beta$ -arrestines. En effet le récepteur GABA<sub>A</sub> présente deux motifs de liaison au complexe AP-2, un motif classique YXX $\phi$  et un motif atypique riche en acides aminés basiques qui est aussi retrouvé sur les récepteurs synaptotagmin 1 et glutamate de type AMPA. Une étude montre que ces deux motifs contribuent à la liaison à AP-2 mais sont impliqués de manière différente dans l'internalisation du récepteur GABA<sub>A</sub> [170, 171].

*En résumé, le complexe AP-2 peut directement interagir avec l'extrémité C-terminale des RCPG pour initier l'endocytose des récepteurs qu'elle soit constitutive ou dépendante du ligand. Cependant, dans certains cas, AP-2 est potentiellement capable de coopérer avec les  $\beta$ -arrestines pour déclencher l'internalisation d'un RCPG. Certains RCPG possèdent des motifs de liaison à AP-2 dans leurs boucles intracellulaires mais pas au niveau de leur extrémité C-terminale. Le rôle de ces motifs dans les boucles intracellulaires n'est pas connu à l'heure actuelle mais suggère que ce type d'interaction directe avec AP-2 peut favoriser la régulation de l'internalisation des RCPG.*

## **C.4.2. Mécanismes d'internalisation des RCPG indépendants de la clathrine.**

### **C.4.2.a Mécanismes dépendants des cavéoles**

Les cavéoles sont des structures membranaires qui ont été définies sur la base de leur apparence morphologique d'invaginations déterminées en microscopie électronique ressemblant à une boîte ronde plate de 50-100 nm de diamètre. Toutes les cellules ne possèdent pas de cavéoles et la proportion de cavéoles peut extrêmement varier selon le type cellulaire considéré. La forme et l'organisation structurale des cavéoles sont dues à la présence de trois protéines, les cavéolines (1, 2 et 3) qui s'auto-assemblent en oligomères pour former une sorte de manteau cytoplasmique sur les invaginations de la membrane plasmique. Les membranes des cavéoles sont enrichies en glycosphingolipids et en cholestérol comme le sont d'autres zones membranaires de la cellule appelées les « lipids raft » [172].

Plusieurs RCPG ont été identifiés dans les cavéoles. Cependant, ce sont souvent les interactions entre les RCPG et les cavéolines qui ont été étudiées ce qui ne signifie pas obligatoirement que les RCPG sont présents dans les cavéoles. En effet, les cavéolines ne sont pas strictement localisées au niveau des cavéoles à la membrane ; on les retrouve



aussi dans des réserves intracellulaires et particulièrement dans les vésicules d'exocytose. Par exemple, le récepteur angiotensine AT1 co-immunoprécipite avec la cavéoline-1 mais n'est pas présent dans les cavéoles, et il n'est retrouvé que dans les radeaux lipidiques à la membrane. Dans le cas du récepteur angiotensine AT1, la cavéoline-1 favorise l'expression membranaire du récepteur [173]. Ainsi, l'internalisation dépendante des cavéoles a été démontrée pour les récepteurs  $\beta$ 1-adrénergique, endothéline ETa et ETb, adénosine A1, Bradykinine 2, GnRH, Somatostatine SST2, muscarinique M2 et mGluR7. L'internalisation des RCPG par les cavéoles est un phénomène dépendant de la dynamine [174].

Pour expliquer la localisation de ces récepteurs au niveau des cavéoles, différentes hypothèses ont été avancées. La partie extracellulaire des RCPG pourrait interagir avec le cholestérol présent à la membrane. En effet, il est suggéré une interaction entre les hélices  $\alpha$  des RCPG et le cholestérol, et puisque la conformation de ces hélices  $\alpha$  est très dépendante de l'activation du récepteur, il est proposé que la localisation des RCPG au sein des cavéoles pourrait être dépendante de l'état d'activation des RCPG ainsi que de l'état de dimérisation des récepteurs. Un autre type d'interaction, l'acylation par des acides gras, particulièrement la palmitoylation, pourrait agir comme un signal d'adressage des RCPG aux cavéoles. Enfin, de nombreuses études sont en faveur de l'hypothèse que les oligomères de cavéolines constituent un échafaudage pour la séquestration de protéines résidentes dans les domaines cavéoles. En effet, la cavéoline-1 interagit directement avec un grand nombre de protéines de la signalisation telles que les sous-unités  $G\alpha$ , PKA, PKC, eNOS et des protéines kinases Src-like. Le domaine d'interaction de ces protéines de la signalisation sur la cavéoline-1 a été défini et comprend une quarantaine d'acides aminés au niveau de l'extrémité C-terminale de la cavéoline-1 [175, 176].

En utilisant le domaine d'échaffaudage de la cavéoline-1 comme amorce, le « screening » d'une librairie de peptides synthétiques a permis d'identifier deux motifs de liaison à la cavéoline. Ces motifs de liaison à la cavéoline contiennent des acides aminés aromatiques régulièrement espacés  $\phi X\phi XXXX\phi$  et  $\phi XXXX\phi XX\phi$  (où  $\phi$  est un acide aminé aromatique : tryptophane, phenylalanine ou tyrosine et X n'importe quel acide aminé). Ces motifs sont présents chez toutes les protéines associées aux cavéoles y compris les RCPG retrouvés au niveau de ces structures ( $\beta$ 1-adrénergique, ETa, muscarinique M2) [174]. Cependant la présence de ces motifs dans un RCPG ne saurait permettre la prédiction d'une association avec la cavéoline-1.

Les RCPG sont capables de faire la navette entre cavéoles et le reste de la membrane en y entrant ou sortant et différents cas de figures ont été observés. (A) le récepteur est dirigé dans les cavéoles lors de la stimulation du récepteur par un agoniste, déclenchant un signal spécifique de ce récepteur depuis les cavéoles. (B) le récepteur est

dirigé dans les cavéoles après la liaison d'un agoniste, afin d'activer un signal spécifique des cavéoles, mais ressort des cavéoles pour être internalisé via les puits recouverts de clathrine. (C) le récepteur est principalement présent dans les cavéoles et s'internalise via cette voie par défaut. (D) le récepteur est présent dans les cavéoles mais en sort après liaison à l'agoniste pour être internalisé via les puits recouverts de clathrine.

*La question du rôle de ces cavéoles dans la fonction et la régulation des RCPG reste ouverte mais différents éléments de réponse ont été proposés. Les RCPG pourraient être envoyés dans les cavéoles pour pouvoir transduire un signal spécifique grâce à la présence de protéines de la signalisation au niveau des cavéoles. Le ciblage de récepteurs vers les cavéoles pourrait également protéger ces récepteurs contre une internalisation constitutive ou induite par le ligand leur permettant ainsi de continuer à transduire un signal, comme c'est le cas du récepteur endothéline ETb. D'autre part, la voie d'endocytose choisie par un RCPG peut varier selon des facteurs spécifiques au type de cellule considérée et interchanger les voies d'internalisation des cavéoles vers les puits recouverts de clathrine pouvant ainsi altérer le devenir du récepteur internalisé. Au vue de la forte interconnection entre le trafic intracellulaire d'un RCPG et le signal émis par celui-ci, le choix de voies d'endocytoses alternatives apparaît comme un élément déterminant dans le signal final d'un RCPG donné après stimulation.*

## **C.5. Devenir des RCPG internalisés**

Les RCPG internalisés rejoignent rapidement des structures vésiculaires diverses qui constituent un véritable réseau au sein de la cellule. Ce réseau vésiculaire assure différentes fonctions cellulaires telles que l'endocytose, le recyclage de protéines membranaires, la dégradation protéique, l'exocytose, la polarisation cellulaire. Ce réseau est extrêmement régulé et organisé, et il permet aux RCPG d'être efficacement recyclés ou d'être dégradés. Les RCPG juste internalisés sont immédiatement acheminés vers une structure vésiculaire appelée endosomes précoces où le tri entre les RCPG destinés au recyclage et ceux destinés à la dégradation s'effectue. Certains RCPG seront orientés vers des voies de recyclage alors que d'autres seront dégradés au niveau de vésicules spécialisées dans la dégradation protéique, les lysosomes. Cependant, sur l'ensemble de la population des RCPG d'une cellule, il est probable que toute la population d'un même RCPG ne s'engage pas dans une seule voie de recyclage ou de dégradation mais que seule une certaine proportion de récepteurs s'engage majoritairement dans une voie, ceci n'excluant pas qu'une minorité de ce même récepteur puisse être orienté vers une autre voie.

Les RCPG s'engagent, néanmoins, plutôt dans des voies de recyclage rapide (quelques minutes) pour les récepteurs de classe A, des voies de recyclage lent (plusieurs heures) ou dans des voies de dégradation pour les récepteurs de classe B. Le tri et les mécanismes régissant le devenir d'un RCPG sont complexes et se situent à plusieurs niveaux du réseau vésiculaire de la cellule.

### **C.5.1 Impact de l'extrémité C-terminale et des $\beta$ -arrestines**

Le devenir post-endocytaire des RCPG est fortement influencé par des domaines de l'extrémité C-terminale ou par les interactions de partenaires avec l'extrémité C-terminale des RCPG. Des échanges d'extrémité C-terminale ont été réalisés entre le récepteur  $\beta$ 2-adrénergique, recyclé très rapidement à la membrane, et le récepteur vasopressine V2 qui recycle très lentement ; le récepteur  $\beta$ 2-adrénergique chimérique présente un profil de recyclage lent alors que le récepteur vasopressine V2 acquiert la capacité d'être recyclé rapidement [158]. Ce même type de résultats a été obtenu entre respectivement les récepteurs dopamine D1,  $\mu$ -opioïde, SP/NK1 et les récepteurs dopamine D2,  $\delta$ -opioïde, et PAR1.

Bien que les  $\beta$ -arrestines ne soient pas connues pour interagir avec la majorité des motifs et protéines identifiées dans la régulation du trafic postendocytaire des RCPG, il est clair que les  $\beta$ -arrestines jouent un rôle au niveau de l'extrémité C-terminale des RCPG. En effet, des changements de classe A et B ont aussi été observés lors d'expériences d'échange d'extrémité C-terminale de RCPG.

Le modèle classiquement proposé, s'appuie sur la corrélation entre la stabilité de l'interaction extrémité C-terminale/ $\beta$ -arrestines et de l'orientation vers différentes voies de recyclage ou de dégradation. En effet, les récepteurs de classe A, interagissent de manière transitoire avec les  $\beta$ -arrestines et la dissociation des  $\beta$ -arrestines du  $\beta$ 2-adrénergique est nécessaire pour la déphosphorylation, la resensibilisation et le recyclage du récepteur [150]. Les récepteurs de classe B interagissant avec les  $\beta$ -arrestines sur des durées de temps plus longues ne sont pas capables d'être recyclés rapidement et sont généralement dégradés ou recyclés lentement. Cependant des exceptions existent avec le récepteur somatostatine SST<sub>2A</sub> et le récepteur Neurokinine1 qui sont des récepteurs de classe B mais qui sont capables d'être déphosphorylés, resensibilisés et rapidement recyclés à la membrane. A l'inverse, le récepteur SST<sub>3</sub>, présente un profil de classe A mais est principalement dirigé vers une voie de dégradation dans les lysosomes [153].

Dans le cas du récepteur angiotensine II AT<sub>1A</sub>, la dissociation des  $\beta$ -arrestines du récepteur n'est pas suffisante pour entraîner la déphosphorylation du récepteur. Ces données suggèrent que la régulation du trafic postendocytique des RCPG fait intervenir d'autres acteurs intracellulaires en relation ou pas avec les  $\beta$ -arrestines.

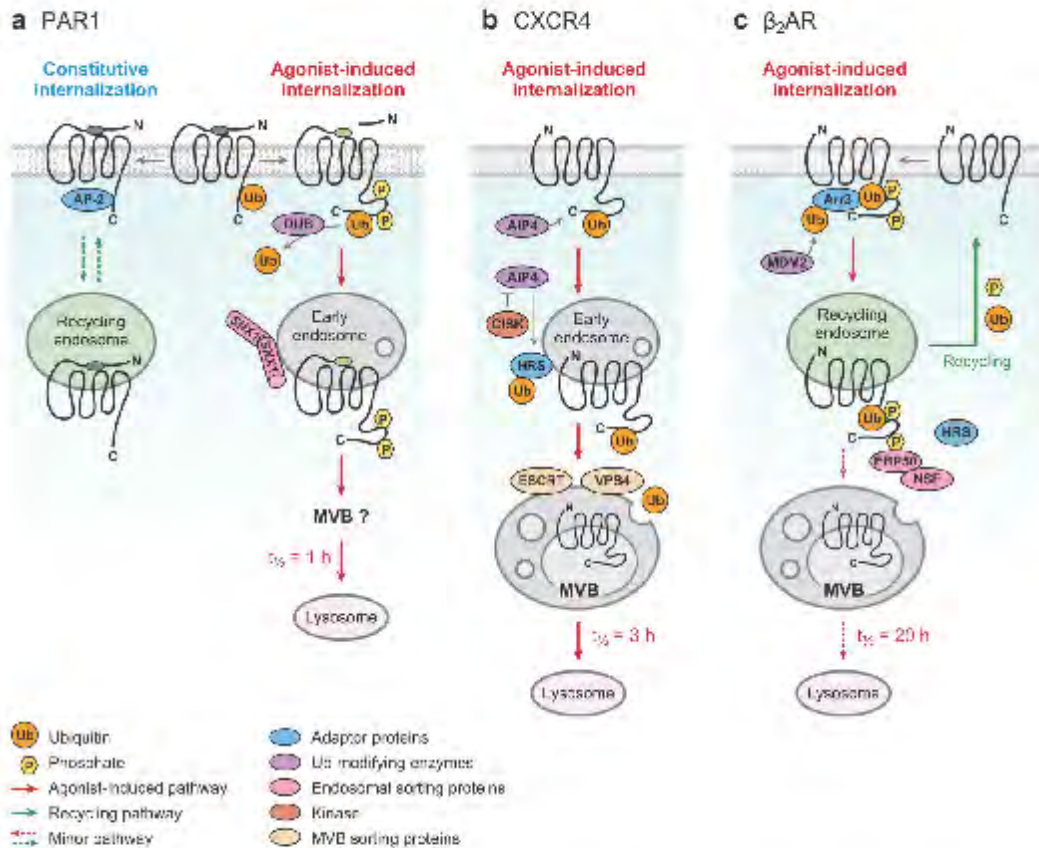
### **C.5.2 Le tri des RCPG vers les voies de dégradation**

Après leur passage dans des endosomes précoces, les RCPG qui ne sont pas rapidement recyclés sont envoyés vers des endosomes particuliers appelé MVB (multi-vesicular body) contenant des vésicules intraluminales, caractéristiques de ces structures et constituent un centre de tri des protéines cargos. Des protéines associées aux endosomes et impliquées dans les processus de tri des protéines cargos transitant par les MVB ont été identifiées.

#### **C.5.2.a Ubiquitinylation des RCPG et machinerie ESCRT**

C'est à l'intérieur des MVB que s'effectue le tri des RCPG qui seront envoyés vers des voies de recyclage lent ou de dégradation. La machinerie ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) est un ensemble de protéines qui acheminent les protéines cargos ubiquitinylés vers les lysosomes. Ces protéines sont présentes sur les membranes des endosomes et dans le cytoplasme et existent sous la forme de trois complexes majeurs nommés ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III [177].

Le processus de tri est initié par un complexe protéique associé aux endosomes précoces mais celui-ci n'est pas considéré comme faisant partie de la machinerie ESCRT. Il est cependant appelé ESCRT-0, et inclut la protéine Hrs (hepatocyte-growth factor-regulated tyrosine kinase substrate). La protéine Hrs est recrutée à la membrane des endosomes précoces grâce à un motif FYVE qui lui permet de lier à une molécule de PtdIns(3)P, un lipide abondant dans les membranes des endosomes [178]. La protéine Hrs recrute la clathrine à des microdomaines discrets qui forme des mailles plates de clathrine sur la membrane des endosomes là où les protéines destinées à la dégradation sont concentrées [179]. Cette protéine Hrs possède un domaine d'interaction avec l'ubiquitine, appelé motif UIM (Ubiquitin Interacting Motif) qui lui permet d'acheminer les protéines cargo ubiquitinylés jusqu'à la machinerie ESCRT au niveau des MVB. En effet, Hrs interagit directement avec un composant central du complexe ESCRT-I, la protéine Tsg101 qui possède, elle aussi, un domaine UIM. Les complexes ESCRT-II et ESCRT-III sont également associés à la membrane des MVB en cours de maturation, ils sont recrutés séquentiellement en aval du



**Figure 8: Différentes voies d'adressage aux lysosomes pour 3 RCPG PAR1, CXCR4 et  $\beta$ 2-AR**

(a) PAR1 présente une internalisation constitutive et dépendante de l'agoniste indépendante des b-arrestines mais régulé par l'ubiquitinylation. L'internalisation constitutive de PAR1 requiert AP2 mais est négativement régulé par l'ubiquitinylation. PAR1 activé est phosphorylé, rapidement internalisé, et trié dans les endosomes aux lysosomes par un mécanisme dépendant de SNX1 indépendamment de HRS et TSG101, composant de la machinerie ESCRT-I. Le passage de PAR1 internalisé par les MVB avant d'être dirigé vers les lysosomes n'est pas connu. (b) Le CXCR4 activé est ubiquitinylé à la membrane par l'ubiquitinyne ligase E3, AIP4. L'ubiquitinylation est un signal d'adressage aux lysosomes et n'est pas nécessaire pour l'internalisation de CXCR4. AIP4 ubiquitinyne Hrs après l'activation de CXCR4, ce qui semble être une étape critique pour le ciblage aux lysosomes. CISK phosphoryle et inhibe AIP4 et ainsi le ciblage lysosomal de CXCR4. VSP4 régule aussi le statut d'ubiquitinylation de CXCR4 et le tri dans les MVB. (c) La stimulation par un agoniste induit rapidement la phosphorylation et l'ubiquitinylation du  $\beta$ 2-AR. Le  $\beta$ -arrestine 2 est ubiquitinylé par Mdm2 et recrutée à  $\beta$ 2-AR, ce qui est nécessaire à l'internalisation du  $\beta$ 2-AR. Le  $\beta$ 2-AR internalisé est rapidement déphosphorylé et rapidement recyclé à la membrane par un mécanisme dépendant de EBP50/NHERF, NSF et Hrs. Après une longue exposition à un agoniste, le  $\beta$ 2-AR activé est adressé aux lysosomes par un mécanisme dépendant de l'ubiquitinylation du récepteur.

recrutement d'ESCRT-I et jouent un rôle dans la formation en continu de structures membranaires intraluminales (dans le MVB), et dans l'adressage des protéines cargo ubiquitinylées vers ces structures membranaires intraluminales [180]. Les protéines cargos ubiquitinylées sont déubiquitinylées, avant leur entrée dans le MVB, par des enzymes de déubiquitinylation. Parallèlement, le complexe ESCRT est désassemblé par une AAA-ATPase, Vsp4 (vacuolar protein sorting) ce qui facilite les étapes suivantes de la formation des vésicules intraluminales des MVB, contenant les protéines à trier [181].

Le récepteur  $\beta$ 2-adrénergique a été le premier récepteur identifié comme étant ubiquitinylé après une stimulation prolongée du récepteur par un agoniste. L'ubiquitinylation du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique qui est maximale à une heure après la stimulation est responsable de l'envoi du récepteur vers des voies de dégradation lysosomale observé à partir de deux heures après une stimulation prolongée par un agoniste [155]. Bien que l'ubiquitine ligase E3 MDM2 soit essentielle pour l'internalisation du  $\beta$ 2-adrénergique, via l'ubiquitinylation des  $\beta$ -arrestines, elle n'est pas responsable de l'ubiquitinylation du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique. Une étude récente montre que le récepteur  $\beta$ 2-adrénergique est ubiquitinylé par l'ubiquitine ligase NEDD4 (ubiquitin ligase neural precursor development downregulated protein 4) grâce au recrutement de NEDD4 au récepteur par les  $\beta$ -arrestines (Figure 8) [182].

Cependant, c'est pour le récepteur CXCR4, que le mécanisme de régulation du tri des RCPG vers les lysosomes par l'ubiquitinylation, est le mieux compris. Le récepteur CXCR4 est rapidement ubiquitinylé, envoyé aux lysosomes et dégradé en quelques heures. C'est la NEDD4-like E3 ubiquitine ligase API4, qui colocalise à la membrane plasmique avec CXCR4 et qui ubiquitinye le récepteur après stimulation par un agoniste. Cette enzyme ubiquitinye le récepteur CXCR4 sur des acides aminés lysines contenus dans un motif SSLKILSKGK présent au niveau de l'extrémité C-terminale du récepteur CXCR4. De manière intéressante, la mutation des sérines dans ce motif atténue la dégradation de CXCR4, suggérant que la phosphorylation du récepteur pourrait favoriser l'ubiquitinylation du récepteur.

L'ubiquitinylation du CXCR4 se fait à la membrane mais sert de signal de tri pour guider le récepteur aux lysosomes via les MVB. Les récepteurs CXCR4 activés colocalisent avec Hrs et l'ubiquitine ligase E3 AIP4 au niveau de microdomaines endosomaux. De plus, l'ubiquitine ligase E3 AIP4 ubiquitinye également Hrs après la stimulation par un agoniste, suggérant que l'ubiquitinylation d'Hrs est un facteur important dans le ciblage du CXCR4 aux lysosomes. L'enzyme AIP4 est, elle-même, régulée négativement par la phosphorylation de sérine/thréonine d'AIP4 par la kinase CISK qui agit en aval de la signalisation PI3Kinase [183]. La kinase CISK colocalise avec AIP4 à la membrane plasmique et il est suggéré que

la phosphorylation d'AIP4 par CISK empêche AIP4 de reconnaître le motif de dégradation sur CXCR4. Enfin, l'activité de l'AAA-ATPase, Vsp4 et la débubiquitination de CXCR4 sont nécessaires pour un bon adressage de CXCR4 aux lysosomes et une dégradation efficace (Figure 8). L'utilisation d'un mutant de Vsp4, incapable de désassembler les complexes ESCRT et de les séparer de la membrane endosomale, bloque la dégradation du récepteur CXCR4 [184].

D'autres RCPG sont ubiquitinylés et dégradés après une stimulation par un agoniste, on retrouve notamment les récepteurs vasopressine V2, somatostatine SST3, PAR2, neurokinine NK1, et le récepteur sphingosine 1-phosphate S1P. Ceci suggère un rôle général de l'ubiquitinylation dans le trafic des RCPG vers les lysosomes.

Cependant, l'ubiquitinylation ne semble pas être un pré-requis universel pour la dégradation de tous les RCPG. En effet, un récepteur  $\delta$ -opioïde muté sur toutes ses lysines intracellulaires, n'est pas ubiquitinylé mais est dégradé dans les lysosomes comme le récepteur sauvage indiquant l'existence de voies alternatives indépendantes de l'ubiquitinylation des RCPG. L'invalidation de Tsg101 (composant du complexe ESCRT-I) n'affecte pas l'adressage aux lysosomes et la dégradation du récepteur  $\delta$ -opioïde muté, alors que Hrs et Vsp4 sont toujours nécessaires dans le processus d'adressage aux lysosomes. Ces données suggèrent que les voies de dégradation des RCPG dépendantes et indépendantes de l'ubiquitinylation n'interagissent de la même manière avec la machinerie ESCRT. [185].

#### **C.5.2.b Les GASP (G-protein coupled receptor associated sorting protein)**

L'observation que le récepteur  $\delta$ -opioïde, muté sur toutes ses lysines intracellulaires, présente un profil de dégradation normal en absence d'ubiquitinylation, a conduit à l'hypothèse que d'autres protéines autres que la machinerie ESCRT sont impliquées dans l'adressage de ce récepteur aux lysosomes. En effet, le récepteur  $\delta$ -opioïde sauvage est adressé aux lysosomes par une interaction directe avec la protéine GASP. Une inhibition de la dégradation du récepteur est observée lors de la surexpression du motif d'interaction avec GASP situé au niveau de l'extrémité C-terminale du récepteur. Les protéines GASP constituent une famille qui comporte dix membres et qui est capable de se lier à un grand nombre d'extrémité C-terminale de RCPG. Seules GASP-1 et GASP-2 sont retrouvées associées au RCPG mais la très haute conservation des domaines de ces protéines suggère que les autres membres de cette famille peuvent aussi interagir avec les RCPG. Bien que GASP-1 ait été impliqué dans la régulation de la dégradation de plusieurs RCPG ( $\delta$ -opioïde, dopamine D2), via les lysosomes, GASP-1 a aussi été retrouvé interagissant avec des



récepteurs tels que le  $\beta$ 2-adrénérique ou le récepteur muscarinique M2, récepteurs qui sont rapidement recyclés à la membrane. Ceci pourrait laisser présager que GASP-1 joue un rôle dans la médiation de la régulation à long terme de ces récepteurs après une stimulation chronique par un agoniste. Par ailleurs, une étude a montré l'importance de l'affinité relative des GASP pour les différents RCPG dans le tri postendocytique des récepteurs [186].

Le mécanisme par lequel les GASP permettent l'adressage des RCPG est peu connu. GASP-1 pourrait interagir avec Hrs ce qui connecterait les récepteurs à la machinerie ESCRT. La protéine GASP-2 interagit avec une protéine appelée huntingtin, qui s'associe avec les membranes endosomales et interagit directement ou indirectement avec une variété de composants endocytiques et du cytosquelette. Il est possible que ce complexe huntingtin-GASP-2 puisse, via d'autres protéines du tri, contrôler l'adressage des RCPG aux lysosomes. En effet, la protéine HAP1 (huntingtin associated protein) interagit avec huntingtin mais aussi avec Hrs. Plus récemment, une protéine associée dans la biogénèse des lysosomes, la dysbindin, a été impliquée dans la dégradation du récepteur dopamine D2. Cette protéine, dysbindin co-immunoprécipite avec GASP-1 qui est elle-même impliquée dans l'adressage du récepteur dopamine D2 aux lysosomes [187].

### **C.5.2.c La protéine SNX1 (Sorting Nexin-1)**

La protéine SNX1 (Sorting Nexin-1) est une protéine impliquée dans la régulation du trafic membranaire et est localisée sur les endosomes précoces. La SNX1 interagit directement avec le récepteur PAR1. Ce récepteur est aussi envoyé dans des voies de dégradations lysosomales mais qui sont indépendantes de l'ubiquitinylation, de Hrs et de Tsg101 (complexe ESCRT-I) suggérant que PAR1 est adressé au lysosome selon un mécanisme indépendant des complexes ESCRT [188, 189]. Une étude montre que PAR1 est déubiquitinylé après son activation et qu'un mutant incapable d'être ubiquitinylé est dégradé comme le récepteur sauvage. Ces données confirment que PAR1 non ubiquitinylé est dirigé vers des voies de dégradations lysosomales. En revanche, l'adressage de PAR1 aux lysosomes est dépendant de la protéine SNX1 (Sorting Nexin-1) ([Figure 8](#)). La délétion de la fonction de SNX1 par la surexpression d'un dominant négatif ou par l'utilisation de siRNA bloquant la synthèse de la protéine endogène conduit à l'inhibition de la dégradation lysosomale de PAR1 [188]. La protéine SNX2 homologue à SNX1 module la dégradation lysosomale de PAR1 en affectant la localisation cytoplasmique de SNX1. La protéine SNX1 est capable de se lier à l'extrémité C-terminale d'autres RCPG, tels que le récepteur à l'oxytocine, le  $\delta$ -opioïde et le récepteur US28 qui sont tous les trois dégradés dans les lysosomes. Cependant, de la même manière que GASP, SNX1 est aussi associé à des



RCPG qui recyclent rapidement comme les récepteurs muscariniques M1 et M4, le récepteur neurokinine1 et 2 et le récepteur GLP-1 (glucagon like peptide-1) suggérant que SNX1 pourrait jouer un rôle dans la régulation négative des RCPG après une stimulation chronique à un agoniste, ou être impliqué dans d'autres types de mécanismes de régulation des RCPG [186].

### **C.5.3 Le tri des RCPG vers les voies de recyclage**

Le passage de protéines cargos des endosomes vers la membrane plasmique est classiquement vu comme étant un processus effectué par défaut. Cette idée initialement suggérée pour les récepteurs de nutriments paraît hautement probable pour les RCPG puisque l'inhibition du signal d'adressage d'un RCPG aux lysosomes aboutissant à l'augmentation de la présence membranaire du RCPG considéré. Cependant, ce modèle n'est pas suffisant pour expliquer le recyclage rapide et efficace d'un bon nombre de RCPG et en particulier du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique. En effet, le recyclage du  $\beta$ 2-adrénergique est dépendant d'une interaction avec un partenaire cytoplasmique au niveau de la partie distale de son extrémité C-terminale. La mutation de ce domaine non seulement abolit le recyclage du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique mais redirige le récepteur vers des voies de dégradation lysosomales [190, 191]. A l'inverse, la fusion de cette séquence de recyclage au récepteur  $\delta$ -opioïde est suffisante pour provoquer le recyclage du récepteur chimérique et sauver le récepteur de la dégradation. Il est donc proposé un modèle où les RCPG comportant une « séquence de recyclage » sont rapidement recyclés (classe A), alors que les récepteurs ne comportant pas de séquence spécifique sont recyclés lentement par un processus « par défaut » (classe B) [192].

#### **C.5.3.a Diversité des séquences de recyclage des RCPG**

Un certain nombre de séquences de recyclage identifiées sur les RCPG, comme celle qui a été identifiée sur le récepteur  $\beta$ 2-adrénergique, correspondent à un ligand domaine PDZ (post synaptic density 95/disc large/zonula occludens-1). Par exemple, les récepteurs  $\beta$ 1-adrénergique,  $\beta$ 2-adrénergique et TSH (thyrotropin-stimulating hormone) contiennent tous les trois des séquences ligands de domaine PDZ de type I (séquence : X-S/T-X- $\phi$ ). Toutes ces séquences de recyclage rapide se trouvent sur la partie distale de l'extrémité C-terminale, et sont très sensibles à une mutation affectant la structure et la position de ce domaine d'interaction. En effet, le groupement carboxyle de l'extrémité C-

terminale du récepteur forme une liaison ionique avec le domaine PDZ contenu dans les protéines partenaires [186].

Le récepteur ETa, présente une séquence de recyclage rapide qui correspond à un ligand de domaine PDZ mais elle est localisée à l'intérieur du domaine intracellulaire du récepteur. Ces ligands PDZ internes ont la particularité de présenter une petite séquence interne repliée en feuillet  $\beta$ , requise pour la liaison du domaine PDZ. L'alignement de près de 300 RCPG a permis d'identifier 35 autres RCPG contenant des ligands PDZ internes. Cependant, il reste à démontrer que ces ligands PDZ internes servent également de séquence fonctionnelle de recyclage chez ces récepteurs [193].

L'existence d'autres séquences de recyclage non apparentées aux ligands PDZ a été rapportée. Le récepteur  $\kappa$ -opioïde présente dans la partie distale de son extrémité C-terminale, une séquence NKPV, qui n'est pas une séquence de ligand PDZ conventionnelle. Une séquence présente dans l'extrémité C-terminale du récepteur du récepteur  $\mu$ -opioïde assure le recyclage du récepteur avec une efficacité similaire à celle du ligand PDZ chez le récepteur  $\beta$ 2-adrénergique. Cette séquence de recyclage du récepteur  $\mu$ -opioïde peut compenser la perte de la séquence ligand PDZ d'un récepteur chimérique d'un point de vue du recyclage. Cette séquence détectée chez le récepteur  $\mu$ -opioïde ne se lie pas aux domaines PDZ, néanmoins aucun partenaire n'a été découvert à ce jour [194].

### **C.5.3.b Protéines impliquées dans les mécanismes de recyclage des RCPG**

Plusieurs protéines interagissant avec les séquences de recyclage des RCPG ont été identifiées. Dans la plupart des cas, plusieurs protéines sont capables d'interagir avec les séquences de recyclage des RCPG. La séquence de recyclage DS/TXL présente dans le récepteur  $\beta$ 2-adrénergique est capable d'interagir avec un des deux domaines PDZ de la protéine NHERF1 (Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor-1). Des interactions similaires entre le motif DS/TXL et NHERF1 ont été décrites pour le récepteur purinergique P2Y1 et le récepteur CFTR. Cependant, le récepteur à l'hormone parathyroïde (PTH) interagit via un motif différent, ETVM, avec les deux domaines PDZ de NHERF1 et de NHERF2. Les protéines NHERF sont capables d'interagir avec les protéines d'actines du cytosquelette via un domaine ERM (ezrin-radixin-moesin). Les mutations de NHERF1 dans le domaine PDZ ou ERM entraînent une inhibition de son recyclage et une augmentation conséquente de la dégradation lysosomale du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique [190].

Une autre protéine dépourvue de domaine PDZ régule également le recyclage du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique, la protéine NSF (N-Ethylmaleimide Sensitive Fusion protein) [191]. En effet, la surexpression de la protéine NSF permet de compenser l'inhibition de

l'internalisation du  $\beta$ 2-adrénergique provoquée par l'expression d'un dominant négatif de la  $\beta$ -arrestine1.

Des analyses protéomiques ont révélé que les extrémités C-terminales des récepteurs  $\beta$ 1-adrénergiques et  $\beta$ 2-adrénergiques diffèrent au niveau de leur spécificité envers le domaine PDZ. Plusieurs protéines peuvent interagir avec le récepteur  $\beta$ 1-adrénergique pour réguler le recyclage de ce récepteur mais aussi pour intervenir dans d'autres fonctions de régulation. La protéine SAP97 contenant un domaine PDZ est la protéine majoritairement responsable du recyclage du récepteur  $\beta$ 1-adrénergique. Un modèle a été proposé dans lequel SAP97 se lie à l'extrémité C-terminale du récepteur  $\beta$ 1-adrénergique [195]. Cette interaction permet à SAP97 d'interagir avec une protéine AKAP-79 (A-kinase anchoring protein) qui elle-même facilite l'association de la PKA au complexe. La proximité de la PKA vis-à-vis du récepteur permettrait la phosphorylation d'une sérine dans la troisième boucle intracellulaire du récepteur régulant aussi le recyclage de ce récepteur [186].

La présence de séquences de recyclage différentes de celles des ligands PDZ suggèrent l'existence de protéines régulant le recyclage des RCPG, différentes des protéines contenant un domaine PDZ. La protéine ARAP1, ne contenant pas de domaine PDZ, interagit avec l'extrémité C-terminale du récepteur angiotensine AT1 et favorise son recyclage. La filamine, protéine associée au cytosquelette est capable de se lier au récepteur calcitonine et favorise le recyclage de ce récepteur [186].

### **C.5.3.c Un ou plusieurs mécanismes de recyclage des RCPG ?**

La diversité des séquences mises en évidence pour le recyclage des RCPG ainsi que la variété de protéines partenaires impliquées dans ce processus, soulèvent la question de l'existence d'une multitude de mécanismes utilisés dans le recyclage des RCPG. Une première hypothèse propose que chaque RCPG utilise des protéines adaptatrices spécifiques. La seconde hypothèse propose que les RCPG accèdent via différentes protéines initiatrices (NHERF, SAP97, NSF, ARAP1, Filamine...) à un même mécanisme conservé de recyclage commun à une majorité de RCPG. Des études récentes étayent plutôt la seconde hypothèse, et suggèrent qu'il existe un lien entre la voie de recyclage dépendante des séquences dans les RCPG et la machinerie d'adressage aux lysosomes, ESCRT. La protéine Hrs, est impliquée dans l'arrêt du signal des RCPG en favorisant leur adressage aux lysosomes. Cependant, des mutations rendant Hrs non fonctionnel conduisent à l'inhibition du recyclage du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique et du récepteur  $\mu$ -opioïde, les récepteurs internalisés étant retrouvés piégés dans les endosomes précoces.

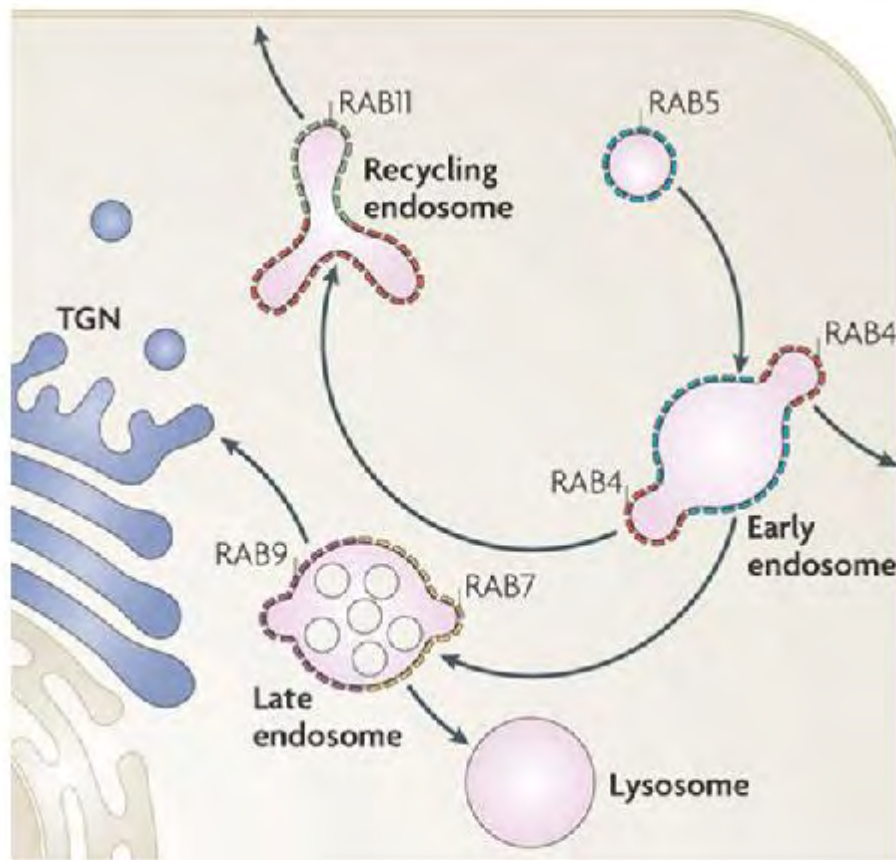
D'autre part dans le même système cellulaire, le recyclage par défaut du récepteur transferrine et d'un RCPG tronqué de son extrémité C-terminale est indépendant d'Hrs. L'invalidation par ARN interférence de la protéine Tsg101 du complexe ESCRT-I, ou de la protéine Vsp4 n'a montré aucun changement significatif dans le recyclage de ces deux récepteurs [196].

Ces données suggèrent donc l'existence d'un mécanisme commun de recyclage des RCPG faisant intervenir Hrs. Compte tenu du rôle double d'Hrs, dans le recyclage et l'adressage aux lysosomes, il est proposé que la protéine Hrs puisse occuper une fonction de « centre de tri » en amont des deux voies.

#### **C.5.4 Marqueurs et acteurs du tri intracellulaire, la famille des protéines Rab**

La famille des Rab GTPases est la plus grande et la plus variée de la superfamille des petites protéines G Ras-like avec plus de soixante membres [197]. Les protéines Rab contrôlent de nombreux processus cellulaires tels que l'endocytose, le trafic intracellulaire, la fusion des endosomes et l'exocytose. D'abord identifiées chez la levure, puis chez le rat, leur nom provient de leur homologie avec les protéines ras présentes au niveau du système nerveux de rat (*Ras-like rat brain*). Les protéines Rab subissent des modifications post-transcriptionnelles et notamment, l'ajout de deux groupements geranyl-geranyl en C-terminal qui leur permettent d'être associés aux membranes. Les Rab se distinguent par une séquence d'acides aminés spécifiques appelée motifs RabF. Comme les autres GTPases, les Rab ont un cycle entre un état activé lié au GTP et inactif lié au GDP. Le statut d'activation est régulé par les protéines régulatrices des protéines G, les GAP qui accélèrent le taux d'hydrolyse du GTP lié en GDP et les GEF qui catalysent l'échange de GDP lié en GTP [198].

Les protéines Rab sont localisées à tous les niveaux du réseau vésiculaire intracellulaire, appareil de Golgi, vésicules et granules sécrétoires, les endosomes tardifs, lysosomes, endosomes précoces, phagosomes, mitochondrie, jonctions serrées. Ces protéines jouent un rôle dans le bourgeonnement des vésicules, la mobilité vésiculaire, l'attachage et la fusion des vésicules entre elles, et participent également au démantèlement des manteaux de clathrine [198]. Pour le trafic des RCPG, plusieurs groupes ont étudié les rôles de protéines Rab, notamment les Rab4, Rab5, Rab7 et Rab11, qui interviennent dans la régulation de l'endocytose et du tri entre les endosomes précoces, tardifs, de recyclage et les lysosomes (Figure 9) [199].



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

**Figure 9: Les principaux Rab GTPases impliquées dans la régulation des RCPG**

Les endosomes précoces contiennent des domaines enrichis en Rab5 (bleu) et Rab4 (rouge), qui sont impliqués dans la fusion des endosomes et le recyclage endocytaire respectivement. Les endosomes de recyclage rapide sont enrichis en Rab4 alors que les endosomes de recyclage lent sont enrichis en Rab11 (vert). Les endosomes tardifs contiennent des domaines enrichis en Rab7 (jaune) et Rab9 (violet) qui régule le trafic vers les lysosomes et à l'appareil de Golgi respectivement. (D'après *Stenmark, 2009*)

#### **C.5.4.a Rôle des Rab5 dans la régulation de l'endocytose des RCPG**

Rab5 est localisé au niveau de la membrane plasmique, des vésicules recouvertes de clathrine et des endosomes précoces. Rab5 est nécessaire pour la fusion des endosomes précoces *in vitro*. Son expression dans des cellules stimule l'internalisation de marqueurs endocytiques et favorise l'apparition de grosses structures endosomales [199].

Le récepteur  $\beta$ 2-adrénergique est internalisé et est retrouvé dans des endosomes précoces Rab5 positif après la stimulation du récepteur par un agoniste [200]. Les récepteurs endothéline ETa et ETb sont rapidement internalisés après stimulation et colocalisent très vite avec Rab5. Il est intéressant de noter, que Rab5 contrôle l'internalisation de ces deux récepteurs, le récepteur ETa étant recyclé à la membrane et le récepteur ETb étant envoyé vers les lysosomes pour être dégradé [201]. L'expression d'un dominant négatif de Rab5, un mutant Rab5-S34N, bloque l'internalisation de plusieurs RCPG en particulier des récepteurs  $\beta$ 2-adrénergique, dopamine D2, neurokinine NK1, et chimiokine 2 CXC2 [199]. Rab5 se lie directement avec le récepteur angiotensine AT1 qui est spécifiquement internalisé dans des endosomes contenant Rab5 alors que ce récepteur est capable d'être internalisé via des mécanismes dépendants et indépendants des  $\beta$ -arrestines [202]. Ceci suggère que Rab5 régule une étape commune du tri de RCPGs qui sont endocytés via des mécanismes distincts.

Rab5 aurait également un rôle dans la resensibilisation des RCPG. En effet la surexpression du dominant négatif, Rab5-S34N, provoque l'accumulation de vésicules portant les récepteurs  $\beta$ 2-adrénergique internalisés, attachées ou juxtaposées à la membrane plasmique, et ceci empêche la déphosphorylation et la resensibilisation des récepteurs. La resensibilisation du récepteur NK1 est également inhibée par la surexpression du dominant négatif Rab5-S34N.

Les RCPG peuvent jouer le rôle des GEF (Guanine Exchange Factor) vis-à-vis des protéines Rab et ainsi conduire à leur activation. Dans le cas de Rab5, l'activation du récepteur angiotensine AT1 par un agoniste stimule l'échange de Rab5-GDP en GTP et de ce fait module l'activité de Rab5 qui mène à la fusion des endosomes précoces. Sur la base de ces données, il a été proposé que les RCPG régulent leur trafic intracellulaire à travers les différents compartiments vésiculaires en agissant directement sur l'activité des protéines Rab [199].

#### **C.5.4.b Rôle des protéines Rab4 et Rab11 dans le recyclage**

Les protéines Rab4, Rab5 et Rab11 présentent une distribution cellulaire spécifique avec un recouvrement entre ces trois protéines au niveau des endosomes précoces et de recyclage. Les protéines Rab4 contrôlent le recyclage rapide de protéines cargos vers la membrane plasmique depuis les structures endosomales précoces contenant les Rab4-Rab5. L'expression d'un dominant négatif, Rab4-N121I bloque le recyclage rapide du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique. L'expression de ce mutant bloque la resensibilisation du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique sans toutefois affecter sa déphosphorylation et son internalisation, suggérant que la déphosphorylation du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique se fait quand le récepteur transite entre des compartiments régulés par Rab5 et des compartiments régulés par Rab4 [200]. Le recyclage rapide des RCPG comme le récepteur  $\beta$ 2-adrénergique, se fait directement depuis l'endosome précoce vers la membrane plasmique.

Cependant, les RCPG recyclés lentement, transitent quant à eux, par des endosomes périnucléolaires puis ensuite vers la membrane. Les protéines Rab11 sont localisées au niveau des endosomes précoces, des endosomes périnucléolaires ainsi qu'au niveau du réseau *trans*-golgien. Le rôle des protéines Rab11 est le contrôle du recyclage lent et le trafic du réseau *trans*-golgien. La surexpression de dominant négatif de Rab11, bloque le recyclage lent des RCPG de classe B tels que les récepteurs vasopressine V2, somatostatine SST3 et le CXCR2. De manière intéressante, on retrouve le récepteur  $\beta$ 2-adrénergique avec Rab11 dans des endosomes périnucléaire, suggérant que le tri de ce récepteur est régulé par de multiples mécanismes [199].

#### **C.5.4.c Rôle des protéines Rab7 dans l'adressage des RCPG aux lysosomes**

Rab7 est principalement localisé au niveau des endosomes tardifs et des lysosomes et régule le trafic vésiculaire de l'endosome tardif vers les lysosomes ainsi que le trafic des lysosomes vers les endosomes tardifs [203]. Rab7 pourrait aussi réguler le trafic des RCPG des endosomes précoces aux endosomes tardifs et aux lysosomes. La surexpression d'un dominant négatif de Rab7 bloque l'adressage aux lysosomes et la dégradation des récepteurs CXCR2 et  $\kappa$ -opioïde. La surexpression de Rab7 permet la redistribution du récepteur angiotensine AT1 des endosomes précoces vers les endosomes tardifs et les lysosomes[199].

### **C.5.5 Tri des RCPG à partir des cavéoles**

Certains RCPG sont internalisés via les cavéoles. Le trafic intracellulaire des RCPG à partir des cavéoles reste peu connu. Soit les RCPG suivent une voie indépendante de la voie clathrine dépendante, soit ces vésicules issues des cavéoles fusionnent avec celles de la voie clathrine dépendante à un certain stade. L'existence de cavéosomes a été suggéré mais il y a peu d'informations sur la fonction d'une telle structure et sur la relation entre les cavéosomes et les endosomes. La présence de Rab5 a été rapportée au niveau des cavéosomes [198].

*En résumé, un RCPG internalisé peut être soit recyclé, soit dégradé. Le recyclage rapide d'un RCPG se fait grâce à des séquences présentes sur le RCPG (PDZ, autres...) qui permettent la liaison de protéines initiatrices et ainsi l'accès du récepteur à un mécanisme de recyclage commun des RCPG faisant intervenir la protéine Hrs. L'adressage des RCPG aux lysosomes peut se faire par différents mécanismes impliquant notamment l'ubiquitinylation du récepteur, les protéines GASP, SNX1 ainsi que Hrs et la machinerie ESCRT. Les protéines Rab sont des marqueurs du tri vésiculaire mais peuvent aussi participer au tri des RCPG.*

## **D] Transduction du signal indépendante des protéines G :**

### **Rôle des $\beta$ -arrestines**

L'internalisation des RCPG a tout d'abord été considérée comme un moyen pour la cellule de resensibiliser ces récepteurs et ainsi de limiter la période pendant laquelle ceux-ci ne peuvent pas émettre de signal. Les RCPG présentent une grande diversité de profils d'internalisation et de devenir postendocytaire qui résulte d'une interaction spécifique avec de multiples partenaires cellulaires. Aujourd'hui, de plus en plus de résultats indiquent que l'internalisation des RCPG donne également naissance à la transduction d'un signal post-endocytaire, principalement relayé grâce à l'action des  $\beta$ -arrestines. L'impact du signal post-endocytaire des RCPG commence seulement à être admis, et la grande diversité des profils post-endocytaires des RCPG pourrait apporter un degré de complexité supplémentaire dans la modulation du signal de ces récepteurs.



Dans cette partie, nous nous intéresserons au signal des RCPG indépendant des protéines G mais dépendant des  $\beta$ -arrestines et nous discuterons de l'importance de la régulation post-endocytaire sur le signal émis par un RCPG.

## **D.1. Découverte et structure des $\beta$ -arrestines.**

### **D.1.1 Découverte et classification des arrestines**

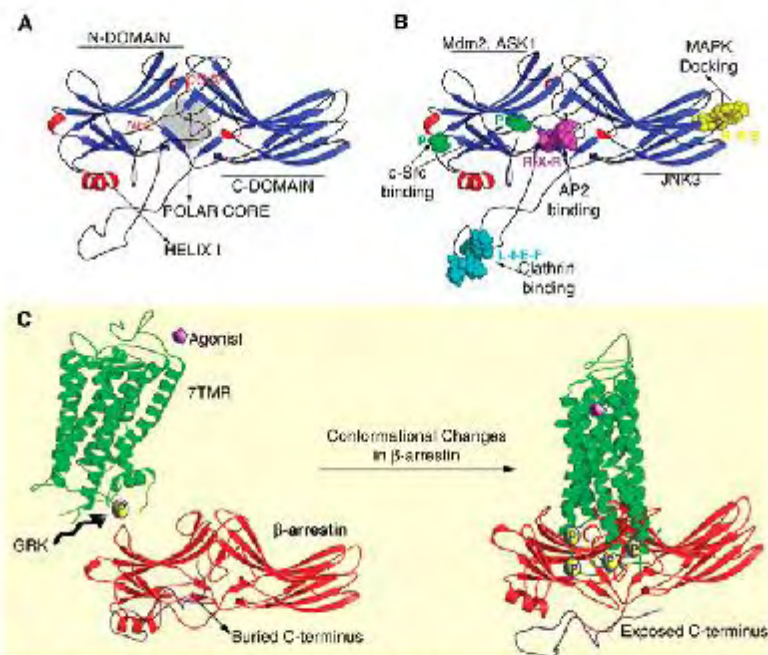
La phosphorylation par les GRK de la rhodopsine ou du récepteur  $\beta$ 2-adrénérique n'étant pas suffisante pour expliquer l'inactivation complète de ces RCPG, l'existence d'un « arrestin agent » a été formulé comme complément au système GRK. L'arrestine visuelle a été la première à être découverte en 1985, et retrouvée associée à la rhodopsine activée par la lumière [204]. Plus tard, une arrestine non visuelle, la  $\beta$ -arrestine 1 est retrouvée impliquée dans la désensibilisation du  $\beta$ 2-adrénérique initié par GRK2 [205]. Le clonage de la  $\beta$ -arrestine1 a révélé 59% d'homologie de séquence avec l'arrestine visuelle [101].

A l'heure actuelle, la famille des arrestines comporte quatre membres. Celles-ci peuvent être divisées en deux groupes basés sur leur homologie de séquence, de fonction et de distribution tissulaire. D'un côté l'arrestine 1, aussi appelée arrestine visuelle, et l'arrestine 4, aussi appelée arrestine de cône. De l'autre, les  $\beta$ -arrestines ou les arrestine 2 et arrestine 3 respectivement appelées  $\beta$ -arrestine 1 et  $\beta$ -arrestine 2. L'arrestine visuelle et l'arrestine de cône sont exprimées au niveau de la rétine alors que les  $\beta$ -arrestines sont ubiquitaires [206].

### **D.1.2. Structure des arrestines**

Les structures des cristaux de l'arrestine-1 (arrestine visuelle) bovine, de l'arrestine 2 ( $\beta$ -arrestine1) bovine et de l'arrestine 4 (arrestine de cône) de la salamandre ont été résolues et ont apporté des informations qui permettent de mieux comprendre les fonctions des  $\beta$ -arrestines.

Les arrestines ont une forme allongée et sont quasi-exclusivement constituées de feuillets  $\beta$ , et de boucles reliant ces différents feuillets à l'exception d'une courte hélice  $\alpha$  [207]. Ces protéines sont composées de deux domaines, N-domaine et C-domaine



R.J Lefkowitz, S.K Shenoy Science 2005;308:512-517

**Figure 10: Modèle structural de la  $\beta$ -arrestine 2 et changement conformationnel dépendants du récepteur.**

A) Structure de la  $\beta$ -arrestine 2 présentant les domaines N- et C-terminaux, le coeur polaire et l'hélice 1 de cette protéine. B) Structure de la  $\beta$ -arrestine 2 présentant les motifs importants d'interaction avec les protéines Src, AP2, clathrine, mdm2, ASK1, MAPKinase et JNK3. C) Changements conformationnels dépendant de l'activation d'un RCPG. Le modèle de la rhodopsine a été utilisé pour modéliser ce RCPG. A gauche, l'état basal, l'extrémité C-terminale de la  $\beta$ -arrestine 2 est à l'intérieur de la protéine et n'est pas accessible. La stimulation par un agoniste provoque la phosphorylation du récepteur par les GRK. Le domaine chargé du récepteur pénètre dans le coeur polaire de l'arrestine et le rompt. La rupture du coeur polaire de l'arrestine provoque des changements conformationnels globaux aboutissant à la libération de l'extrémité C-terminale qui devient exposé aux interactions protéiques. L'extrémité C-terminale de l'arrestine contient notamment les domaines de liaison à la clathrine et AP2. (D'après Lefkowitz & Shenoy, 2005)

connectés par un cœur polaire disposé au centre de la molécule. Les deux domaines sont reliés par une petite portion charnière. L'extrémité C-terminale est connectée par un lien

flexible au C-domaine et contient un court brin  $\beta$  qui interagit avec un brin  $\beta$  latéral du N-domaine. Lors de la liaison au RCPG, deux régions semblent opérer un réarrangement conformationnel, la région comportant les acides aminés de 282 à 309 et l'extrémité C-terminale. La charnière connectant les deux domaines N- et C- jouerait aussi un rôle important. En effet, la diminution de la longueur de la charnière entraîne la diminution de l'activation de l'arrestine suggérant que la transition de l'arrestine d'un état actif vers un état inactif se fait par un mouvement relatif du N-domaine par rapport au C-domaine. Le cœur polaire de l'arrestine est constitué d'acides aminés chargés provenant du N-terminale, Asp 29 (pour la  $\beta$ -arrestine1), du N-domaine, Arg 169 et Lys 170, du C-domaine Asp 290 et Asp 297, et de l'extrémité C-terminale, Arg 393. L'établissement des interactions intramoléculaires qui constituent le cœur polaire permet de rapprocher différentes parties de l'arrestine entre elles et de maintenir la molécule d'arrestine dans sa conformation inactive. Les acides aminés constituant le cœur polaire sont très conservés indiquant que cet élément structural est aussi conservé chez toutes les arrestines et qu'il est indispensable à la fonction des arrestines. Les différentes chaînes latérales des acides aminés constituant le cœur polaire parviennent à la neutralité par un réseau élaboré d'interactions électrostatiques, et l'élimination du cœur polaire par liaison d'un groupement phosphate du RCPG pourrait promouvoir le réarrangement conformationnel responsable de l'activation. La rupture de ce réseau d'acides aminés peut être simulée par la substitution d'une arginine par un acide aminé non chargé. L'arrestine mutante résultante lie aussi bien les RCPG phosphorylés que les non-phosphorylés suggérant que cette arginine joue un rôle clé dans le maintien de la configuration inactive de l'arrestine [207]. Les changements conformationnels de l'arrestine nécessaires pour transiter d'un état inactif à un état actif ont également été mesurés par une technique de B.R.E.T intramoléculaire (Figure 10) [208].

### **D.1.3. Base structurale de l'interaction des arrestines avec les RCPG**

Une caractéristique importante de l'interaction des arrestines avec les RCPG est la capacité des arrestines à reconnaître d'une part la conformation activée d'un RCPG et d'autre part l'état phosphorylé de ce récepteur. Des études de tronçatures de domaines des arrestines ont été réalisées. Au moins trois régions dans la moitié N-terminale de l'arrestine visuelle sont impliquées dans la reconnaissance de la rhodopsine activée. Les domaines N-

terminaux des  $\beta$ -arrestines 1 et 2 possèdent aussi la capacité de reconnaître les états activés des RCPG suggérant que la région de reconnaissance des RCPG activés sur les arrestines se situe dans la partie N-terminale de la protéine [209]. Cette région N-terminale reconnaissant le récepteur activé a été localisée au niveau des brins  $\beta$  5 et 6 avec les boucles adjacentes, mais une seconde région est présente au sein du brin  $\beta$  15 et 16 dans le domaine C-terminal. La substitution de ces éléments entre la  $\beta$ -arrestine 1 et la  $\beta$ -arrestine 2 reverse leur spécificité pour le récepteur [210].

L'importance de l'état de phosphorylation du récepteur dans la liaison de l'arrestine a été abondamment explorée. Le domaine de reconnaissance sur l'arrestine visuelle est localisé entre les acides aminés 163-179, avec cependant d'autres phosphates adjacents positivement chargés à l'intérieur du brin  $\beta$  (lys-14, lys-15) qui interviennent dans la liaison aux phosphates [207]. D'autres acides aminés positivement chargés pourraient prendre part à l'interaction incluant l'Arg-18, Lys-20, Lys-55, Arg-56 et Lys-300 de l'arrestine visuelle. Une inversion de charge de l'Arg-175 de l'arrestine visuelle génère une arrestine constitutivement activée capable de se lier à un RCPG non phosphorylé. Ce acide aminé « phosphosensor » est critique pour détecter l'état de phosphorylation du RCPG et est conservé chez les différentes arrestines.

Toutes ces données ont permis de proposer un modèle d'interaction entre les arrestines et les RCPG. Dans ce modèle, l'arrestine sonde l'état de phosphorylation du récepteur et se lie via ses domaines de reconnaissance de l'activation du RCPG et de l'état de phosphorylation du RCPG. Quand le RCPG est activé et phosphorylé, l'arrestine parvient à interagir avec une haute affinité avec le récepteur en s'engageant au niveau de ses deux domaines de reconnaissance (activation et phosphorylation). Les lysines (notamment Lys-14 et Lys-15) localisées au niveau du domaine N-terminal guideraient les groupements phosphates des RCPG vers le domaine de reconnaissance de l'état de phosphorylation des arrestines, ce qui enclencherait l'arginine « phosphosensor » et ainsi initierait l'activation de l'arrestine. Les groupements phosphates du RCPG hautement chargés suppriment les interactions du cœur polaire relâchant ainsi les contraintes imposées par l'extrémité C-terminale de l'arrestine sur les N-domaines et C-domaines. Récemment, le rôle de la courte hélice  $\alpha$  a été étudié et montre que celle-ci permet de maintenir le brin  $\beta$  1 qui interagit avec plusieurs acides aminés phosphates du RCPG dans une position favorable pour son interaction avec les phosphates du récepteur [211].

*L'activation de l'arrestine requiert des réarrangements structuraux de la part des différents domaines de la protéine. Ceux-ci sont mis en place grâce à la déstabilisation du cœur polaire de l'arrestine. Ces réarrangements structuraux conduisent au démasquage des*

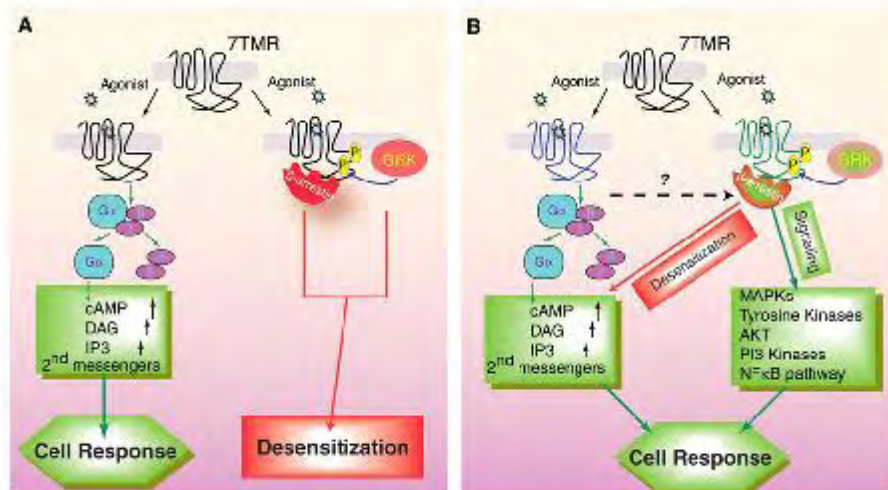
*différents domaines d'interaction avec des protéines endocytiques (AP-2, clathrine) et des protéines de la signalisation.*

#### **D.1.4. Dimérisation des $\beta$ -arrestines**

Les  $\beta$ -arrestines sont, non seulement capables d'adopter des conformations multiples, mais aussi de s'oligomériser par l'intermédiaire d'une interface de dimérisation présente sur chacune des molécules de  $\beta$ -arrestine. La dimérisation des  $\beta$ -arrestines pourraient réguler les interactions avec des molécules de la signalisation, en autorisant l'interaction pour certains partenaires et en l'inhibant pour d'autres. De plus, l'hétérodimérisation des arrestines pourrait jouer un rôle important dans le recrutement de nombreux partenaires puisque beaucoup de voies de signalisation dépendantes des  $\beta$ -arrestines font appel aux deux  $\beta$ -arrestines.

#### **D.2. Rôle des $\beta$ -arrestines dans la signalisation des RCPG**

La découverte des  $\beta$ -arrestines s'est faite dans le contexte de la désensibilisation des RCPG puis leur rôle dans l'endocytose a été mis à jour révélant le rôle de « connecteur » de récepteurs désensibilisés à la machinerie endocytique. En 1999, une étude révèle qu'après le recrutement des  $\beta$ -arrestines au récepteur  $\beta$ 2-adrénergique activé, les  $\beta$ -arrestines interagissent avec la protéine kinase Src [212]. A la suite de cette étude, des « screens » de double hybride en levure et de protéomique ont rapporté que les  $\beta$ -arrestines peuvent se lier à une large gamme de protéines de la signalisation et les recruter dans un complexe associé aux RCPG, appelé signalosome [213]. Bien que toutes ces protéines n'aient pas encore été associées à une fonction physiologique, il est maintenant clair que la liaison des  $\beta$ -arrestines aux RCPG ne marque pas l'arrêt du signal mais plutôt le début d'une seconde vague de signaux indépendants des protéines G, ajoutant ainsi un niveau de complexité supplémentaire dans la signalisation des RCPG (Figure 11).



R J Lefkowitz, S K Shenoy Science 2005;308:512-517

### Figure 11: Transduction du signal par les RCPG

(A) Paradigme classique: La forme active du RCPG stimule les protéines G et est rapidement phosphorylé par les GRK ce qui conduit au recrutement des  $\beta$ -arrestines. Le récepteur est alors désensibilisé et le signal stoppé. (B) Nouveau paradigme: Les  $\beta$ -arrestines désensibilisent le signal des RCPG dépendants des protéines G mais agissent elles aussi comme des transducteurs du signal. (D'après Lefkowitz & Shenoy, 2005)

### D.2.1. Les $\beta$ -arrestines et la famille des protéines kinases Src

Les  $\beta$ -arrestines se lient aux protéines de la famille des protéines kinases Src, et les recrutent aux récepteurs activés. Le domaine N-terminal de la  $\beta$ -arrestine2 est enrichi en proline et contient trois motifs PXXP qui interagissent avec le domaine SH3 (Src Homology 3 domain) de c-SRC [212]. La  $\beta$ -arrestine1 possède un seul motif PXXP qui interagit avec le domaine SH2 de c-Src [214]. Cependant, l'internalisation du récepteur ne semble pas être nécessaire pour le recrutement de Src par les  $\beta$ -arrestines. En effet, le complexe récepteur  $\beta$ 2-adrénergique/ $\beta$ -arrestines associé à c-Src est visible à la membrane plasmique après stimulation par de l'isoprotérénol. En revanche, la mutation de la sérine 412 de l'extrémité C-terminale de la  $\beta$ -arrestine2, qui fait disparaître l'association du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique avec les  $\beta$ -arrestines, empêche aussi l'interaction entre l'arrestine et Src [212].

Le recrutement de Src au RCPG, dépendant des  $\beta$ -arrestines, semble être important pour l'internalisation dépendante de la clathrine. Src recrutée par les  $\beta$ -arrestines, phosphoryle la GRK2 ce qui la déstabilise et favorise son entrée dans le protéasome entraînant la fin de la désensibilisation du RCPG [215]. D'autre part, Src associée aux  $\beta$ -arrestines, phosphoryle la tyrosine 597 de la dynamine1 ce qui régule l'auto-assemblage de la dynamine. L'expression d'un mutant Y597F de la dynamine 1, empêche l'internalisation du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique et du récepteur muscarinique M2 [148]. Une autre cible de Src associée aux arrestines est la sous-unité  $\beta$ 2-adaptine du complexe AP-2. En effet, Src stabilise l'association constitutive entre la  $\beta$ -arrestine 2 et la  $\beta$ 2-adaptine indépendamment de son activité kinase. De plus, Src phosphoryle la tyrosine 737 de la  $\beta$ 2-adaptine au niveau des puits recouverts de clathrine membranaires en réponse à la stimulation des récepteurs Angiotensine II AT1a,  $\beta$ 2-adrénergique, vasopressine V2, Bradikinine B2. La phosphorylation de cette tyrosine aboutit à la dissociation d'AP-2 du complexe récepteur/arrestines, déclenchant l'internalisation du récepteur. L'inhibition de la phosphorylation de la  $\beta$ 2-adaptine provoque la rétention des complexes récepteurs-arrestines à la membrane plasmique dans les puits recouverts de clathrine [216].

Au-delà de son rôle dans l'endocytose des RCPG, il apparaît que Src est recrutée au niveau de complexes RCPG-arrestines-protéines de la signalisation appelés signalosomes. Le recrutement de Src, aux récepteurs  $\beta$ 2-adrénergique et Neurokinine NK1 activés contribue à l'activation de la voie MAPKinase à travers la phosphorylation des ERK1/2 [212, 217]. D'autre part, le récepteur LH (Luteinizing hormone) active une autre protéine de la famille Src, c-Fyn d'une manière dépendante de la  $\beta$ -arrestine2 [218]. La diminution de l'expression de  $\beta$ -arrestine2 par l'utilisation d'ARN interférence provoque l'inhibition de

l'activation de c-Fyn par le récepteur LH. Finalement, le récepteur dopamine D2 active la voie de signalisation du facteur nucléaire NF- $\kappa$ B d'une manière dépendante de Src et la surexpression de la  $\beta$ -arrestine1 potentialise cette activation [219].

### **D.2.2. Interaction des $\beta$ -arrestines avec les protéines ERK1/2**

L'implication des  $\beta$ -arrestines dans la régulation de la cascade d'activation des ERK1/2 est le mécanisme dépendant des  $\beta$ -arrestines le plus étudié à ce jour. Les ERK1/2, sont les kinases terminales des trois kinases de la cascade des MAPKinase. Cette cascade comporte les MAPKKK (MAP kinase kinase kinase) c-Raf1, B-Raf, les MAPKK (MAP kinase kinase) MEK1/2 et les MAPK (MAP kinase) ERK1/2. L'activité des ERK1/2 est requise pour la transition du cycle cellulaire Go/G1 et d'une manière générale, nécessaire dans la mitose et la méiose. Les RCPG activent souvent cette voie MAPKinase par des voies dépendantes des protéines G, notamment via les PKA et PKC, ou aussi par transactivation du récepteur à l'EGF. Cependant, il est maintenant connu que les  $\beta$ -arrestine 1 et 2 peuvent simultanément engager les trois composants de la cascade MAPKinase, et fonctionner en complexe régulé par l'agoniste du RCPG considéré, augmentant l'efficacité de la cascade de phosphorylation Raf-MEK-ERK et imposant une restriction spatiale dans la cellule sur ce signal.

La purification sur gel du récepteur PAR2 révèle que c-Raf1 et ERK1/2 sont des composants d'un complexe signalosome constitué de plusieurs protéines qui s'assemblent autour du récepteur lié aux  $\beta$ -arrestines [220]. Des résultats similaires ont été obtenus avec le récepteur angiotensine II AT1a qui colocalise, quelques minutes après la stimulation, avec les  $\beta$ -arrestines et les ERK1/2 dans les endosomes précoces [221]. Les  $\beta$ -arrestines 1 et 2 se lient directement à c-Raf1 et ERK1/2 alors que l'interaction avec MEK semblent plutôt indirecte. Dans des conditions de surexpression et en absence d'activité du récepteur, le complexe  $\beta$ -arrestines/Raf/MEK/ERK existe déjà dans le cytoplasme avec les ERK1/2 sous forme inactive. Dans ce cas, la surexpression de c-Raf1 augmente la phosphorylation des ERK1/2 liés au  $\beta$ -arrestines. Ceci suggère que la liaison des  $\beta$ -arrestines favorise l'activation des ERK1/2 en augmentant l'efficacité de la phosphorylation séquentielle de ces trois composants Raf-MEK-ERK [220]. Lors de la stimulation du RCPG par un agoniste, le complexe  $\beta$ -arrestines-Raf-MEK-ERK subit une translocation membranaire aboutissant à l'activation des ERK1/2 [159]. Les récepteurs de classe B comme le PAR2 ou le récepteur Angiotensine II AT1a, présentent une interaction stable avec les  $\beta$ -arrestines et les ERK1/2 et restent localisés au niveau des endosomes.



Les mécanismes par lesquels les RCPG associés aux  $\beta$ -arrestines activent les ERK1/2 restent mal connus. Des mutants des récepteurs Angiotensine II AT1a et PAR2 incapables de lier les protéines G et les ligands et recrutent spécifiquement les  $\beta$ -arrestines sans activer la protéine G, ont permis de montrer que l'activation des ERK1/2 par le complexe récepteur-arrestines est indépendante des protéines G [220]. L'expression d'un récepteur chimérique NK1-arrestine visuelle non couplé à la protéine G provoque l'activation constitutive d'un réservoir d'ERK1/2 qui reste lié, avec c-Raf1 et MEK1/2, au récepteur-arrestine chimérique internalisé confirmant que les protéines G ne sont pas requises [222]. L'adressage de c-Raf1 à la membrane plasmique de même que la translocation membranaire de la  $\beta$ -arrestine2 sont suffisantes pour activer les ERK1/2, indépendamment, suggérant que l'arrestine fonctionne comme une protéine d'échafaudage passive en recrutant c-Raf1 cytosolique à la membrane. Les ERK1/2 liés au signalosome sont aussi relativement protégés de la déphosphorylation par des MAP kinase phosphatases, ce qui est favorable à une activation soutenue des ERK1/2 [220]. D'autre part, la protéine phosphatase PP2A est retrouvée associée aux  $\beta$ -arrestines. Cette phosphatase est connue pour son rôle activateur des ERK1/2 du fait qu'elle déphosphoryle la sérine 259 de c-Raf1, dans son état inactif. Ainsi la présence de PP2A dans le signalosome apporte probablement un élément de régulation supplémentaire dans l'activation des ERK1/2.

Bien que les deux  $\beta$ -arrestines soient potentiellement capables d'interagir avec les composants de la cascade MAPKinase, des différences entre les deux isoformes ont été rapportées. Pour le récepteur Angiotensine II AT1a, dans des cellules HEK 293, les  $\beta$ -arrestines 1 et 2 semblent exercer des effets opposés. En effet, alors que l'inactivation de la  $\beta$ -arrestine 2 par ARN interférence inhibe l'activation des ERK1/2 de 50% pour le récepteur AT1a sauvage et complètement pour un récepteur mutant incapable de lier la protéine G, l'inactivation de la  $\beta$ -arrestine 1, paradoxalement, augmente l'activation des ERK1/2. Ceci a permis de formuler l'hypothèse selon laquelle, la  $\beta$ -arrestine 2 serait l'isoforme responsable de la médiation du signal MAPKinase alors que la  $\beta$ -arrestine 1 n'interviendrait uniquement dans la désensibilisation. Cependant, l'exemple du récepteur AT1a ne semble pas être représentatif de tous les récepteurs de classe B. En effet, l'activation des ERK1/2 dépendante des  $\beta$ -arrestines par le récepteur de l'hormone parathyroïde (PTH1) est inhibée quand l'une ou l'autre des  $\beta$ -arrestines voit son action diminuée suggérant que pour ce récepteur les deux arrestines sont toutes les deux requises pour assembler le signalosome [223, 224].

La formation des signalosomes a des effets importants sur les caractéristiques spatiales, temporelles et fonctionnelles des ERK1/2. Quand les ERK1/2 sont recrutées par un récepteur de classe B, les ERK1/2 activées suivent le complexe au niveau des

endosomes précoces, et sont dans l'incapacité de migrer dans le noyau de la cellule pour activer la transcription de gènes précoces. A l'inverse, les récepteurs de classe A, comme le récepteur  $\beta$ 2-adrénérique ou le récepteur au LPA utilisent aussi la  $\beta$ -arrestine 2 pour activer les ERK1/2, cependant, la nature transitoire de l'interaction avec l'arrestine empêche l'adressage des ERK1/2 aux endosomes [224]. Le récepteur PAR2, active les ERK1/2 préférentiellement par la voie des  $\beta$ -arrestines, ceci aboutissant à la formation du signalosome dans le cytoplasme séquestrant ainsi les ERK1/2 activés, et empêchant la prolifération cellulaire. Un mutant du PAR2 incapable d'être phosphorylé, ne se liant pas aux  $\beta$ -arrestines et n'internalisant pas, active les ERK1/2 par un mécanisme dépendant des protéines G qui permet la translocation nucléaire des ERK1/2 activés et la prolifération cellulaire [220]. Les récepteurs AT1a et V2 activent les ERK1/2 par des voies dépendantes des protéines G et des  $\beta$ -arrestines conduisant à l'augmentation des ERK1/2 activés à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau cellulaire. Un mutant du récepteur AT1a non couplé aux protéines G, active uniquement les ERK1/2 cytoplasmiques, n'autorisant pas de transcription de gènes au niveau du noyau. A l'inverse un récepteur V2 chimérique avec l'extrémité C-terminale du récepteur  $\beta$ 2-adrénérique, augmente la proportion d'ERK1/2 entrant dans le noyau et permet de stimuler la prolifération cellulaire [223, 225].

Pour les récepteurs de classe B, la localisation cytoplasmique imposée par les  $\beta$ -arrestines aux ERK1/2 activées dicte leur fonction en ciblant préférentiellement des substrats membranaires ou cytoplasmiques. Pendant la chimiotactie induite par le PAR2, les complexes ERK1/2-arrestines-PAR2 sont localisés très près de la membrane plasmique où l'activation des ERK1/2 est requise pour la réorganisation du cytosquelette d'actine [226]. Les substrats cytosoliques d'ERK1/2 incluent la  $\beta$ -arrestine2, et la kinase S6 ribosomale p90RSK. Le rôle de la phosphorylation de la  $\beta$ -arrestine 2 par ERK1/2 n'est pas précisément connu, il est supposé que cela constitue, soit une régulation négative de l'internalisation du récepteur, soit une aide à l'internalisation du récepteur en favorisant la dissociation entre l'arrestine et la clathrine. La phosphorylation de p90RSK par les ERK1/2 est effectuée en aval de la stimulation du récepteur AT1a par la voie dépendante des  $\beta$ -arrestines et aboutit à la phosphorylation de Mnk1 et eIF4E augmentant ainsi le taux de traduction des ARN messagers [227].

Le double rôle des  $\beta$ -arrestines est également organisé au niveau temporel. La contribution des protéines G et de la  $\beta$ -arrestine2 dans l'activation de la voie MAPKinase par le récepteur AT1a a été disséquée en utilisant des techniques d'ARN interférence contre l'isoforme  $\beta$ -arrestine2, des inhibiteurs pharmacologiques, des récepteurs mutants non couplés aux protéines G et des ligands sélectifs des voies  $\beta$ -arrestines. Quand l'expression de la  $\beta$ -arrestine 2 est inhibée, l'activation des ERK1/2 par le récepteur AT1a devient

transitoire et sensible à des inhibiteurs de la PKC indiquant que le signal transitoire d'activation des ERK est assuré par une voie protéine  $G_q$ / PLC $\beta$ /PKC. A l'inverse, inhiber la PKC en présence de la  $\beta$ -arrestine 2 bloque le pic initial de l'activité ERK1/2 mais n'inhibe pas la phase soutenue de l'activation des ERK1/2. La stimulation du récepteur mutant AT1a non couplé à la protéine  $G_q$  ou la stimulation du récepteur sauvage avec un ligand sélectif des voies  $\beta$ -arrestines, génère un signal soutenu d'activation des ERK, insensible à l'inhibition de PKC et abolit par ARN interference de la  $\beta$ -arrestine 2 [228].

*En résumé, les  $\beta$ -arrestines se trouvent déjà complexées avec différentes MAPkinases en l'absence de ligand. L'activation d'un RCPG provoque la translocation membranaire du complexe et l'activation séquentielle des MAPKinases. Les  $\beta$ -arrestines jouent un rôle de protéines d'échafaudage et optimisent les réactions de phosphorylations entre les différentes kinases de la voie MAPKinase. Les kinases ERK1/2 activées et associées aux  $\beta$ -arrestines sont séquestrées dans le cytoplasme sur de longues périodes et n'ont pas de rôle nucléaire.*

### **D.2.3. Interaction des $\beta$ -arrestines avec la c-Jun terminal Kinase 3**

Les Jun N-terminal Kinases (JNK) sont des kinases qui régulent l'apoptose par la libération du cytochrome C mitochondrial pendant le stress cellulaire et qui peuvent aussi contrôler la transcription par phosphorylation du facteur de transcription c-Jun. Il existe trois kinases JNK, mais seule la JNK3 est capable de se lier aux quatre arrestines et ce complexe est retrouvé associé à des protéines de la voie JNK, Ask1 (MAPKKK) et MKK4 (MAPKK). Cependant, alors que les deux  $\beta$ -arrestines activent JNK3, seule la  $\beta$ -arrestine 2 est capable d'assembler le complexe JNK3/Ask1/MKK4/arrestine pour potentialiser la phosphorylation séquentielle des différents composants [229].

Un régulateur négatif de la voie JNK, la MAPkinase phosphatase, MKP7, interagit aussi avec la  $\beta$ -arrestine 2. MKP7 interagit de manière constitutive avec la  $\beta$ -arrestine 2 cytosolique réprimant ainsi en permanence JNK3. Lors de l'activation du récepteur angiotensine II AT1a, MKP7 se dissocie du complexe  $\beta$ -arrestine ce qui permet l'activation de JNK3 [230]. De la même manière que les ERK1/2, JNK3 lié aux  $\beta$ -arrestines est séquestré dans le cytoplasme. La possibilité pour JNK3 activé par cette voie arrestine dépendante de phosphoryler le facteur de transcription c-Jun n'est pas connue.

#### **D.2.4. Interaction des $\beta$ -arrestines avec PP2A-Akt-GSK3 $\beta$**

La protéine sérine/thréonine phosphatase PP2A est exprimée de manière ubiquitaire et possède une large gamme de substrats. Un complexe  $\beta$ -arrestine 2 contenant la sous-unité catalytique de PP2A, Akt et GSK3 $\beta$  (Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$ ) a été copurifié à partir du striatum de souris riche en récepteur dopamine D2 [231]. Dans le signalosome,  $\beta$ -arrestine 2 – récepteur dopamine D2, PP2A déphosphoryle la thréonine 308 rendant Akt inactive. D'autre part, Akt inhibe GSK3 $\beta$  en phosphorylant la sérine 9 de GSK3 $\beta$ . Ainsi, l'inactivation d'Akt par PP2A favorise l'activation de GSK3 $\beta$ , normalement inhibée. La GSK3 $\beta$  active, va à son tour, phosphoryler la  $\beta$ -caténine accélérant sa dégradation et inhibant sa translocation nucléaire. Le récepteur PAR2 est aussi capable d'inhiber l'action d'Akt, en effet l'invalidation de la  $\beta$ -arrestine 1 ou  $\beta$ -arrestine 2 par siRNA entraîne l'augmentation de l'activation de la voie PI3Kinase, alors que la surexpression de l'une ou l'autre des  $\beta$ -arrestines accroît l'inhibition de la voie PI3Kinase. Des études in-vitro montrent que le récepteur PAR2 favorise l'association directe des deux  $\beta$ -arrestines à la PI3Kinase, et inhibe son activité [232, 233].

A l'inverse, la stimulation du récepteur PAR1, permet l'activation d'Akt par un mécanisme dépendant de la  $\beta$ -arrestine 2 [234].

#### **D.2.5. Implication des $\beta$ -arrestines dans la voie NF- $\kappa$ B**

La phosphorylation d'I $\kappa$ B $\alpha$  (Inhibitor of nuclear factor NF- $\kappa$ B) par des I $\kappa$ B $\alpha$  kinases accélère la dégradation par le protéasome d'I $\kappa$ B $\alpha$ , augmentant ainsi l'activité de NF- $\kappa$ B. I $\kappa$ B $\alpha$  se lie à la  $\beta$ -arrestine 2 dans la région contenant les 60 premiers acides aminés de l'arrestine et I $\kappa$ B kinase  $\alpha/\beta$  ainsi que NR-I $\kappa$ B-inducing kinase interagissent avec les  $\beta$ -arrestine 1 et  $\beta$ -arrestine 2 [235, 236]. Les deux  $\beta$ -arrestines semblent agir comme régulateurs négatifs de la transcription dépendante d'NF- $\kappa$ B. La  $\beta$ -arrestine 1 interagit de manière constitutive avec I $\kappa$ B $\alpha$  et la diminution d'expression de la  $\beta$ -arrestine 1 conduit à l'augmentation de l'activation d'NF- $\kappa$ B en réponse au TNF $\alpha$ , suggérant que les  $\beta$ -arrestines inhibent le signal NF- $\kappa$ B en protégeant I $\kappa$ B $\alpha$  de la dégradation [236]. Le récepteur  $\beta$ 2-adrénergique activé, augmente l'interaction entre la  $\beta$ -arrestine 2 et I $\kappa$ B $\alpha$ , empêchant ainsi sa phosphorylation et dégradation et donc l'inhibition de NF- $\kappa$ B induite par l'action de l'interleukine 8, IL8 [235].

### **D.2.6. $\beta$ -arrestines interagissent avec des phosphodiesterase de l'AMPc et des DAG kinases**

Les phosphodiesterases de l'AMPc et la DGK (diacylglycérol kinase) sont des enzymes chargées d'inactiver les seconds messagers tels que l'AMPc ou la PLC $\beta$ . Or la phosphodiesterase de l'AMPc de type 4 (PDE4D) et la DGK sont recrutées au lieu de production des seconds messagers par les  $\beta$ -arrestines, ce qui a pour résultat de stopper le signal dépendant des protéines G. Les deux  $\beta$ -arrestines sont capables d'interagir avec les cinq isoformes de PDE4D, PDE4D1-5. Le récepteur  $\beta$ 2-adrénergique forme un signalosome avec la  $\beta$ -arrestine 2 et les phosphodiesterases PDE4D3 et PDE4D5 [237]. Cependant, le recrutement de PDE4D dans le signalosome semble dépendre du récepteur considéré ; en effet, le récepteur  $\beta$ 1-adrénergique recrute un isoforme différent de ces phosphodiesterases, PDE4D8, sans le concours des  $\beta$ -arrestines.

Dans le cas du récepteur muscarinique M1, le signalosome constitué des  $\beta$ -arrestines et de la DGK inhibe l'activité de la PKC. La DGK convertit le DAG (Diacylglycérol) en acide phosphatidique. Outre de favoriser l'arrêt du signal déclenché par la PLC $\beta$ , ce mécanisme pourrait générer des concentrations cellulaires importantes d'acide phosphatidique, un précurseur du second messager lipidique le LPA.

### **D.2.7. $\beta$ -arrestines et régulation de la transcription**

La répartition des  $\beta$ -arrestines entre le cytoplasme et le noyau de la cellule diffère selon le type de  $\beta$ -arrestine. La  $\beta$ -arrestine 2 possède une séquence d'export nucléaire (NES) alors que la  $\beta$ -arrestine 1 n'en contient pas. Ainsi, la  $\beta$ -arrestine 2 libre est exclue du noyau et réside dans le cytoplasme alors que la  $\beta$ -arrestine 1 est distribuée de manière uniforme à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau. Quand cette séquence d'export nucléaire est mutée, la  $\beta$ -arrestine 2 s'accumule dans le noyau suggérant que celle-ci doit être activement exportée du noyau vers le cytoplasme de la cellule. Cependant, la  $\beta$ -arrestine 2 ne possède pas de séquence de localisation nucléaire indiquant que l'adressage de la  $\beta$ -arrestine 2 au noyau nécessite le concours d'un ou plusieurs partenaires [238].

Ces différences dans le transport nucléaire permettent aux  $\beta$ -arrestines d'exercer des effets divers dans le contrôle de la transcription. La  $\beta$ -arrestine 2 interagit avec NF- $\kappa$ B, JN3 et l'ubiquitine ligase E3, Mdm2. Ainsi, la localisation cytoplasmique de la  $\beta$ -arrestine 2 pourrait inhiber les fonctions nucléaires de ces protéines. Par exemple, l'interaction de Mdm2 avec la

$\beta$ -arrestine 2 provoque son export nucléaire [238]. Mdm2 ubiquitinye le facteur de transcription p53 conduisant à sa dégradation par le protéasome. L'export nucléaire de Mdm2 par la  $\beta$ -arrestine 2 pourrait augmenter l'expression nucléaire de p53 et ainsi moduler son activité [239].

Les conséquences sur les ERK1/2 nucléaires sont variables. Dans le cas des récepteurs de classe B, la  $\beta$ -arrestine 2 provoque la rétention cytoplasmique des ERK1/2 et inhibe la transcription. Dans le cas des récepteurs de classe A, l'interaction transitoire de la  $\beta$ -arrestine 2 avec les récepteurs, favorise en principe une activation nucléaire des ERK1/2.

La  $\beta$ -arrestine 1 possède une séquence de localisation nucléaire (NLS), permettant à celle-ci de naviguer entre le cytoplasme et le noyau. Des données suggèrent que la  $\beta$ -arrestine 1 pourrait être directement impliquée dans le transport entre le cytoplasme et le noyau comme moyen de communication entre le RCPG à la membrane et des régulateurs de transcription présents dans le noyau de la cellule. Par exemple, l'activation du récepteur d-opioïde provoque la translocation nucléaire de la  $\beta$ -arrestine 1, où elle interagit avec les promoteurs des gènes p27 et c-fos, et permet de stimuler la transcription en recrutant l'enzyme histone acétyltransférase p300, qui augmente l'acétylation des histones H4 environnantes [238].

### **D.2.8. Autres cibles des $\beta$ -arrestines**

Une étude récente du groupe de Lefkowitz s'est attachée à réaliser une analyse globale des phosphorylations induites par l'action des  $\beta$ -arrestines après stimulation du récepteur angiotensine II AT1a, dans des cellules HEK 293. Les résultats de ce phosphoprotéome ont permis d'identifier 38 protéines kinases et 3 phosphatases impliquées dans des voies de signalisation strictement dépendantes des voies  $\beta$ -arrestines. Ces kinases sont des MAPkinases, des kinases activées par p21 (Cdc42-Rac), des kinases de protéines ribosomales S6 (p70S6 kinase), des kinases activées par le 5'-AMP, des kinases impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, des tyrosines kinases non récepteurs (src, fyn, yes, Lck, Lyn, Fyn), des tyrosines kinase riche en proline, et la « focal adhesion kinase », FAK.

Les trois phosphatases, sont la protéine phosphatase 1 de sérine/thréonines phosphatases, la phosphatase slingshot 1, et la protéine tyrosine phosphatase contenant un domaine SH2 (SHP2).

Cette analyse démontre que les signaux des RCPG dépendant des  $\beta$ -arrestines sont d'une très grande diversité. En particulier, cette étude fait ressortir un réseau de

réorganisation du cytosquelette où les  $\beta$ -arrestines régulent la phosphorylation de protéines clés telles que la cofiline et slingshot [240].

*Le nombre grandissant de partenaires impliqués dans la transduction du signal des RCPG dépendante des  $\beta$ -arrestines permet d'expliquer le rôle de ces protéines dans de nombreux processus physiologiques.*

### **D.3. Rôles physiologiques des $\beta$ -arrestines**

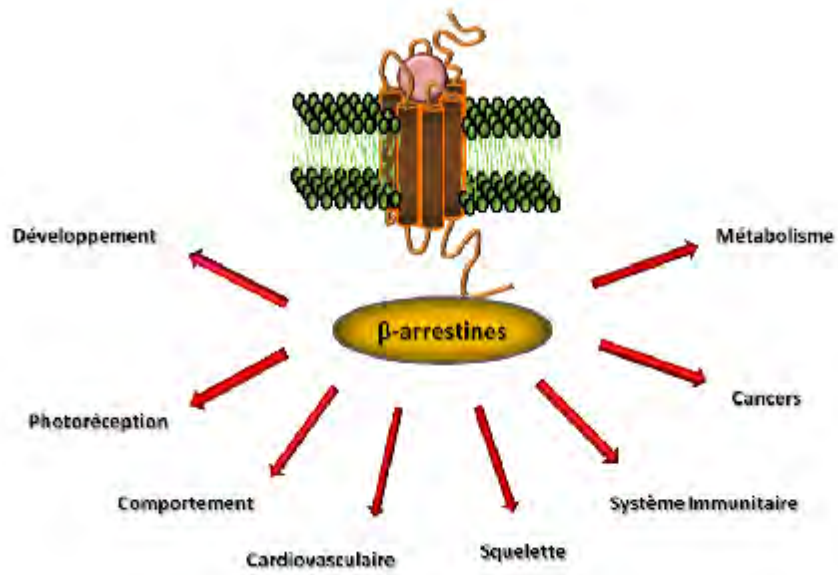
Le rôle des  $\beta$ -arrestines dans la signalisation cellulaire des RCPG a probablement beaucoup d'impact dans la physiologie. Ce chapitre dresse l'état des lieux actuel des connaissances sur le rôle physiologique des  $\beta$ -arrestines (Figure 12).

#### **D.3.1. Rôle des $\beta$ -arrestines dans le développement**

Le rôle des  $\beta$ -arrestines dans le développement a été largement mis en avant, avec l'observation des différents phénotypes de drosophiles, souris et zebrafish invalidés pour les

$\beta$ -arrestines. L'un des rôles des arrestines dans le développement provient de leur implication dans la signalisation Hedgehog. En effet, les zebrafish invalidés pour les  $\beta$ -arrestines possèdent un phénotype très proche des mutants qui ont perdu la fonction « smoothed ». L'hybridation in-situ a permis de montrer une perte d'expression de gènes régulés par Shh incluant *nkx2.2* et *ptc* ce qui corrobore la perte de signal « Smoothened ». Le phénotype résultant de l'invalidation de la  $\beta$ -arrestine 2 peut être réversé par l'expression de  $\beta$ -arrestine 2 ou par l'activation constitutive de la voie Hedgehog en aval de Shh [241].

A l'inverse, les embryons de zebrafish invalidés pour la  $\beta$ -arrestine 1, présentent des déficiences au niveau de l'hématopoïèse correspondant à la régulation négative de *cdx4*, un facteur de transcription qui détermine le lignage hématopoïétique en modulant l'expression du gène *hox*. Ce phénotype sur l'hématopoïèse peut être restauré par réintroduction de la  $\beta$ -arrestine 1 ou par injection des ARN messagers de *cdx4*, *hoxa9a* ou *hoxa9b* [241].



**Figure 12: Implications des  $\beta$ -arrestines dans des fonctions physiologiques et physiopathologiques**



### **D.3.2. Arrestines, fonction photoréceptrice et dégénération rétinale**

L'implication des arrestines dans la fonction photoréceptrice a été mise en évidence chez des patients atteints de maladies génétiques. En effet, la maladie d'Oguchi, résulte de mutations qui inactivent les gènes codant pour l'arrestine visuelle et la GRK1 ce qui empêche la désensibilisation [242]. D'autre part, les rétinites pigmentaires sont causées par des mutations de la rhodopsine qui conduisent soit à l'activation constitutive du récepteur soit à une interaction constitutive entre le récepteur et l'arrestine visuelle. Une rétinite pigmentaire autosomale dominante est associée à une mutation d'une lysine, K296E dans le site de liaison de l'opsin sur la rhodopsine. Ce mutant n'est pas capable d'être activé par la lumière, et in vivo il est constamment phosphorylé et lié à l'arrestine. De ce fait, il ne transmet aucun signal dépendant de la transducine (protéine  $G_t$ ) suggérant que la dégénération rétinale ne provient pas d'une activation continue de la cascade de phototransduction. Connaissant l'interaction des arrestines 1 et 4 avec Mdm2 et JNK3, des études suggèrent que les arrestines pourraient être à l'origine d'un signal d'apoptose impliqué dans cette pathologie [241].

### **D.3.3. Implications des $\beta$ -arrestines dans la signalisation dopaminergique et impact sur le comportement**

La transmission neuronale dopaminergique dans le système nerveux central régule les réponses comportementales comme l'activité locomotrice ou le système de récompense. La dégénérescence de fibres nerveuses dopaminergiques est à l'origine de la maladie de Parkinson. D'autre part, des antagonistes du récepteur dopamine D2 sont utilisés dans le traitement de la schizophrénie, et des troubles d'hyperactivité et de l'attention, maladies qui sont le résultat d'une hyperactivité des circuits dopaminergiques.

Plusieurs données suggèrent que ces comportements dépendant des circuits dopaminergiques sont régulés par des complexes de signalisation faisant intervenir les  $\beta$ -arrestines. L'hyperactivité locomotrice induite par la molécule apomorphine, un agoniste du récepteur dopaminergique D2, est réduite dans des souris invalidées pour le gène de la  $\beta$ -arrestine 2 [243]. De la même manière, des souris invalidées pour le gène de la GRK6 présentent une réponse locomotrice exacerbée en réponse à des ligands dopaminergiques [244]. GRK6 est la plus abondante des GRK dans le striatum et a été impliqué dans le signal dépendant des  $\beta$ -arrestines venant du récepteur angiotensine II AT1a.

Ces effets impliqueraient le complexe  $\beta$ -arrestine 2/PP2A à la suite de l'activation du récepteur dopaminergique D2. PP2A lié à la  $\beta$ -arrestine 2 inactive Akt par phosphorylation de la thréonine 308, permettant l'activation de GSK3 $\beta$ . Un traitement aux amphétamines, qui augmente la libération synaptique de dopamine, provoque l'augmentation de l'interaction de PP2A avec Akt chez des souris sauvages mais pas chez des souris invalidées pour la  $\beta$ -arrestine 2 [243]. Une inhibition directe de PP2A ou de GSK3b atténue l'hyperactivité locomotrice dans des souris invalidées pour des transporteurs de dopamine, suggérant que l'activation de GSK3b induite par la dopamine résulte d'une inhibition d'Akt par une phosphorylation de PP2A dépendante de la  $\beta$ -arrestine 2 [231].

#### **D.3.4. Rôle cardiovasculaire des $\beta$ -arrestines**

Les RCPG jouent un rôle très important dans la régulation de la fonction cardiovasculaire. La fréquence cardiaque est régulée par les récepteurs adrénergiques et muscariniques respectivement stimulés par la noradrénaline et l'acétylcholine. La tonicité vasculaire est régulée par les récepteurs adrénergique, angiotensine II, bradykinine et la fonction rénale est sous l'influence des récepteurs angiotensine II, vasopressine, adrénergique et dopamine.

##### **D.3.4.a Hypertrophie cardiaque et insuffisance cardiaque**

In vitro, le mutant AT1-i2m, du récepteur angiotensine II, AT1a, ne peut pas se coupler aux protéines G mais active une voie Src-Ras-ERK1/2 qui conduit à l'activation des ERK1/2 cytoplasmiques et de l'enzyme p90RSK. In vivo, l'expression de ce mutant AT1-i2m, montre une hypertrophie des cardiomyocytes, bradycardie, une expression de gènes cardiaques fœtaux plus importants que le sauvage. Cette voie Src-Ras-ERK1/2 activant p90RSK via les ERK1/2 cytosoliques activé peut être stimulée in vitro, par un ligand (SII) du récepteur AT1a activant spécifiquement les voies  $\beta$ -arrestines [241].

Ce même ligand, SII, a aussi été étudié in vivo, où ses principaux effets sont de stimuler la production d'aldostérone via un mécanisme dépendant des  $\beta$ -arrestines 2 et des ERK1/2. En effet, l'activation des ERK1/2 dépendante de la  $\beta$ -arrestine 2 augmente l'expression d'une protéine de transport du cholestérol qui régule la synthèse d'aldostérone. Cette hausse des niveaux d'aldostérone circulante contribuent au remodelage cardiaque et à la progression de l'insuffisance cardiaque [245].

L'utilisation d'un récepteur  $\beta$ 1-adrénergique dans un modèle incapable d'être phosphorylé par les GRK, montre que la transactivation du récepteur EGF par le récepteur  $\beta$ 1-adrénergique via les  $\beta$ -arrestines pourrait avoir un rôle cardioprotecteur et que la stimulation la voie dépendante des  $\beta$ -arrestines du récepteur  $\beta$ 1-adrénergique pourrait devenir une option thérapeutique contre l'insuffisance cardiaque [246].

#### **D.3.4.b Hypertrophie du muscle vasculaire lisse et hyperplasie**

Le signal dépendant des  $\beta$ -arrestines semble favoriser le développement et la progression de l'athérosclérose vasculaire. Une hyperplasie neointimale, après une blessure à la carotide, est augmentée dans des souris invalidées pour la  $\beta$ -arrestine 1 et diminué dans des souris invalidées pour la  $\beta$ -arrestine 2. La perte de la  $\beta$ -arrestine 2 est associée avec la diminution de la prolifération de cellules musculaires lisses et l'activation des ERK1/2 induite par les RCPG, ceci étant en accord avec une implication de la  $\beta$ -arrestine 2 dans la réponse à la suite de la blessure. Le croisement entre des souris invalidées pour le récepteur LDL, un modèle génétique d'athérogénèse accru, et des souris invalidées pour la  $\beta$ -arrestine 2 provoque une diminution de la prévalence des athéromes et du nombre de zones les développant [247]. Les bases moléculaires de ces effets in vivo, pourraient provenir de l'activité mitotique et anti-apoptotique du récepteur AT1a via un signal dépendant des  $\beta$ -arrestines.

#### **D.3.4.c Tonicité et réactivité vasculaire**

L'acide nicotinique agit sur un RCPG, le GPR109A, qui provoque la diminution du niveau d'acide gras circulant dans le sang en activant un signal dépendant des protéines  $G_i/G_o$ . Cependant, il provoque aussi un rougissement au niveau de la peau par la stimulation de la phospholipase A2, qui conduit à la production et sécrétion de prostaglandine D2 vasodilatatrice. Chez les souris invalidées pour les  $\beta$ -arrestines, il n'a pas de différences significatives sur la diminution des acides gras dans le sérum, par contre le rougissement cutané est stimulé par l'acide nicotinique dans les souris sauvages et invalidées pour la  $\beta$ -arrestine 2, mais pas chez les souris invalidées pour la  $\beta$ -arrestine 1 [248]. Des études in vitro montrent que l'acide nicotinique induit la liaison de la  $\beta$ -arrestine 1 à la phospholipase A2 qui s'active et provoque la libération d'acide arachidonique, précurseur de la prostaglandine D2 [249].

### **D.3.5. Rôle des $\beta$ -arrestines dans le remodelage squelettique**

La PTH, une hormone peptidique agissant sur le récepteur PTH1, est le principal régulateur de l'homéostasie calcique et phosphate des os. Dans des souris invalidées pour la  $\beta$ -arrestine 2, le métabolisme osseux est affecté, alors que les niveaux de calcium dans le sérum et le squelette des animaux sont normaux. Le taux basal de renouvellement de l'os est augmenté. L'expression d'ARNm de protéines impliquées dans la formation de l'os est augmentée. D'autre part la résorption osseuse est accélérée. Tous ces effets indiquent que le métabolisme osseux, reflétant l'activation des ostéoclastes (cellules provoquant la destruction du tissu osseux) dépendante des ostéoblastes (cellules assurant la synthèse du tissu osseux) est régi par un mécanisme faisant intervenir des voies dépendantes des protéines G en réponse au récepteur PTH, et ces voies sont restreintes par l'action désensibilisatrice des  $\beta$ -arrestines [241].

A l'inverse, l'utilisation d'un analogue du PTH, qui active sélectivement les voies dépendantes des  $\beta$ -arrestines, sur des souris sauvages, montre une augmentation de la formation d'os, ainsi que du nombre d'ostéoblastes alors qu'il n'y a pas d'augmentation du nombre d'ostéoclastes. Ainsi, le signal dépendant des  $\beta$ -arrestines du récepteur PTH1 semble contribuer à la réponse anabolique de PTH et est suffisant pour stimuler la formation osseuse via les ostéoblastes sans stimuler l'activation des ostéoclastes [241].

### **D.3.6 Implications des $\beta$ -arrestines dans la réponse immunitaire et la chimiotactie**

Les  $\beta$ -arrestines sont probablement impliquées dans des effets régulateurs positifs et négatifs du système immunitaire. D'une part, la désensibilisation de RCPG opérée par les  $\beta$ -arrestines est critique pour que les cellules migrantes soient capables de suivre un gradient chimioattractant. D'autre part, le rôle d'échafaudage des  $\beta$ -arrestines est nécessaire pour l'installation de la polarité cellulaire et pour faciliter la dégranulation au niveau du site d'inflammation. Différents modèles de cellules et de souris invalidées pour les  $\beta$ -arrestines présentent des mécanismes de chimiotactie non fonctionnels, notamment ceux passant par les récepteurs, CCR4, PAR2, AT1a, CXCR1, CXCR2 et CXCR3 [241].

Le mécanisme moléculaire a été particulièrement bien démontré pour le récepteur AT1a, car les cellules exprimant le récepteur AT1a vont suivre un gradient du ligand SII, sélectif des voies  $\beta$ -arrestines, cette réponse étant perdue quand l'expression des  $\beta$ -

arrestines est diminuée. Les  $\beta$ -arrestines contribueraient à la chimiotactie, en régulant l'assemblage du réseau d'actine via les ERK1/2 activées et un complexe cofiline/LIMKinase/chronophine mais aussi par l'intermédiaire d'autres effecteurs tels que Lyn (kinase de la famille de Src), et PP2A [250].

Cependant, les  $\beta$ -arrestines pourraient aussi réguler négativement le système immunitaire notamment par leur action négative sur des facteurs de transcription impliqués dans des voies de signalisation de cytokines comme le facteur NF- $\kappa$ B. En effet, ces facteurs de transcription pourraient inhiber la production de cytokines pro-inflammatoires et ainsi limiter l'intensité du stimulus chimiotactique. De plus, un autre mécanisme de régulation négative dépendant des  $\beta$ -arrestines semble réguler l'activité des cellules « natural killers ». En effet, la  $\beta$ -arrestine 2 recrute les phosphatases SHP-1 et SHP-2 au récepteur KIR2DL1 qui est un récepteur inhibiteur des cellules natural killers, favorisant ainsi le signal inhibiteur en aval du récepteur [241].

A ce jour, la double implication des  $\beta$ -arrestines dans la régulation de la réponse immunitaire nécessite des travaux complémentaires afin de déterminer plus précisément leur rôle *in vivo*.

### **D.3.7. Implications des $\beta$ -arrestines dans la croissance tumorale et la migration cellulaire**

Des données récentes obtenues à partir de modèle de tumeurs *in vivo* sont en faveur d'un rôle des signaux dépendants des  $\beta$ -arrestines dans le développement et la progression de cancers. Les cellules cancéreuses de la vessie, surexprime le récepteur thromboxane TP- $\beta$  et les  $\beta$ -arrestines. Il existe deux récepteurs thromboxane TP- $\alpha$  et TP- $\beta$  ; ils partagent les 328 premiers acides aminés mais diffèrent sur la partie C-terminale et seul le récepteur TP- $\beta$  peut recruter les  $\beta$ -arrestines. L'expression de TP- $\beta$  dans des cellules urothéliales SV-HUV non transformées, qui n'expriment normalement que TP- $\alpha$ , aboutit à la phosphorylation des ERK1/2 et de FAK (focal adhesion kinases) d'une manière agoniste dépendante, entraînant la prolifération cellulaire, la migration et l'invasion de ces cellules *in vitro*. Ces effets peuvent être inhibés par l'inactivation de la  $\beta$ -arrestine 2 par ARN interférence [251].

Dans des cancers du sein de stade avancé, les  $\beta$ -arrestines, les récepteurs LPA1 et LPA2, Ra1 et Ra1-GDS sont surexprimés. *In vitro*, le LPA stimule la migration et l'invasion des cellules de cancers du sein MDA-MB-231, qui surexprime la  $\beta$ -arrestine 1. L'inhibition de l'expression de la  $\beta$ -arrestine 1 ou de Ra1 diminue cette réponse [252].

Dans une majorité de cancers ovariens, l'expression du récepteur endothéline ETa et de la  $\beta$ -arrestine 1 augmente avec le stade d'avancement de la tumeur. Dans des cellules cancéreuses d'ovaires en culture, les  $\beta$ -arrestines permettent l'assemblage d'un signalosome contenant le récepteur endothéline ETa et la protéine c-Src, et l'axine. L'interaction avec Src conduit à la transactivation du récepteur EGF et à la phosphorylation de la  $\beta$ -caténine et l'interaction avec l'axine facilite l'inactivation de GSK3 $\beta$  et ainsi la stabilisation de la  $\beta$ -caténine. Dans un modèle de xénogreffes tumorales, des cellules cancéreuses d'ovaires exprimant la  $\beta$ -arrestine 1 mutée sur la sérine 412 (inhibant la signalisation dépendante des arrestines du récepteur ETa) développent moins de métastases, suggérant que le signal dépendant des arrestines contribue à la tumorigénèse et à la progression du cancer de l'ovaire [253].

L'activation de c-Src et du récepteur EGF via la  $\beta$ -arrestine 1 pourrait aussi contribuer aux effets pro-tumoraux induits par le récepteur prostaglandine E2 dans la formation des papillomes (tumeurs bénignes) [254].

L'implication des  $\beta$ -arrestines dans les cancers dépassent le cadre de la régulation de la signalisation des RCPG puisqu'elles sont notamment retrouvées impliquées dans la signalisation de récepteurs tyrosine (récepteur EGF) ou sérine/thréonine (récepteur TGF $\beta$ ) kinases [241].

### **D.3.8. Implication des $\beta$ -arrestines dans la régulation du métabolisme**

Les souris invalidées pour le gène de la  $\beta$ -arrestine 1 sont insulino-résistantes alors que les souris présentant une surexpression hépatique de  $\beta$ -arrestine 2 présentent une sensibilité à l'insuline exacerbée. De la même manière, la sensibilité à l'insuline augmente lorsque l'expression hépatique de  $\beta$ -arrestine 2 est augmentée par surexpression adénovirale, dans des souris obèses *db/db*. Les souris invalidées pour la  $\beta$ -arrestine 2 présentent une phosphorylation diminuée d'Akt, GSK3 $\beta$  et FOXO1, en réponse à l'insuline, ce qui est en accord avec la perte d'un complexe  $\beta$ -arrestine2/Akt/récepteur insuline/Src. D'une manière similaire, des souris sauvages et *db/db* développent une insulino-résistance quand une  $\beta$ -arrestine 2 tronquée (1-185), qui empêche l'interaction Src-Akt, est introduite dans le foie des souris. Ces données suggèrent que le signal induit par le récepteur de

l'insuline relayé par c-Src et Akt par l'action des  $\beta$ -arrestines est un élément déterminant dans la sensibilité à l'insuline in vivo [255].

Dans des cellules pancréatiques  $\beta$ , la  $\beta$ -arrestine 1 joue un rôle dans la signalisation du récepteur GLP-1 (glucagon peptide like 1). L'inhibition de l'expression de la  $\beta$ -arrestine 1 atténue le signal provenant du récepteur GLP-1, en diminuant les niveaux d'AMPc, d'activation des ERK1/2 et des protéines CREB, entraînant une sécrétion d'insuline plus faible [256].

*En résumé, les  $\beta$ -arrestines sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques et physiopathologiques, ce qui fait de ces protéines des cibles pharmacologiques. L'identification de ligands capables d'activer ou d'inhiber spécifiquement les voies de signalisation dépendantes des  $\beta$ -arrestines pourrait fortement contribuer au développement de nouvelles molécules thérapeutiques.*

## **D.4. Autres voies de signalisation indépendantes des protéines G**

### **D.4.1 Les protéines Homer**

Les protéines Homer sont codées par trois gènes distincts chez l'homme. Ces protéines Homer interagissent avec les récepteurs métabotropiques du glutamate mGlu1a et mGlu5. Lorsque l'expression de Homer 3 est abolie, la fonctionnalité de Homer 1a est supprimée grâce à l'expression d'un dominant négatif, ou si l'interaction entre Homer et le récepteur mGlu5 est supprimée, les récepteurs du glutamate mGlu1a et mGlu5 présentent une activité constitutive. Ces protéines Homer ont la particularité de présenter un domaine EVH1 (Ena/vasp homology domain) en N-terminal, qui se lie à des séquences riches en proline (PPSPF) principalement retrouvées dans des protéines de la signalisation dans les neurones, myocytes squelettiques, et lymphocytes T. Les protéines interagissent avec des protéines de la signalisation telles que la PI3kinase ou les IP3, et peuvent moduler l'activité de ces deux récepteurs glutamate indépendamment des protéines G [257].

### D.4.2. Les protéines Shank

La famille Shank est constituée de protéines qui regroupent et permettent l'ancrage de protéines transmembranaires et de leurs protéines associées au sein de la zone PSD : Postsynaptic density (structure dense électroniquement associée à la face cytoplasmique de la membrane post-synaptique). Ces protéines, via leur domaine PDZ, interagissent directement avec des RCPG tels que le récepteur de la somatostatine SST2, le récepteur de la latrophiline CL1, ou les récepteurs métabotropiques du glutamate de la famille I.

Les protéines Shank présentent une structure comportant de multiples domaines d'interaction suggérant qu'elles ont une fonction de protéines d'échaffaudage, permettant d'établir des plateformes de signalisation. Elles sont notamment impliquées dans le maintien de l'homéostasie calcique neuronal [258].

### D.4.3. Autres protéines

Il existe d'autres exemples de protéines de la signalisation capables d'interagir directement avec les RCPG.

Le récepteur CCK2 possède un motif ITIM dans sa partie C-terminale capable d'interagir avec la protéine tyrosine phosphatase SHP2. Cette interaction du récepteur CCK2 avec SHP2 conduit à l'activation d'Akt [259].

Le récepteur  $\beta$ 2-adrénérique interagit de manière directe avec la protéine Src, ce qui conduit à son activation. Le mécanisme d'activation, ferait intervenir un dimère de récepteur induit par l'agoniste, ce qui favoriserait le rapprochement de deux molécules Src conduisant à leur activation par autophosphorylation intermoléculaire [260].

L'association directe de petites protéines G, telles que ARF et RhoA, avec certains RCPG portant le motif NPXXY, favorise le couplage entre récepteurs et l'activation de la phospholipase D. C'est notamment le cas pour les récepteurs de l'angiotensine AT1 ou muscarinique M3 [261].

Le récepteur de la somatostatine SST2 interagit directement avec la sous-unité régulation de la PI3kinase, la p85, au niveau d'une tyrosine phosphorylée dans l'ICL2 du récepteur. La libération de la p85 se ferait de manière consécutive à l'activation du récepteur SST2 par la somatostatine [262].



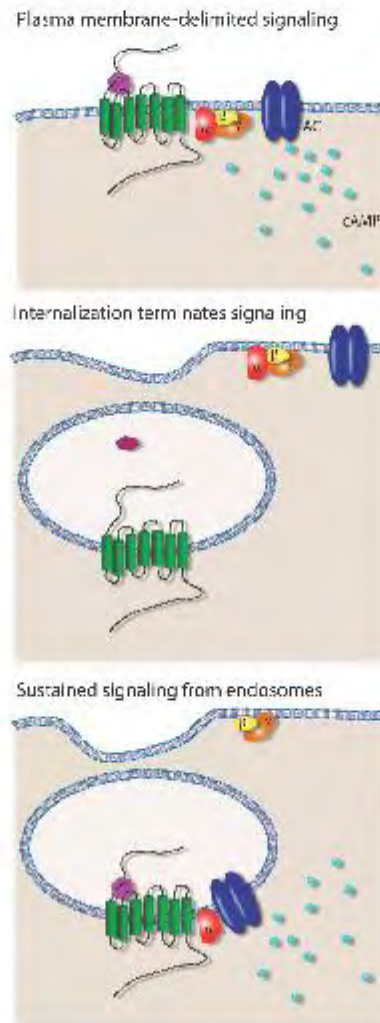
Enfin, la voie de signalisation JAK/STAT est activée par le récepteur angiotensine II AT1a, via une interaction directe entre JAK2 et un motif YIPP phosphorylé sur la tyrosine. JAK2 activé permet ensuite l'activation des protéines STAT [263].

## **E] Transduction du signal dépendant des protéines G par des RCPG internalisés**

Le schéma d'internalisation des RCPG actuels, bien accepté, entérine le fait que le signal dépendant des protéines G est exclusivement transmis à la membrane plasmique alors que le signal dépendant des  $\beta$ -arrestines est plutôt transmis au niveau des compartiments endosomaux. Récemment trois études sont venues remettre en question l'idée que la transduction du signal des RCPG par les protéines G se termine par l'internalisation des récepteurs (Figure 13).

Ces trois études de trois groupes différents présentent de solides preuves de l'existence d'un signal AMPc persistant qui émane de RCPG internalisés. Un modèle récent de souris transgénique exprimant de manière ubiquitaire le biosenseur de la production d'AMPc, la protéine Epac, a été utilisé pour déterminer l'origine du signal AMPc persistant. La première étude du groupe de Lohse, utilise ce modèle transgénique afin d'étudier le signal AMPc persistant dans des cellules de thyroïde fraîchement isolées à partir des souris. En effet, après stimulation du récepteur TSH par son ligand naturel, le récepteur et son ligand sont rapidement internalisés via un mécanisme principalement dépendant de la  $\beta$ -arrestine2 et migrent jusqu'à des vésicules périnucléaires. Cependant, malgré l'internalisation du récepteur TSH, les niveaux d'AMPc intracellulaires restent très élevés. Les résultats de cette étude, incluant des effets d'inhibiteurs d'endocytose, et des techniques de fractionnement cellulaire, montrent que les protéines G et l'adénylate cyclase sont aussi présentes sur les membranes des vésicules d'endocytose avec les récepteurs TSH et que les complexes internalisés TSH-TSHR continuent de transduire un signal dépendant des protéines G. A la différence du signal membranaire qui est rapidement réversible, le signal provenant des récepteurs internalisés continue en l'absence de stimulation TSH. Ce signal AMPc persistant induit par le récepteur TSH internalisé, serait crucial pour assurer la fonction sécrétoire de la thyroïde [264].

Rapidement après cette étude, Ferrandon et collègues publient une étude similaire sur le récepteur PTH. Le récepteur PTH possède deux ligands naturels, l'hormone endocrine PTH, et la PTHrP un facteur autocrine. Ces deux peptides déclenchent un signal de durée différente. Les résultats de cette étude montrent que la stimulation par PTH induit une



### Figure 13: Transduction du signal AMPc par des RCPG internalisés

Image du haut: Le RCPG est à la membrane et émet un signal via une protéine Gs ce qui conduit à l'activation de l'adénylate cyclase et à la formation d'AMPc. Image milieu: Le RCPG est internalisé. Selon le modèle classique de désensibilisation des RCPG, le récepteur internalisé n'émet plus de signal dépendant des protéines G. Image du bas: Nouveau concept: Les RCPG internalisés peuvent émettre un signal AMPc persistant via les protéines Gs présentes au niveau de la membrane de l'endosome. (D'après *Jalink & Moolenaar, 2010*)

internalisation rapide du récepteur PTH dans les endosomes précoces en association avec l'adénylate cyclase. Les complexes PTH-PTHrP internalisés ne sont pas associés avec la désensibilisation de la voie AMPc mais plutôt avec un signal AMPc persistant. A l'inverse, le PTHrP présente un profil de signalisation membranaire et rapidement réversible [265]. Bien que ces deux études apportent des éléments forts en faveur d'un signal persistant induit par des récepteurs internalisés couplés aux protéines  $G_s$  au niveau des endosomes, une troisième étude montre que le récepteur sphingosine-1-phosphate (S1P1), couplé à  $G_i/G_q$ , émet un signal persistant dépendant de la protéine  $G_i$ , une fois le récepteur internalisé. Une molécule immunomodulatrice, FT720, utilisée dans les traitements de scléroses en plaques, cible ce récepteur S1P1. La stimulation de S1P1 avec le FT720 provoque l'activation d'un signal d'inhibition de l'AMPc persistant, dépendant de  $G_i$  après l'internalisation du récepteur. A l'inverse le signal calcique dépendant de la protéine  $G_q$  reste lui restreint à la membrane plasmique [266].

En revanche, une étude très récente sur le récepteur TSH, faisant suite à ces trois articles, rapporte que le signal AMPc persistant n'est pas dépendant de l'internalisation du TSHR. En effet, les auteurs démontrent que ce signal n'est pas inhibé lorsque l'internalisation est bloquée par des inhibiteurs ou des dominants négatifs de la dynamine. De plus, la surexpression de la  $\beta$ -arrestine 2 n'entraîne pas non plus d'inhibition de ce signal [267].

Il ressort de ces données que trois études mentionnées dans ce chapitre sont en faveur de l'existence d'un complexe RCPG-protéine G, au niveau des endosomes intracellulaires, capable d'émettre un signal de longue durée. Ces données ouvrent la voie à beaucoup d'autres questions. En effet, des données antérieures rapportent que les récepteurs TSH et PTH sont principalement internalisés via les  $\beta$ -arrestines ; or les auteurs de ces études ne discutent pas comment l'existence de ces complexes de récepteurs internalisés avec leurs protéines G est conciliable avec leur internalisation dépendante des  $\beta$ -arrestines. D'autre part, comment expliquer cette dernière étude qui est venue contredire les autres observations ? Ainsi, ces découvertes nécessitent des travaux complémentaires pour déterminer l'existence in vivo de ces complexes de RCPG internalisés associés aux protéines G ainsi que leurs rôles physiologiques.



## Deuxième Chapitre:

# Pharmacologie des RCPG





## II. Pharmacologie des RCPG

Les RCPG constituent une cible privilégiée de nombreux médicaments actuellement sur le marché et intéressent l'industrie pharmaceutique, du fait de leur large champs d'applications cliniques. La compréhension du mode d'action des ligands naturels des RCPG, du mode de liaison de ces ligands et du mécanisme d'activation moléculaire des RCPG est cruciale pour aider le développement de molécules agonistes, antagonistes ciblant un RCPG particulier.

De nombreuses études se sont donc intéressées à la modulation de l'activité d'un récepteur. Le type de ligand qui s'associe au récepteur détermine l'aspect qualitatif et quantitatif du signal intracellulaire engendré par sa liaison. Ces interactions ligand-récepteur en relation avec la signalisation déclenchée en aval, ont été mises en équation pour proposer des modèles théoriques d'activation des RCPG. Ces modèles ont dû constamment être revus pour toujours s'adapter aux récentes découvertes.

La pharmacologie des RCPG se révèle de plus en plus complexe, avec la découverte de différents niveaux de modulation des RCPG au-delà du simple ligand, par interaction avec d'autres protéines associées aux RCPG ou par interaction entre RCPG. Plus récemment, la découverte de l'action postendocytaire des  $\beta$ -arrestines, indépendamment des protéines G, a ouvert de nouvelles perspectives dans ce domaine, notamment avec la découverte des ligands biaisés.

## **A] Mécanismes théoriques d'activation des RCPG**

### **A.1. Le complexe ternaire**

Les premiers concepts pharmacologiques d'action des drogues n'accordaient aux récepteurs dépourvus de ligands aucune activité biologique associée, ainsi seuls les complexes ligand-récepteurs sont considérés comme actifs et liés aux protéines G. Le modèle du complexe ternaire schématise ce couplage du récepteur à la protéine G sous l'effet d'un ligand agoniste. Développé à l'origine pour expliquer la liaison d'un agoniste sur le récepteur  $\beta$ 2-adrénérique, ce modèle ternaire ne considère comme fonctionnel uniquement le complexe agoniste-récepteur, l'agoniste stabilisant la conformation active du récepteur. Ce modèle ternaire a été établi grâce à des analyses de compétition de ligand radiomarqué qui ont révélées que l'activité intrinsèque de l'agoniste pour la stimulation d'effecteurs intracellulaires est fonction de la proportion de complexe agoniste-récepteur de haute affinité et de la constante d'affinité de l'effecteur intracellulaire pour le complexe agoniste-récepteur. Ce modèle décrit donc une interaction d'un récepteur R avec un agoniste A qui permet à une protéine G de s'associer avec ce couple agoniste-récepteur et ainsi de devenir un complexe fonctionnel ARG (Figure 14) [268].

Une dizaine d'années plus tard, de nouveaux résultats ont permis de faire évoluer ce concept vers un modèle plus élaboré, le complexe ternaire étendu.

### **A.2. Le complexe ternaire étendu CTE**

L'apparition du complexe ternaire étendu résulte de la découverte que le récepteur  $\beta$ 2-adrénérique peut spontanément, sans ligand, adopter une conformation active et se coupler aux protéines G [269-271]. Cette activité biologique du récepteur en l'absence de ligand, appelée activité constitutive a été intégrée dans ce modèle qui est une extension du complexe ternaire (Figure 14). Par rapport au complexe ternaire, ce modèle étendu prend en compte le fait qu'un récepteur à l'état basal, en l'absence de ligand, est capable de passer d'un état inactif non couplé à la protéine G vers un état actif couplé. Ce passage vers l'état actif est réversible et il se crée un équilibre entre les populations de récepteurs étant dans un

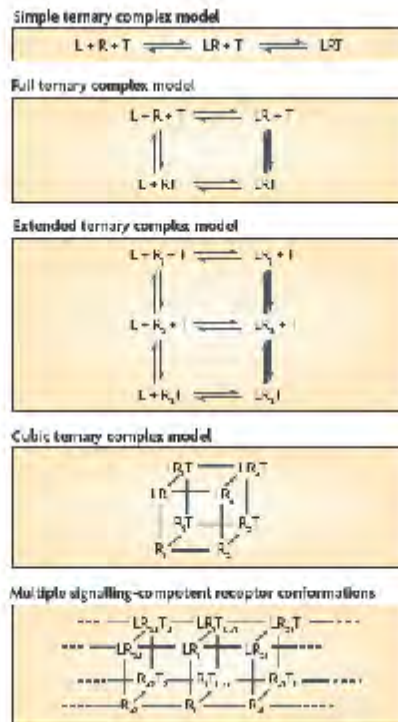


état actif et inactif. Cet équilibre en absence d'agoniste définit le niveau basal de l'activité biologique. Ce concept, selon lequel l'ensemble de la population d'une protéine donnée à un instant  $t$  existe sous une multitude d'états en équilibre entre eux, avait déjà été énoncé par le groupe de Monod en 1965 [272]. Ce complexe ternaire étendu introduit aussi une étape d'isomérisation du récepteur, régulant l'équilibre entre au moins deux états allostériques inter-convertibles. C'est la raison pour laquelle ce modèle est aussi appelé complexe ternaire allostérique.

Le modèle ternaire étendu satisfait la notion d'activité constitutive des RCPG indépendante du ligand, et englobe les différents comportements des diverses classes de ligands (agonistes pleins, agonistes partiels, antagoniste neutres et agonistes inverses). Selon ce modèle, un équilibre est atteint entre la conformation inactive du récepteur ( $R$ ) et la conformation active ( $R^*$ ) avec des contraintes structurales au niveau de la conformation inactive qui font que seul  $R^*$  peut interagir efficacement avec les protéines  $G$ . En absence d'agoniste, la conformation inactive est majoritaire au sein de l'ensemble de la population de récepteurs mais la barrière d'énergie entre  $R$  et  $R^*$  serait suffisamment faible pour permettre à une fraction de récepteurs de transiter naturellement vers un état actif. Les agonistes pleins et partiels se lient avec une forte affinité sur la conformation active du récepteur et permettent le franchissement de la barrière énergétique déplaçant l'équilibre vers l'état activé  $R^*$ . Plus l'agoniste partiel se rapproche d'un agoniste plein, plus la quantité relative de récepteurs dans un état activé  $R^*$  augmentera. Les antagonistes neutres se lient à  $R$  et  $R^*$  avec la même affinité, sans affecter l'équilibre entre les deux états, et sont sans effet sur les récepteurs constitutivement activés. Les agonistes inverses possèdent la capacité d'inhiber l'activité constitutive des RCPG et favorisent un déplacement d'équilibre vers l'état inactif  $R$ .

### **A.3. Le complexe ternaire cubique (CTC)**

Le complexe ternaire cubique est une variante du complexe ternaire étendu qui prend en compte la possibilité pour le récepteur à l'état inactif de se coupler aux protéines  $G$  [273]. Dans ce modèle, toutes les possibilités d'interaction entre les trois intervenants, le récepteur, le ligand et la protéine  $G$  sont intégrées. L'interaction des différentes formes du récepteur avec la protéine  $G$  ( $RG$  et  $R^*G$ ). L'interaction des différentes formes du récepteur avec l'agoniste ( $AR$  et  $AR^*$ ). L'interaction de l'agoniste avec le complexe récepteur-protéine  $G$ , avec le récepteur inactif ou actif ( $ARG$  et  $AR^*G$ ). Dans ce modèle, ces huit états de récepteur co-existent et forment un équilibre (Figure 14).



**Figure 14: Les différents modèles d'activation théoriques des RCPG**  
 De haut en bas: le modèle du complexe ternaire simple, le modèle du complexe ternaire entier, le modèle du complexe ternaire étendu, le modèle du complexe ternaire cubique et le modèle multi-états. (L=ligand, R=récepteur, T= transducteur)  
 (D'après Rajagopal et al, 2010).

#### A.4. Du modèle à deux états vers un modèle multi-états

Les complexes ternaires basique, étendu et cubique, sont tous les trois des modèles à deux états différenciant uniquement l'état inactif de l'état actif d'un récepteur. Cependant ces modèles à deux états ne suffisent pas à expliquer un grand nombre de phénomènes relatifs aux RCPG. Premièrement, il est désormais connu que les protéines G sont déjà associées au RCPG sous forme de complexe préformé à l'état inactif, et que l'activation du RCPG ne dirige pas un couplage aux protéines G mais permet un changement conformationnel des complexes récepteurs-protéines G préformés. De plus, on sait qu'un RCPG est capable de se lier à différentes protéines G. Ainsi, une population de RCPG présente des sous-populations de complexes récepteurs-protéines G de différentes natures, ou de récepteurs non couplés, suggérant que l'effet d'un agoniste sur un RCPG sera aussi fonction de la proportion du RCPG associé à la protéine G requise par rapport à la population totale de récepteurs. D'autre part, des agonistes sont capables d'activer sélectivement une sous-population de récepteurs couplant à une protéine G spécifique [274]. Deuxièmement, ces modèles à deux états, n'intègrent pas l'existence de ligands allostérique, qui sont capables de moduler l'état d'activation du récepteur par un agoniste orthostérique, de manière qualitative mais aussi quantitative [274]. Enfin, les modèles à deux états considèrent uniquement la protéine G comme partenaire capable d'émettre au signal, or il est désormais clair que les RCPG sont capables d'émettre un signal indépendant des protéines G notamment via leur association aux  $\beta$ -arrestines.

Ainsi, les résultats des différents travaux suggèrent fortement que les RCPG puissent adopter non pas deux, mais une multitude d'états conformationnels. Ces états varient en fonction de l'interaction des récepteurs avec un partenaire effecteur, par exemple les protéines G ou les  $\beta$ -arrestines. L'existence de conformations induites sélectivement en fonction de l'agoniste a été démontrée de façon convaincante grâce à l'utilisation de diverses approches fournissant une explication au couplage multiple aux protéines G ou aux  $\beta$ -arrestines, et à l'activation de différentes voies de signalisation par un même RCPG stimulé par différents ligands. La découverte récente de ligands capables d'activer sélectivement des voies de signalisation dépendantes des protéines G ou des  $\beta$ -arrestines a fortement renforcé la pertinence d'un modèle multi-états [275]. Des évidences structurales directes ont également été obtenues par spectroscopie de fluorescence du récepteur  $\beta$ 2-adrénérique purifié, montrant que la plupart des ligands induisent des réorganisations structurales

compatibles avec l'existence d'états conformationnels ligands-spécifiques multiples (Figure 14) [276, 277].

Les données actuelles en pharmacologie des RCPG sont en faveur d'un modèle d'activation des RCPG dans lequel les contacts entre le récepteur et des déterminants structuraux de l'agoniste vont stabiliser une succession d'états conformationnels, qui détermineront aussi bien le/les partenaires impliqué(s) dans la transduction du signal intracellulaire (protéines G,  $\beta$ -arrestines, autres protéines ?) que l'amplitude et la spécificité du signal lui-même.

Le concept de sélectivité fonctionnelle aussi appelé agonisme biaisé découle du modèle multi-états. Ce concept propose que chaque ligand d'un RCPG se lie avec une forte affinité pour une conformation particulière du récepteur et déplace l'équilibre vers cet état, ceci permettant d'activer sélectivement un signal spécifique d'activation de ce RCPG.

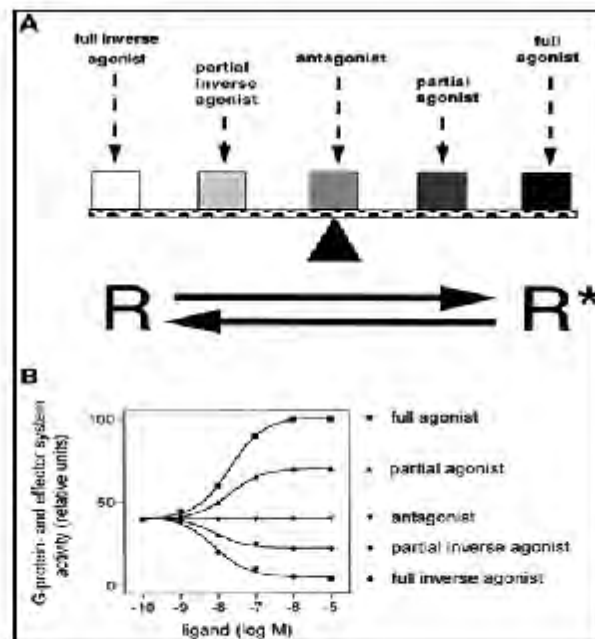
## **B] Modulation de l'activation des RCPG**

Les RCPG transitent de manière réversible entre un état inactif et un état actif, et un ligand par son interaction avec le récepteur va stabiliser préférentiellement l'un ou l'autre de ces états. Ces ligands vont stabiliser une conformation du RCPG pour laquelle il possède le plus d'affinité. Les effets cellulaires et biologiques observés suite à l'action d'un ligand permettent de classer ce ligand comme agoniste plein, partiel, inverse ou antagoniste neutre (Figure 15). Cependant il est important de noter que la classification d'un grand nombre de ligands dans les différentes catégories énoncées ci-dessus n'est attribuée que très souvent après l'observation de l'activation d'une seule voie de signalisation d'un RCPG par un ligand donné. Ainsi un ligand X peut être classé agoniste partiel sur une voie de signalisation A et peut aussi bien être un agoniste inverse sur une voie de signalisation B.

### **B.1. Les agonistes**

Selon le comité international de pharmacologie, le terme d'agoniste s'applique à un ligand qui se lie sur un récepteur, provoquant un réarrangement conformationnel du récepteur qui aboutit à l'initiation d'une réponse biologique. Les agonistes pleins et partiels augmentent l'activité du récepteur, alors que les agonistes inverses la réduisent.

Selon la localisation du site de liaison sur le site de récepteur, deux types de ligands sont discriminés. Les ligands qui occupent le site de liaison du/des ligand(s) endogène(s) sur



**Figure 15: Les différentes propriétés des ligands des RCPG**

A) Equilibre présentant les états relatifs que stabilisent préférentiellement les différents ligands des RCPG. Les agonistes inverses déplacent l'équilibre vers un état inactif, les antagonistes neutres ne modifient pas l'équilibre, et les agonistes partiels ou pleins déplacent l'équilibre vers une conformation active. B) Graphique représentatif du profil expérimental lors d'une expérience de dose-réponse avec les différents types de ligands de RCPG.

les récepteurs sont nommés, ligands orthostériques. Le site de liaison « orthostérique » se réfère spécifiquement au site de liaison primaire du/des ligand(s) endogène(s).

Par opposition au site orthostérique, les autres sites de liaison de ligands en dehors du site de liaison du/des ligand(s) endogène(s) sont appelés sites de liaisons « allostériques » ou « allotropiques ». Ainsi les ligands capables de se lier sur ces sites allostériques seront eux-mêmes dénommés « ligands allostériques ».

Certains agonistes nécessitent la présence d'un autre ligand sur un site allostérique, pour avoir une efficacité normale. Dans cette situation, le ligand orthostérique est appelé « agoniste primaire » alors que le second ligand est appelé « co-agoniste » [278].

### **B.1.1. Les agonistes pleins et partiels**

Un agoniste plein est défini par l'obtention une réponse maximale possible du système après la stimulation du récepteur par un agoniste. En général, le ligand endogène est souvent considéré comme un agoniste plein, bien qu'il existe des exceptions. Les agonistes partiels sont définis par comparaison de l'amplitude de leur activité biologique avec celle induite par l'agoniste plein. L'agoniste partiel, ne peut induire une réponse aussi forte que l'agoniste plein, même lorsque l'agoniste partiel est présent à une concentration saturant tous les sites de liaison des récepteurs.

Cependant, la différence entre les agonistes pleins et partiels n'est pas uniquement liée à l'amplitude de la réponse biologique. Un agoniste partiel va en effet, stabiliser une conformation active différente de celle stabilisée par un agoniste plein, initiant un signal différent d'un point de vue de l'amplitude mais aussi d'un point de vue de la nature même du signal. La spectroscopie de résonance plasmonique (PWR) a permis de démontrer que les récepteurs  $\delta$ -opioïdes peuvent être stabilisés dans des conformations différentes par la présence de différents agonistes [279]. L'affinité sélective d'un agoniste plein ou partiel pour une conformation du RCPG va bouleverser les équilibres et modifier la distribution des espèces au sein de l'ensemble des états du récepteur.

Ainsi, tous les agonistes ne stabilisent pas la même conformation active. Par exemple, le récepteur PACAP interagit avec deux formes du ligand PACAP, PACAP-27 et PACAP-38 et est couplé positivement aux protéines  $G_s$  et  $G_q$ . Alors que les courbes dose-réponse d'activation de l'adénylate cyclase présentent des puissances des deux ligands similaires (0,1-0,4nM), le PACAP-38 est plus puissant que le PACAP-27 pour l'activation de la phospholipase C (15 nM contre >1 $\mu$ M respectivement) [280].

Un autre exemple concerne le récepteur des cannabinoïde CB1 qui couple aux protéines  $G_s$  et  $G_i$ , et régulent donc positivement ou négativement l'adénylate cyclase.

Certains agonistes du récepteur CB1 induisent des conformations favorisant le couplage avec la protéine  $G_s$ , alors que d'autres agonistes favorisent un couplage à la protéine  $G_i$ . Implicitement, les deux protéines G impliquées nécessitent des conformations différentes [281].

Il est important de noter, qu'un agoniste partiel, lorsqu'il est en compétition avec un agoniste plein agit comme un antagoniste vis-à-vis de l'agoniste plein. D'autre part, la désensibilisation et l'internalisation du RCPG qui suit la stimulation par un agoniste seront également fonction de l'agoniste utilisé.

### **B.1.2. Les agonistes inverses**

Un agoniste inverse est un ligand capable de déplacer l'équilibre de la population de récepteurs vers un état inactif en réduisant la fraction de récepteur dans un état actif en l'absence de ligand. En d'autres termes, un agoniste inverse est capable de réverser l'activité constitutive d'un RCPG. Ainsi, leur découverte s'est faite tardivement par rapport aux autres types de ligands, ceci est principalement dû à l'absence de système recombinant présentant une expression de RCPG suffisante pour détecter leur activité constitutive. L'apparition de RCPG mutants constitutivement activés a permis de mettre en évidence les propriétés des agonistes inverses. En effet, ces récepteurs constitutivement activés présentent une activité basale supérieure à l'activité basale du récepteur sauvage et les agonistes inverses sont capables d'inhiber cette activité constitutive. De plus, les systèmes naturels possèdent une stoechiométrie récepteur/protéine G ne permettant pas la formation d'une quantité suffisante de récepteurs en conformation active pour la démonstration d'une activité constitutive. De nombreux composés ont été initialement considérés comme étant des antagonistes compétitifs sans activité intrinsèque avant d'être reconnus agonistes inverses. C'est le cas pour des agents thérapeutiques importants comme la prazosine ( $\alpha_1$ -adrénergique), le losartan (angiotensine AT1) ou encore la cimetidine (Histamine H2) [282].

Un exemple d'agoniste inverse naturel est le rétinol de la rhodopsine. En effet, l'absence d'interaction du rétinol avec la rhodopsine entraîne une activation constitutive de la signalisation du récepteur, indiquant que la liaison du rétinol avec la rhodopsine maintient le récepteur dans une conformation inactive [283]. Les protéines naturelles Agouti, et Agouti-related sont aussi des agonistes inverses, respectivement du récepteur de la mélanocortine MC1, et des récepteurs de la mélanocortine MC3 et MC4 [284].

Une étude de F.R.E.T. (Fluorescence resonance energy transfer) intramoléculaire du récepteur  $\alpha_2a$ -adrénergique a montré que la liaison d'un agoniste inverse au récepteur induit des réarrangements conformationnels différents de ceux induits par des agonistes pleins ou

partiels. Les différences de cinétiques des réarrangements conformationnels, induits par les agonistes pleins, partiels ou inverses, traduisent que ces différentes classes de ligands font appel à des commutateurs moléculaires distincts dans le récepteur [285]. Smit et collègues proposent qu'au niveau moléculaire les agonistes inverses pourraient empêcher la transition du tryptophane W6.48 (selon la nomenclature établie par Weinstein et Ballesteros) du TM6 vers le TM5 en occupant une petite cavité située entre ces deux TM [286]. Ce mécanisme semble avoir lieu dans le cas de la rhodopsine et du récepteur de l'histamine H1.

Cependant, une conséquence du concept de sélectivité fonctionnelle est qu'un ligand peut très bien être un agoniste inverse sur une voie de signalisation et un agoniste partiel sur une autre voie. C'est le cas de deux agonistes inverses du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique. L'ICI118551 et le propranolol sont agonistes inverses sur la voie de l'adénylate cyclase initiée par la protéine  $G_s$  et ils présentent une activité d'agonistes partiels sur la voie MAPKinase par un mécanisme indépendant de  $G_s$  ou  $G_i$ , faisant intervenir les  $\beta$ -arrestines [287]. Ainsi, la classification d'un ligand comme agoniste plein, partiel ou inverse, devrait être faite en se référant systématiquement à la voie de signalisation étudiée.

## **B.2. Les antagonistes neutres**

Un antagoniste neutre, par définition, ne possède pas d'activité intrinsèque, c'est-à-dire qu'il ne déplace pas l'équilibre de la population de récepteurs à l'état basal. Les antagonistes neutres sont beaucoup moins trouvés que les agonistes partiels ou inverses. En effet, on estime qu'environ 85% des ligands qualifiées d'« antagonistes » sont finalement des agonistes. Un antagoniste neutre doit présenter une affinité similaire sur les états inactifs R et actifs  $R^*$ , ne perturbant pas ainsi l'équilibre en place à l'état basal, ce qui explique sa rareté. Les antagonistes neutres orthostériques sont souvent compétitifs au niveau du site de liaison orthostérique vis-à-vis d'autres composés. En l'absence d'autres composés, l'antagoniste est dit neutre car il ne présente aucune activation d'effecteurs du récepteur et ne déplace pas l'équilibre entre R et  $R^*$ . Peu de médicaments ciblant les RCPG sont des antagonistes neutres [282].

## **B.3. Agonistes protéens et ligands bifonctionnels**

### **B.3.1. Agonistes protéens**

Les agonistes protéens sont une espèce pharmacologique très rare. Leur nom provient du dieu grec, Protée, capable de se métamorphoser. Un agoniste protéen est un agoniste possédant la capacité d'être un agoniste partiel sur une population de récepteurs



en conformation inactive, et d'être un agoniste inverse sur une population de récepteurs en conformation active. Ainsi, un agoniste protéen se comporte comme un agoniste ou agoniste inverse sur le même RCPG en fonction du niveau de constitutivité [288].

Les principaux exemples d'agonistes protéens concernent le récepteur histaminique H<sub>3</sub> ou le récepteur  $\alpha$ 2a-adrénergique. La comparaison des effets induits in vivo et in vitro a été réalisée, permettant de mettre en évidence que selon le contexte, certaines molécules se révèlent être des agonistes protéens [289] [290].

### B.3.2 Ligands bi-fonctionnels

Les ligands bi-fonctionnels sont des ligands synthétiques capables d'interagir avec deux RCPG différents, dans le but de potentialiser les effets de celui-ci. Ce type de ligand possède donc deux cibles différentes, c'est la raison pour laquelle ils sont nommés « dual agonistes » ou ligand bi-fonctionnel. L'un des plus remarquables d'entre eux est le sibenadet HCl ou Viozan<sup>TM</sup>. Cette molécule, développée par les laboratoires AstraZeneca active les récepteurs dopaminergiques D2 et  $\beta$ 2-adrénergiques. La stimulation des récepteurs de la dopamine dans le poumon réduit la sécrétion de mucus, la toux et l'essoufflement. Ces effets sont combinés au sein d'une même molécule avec la bronchodilatation induite par la stimulation du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique [291]. Cependant, son développement s'est arrêté en essai clinique de phase III en 2001, du fait de son absence d'avantage thérapeutique comparé aux autres médicaments déjà sur le marché.

Un autre type de ligand bi-fonctionnel existe qui consiste à avoir deux fonctions pharmacologiques différentes selon la cible. En effet, le ligand bi-fonctionnel peut être agoniste sur une cible et antagoniste sur l'autre cible. Cette stratégie de cumuler un double effet au sein d'une même molécule a été appliquée dans le cadre du traitement de la douleur. En effet, lors du traitement de la douleur avec des agonistes classiques des récepteurs opioïdes, l'expression accrue de CCK et de son récepteur est observée. La CCK agit comme un anti-opioïde au niveau du système nerveux central en diminuant les effets antinociceptifs des opioïdes. De cette observation est né le développement d'un ligand bi-fonctionnel, le RSA 601, présentant une activité agoniste sur les récepteurs  $\delta$ - et  $\mu$ -opioïde et une activité antagoniste sur le récepteur CCK2 [292].

Un des inconvénients majeurs de cette stratégie des ligands bi-fonctionnels, est qu'en ciblant deux récepteurs, la probabilité d'effets indésirables associées est aussi fortement augmentée.

## B.4. Ligands allostériques

Un ligand allostérique, est un ligand qui se lie au RCPG sur un site différent du site orthostérique du ligand endogène.

Parmi les modulateurs allostériques, il existe différentes fonctions similaires à celles des ligands orthostériques. Un « stimulant » allostérique est un modulateur n'ayant pas d'activité propre mais dont l'action provoque une augmentation de l'affinité du ligand orthostérique pour le récepteur et/ou de son efficacité. Un antagoniste allostérique est une molécule réduisant l'affinité de l'agoniste orthostérique pour son récepteur et/ou son efficacité. Un agoniste allostérique, possède la propriété intrinsèque d'activer le RCPG mais de par sa liaison à un site allostérique de ce récepteur. Enfin, un ligand allostérique neutre n'affecte ni la liaison, ni l'activité des ligands orthostériques, mais peut simplement bloquer l'action d'autres modulateurs allostériques par simple compétition pour ce même site allostérique.

Du fait de leurs sites d'interaction spatialement distincts de celui des ligands et des conséquences de leur action sur l'équilibre  $R \leftrightarrow R^*$ , les protéines G peuvent être considérées comme des régulateurs allostériques des RCPG [278]. Il est d'ailleurs connu que les protéines G régulent l'affinité de ligands agonistes.

La modulation des RCPG par des substrats endogènes allostériques peut être perçue comme un moyen subtil de la nature de réguler finement la signalisation hormonale. Un cas remarquable de la modulation des RCPG endogènes est l'interaction électrostatique avec un ion. En effet, le  $Zn^{2+}$  module la liaison du ligand et les propriétés fonctionnelles d'un certain nombre de RCPG de la famille A, tels que les récepteurs de la mélanocortine M1 et M4, de la dopamine D1 et D2 ou le récepteur  $\beta$ 2-adrénergique [293].

De nombreux modulateurs allostériques ont été découverts, (particulièrement dans la classe C des RCPG) et quelques uns ont donné lieu à des études cliniques telles que le T62, ligand du récepteur de l'adénosine A1, et du LY354740, ligand des récepteurs mGluR2 et mGluR3. Le cinacalcet, ligand allostérique du récepteur senseur de calcium est depuis 2006 commercialisé en France sous le nom de Mimpara<sup>R</sup> pour le traitement de l'hyperparathyroïdie [294].

Le principe de sélectivité fonctionnelle s'applique également aux modulateurs allostériques. En effet, l'effet d'un modulateur allostérique sur l'activité d'un ligand orthostérique est fonction du ligand orthostérique lui-même. Par exemple, le ligand allostérique LY2033298 est un modulateur sélectif positif de l'acétylcholine mais aussi un agoniste allostérique en l'absence de ligand du récepteur muscarinique M4. En revanche,

LY2033298 est un ligand allostérique neutre vis-à-vis de l'antagoniste du récepteur muscarinique M4, le « quinuclidinyl benzilate » [295, 296].

De par les propriétés inhérentes des modulateurs allostériques, une nouvelle stratégie de « drug design » a émergé, la synthèse de ligand bi-fonctionnel possédant une partie du ligand se liant au site orthostérique du RCPG et l'autre partie se liant à un site allostérique du même récepteur [297, 298]. Plusieurs preuves de concept ont été présentées, notamment sur le récepteur muscarinique M2, afin de valider le développement de ce type de ligand bi-fonctionnel orthostérique/allostérique [299, 300].

*Le développement de modulateurs allostériques est une piste prometteuse d'un point de vue du développement de médicaments, car ces ligands présentent l'avantage de fournir une régulation à la fois fine mais aussi très spécifique d'un ligand orthostérique. Cependant, les ligands allostériques, endogènes ou synthétiques, ne sont pas les seuls à modifier l'activité des RCPG ; en effet, les protéines G et les  $\beta$ -arrestines modifient les caractéristiques intrinsèques (affinité, puissance, efficacité) des RCPG lorsqu'elles sont liées aux RCPG. De la même manière, la dimérisation des RCPG entre eux, constitue un phénomène de modulation allostérique.*

## **B.5. Dimérisation des RCPG**

La dimérisation de protéines transmembranaires est un phénomène connu depuis de nombreuses années. Il permet à des protéines transmembranaires telles que les récepteurs sérine/thréonine kinases ou les récepteurs tyrosine kinases de former un site de liaison pour un ligand, mais aussi d'émettre un signal spécifique. Les RCPG sont classiquement perçus comme des récepteurs qui n'ont pas « besoin » de se dimériser pour transduire un signal en raison de leur structure apte à opérer des réarrangements conformationnels suffisants pour une activation du récepteur et le couplage à des effecteurs. Des expériences ont démontré que des RCPG monomériques sont capables de produire un signal via les protéines G, suggérant que les RCPG n'ont pas besoin de la dimérisation pour fonctionner. Cependant, un nombre croissant de démonstrations biochimiques et biophysiques a indiqué que de nombreux RCPG existent sous forme d'homodimères et d'hétérodimères, mais aussi d'oligomères, et également que ce processus de dimérisation/oligomérisation pourrait moduler, au même titre qu'un modulateur allostérique, leur activation. Ce concept a bouleversé le modèle traditionnel d'interaction qui établissait une stoechiométrie entre RCPG et protéines G de 1 :1. Si la dimérisation/oligomérisation des RCPG in vitro mais aussi in

vivo, est désormais un phénomène bien accepté, mais son importance physiologique demeure mal connu.

La dimérisation des RCPG jouerait un rôle à chaque étape de la vie du RCPG, c'est-à-dire lors des processus de biosynthèse, de transport à la membrane, de régulation par le ligand, de la pharmacologie du récepteur, de la transduction du signal, et de l'internalisation. Au vu de l'abondance des mécanismes qui pourraient être décrits, nous avons choisi dans cette partie, de ne présenter que quelques exemples de dimérisation de RCPG et des conséquences de ce phénomène sur la fonction du récepteur.

D'un point de vue fonctionnel et physiologique, le cas le plus marquant de dimérisation des RCPG est celui du récepteur GABA<sub>B</sub>. En effet, l'unité fonctionnelle de ce récepteur est un hétérodimère de deux RCPGs, GABA<sub>B1</sub> et GABA<sub>B2</sub> qui constituent les deux sous-unités de l'hétérodimère. Cette hétérodimérisation est nécessaire pour l'adressage membranaire des deux sous-unités, sans quoi GABA<sub>B1</sub> monomérique est retenu au niveau intracellulaire alors que GABA<sub>B2</sub> est exprimé à la membrane mais n'est pas fonctionnel. L'hétérodimérisation de GABA<sub>B1</sub> et GABA<sub>B2</sub> est aussi nécessaire pour la fonction du récepteur, avec GABA<sub>B1</sub> qui assure la liaison avec l'agoniste mais n'est pas couplé à une protéine G et GABA<sub>B2</sub> qui couple aux protéines G mais ne lie pas d'agoniste [301]. Des expériences de FRET, indiquent que les récepteurs GABA<sub>B1</sub> et GABA<sub>B2</sub> formeraient des tétramères avec deux protomères GABA<sub>B2</sub> distants l'un de l'autre, alors que les deux autres protomères GABA<sub>B1</sub> sont proches l'un de l'autre, formant probablement le centre du tétramère [302].

La dimérisation des RCPG entraîne une modification conformationnelle des deux protomères ce qui affecte la pharmacologie de ces récepteurs, de la même manière qu'un modulateur allostérique. Une étude récente montre que l'homodimérisation du récepteur adénosine A2A influence la structure du récepteur, et ainsi le réseau d'acides aminés mis en jeu lors de l'activation des récepteurs [303]. Une autre étude rapporte une forte coopérativité négative sur la liaison des ligands à des homodimères des récepteurs TSH, LH et FSH [304]. Enfin, des travaux du groupe de Javitch en 2009, montrent que la communication entre deux protomères d'un homodimère de récepteur dopaminergique D2 module leur activation. En effet, alors que l'activation totale du système est atteinte par la stimulation d'un agoniste sur un seul protomère du dimère couplé à une seule protéine G, la liaison d'un agoniste inverse sur le second protomère augmente le signal global. A l'inverse, la liaison d'un agoniste sur le second protomère ou la présence d'un protomère mutant constitutivement actif, inhibe le signal du premier protomère [305].

*On sait maintenant que les RCPG sont capables d'émettre un signal indépendamment des protéines G, via les  $\beta$ -arrestines. Ainsi toutes les études de*

*dimérisation des RCPG ont très souvent considéré le couplage aux protéines G comme l'effecteur modulé par la dimérisation, en revanche peu d'études se sont intéressées à l'impact de la dimérisation sur le recrutement des  $\beta$ -arrestines et la modulation potentielle de cette signalisation. Le fait que la dimérisation du récepteur TRH augmente son internalisation, qui est  $\beta$ -arrestines dépendante, suggère qu'il est probable que la dimérisation puisse également moduler le recrutement des  $\beta$ -arrestines et les voies de signalisation associées [306].*

## **C] Le concept de sélectivité fonctionnelle ou d'agonisme biaisé**

### **C.1 Concept de sélectivité fonctionnelle**

Les premiers concepts de pharmacologie établissent qu'un ligand possède une activité intrinsèque sur un récepteur donné, ce qui permet l'initiation d'un signal intracellulaire. Le signal en aval d'un récepteur a d'abord été considéré comme spécifique du récepteur avant d'être considéré comme spécifique du ligand. En effet, selon le concept du complexe ternaire, le récepteur peut être dans un état inactif ou actif, et les différents ligands stabilisent préférentiellement le récepteur dans un de ces deux états. Ainsi, les différences observées entre deux signaux émanant d'un même récepteur stimulé par un agoniste, mesurés dans deux systèmes cellulaires différents, ont longtemps été attribuées à la disparité de l'équipement cellulaire.

Le concept de sélectivité fonctionnelle propose que chaque agoniste d'un RCPG donné, stabilise préférentiellement une des conformations actives du récepteur, conduisant à l'activation d'un signal cellulaire spécifique de cet agoniste via ce RCPG. En effet, les protéines telles que les RCPG traversent un « champ d'énergie » où l'énergie thermique conduit la protéine dans des « puits » d'énergie préférés. Les conformations des RCPG, au niveau de ces puits d'énergie, possèdent une affinité préférentielle pour des protéines de la signalisation cellulaire. Quand une molécule se lie au récepteur, il devient une autre espèce thermodynamique et le complexe ligand-récepteur traverse un nouveau champ d'énergie. L'affinité sélective pour les conformations actives de RCPG fait que les agonistes se lient préférentiellement à cette nouvelle espèce. Puisque les conformations du récepteur sont inter-convertibles, cette liaison sélective produit une pression thermodynamique vers un enrichissement par les espèces actives aux dépens des espèces inactives selon le principe de Le Chatelier « *si un équilibre dynamique est perturbé par un changement de conditions,*

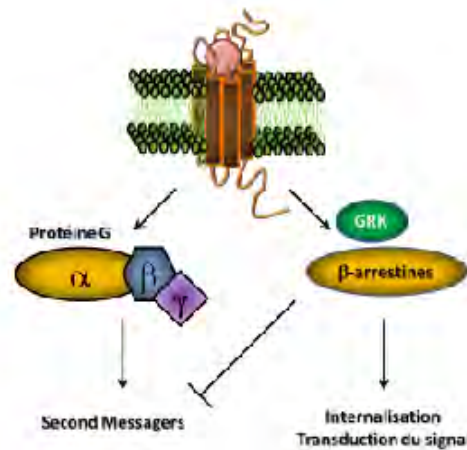
*la position de l'équilibre bouge pour contre-balancer le changement* ». Ceci lie un agoniste à un signal spécifique via le récepteur, avec l'agoniste favorisant l'enrichissement de la conformation du récepteur qui produit le signal [307].

Un agoniste est dit « biaisé » quand il est sélectif d'une conformation du RCPG qui mène à l'activation d'une partie seulement des voies cellulaires d'un récepteur par l'intermédiaire d'un seul effecteur spécifique (protéines G,  $\beta$ -arrestines) sans activer d'autres effecteurs du même récepteur, produisant ainsi une distorsion de la signalisation. Par exemple, pour un RCPG qui se couple à plusieurs protéines G, un ligand biaisé va activer un signal intracellulaire dépendant d'une seule des protéines G alors qu'un ligand non biaisé activera toutes les protéines G. De la même manière avec les  $\beta$ -arrestines, un ligand biaisé peut activer spécifiquement des voies dépendantes d'une protéine G sans activer les  $\beta$ -arrestines et vice-versa. Depuis la découverte du rôle des  $\beta$ -arrestines dans la signalisation, un nombre grandissant de ligands biaisés pour le signal  $\beta$ -arrestines ont été identifiés (Figure 16).

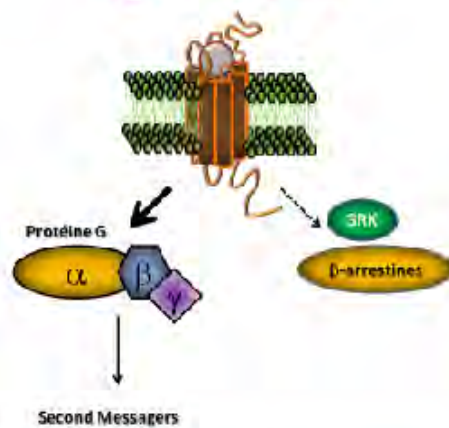
## C.2. Les ligands biaisés

Les ligands biaisés rassemblent aussi bien les ligands qui sont capables d'activer un RCPG via une protéine G donnée parmi plusieurs couplés au même récepteur que les ligands capables d'activer des voies, soit dépendantes des protéines G, soit dépendantes des  $\beta$ -arrestines. La concentration de ligand utilisé détermine également l'activation préférentielle de certaines voies. Par exemple, le récepteur  $\beta$ 2-adrénérique active la protéine Gs pour de faibles concentrations de ligand, alors qu'il active la protéine Gi pour de fortes concentrations de ligands. Par choix, cette partie présentera uniquement les différents agonistes biaisés en relation avec le signal  $\beta$ -arrestines, du fait que leur action est très démonstrative du concept de sélectivité fonctionnelle.

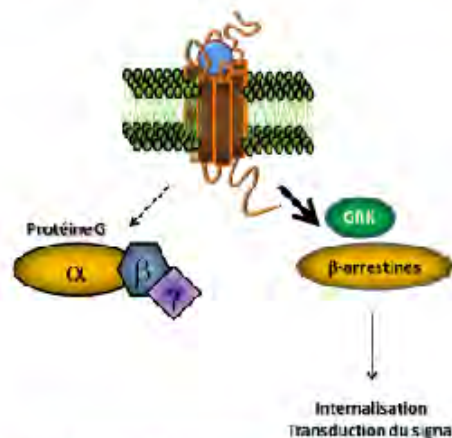
*Récepteur Angiotensine II AT1a.* Un ligand biaisé parfait du récepteur angiotensine II AT1a a été découvert en 2002, le Sar<sup>1</sup>,Ile<sup>4</sup>,Ile<sup>8</sup>-AngII (SII) qui stimule le signal dépendant des  $\beta$ -arrestines de ce récepteur sans activer les protéines G [308]. Ce ligand SII conduit à l'activation du récepteur AT1a via les  $\beta$ -arrestines et à l'activation des ERK1/2 cytosolique qui activent p90RSK dans des cardiomyocytes. En absence d'activité des protéines G, SII stimule la prolifération des cardiomyocytes mais pas l'hypertrophie de ces cellules qui nécessite l'activation de la protéine Gq/11. SII est à l'origine d'effets inotropes et lusitropes



**Ligand non biaisé**



**Ligand biaisé envers les protéines G**



**Ligand biaisé envers les  $\beta$ -arrestines**

**Figure 16: Représentation schématique d'une conséquence du concept d'agonisme biaisé ou de sélectivité fonctionnelle.**

En haut: le ligand est non biaisé il active indifféremment les voies dépendantes des protéines G et des  $\beta$ -arrestines. Au milieu: Le ligand est biaisé envers les protéines G, il active majoritairement les voies dépendantes des protéines G. En bas: le ligand est biaisé envers les  $\beta$ -arrestines, il active majoritairement les voies dépendantes des  $\beta$ -arrestines.

positifs sur des cardiomyocytes de rat isolés. In vivo, SII favorise la production d'aldostérone via un mécanisme dépendant de la  $\beta$ -arrestine 1 [241].

*Récepteur  $\mu$ -opioïde.* La morphine est un ligand du récepteur  $\mu$ -opioïde qui stimule très peu le recrutement des  $\beta$ -arrestines et l'internalisation du récepteur comparé à d'autres agonistes de ce récepteur tels que les enkephalines. Cependant des études chez des souris invalidées pour la  $\beta$ -arrestine 2 suggèrent que la morphine stimule la désensibilisation du récepteur par les  $\beta$ -arrestines. Récemment un nouveau ligand du récepteur  $\mu$ -opioïde a été découvert, l'herkinorine, qui présente une activité encore plus biaisée que celle de la morphine vis-à-vis de l'activation du signal  $\beta$ -arrestines du récepteur  $\mu$ -opioïde. Des composés comme l'herkinorine pourraient augmenter les effets analgésiques liés à l'activation du récepteur  $\mu$ -opioïde sans toutefois déclencher des effets secondaires dépendants de la  $\beta$ -arrestine 2 comme la tolérance, la dépression respiratoire et la constipation [308].

*Récepteur  $\beta$ 2-adrénergique.* Dans une étude de seize antagonistes cliniques du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique, le carvedilol ( $\beta$ -bloquant) a été démontré comme ayant une activité agoniste inverse sur la voie dépendant de la protéine  $G_s$ , mais stimulant de la voie MAPKinase dépendante de la  $\beta$ -arrestine 2. Dans une autre étude, examinant spécifiquement la transactivation du récepteur EGF par le récepteur  $\beta$ 1-adrénergique via des voies  $\beta$ -arrestines dépendantes, le carvedilol et l'alprenolol, deux  $\beta$ -bloquants, ont été identifiés comme inducteurs de ce phénomène. En effet, le carvedilol et l'alprenolol stimulent la transactivation du récepteur EGF par un mécanisme dépendant de la phosphorylation du récepteur  $\beta$ 1-adrénergique et des  $\beta$ -arrestines 1 et 2. Cependant, l'implication physiologique du signal dépendant des  $\beta$ -arrestines via les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques reste à ce jour inconnue [309].

*Récepteur de l'hormone parathyroïde de type 1, PTH1.* Le récepteur PTH1 possède plusieurs ligands biaisés. Les premiers sont des peptides dérivés du PTHrP avec le premier acide aminé muté ou tronqué, PTHrP(2-36) et Bpa<sup>1</sup>-PTHrP(1-36), et activent la protéine  $G_s$  mais pas la protéine  $G_q$ . Ces ligands sont donc biaisés envers l'activation de  $G_s$  par rapport à  $G_q$  et au recrutement des  $\beta$ -arrestines. Un autre ligand biaisé, le D-trp<sup>12</sup>,Tyr<sup>34</sup>PTH(7-34), décrit comme un agoniste inverse sur la voie  $G_s$ , est capable provoquer le recrutement des  $\beta$ -arrestines et de stimuler le signal dépendant des  $\beta$ -arrestines en l'absence de signal dépendant des protéines  $G_s$  et  $G_q$ . Enfin, le ligand PTH(1-34) active la protéine  $G_s$  et  $G_q$  alors



que le ligand PTH(1-31) active uniquement la protéine  $G_s$  et que le ligand PTH(3-38) active uniquement la protéine  $G_q$  [241].

*Récepteur dopamine D2.* Le récepteur dopamine D2, permet via une voie dépendante des  $\beta$ -arrestines et de la phosphatase PP2A, d'inhiber Akt, ce qui conduit à l'activation de GSK3 $\beta$ . Une étude récente montre que différentes classes de médicaments anti-psychotiques bien que présentant des effets différents au niveau de l'activation des protéines G par le récepteur dopamine D2, partagent la propriété d'être antagonistes sur le recrutement de la  $\beta$ -arrestine 2 [310].

*Récepteur GPR109A.* Le récepteur GPR109 après stimulation par l'acide nicotinique provoque la diminution de la concentration d'acide gras plasmatique et augmente le rougissement cutané dû à une vasodilatation des vaisseaux. L'effet du GPR109 sur l'augmentation de la rougeur cutanée est dépendante des voie  $\beta$ -arrestines. La molécule MK-0354 a récemment été développée et diminue la concentration d'acides gras plasmatiques sans produire un effet de rougeur cutanée. Ce composé MK-0354 est un agoniste biaisé pour la protéine  $G_i$  par rapport au recrutement des  $\beta$ -arrestines [241].

*Récepteur sérotonine 5-HT<sub>2A</sub>.* Le récepteur de la sérotonine 5-HT<sub>2A</sub> possède un ligand biaisé, le 2,5-dimethoxy-4-iodoamphétamine (DOI), qui active la protéine  $G_q$  mais ne permet pas l'internalisation de ce récepteur qui est dépendante des  $\beta$ -arrestines. En effet, la phosphorylation des ERK par la stimulation de DOI est complètement bloquée par l'inhibition de la phospholipase C. DOI est un agoniste biaisé envers la protéine  $G_q$  par rapport au recrutement des  $\beta$ -arrestines pour le récepteur 5-HT<sub>2A</sub>, néanmoins les conséquences physiologiques de la stimulation par DOI ne sont pas encore élucidées [241].

### **C.3. De l'agonisme biaisé aux récepteurs biaisés**

A l'heure actuelle, la majorité des ligands biaisés sont des ligands synthétiques dont la propriété a été découverte dans des systèmes in vitro. Ce concept d'agonisme biaisé vis-à-vis des voies  $\beta$ -arrestines est très récent et il est à prévoir que la plupart des agonistes évoqués dans la partie précédente seront utilisés dans des études in vivo très prochainement. A ce jour, une seule étude rend compte de l'utilisation d'un agoniste biaisé in vivo et de l'importance de pouvoir sélectivement activer ou inhiber les effets physiologiques

dépendants des  $\beta$ -arrestines au moyen de tels outils pharmacologiques. Cette étude de Violin et collègues utilise un agoniste du récepteur angiotensine II AT1a, le TRV120027, ce composé est un antagoniste sur les voies dépendantes des protéines G mais active les ERK1/2, Src et la phosphorylation d'eNOS par des voies dépendantes des  $\beta$ -arrestines. Contrairement à des agonistes non biaisés, le TRV120027 augmente la contractilité de cardiomyocytes in vitro. Chez le rat, le TRV120027 diminue la pression artérielle comme le font aussi les agonistes non biaisés, le losartan et le telmisartan. Cependant, alors que le losartan et le telmisartan diminuent la performance cardiaque, le TRV120027 augmente la performance cardiaque et préserve le volume d'éjection systolique cardiaque. Ces différences surprenantes entre agonistes biaisés et non biaisés valident l'utilisation de ligands biaisés pour cibler sélectivement des fonctions particulières d'un récepteur [311].

Ces découvertes ouvrent de nouvelles approches pour le développement de médicaments ciblant les RCPG. Plus récemment encore, il a été découvert un récepteur naturellement biaisé. En effet, le récepteur CXCR7 est connu comme un récepteur naturellement « inactif », incapable d'activer les protéines G, et il a été proposé que ce récepteur puisse jouer un rôle de corécepteur, mais le groupe de Lefkowitz a démontré en 2009 que ce récepteur est en fait capable d'émettre un signal, en réponse à son ligand, via les  $\beta$ -arrestines. Le CXCR7 active la voie des MAPKinases par des voies dépendantes des  $\beta$ -arrestines dans des cellules transfectées de manière transitoire. De plus, des cellules de muscles lisses qui expriment de manière endogène CXCR7, migrent vers leur ligand « interféron inducible T-cell alpha chemoattractant », ITAC, et cet effet est considérablement atténué par un traitement avec un antagoniste du CXCR7 ou par invalidation des  $\beta$ -arrestines par siRNA. Cette étude démontre que des RCPG ont évolué pour émettre un signal exclusivement par les  $\beta$ -arrestines et suggère que d'autres RCPG actuellement considérés comme orphelins ou inactifs pourraient être biaisés comme le CXCR7 [309].

*Ces récentes découvertes de l'importance de l'agonisme biaisé in vivo et de l'existence de RCPG biaisés sont probablement les premières observations d'une longue série, qui démontrent à la fois l'importance du signal  $\beta$ -arrestine mais aussi la complexité de la pharmacologie des RCPG à travers le concept de sélectivité fonctionnelle. En effet, même si ce concept est maintenant bien admis et que l'on commence à entrevoir des applications in vivo, les mécanismes moléculaires régissant la sélectivité et l'existence de multi-états actifs restent très peu compris. Le concept de sélectivité fonctionnelle est lui-même à replacer dans un contexte physiologique. Par exemple, la sélectivité fonctionnelle dit qu'un ligand va stabiliser une conformation particulière et enrichir la population de récepteurs de*

*cette conformation, mais il faut aussi prendre en compte le fait que les récepteurs sont, comme l'indiquent les données expérimentales, probablement précouplés aux protéines G, alors qu'à ce jour ils n'ont pas été décrits précouplés aux  $\beta$ -arrestines. Ainsi, un ligand biaisé sélectif des voies  $\beta$ -arrestines peut-il provoquer le découplage d'un complexe récepteur précouplé à une protéine G par un recrutement des  $\beta$ -arrestines, ou est-il limité à recruter les  $\beta$ -arrestines via une sous population de récepteurs qui ne sont pas déjà précouplés à des protéines G ? Le signal dépendant des  $\beta$ -arrestines est dit « dépendant des  $\beta$ -arrestines » dans la plupart des études, mais qu'en est-il réellement de la participation de chacune des  $\beta$ -arrestines? En effet, on sait que la  $\beta$ -arrestine 1 et la  $\beta$ -arrestine 2 ne sont pas recrutées de la même manière par tous les RCPG, et qu'elles sont fonctionnellement différentes. De plus, il est possible que les RCPG soient capables de transmettre leurs signaux par l'intermédiaire d'autres protéines que les protéines G ou  $\beta$ -arrestines. Des futures études devront apporter des réponses à ces questions afin de pouvoir exploiter au mieux les opportunités offertes par la possibilité d'activer sélectivement les RCPG.*



## Troisième Chapitre :

Le récepteur de la CCK et  
de la Gastrine



### **III. Le récepteur de la Cholecystokinine et de la Gastrine, le récepteur CCK2**

Notre équipe de recherche se focalise spécifiquement sur l'étude d'un RCPG, le récepteur CCK2. Le récepteur CCK2 ou RCCK2 est le récepteur de deux neuropeptides, la cholécystokinine (CCK) et la gastrine qui se lient avec une affinité similaire à celui-ci.

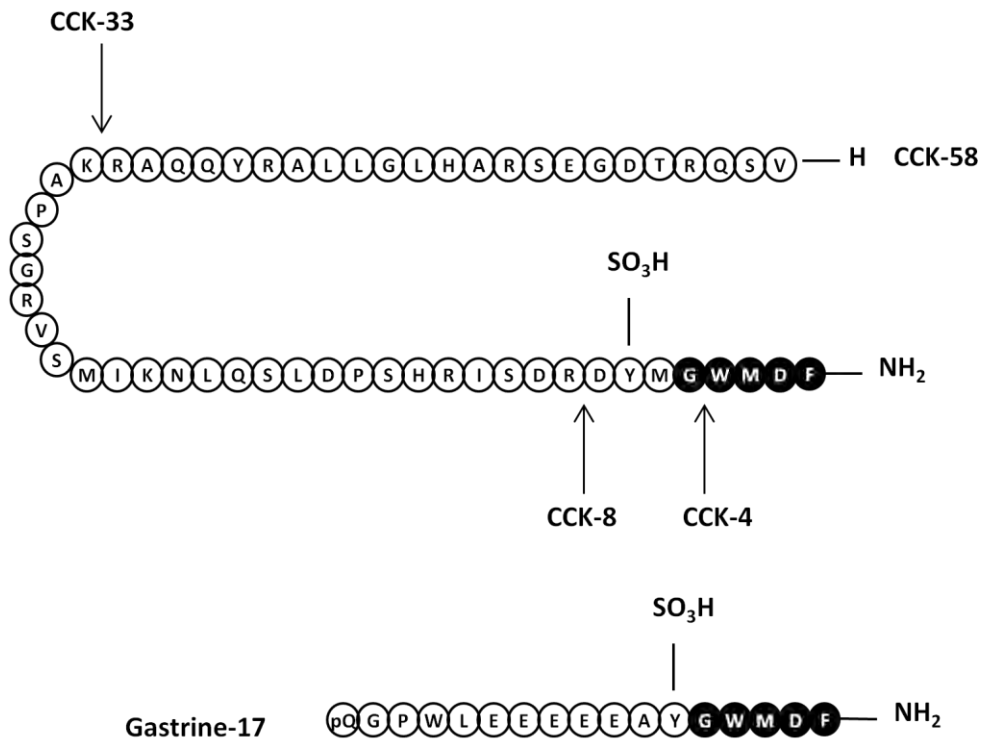
#### **A] Les ligands: la Cholécystokinine (CCK) et la Gastrine**

##### **A.1. Découverte des ligands naturels, CCK et Gastrine**

Au début du 20<sup>ième</sup> siècle, William Bayliss et Ernest Starling découvrent l'existence d'une substance circulant dans le sang qui déclenche la sécrétion pancréatique. Starling introduit le terme d'hormone pour désigner toute substance chimique transportée par le sang et servant de messenger entre deux organes. Les années suivantes, diverses hormones agissant sur la régulation de la digestion comme la gastrine et la cholécystokinine – pancréozymine furent identifiées.

Le physiologiste britannique John Sydney Edkins a été l'un des premiers à suggérer, en 1905, l'existence d'une substance possédant la propriété de stimuler la sécrétion gastrique. Edkins montre que l'injection dans le sang d'un extrait de muqueuse gastrique préalablement incubé avec des substances digérées, stimule la sécrétion d'acide gastrique. Ce n'est qu'en 1964, que la Gastrine est isolée par Gregory et Tracy à partir de la muqueuse antrique de porc [312].

La découverte de la cholécystokinine (CCK) s'effectua en plusieurs étapes. En 1928, Ivy et Oldberg proposent que la muqueuse du petit intestin sécrète une hormone, la cholécystokinine qui a pour propriété de stimuler la contraction de la vésicule biliaire [313]. D'autre part, Harper et Raper, en 1943, attribuent la sécrétion enzymatique pancréatique à l'action d'un autre facteur hormonal, la pancréozymine (PZ) [314]. Pendant la purification d'une autre hormone digestive, la sécrétine, Viktor Mutt note que les extraits intestinaux contiennent aussi une activité pancréozymine. Lors de purification de peptides, Jorpes et Mutt constatent que les fractions contenant l'activité de la pancréozymine contiennent aussi celle de la cholécystokinine. La CCK-33, identifiée par Mutt et Jorpes en 1968, contient



### Figure 17: Séquence de la Cholécystokinine (CCK) et de la Gastrine

Ces deux hormones présentent un pentapeptide terminal commun, nécessaire à leur activité biologique. La CCK et la Gastrine présentent plusieurs formes de différentes longueurs et sont caractérisées par une sulfatation de la totalité des molécules de CCK et de la moitié des molécules de Gastrine ainsi que par l'amidation de l'extrémité carboxy-terminale.



l'activité maximale de CCK et PZ. L'unité structurale de cette hormone ne se fait qu'en 1971, lorsque Mutt et Jorpes isolent un polypeptide de 33 acides aminés qui possède les propriétés décrites aussi bien pour la CCK que pour la PZ. Elle est alors nommée « cholécystokinine-pancréaozymine » (CCK-PZ), puis par la suite simplement cholécystokinine [315].

## **A.2. Biosynthèse de la CCK et de la Gastrine**

### **A.2.1. Structure et maturation de la CCK et de la Gastrine**

La CCK est isolée pour la première fois sous la forme d'un peptide de 33 acides aminés en 1971. Son séquençage en 1968 révèle qu'elle est structurellement proche de la gastrine, puisqu'elle partage avec cette dernière le pentapeptide de l'extrémité C-terminale : Gly-Trp-Met-Asp-Phe-CO-NH<sub>2</sub>. Ces cinq acides aminés représentent la structure minimale nécessaire à l'activité biologique de la CCK et de la Gastrine, cependant la présence des huit derniers acides aminés de la CCK est essentielle pour une activité biologique complète. La forme non maturée de la CCK est la préproCCK composée de 115 acides aminés. Cette préproCCK subit plusieurs clivages protéiques et la sulfatation de la tyrosine en position 7 à partir de l'extrémité C-terminale. Plusieurs formes de CCK résultant de la maturation post-traductionnelle, sont physiologiquement présentes dans le sang, la CCK-58, CCK-33, CCK-22, CCK-8 ([Figure 17](#)) [316, 317].

Le précurseur de la gastrine est la préprogastrine qui comporte 101 acides aminés. La maturation de ce précurseur comprend également des clivages en progastrine puis gastrine, avec une sulfatation de la tyrosine en position 6 à partir de l'extrémité C-terminale, et une  $\alpha$ -amidation carboxyterminale. Là aussi, ces maturations post-traductionnelles vont donner naissance à des polypeptides de différentes longueurs. La maturation de la préprogastrine aboutit à l'obtention de deux peptides de gastrine bioactifs de 34 et 17 acides aminés, dont la moitié est sulfatée ([Figure 17](#)). Il est à noter que le précurseur de la gastrine, la progastrine et la forme non amidée de la gastrine, la gastrine glycine étendue (Ggly) possède la capacité d'induire des signaux de transduction *in vitro* [317]. La question de la réalité d'une activité biologique *in vivo* de la progastrine et Ggly, ainsi que celle de l'existence du récepteur par lequel ces effets seraient induits, reste un sujet de polémique au sein de la communauté scientifique intéressée au sujet [318, 319].

## **A.2.2. Cellules endocrines sécrétant la CCK et la Gastrine**

Chez l'homme, l'expression du gène de la gastrine est localisée au niveau des cellules G de la muqueuse antrale pylorique et du duodénum. La gastrine est sécrétée en réponse au contact du bol alimentaire avec les parois de l'antra gastrique, et plus particulièrement avec la membrane baso-latérale des cellules G. La sécrétion de gastrine est stoppée par l'élévation de la concentration d'acide gastrique [316, 320].

La sécrétion de la CCK est localisée au niveau de la muqueuse du duodénum. Celle-ci est très plissée, et comporte des villosités recouvertes d'entérocytes dont le pôle apical hérissé de microvillosités leur donne l'aspect d'une bordure en brosse. Entre ces grandes villosités s'ouvrent des cryptes, dont la paroi est constituée, entre autres de cellules I sécrétant la cholécystokinine. La membrane apicale de ces cellules est en contact direct avec la lumière intestinale, et la région basale contient des granules de sécrétion contenant la CCK. L'arrivée du chyme dans cette partie de l'intestin, particulièrement si celui-ci est riche en acides aminés et en acides gras, stimule la sécrétion de CCK [321]. La CCK est aussi synthétisée dans certaines cellules corticotrophes et mélanotrophes de l'hypophyse ainsi que dans les cellules médullaires surrénales.

La CCK est aussi présente dans le système nerveux central et les neurones à CCK sont parmi les plus nombreux. Ils régulent des fonctions centrales importantes. Les neurones à CCK sont particulièrement présents dans les aires corticales et dans les neurones dopaminergiques mésencéphaliques. Cependant, il existe aussi des neurones à CCK qui innervent le côlon et le pancréas [317].

## **A.3. Effets physiologiques de la CCK et de la Gastrine**

### **A.3.1. Effets physiologiques de la CCK**

#### **A.3.1.a Au niveau du tractus gastro-intestinal**

La CCK possède plusieurs rôles physiologiques au niveau du tractus gastro-intestinal, tels que la régulation des contractions de l'estomac, du sphincter oesophagien inférieur et de la vésicule biliaire. La CCK ralentit la vidange gastrique en augmentant le tonus du sphincter pylorique par voie endocrine et paracrine en modulant les voies réflexes vagovagales. La CCK stimule la sécrétion des enzymes pancréatiques et provoque la contraction de la vésicule biliaire en agissant sur les cellules du muscle lisse ainsi que par voie vagale, ce qui a pour conséquence de libérer la bile dans le duodénum [322, 323].

La CCK stimule la libération de la somatostatine en agissant directement sur les cellules D du duodénum. La somatostatine inhibe la fonction des cellules pariétales, entérochromaffinlike (ECL), et des cellules productrices de gastrine [324]. Au niveau duodénal, la CCK stimule directement la motilité intestinale via son récepteur exprimé au niveau des muscles lisses du côlon, ou indirectement via le plexus myoentérique [325] [326].

### **A.3.1.b Au niveau du système nerveux périphérique**

Au niveau périphérique, on retrouve des neurones à CCK en grande quantité au niveau de la couche de muscles circulaires lisses du côlon, au niveau des corps ganglionnaires du pancréas, et un peu dans l'iléum [317]. La CCK agirait au niveau du pancréas exocrine, de la vésicule biliaire, et des muscles lisses intestinaux par l'intermédiaire d'un circuit neuronal impliquant le nerf vague.

La CCK sécrétée au niveau intestinal réduit la prise alimentaire au moyen de l'activation de récepteurs présents sur les neurones sensoriels vagues. Ces fibres vagues sensibles à la CCK innervent les différents organes du tractus gastro-intestinal. La CCK est un peptide « coupe-faim » qui induit rapidement une inhibition de la prise alimentaire chez l'homme via un mécanisme dépendant de la présence de son récepteur sur le nerf vague. [325] [327].

Au niveau du système nerveux périphérique, le récepteur RCCK2, est principalement présent dans les ganglions de la racine dorsale et dans le nerf vague [328]. En périphérie, où les récepteurs sont exposés à la fois à la CCK et à la Gastrine, on estime que le ligand endogène prédominant est la Gastrine, en raison de sa concentration plasmatique environ 5 à 10 fois plus élevée que celle de la CCK [316].

### **A.3.1.c Au niveau du système nerveux central**

Le cerveau présente un grand nombre de neurones à CCK, particulièrement au niveau des aires corticales. Le noyau accumbens impliqué dans la schizophrénie et les crises de panique est principalement innervé par des neurones dopaminergiques co-libérant la CCK. L'administration de CCK provoque des attaques de panique chez des volontaires sains, et augmente les désordres comportementaux chez des patients présentant déjà ces troubles [317, 328]. Les concentrations de CCK sont abaissées dans le cortex cérébral des personnes atteintes de schizophrénie, principalement dans les lobes frontaux et temporaux ; ainsi, il a été suggéré que la schizophrénie pourrait être associée à une activité réduite de la CCK [329].

La CCK est un peptide de la satiété qui agit sur les centres cérébraux de la faim et favorise l'arrêt de la prise alimentaire chez différentes espèces de mammifères incluant

l'homme. Une des voies informatives pour déclencher le réflexe satiétogène après le repas est vagale avec transmission initiale au noyau du tractus solitaire, zone qui intègre les signaux afférents provenant du système gastro-intestinal. L'information afférente neuronale traverse ensuite cette zone jusqu'à l'hypothalamus [329].

D'autre part, la CCK est également impliquée dans la régulation du système opioïde. La CCK réduirait en effet les effets antinociceptifs produits par la libération des opioïdes endogènes [328].

La grande majorité des récepteurs CCK dans le système nerveux central (SNC) est le sous-type RCCK2. Il est présent au niveau des zones du télencéphale telles que la couche externe du bulbe olfactif, la couche intermédiaire du néocortex, ou encore du noyau accumbens. Pour le récepteur CCK2, le ligand endogène prédominant dans le système nerveux central est la CCK abondamment produite par les neurones [316, 328].

### **A.3.2. Effets physiologiques de la Gastrine**

#### **A.3.2.a Rôle de la Gastrine dans la digestion**

La gastrine stimule la sécrétion d'acide chlorhydrique par les cellules pariétales de la paroi de l'estomac. La gastrine se lie au récepteur CCK2 et agit sur les cellules entérochromaffinlike (ECL) pour déclencher la libération d'histamine. Une fois libérée l'histamine stimule de manière paracrine les cellules pariétales qui sécrètent l'acide gastrique. La gastrine active aussi directement les cellules pariétales via le RCCK2 [316]. Lorsque le suc gastrique atteint un taux d'acidité suffisamment élevé (pH autour de 2), la sécrétion de gastrine est inhibée par la somatostatine. On peut noter que la sécrétion de gastrine est également stimulée par l'action de la caféine, légèrement par l'alcool, et par les protéines absorbées. Le tonus du sphincter oesophagien inférieur est augmenté sous l'effet de la gastrine.

Dans certaines pathologies cancéreuses, comme les gastrinômes (syndrome de Zollinger-Ellison), les cellules tumorales sécrètent de la gastrine. Il en résulte une hypergastrinémie, qui aboutit à une sécrétion d'acide chlorhydrique considérable. Cette hyperacidité de l'estomac provoque la formation d'ulcères de la muqueuse gastrique [330, 331].

### **A.3.2.b Action trophique de la Gastrine**

La première observation de l'action trophique de la gastrine a été faite chez des patients atteints de gastrinôme qui présentaient des hypertrophies de la muqueuse gastrique. La gastrine exerce une action trophique, en stimulant la prolifération et la différenciation des cellules de la muqueuse gastrique. Des souris invalidées pour la gastrine ou son récepteur CCK2, présentent une muqueuse gastrique atrophiée, et une carence en cellules pariétales et ECL. L'absence de gastrine, perturbe la sécrétion acide basale, insensibilise celle-ci à une stimulation ponctuelle par l'histamine ou la gastrine, réduit le nombre de cellules pariétales et perturbe la migration des cellules ECL le long des glandes gastriques [332, 333].

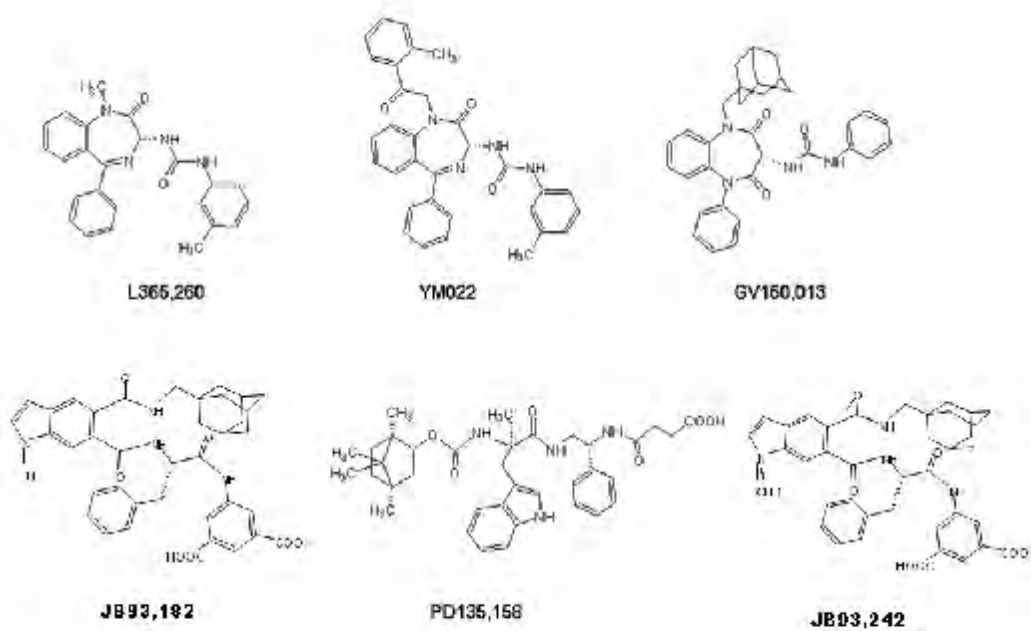
Au niveau du pancréas, l'expression de la gastrine et de son récepteur est cantonnée au tissu endocrine, où la gastrine régulerait la sécrétion du glucagon [334]. La gastrine pourrait aussi contribuer au développement pancréatique, et à la prolifération et différenciation des îlots de Langerhans lors de la régénération [325].

## **A.4. Les ligands synthétiques du récepteur CCK2**

Les fonctions physiologiques et physiopathologiques associées au récepteur CCK2 ont suscité un intérêt pour le développement de ligands spécifiques à visées thérapeutiques. Un important répertoire de molécules structurellement diverses et sélectives du récepteur CCK2 a été généré. Ce panel d'agonistes et antagonistes a contribué à la caractérisation des sous-types de RCCK, le récepteur CCK1 et CCK2 ainsi qu'à une meilleure compréhension du rôle de chacun dans les différents tissus.

Cette diversité de ligands inclut des dérivés peptidiques de la gastrine et de la CCK, ainsi que des petites molécules conçues pour mimer les caractéristiques structurales essentielles des hormones endogènes : les peptoïdes. Des ligands synthétiques additionnels ont été identifiés par criblage à haut débit de bibliothèques de composés non-peptidiques, et ont subi une étape d'optimisation du composé chimique aboutissant à l'accroissement de l'affinité et de la spécificité pour le RCCK2. Ces ligands couvrent une large gamme d'activités fonctionnelles, allant de l'agoniste plein ou partiel, à l'agoniste inverse.

Par souci de clarté, nous avons choisi, ici, de ne présenter que les familles des ligands synthétiques qui ont été utilisés dans nos études c'est-à-dire le PD135,158 ; le GV150,013X ; le L-365,260 ; le YM022 ; le JB93,182 et le JB93,242 (Figure 18).



**Figure 18: Structures chimiques de ligands synthétiques du RCK2**

Les ligands synthétiques présentés ici sont ceux utilisés au cours de ce travail de thèse. En haut, les trois composés dérivés des benzodiazépines L365,260 ; YM022 ; GV150,013X. En bas à gauche et à droite, respectivement JB93,182 (agoniste inverse) et JB93,242 (agoniste partiel) qui ne diffèrent que par la présence d'un groupement méthyle sur JB93,242. En bas au milieu, le PD135,158, de la catégorie des dipeptoides.

### A.4.1 Les dérivés de benzodiazépines

Les modifications chimiques de la structure de l'asperlicine (antagoniste sélectif du récepteur CCK1), tout en conservant le squelette de benzodiazépine, ont permis d'obtenir des antagonistes puissants et sélectifs des deux récepteurs CCK. Ce sont les laboratoires MERK qui ont généré le premier antagoniste très puissant et sélectif du RCCK2, le L-365,260. Ce composé présente une affinité de l'ordre du nanomolaire in vitro et une forte sélectivité pour le RCCK2 (rapport  $K_i$  RCCK2/RCCK1=140). Les essais cliniques de phase I menés sur des hommes volontaires sains montrent une inhibition de la sécrétion d'acide gastrique, de manière dépendante de la dose, malgré une faible biodisponibilité orale liée à la faible solubilité aqueuse du composé.

L'objectif des chercheurs des laboratoires Merck a donc été de développer des antagonistes de seconde génération, conservant la puissance et la sélectivité du L365,260, mais présentant une biodisponibilité orale supérieure grâce à l'incorporation d'un groupement hydrophile. L'un des dérivés les plus intéressants est le L740,093, comportant un caractère basique. Le L740,093 présente une très bonne affinité pour le RCCK2 ( $K_i=0,1$  nM), et une très bonne sélectivité pour le RCCK2 ( $R= 16 040$ ). Ce composé présente une inhibition de la sécrétion acide in vivo 100 fois supérieure à celle du L365,260 et est 100 fois plus soluble que ce dernier. Cependant, d'autres études ont montré que l'administration de L365,260 ou de ses dérivés était associée à des arythmies cardiaques, ce qui a conduit à l'arrêt des études cliniques [335].

Le groupe Yamanouchi a introduit des substituts amino-basiques sur la base structurale du L-365,260 donnant le YM022, molécule optimale de cette série ayant une forte affinité pour le RCCK2 ( $IC_{50}=0,11$  nM) et une bonne sélectivité ( $R=1 364$ ). Les essais menés in vivo ont conclu que le YM022 inhibe spécifiquement la sécrétion d'acide gastrique induite par la gastrine chez le rat [336].

Le L365,260 et le YM022 ont respectivement été caractérisés comme agoniste partiel et antagoniste neutre d'un point de vue pharmacologique sur l'activation de la voie phospholipase C par le RCCK2 (Figure 18) [337].

### A.4.1 Les dérivés du 1,5-benzodiazépines

Un criblage à haut débit conduit par les laboratoires GlaxoSmithKline a identifié une série de dérivés basés sur la 1,5-benzodiazépine avec des propriétés agonistes sur le récepteur CCK1 parmi lesquels certains étaient des antagonistes du récepteur CCK2. Ces

composés furent optimisés en introduisant différents substituants sur ce squelette 1,5-benzodiazépine. Les études des relations structure-activité ont conduit à l'identification d'un carbone déterminant, le C3, dont l'énantiomère R, est plus puissant vis-à-vis du RCCK2. De ces composés, le GV150,013X semblait le plus prometteur, de par ses propriétés inhibitrices de la sécrétion d'acide gastrique et anxiolytiques démontrées dans différents modèles animaux, sans effets d'accoutumance associés. Le développement de ce composé est allé jusqu'en phase II d'essais cliniques, pour le traitement de l'anxiété et des troubles du sommeil. Le GV150,013X a été caractérisé comme agoniste inverse sur l'activation de la voie phospholipase C par le RCCK2 (Figure 18) [337].

#### **A.4.2. Dipeptoïdes**

Les laboratoires de Parke-Davis ont utilisé la séquence térapeptidique terminale de la CCK pour la conception rationnelle de nouveaux ligands du RCCK2. Le tryptophane et la phénylalanine de cette séquence sont les acides aminés minimums requis pour une affinité de l'ordre du micromolaire pour le RCCK2. Cette courte séquence dipeptidique Boc-Trp-Phe-NH<sub>2</sub>, a été optimisée séquentiellement en N- et en C-terminal. Les analogues dipeptidiques en résultant ont été nommés « dipeptoïdes ».

Le PD-135158 (Cam 1028) est un de ces dipeptoïdes. Il présente une IC<sub>50</sub> du déplacement de liaison de la CCK radiomarquée de 3,5 nM. Ce composé provoque des effets anxiolytiques chez la souris, que ce soit par administration subcutanée ou orale, sans phénomène de tolérance, ni de sédation. Cependant, une étude a montré que le PD135,158 n'est pas capable d'inhiber l'activation de l'ornithine décarboxylase (ODC) stimulée par la gastrine dans les cellules ECL de rat, suggérant que ce dipeptoïde est en réalité un agoniste du RCCK2 [338, 339]. L'activité agoniste partielle du PD135,158 a été confirmée sur l'activation de la voie phospholipase par le RCCK2 (Figure 18) [337].

#### **A.4.3. Les dérivés di-benzo-bi-cyclo [2.2.2]octane et bi-cyclique hétéroaromatique**

Les chercheurs de la fondation James Black ont synthétisé une nouvelle série d'antagonistes puissants et sélectifs du RCCK2, sur la base du squelette de dibenzo-bicyclo [2.2.2]octane (BCO). Cependant, des différences inter-espèces ont abouti au remplacement du BCO par des analogues ortho-disubstitués bicycliques hétéroaromatiques, tout en

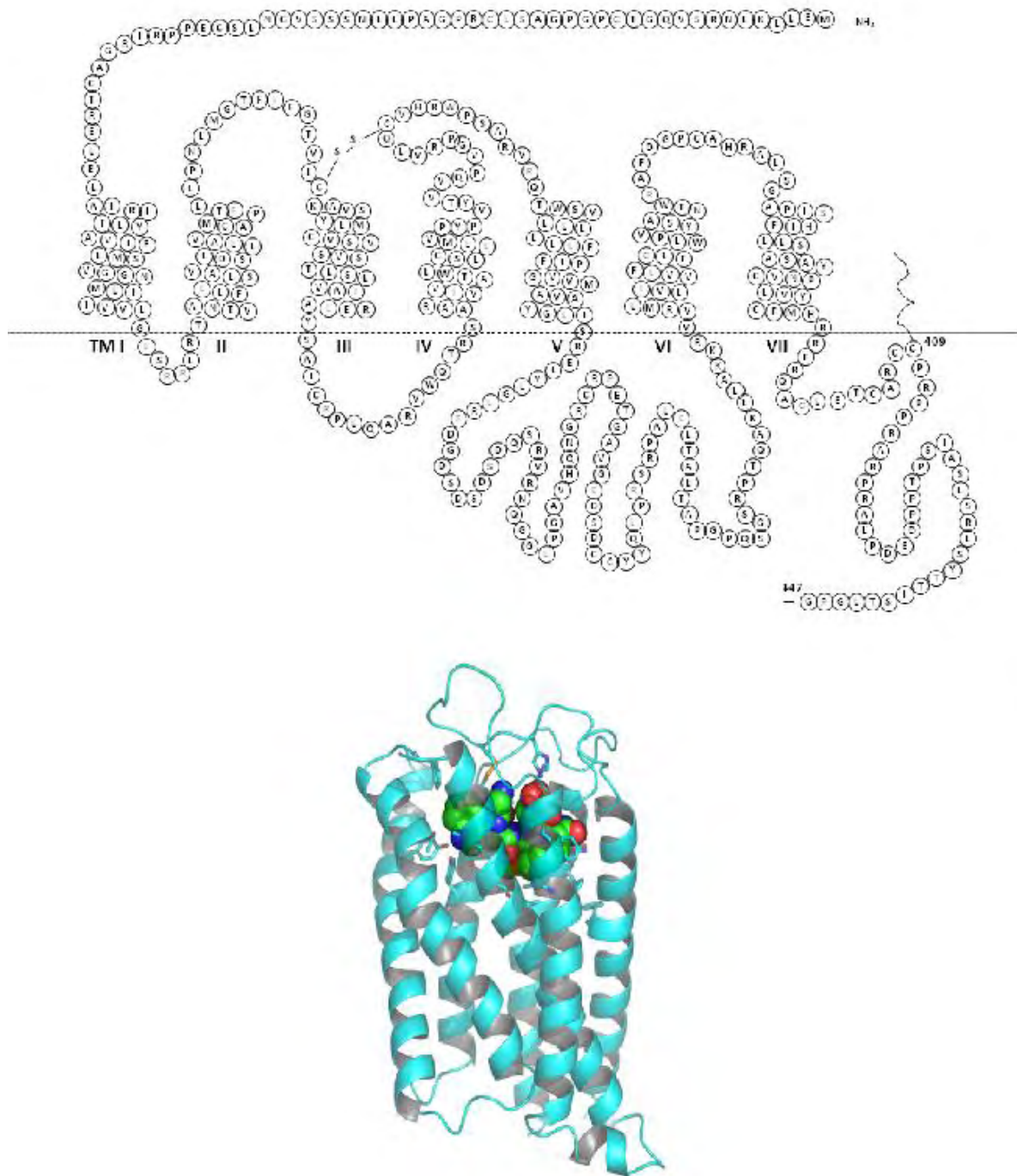


conservant les affinités et les sélectivités des dérivés de BCO. C'est le cas, par exemple, du dérivé indole JB93,182. Cette molécule inhibe l'activation de l'histidine décarboxylase (HDC) stimulée par la gastrine *in vivo*. Durant des études de relation structure-activité, il a été découvert que de petites modifications de la structure pouvaient aboutir à l'obtention de molécules se comportant comme des agonistes. C'est le cas du JB93,242 qui se comporte comme un agoniste partiel sur l'activation de la voie PLC alors que le JB93,182 a été redéfini comme agoniste inverse sur cette même voie (Figure 18) [337].

*La plupart des ligands non peptidiques du RCCK2 ont fait l'objet d'une poursuite de développement et d'essais cliniques principalement dans le traitement des troubles de la sécrétion gastrique ou de l'anxiété. Cependant, beaucoup d'entre eux, ont présenté des problèmes de faible biodisponibilité, avec la nécessité d'utiliser des doses importantes pour être efficaces. Le développement des molécules présentées ci-dessus a été arrêté en cours d'essais cliniques mais d'autres molécules structurellement proches sont développées pour contourner les problèmes rencontrés avec ces ligands. L'activité de ces molécules n'a pas été testée sur les voies dépendantes des  $\beta$ -arrestines de la signalisation RCCK2 or cela pourrait apporter de nouvelles données favorisant la conception de molécules biaisées sur ce récepteur.*

## **B] Le récepteur CCK2**

Les récepteurs de la CCK ont été découverts pour la première fois en 1978, par des expériences de liaison d'un analogue de la CCK, la caeruleine radio-marquée sur des cellules acineuses pancréatiques de rat [340]. Un second type de récepteur avec un profil pharmacologique différent est ensuite découvert dans le cerveau de rat. Dans le cerveau, la gastrine et la pentagastrine se lient avec une affinité de l'ordre du nanomolaire mais dans le pancréas de rat celle-ci est 500 à 2000 fois plus faible [341]. De par leur localisation, le premier récepteur a été nommé RCCK-A pour Alimentary, et le second RCCK-B pour Brain mais selon les recommandations du comité de l'Union Internationale de Pharmacologie (IUPHAR), le RCCK-A a été renommé RCCK1, et le RCCK-B, RCCK2 [328]. Le RCCK-1 et le RCCK-2 diffèrent par leurs affinités relatives pour les ligands naturels ainsi que par leurs distributions tissulaires. En effet, le RCCK-1 lie la CCK sulfatée avec une affinité 500 à 1 000 fois supérieure à celle de la gastrine, sulfatée ou non, et son expression est majoritairement localisée en périphérie. A l'inverse, le RCCK-2 lie la CCK ou la gastrine avec des affinités similaires et est préférentiellement exprimé au niveau du cerveau [342].



### Figure 19: Récepteur Cholécystokinine 2 (RCCK2)

En haut, représentation schématique du récepteur CCK2 humain avec sa séquence d'acide aminés. En bas, modèle moléculaire du RCCK2 avec la CCK4 dans la poche de liaison. Modèle du CCK2R, réalisé par notre équipe à partir de la structure de la rhodopsine et raffiné en intégrant les données expérimentales obtenues.

## B.1. Clonage et structure du RCCK2

Le récepteur de la gastrine fut identifié pour la première fois dans des cellules pariétales canines [343]. A l'époque, le récepteur de la CCK localisé dans le cerveau est considéré comme différent de celui de la gastrine, et ce n'est qu'après leurs clonages que les chercheurs réalisent qu'il s'agit d'un même et unique récepteur, le RCCK2 [344]. La séquence code une protéine de 453 acides aminés, présentant une homologie de 48% avec le RCCK1. Par ailleurs, cet ADNc contient sept segments hydrophobes, correspondant aux caractéristiques des récepteurs à 7 domaines transmembranaires [345]. L'ADNc du RCCK2 humain est cloné l'année suivante par criblage d'une banque d'ADNc de cerveau, l'ADNc du RCCK2 canin servant de sonde. C'est une protéine de 447 acides aminés, d'une masse moléculaire de 48 kiloDalton (Figure 19) [346].

### B.1.1. Caractéristiques structurales du RCCK2

La structure du RCCK2 possède une base structurale commune à tous les RCPG. La partie N-terminale du RCCK2 semble fortement impliquée dans l'expression membranaire du récepteur ; en effet une troncature du récepteur dans cette région provoque une perte d'un facteur 10 de l'expression membranaire du RCCK2 [347]. D'autre part, trois sites consensus de N-glycosylation sont présents sur cette région : Asn7, Asn30 et Asn36.

Comme chez d'autres RCPG, deux acides aminés cystéines formant un pont disulfure sont présentes sur les boucles extracellulaires 1 et 2 : Cys127 et Cys205. Lorsque ces cystéines sont mutées, l'expression membranaire du récepteur est abolie, vérifiant la nécessité d'une contrainte induite par le pont disulfure pour la conformation correcte du récepteur [348].

Semblable aux RCPG couplés à la protéine  $G\alpha_q$ , l'ICL3 du RCCK2 de rat contient la région basique conservée **XBBBXXB** : A332-**KKR**VV-**R338** [349]. Certains acides aminés aromatiques situés dans les hélices transmembranaires sont conservés dans les RCPG. C'est le cas du motif **Aro-X<sub>2</sub>-Pro-X<sub>7</sub>-Aro** (où Aro est un acide aminé aromatique, et X, tout autre acide aminé), retrouvé fréquemment dans le TM5, ou encore du motif **Aro-X<sub>3</sub>-Aro-X-Pro**, du TM6. Dans les RCCK2 de rat, le premier motif correspond à **F227-FIPGVVIAVA-Y238**, et le deuxième à : **F347-FLCWL-P353** [347].

Les motifs particuliers de la famille A des RCPG sont également retrouvés dans le RCCK2, comme le motif E/DRY à l'extrémité intracellulaire de l'hélice III : **E151-R-Y153**, et le motif **NPXXY** dans le domaine transmembranaire VII : **N391-PLV-Y395**. Les séquences de

RCCK2 de nombreuses espèces sont désormais connues : chien, rat, homme, souris, lapin, et vache. La comparaison des homologues inter-espèces du RCCK2 révèle un taux d'identité des amino-acides de 84 à 93% [328].

### **B.1.2. Les variants d'épissage**

Chez l'homme, le gène codant pour le RCCK2 est composé de cinq exons et quatre introns, et est localisé sur le chromosome 11, au niveau du locus p15,4. En 1995 un premier variant d'épissage est identifié et présente une extrémité N-terminale tronquée et débutant à la méthionine 67 du domaine transmembranaire I sans toutefois voir sa liaison à la CCK et gastrine affectée. Ce variant présente un exon, le 1b, localisé sur l'intron 1 qui se substitue à l'exon 1 présent sur le récepteur sauvage. Ce variant d'épissage est notamment exprimé dans la lignée cellulaire d'adénocarcinome gastrique humain (AGS)[350].

Un second variant du RCCK2 est alternativement épissé dans la région de l'exon 4, et donne deux ARNm différant par exclusion ou non de cinq acides aminés au niveau de ICL3 [351]. Aucune distinction, pharmacologique ou du signal, n'a été observée pour ces deux formes de 452 et 447 acides aminés [325].

En 2000, un troisième variant contenant 69 acides aminés supplémentaires dans l'ICL3, a été découvert dans des tumeurs colorectales humaines. Ce récepteur, nommé RCCK2i4sv (intron 4 containing splice variant), est identifié dans les tumeurs colorectales mais pas dans les tissus normaux adjacents, et dans les tumeurs pancréatiques humaines [352]. Il est aussi exprimé dans la métaplasie de Barrett, une situation connue pour être précurseur du cancer de l'œsophage. Le RCCK2i4sv induit des oscillations de calcium intracellulaire et augmente la prolifération cellulaire indépendamment de la présence de son ligand [353]. Ce récepteur est décrit comme étant constitutivement actif mais une étude non publiée de notre équipe indique des résultats divergents par rapport aux conclusions du groupe d'Hellmich. Encore plus récemment, une étude a remis en cause l'expression de ce variant. En effet, les auteurs rapportent que son expression est uniquement détectée dans les tumeurs gastrointestinales (GIST) et dans les cancers des poumons à petites cellules [354].

## B.2. Transduction du signal du RCCK2

Le récepteur CCK2 est un récepteur couplé aux protéines Gq qui est impliqué dans de nombreux processus physiologiques et physiopathologiques du fait de son action sur beaucoup de voies de transduction du signal ([Figure 20](#)).

### B.2.1. La voie de la phospholipase C

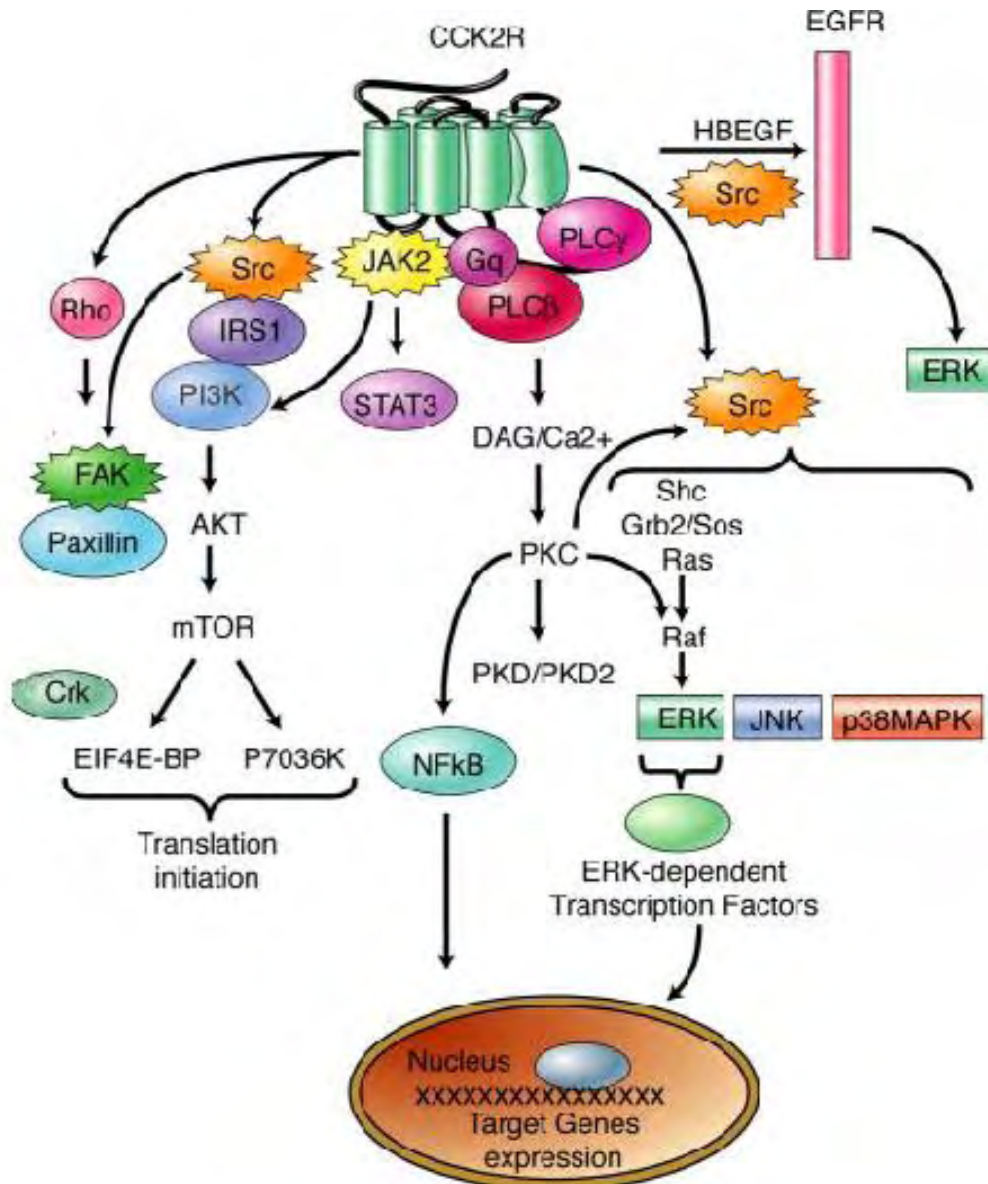
Le RCCK2 est couplé à la protéine G<sub>q/11</sub>, et l'activation du récepteur active la voie de la phospholipase C. L'activation du RCCK2 conduit à l'hydrolyse rapide des phosphatidyl inositol 4,5-biphosphates (PIP<sub>2</sub>) par la phospholipase C (PLC), générant ainsi des inositols triphosphates (IP<sub>3</sub>) et du diacylglycérol (DAG). Les isoformes de la PLC activées par le RCCK2 sont principalement la PLC $\beta$  et la PLC $\gamma$ 1 [330]. Le RCCK2 s'associe avec les domaines SH2 de la PLC $\gamma$ 1 via Y438 de l'extrémité C-terminale. [355]

Les IP<sub>3</sub> sont des messagers secondaires qui stimulent la libération de calcium dans le cytosol, en agissant sur des récepteurs aux IP<sub>3</sub> de la membrane du réticulum endoplasmique. Le DAG active différentes protéines kinase C (PKC) et en particulier les sous-types  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , et  $\eta$  de la PKC dans le cas du RCCK2 [325]. Les PKC sont elles-mêmes impliqués dans la signalisation des MAPKinase via Raf.

Enfin, le RCCK2 pourrait être associé à l'activation de la phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) [356].

### B.2.2. La voie des MAPKinases

Les MAPK sont des sérines/thréonines kinases qui regroupent les ERK1/2, c-jun NH<sub>2</sub>-terminal kinases (JNKs), ERK5, et p38MAPK. La cascade de phosphorylation Ras/Raf/ERK-kinases/ERK1/2 conduit à la régulation de la prolifération, la différenciation, la survie ou l'apoptose cellulaire, que ces kinases modulent en activant par phosphorylation des facteurs de transcription. Le complexe Grb2/Sos ou Shc/Grb2/Sos stimule cette cascade aboutissant à la phosphorylation des ERK1/2 après l'activation de Src et Shc par la gastrine via le RCCK2 [357]. Dans le cas du RCCK2 stimulé par la gastrine, l'activation des ERK1/2 conduit à la transcription d'un gène codant pour une protéine, TFF1, impliquée dans la réparation de l'épithélium [358].



### Figure 20: Représentation schématique de la signalisation du RCCK2

Le récepteur CCK2 stimulé, active un grand nombre d'effecteurs cellulaires appartenant à différentes voies de signalisation comme la voie PLC, MAP-Kinase ou encore PI3kinase. A ce jour, la contribution des  $\beta$ -arrestines dans la signalisation du RCCK2 n'est pas connue. (D'après *Dufresne, Seva & Fourmy, 2006*)

Dans les cellules épithéliales gastrointestinales, la transactivation du récepteur EGF via le RCCK2 peut être à l'origine de l'activation des ERK1/2. En effet, l'expression et la maturation du proHB-EGF dans ces cellules en réponse à la gastrine, entraîne la libération de HB-EGF. Ce peptide libéré par voie auto- et paracrine induit la phosphorylation de son récepteur (EGFR) et donc l'activation des voies en aval, dont celles des ERK1/2. Par ailleurs, le RCCK2 peut transactiver le récepteur à l'EGF via une voie de signalisation impliquant la famille des Src kinases [359, 360].

Une autre MAPK, la p38MAPK, est activée par le RCCK2 via un mécanisme impliquant la PKC, le calcium intracellulaire et Src, et joue un rôle central dans la prolifération induite par le RCCK2 [361].

A ce jour, la contribution des  $\beta$ -arrestines dans l'activation des MAPKinases par le récepteur CCK2 n'a pas été étudiée.

### **B.2.3. La voie de la phosphatidylinositol 3-kinase**

L'activation du RCCK2 conduit à la phosphorylation par Src d'une protéine adaptatrice IRS-1. Cette protéine IRS-1 via ses acides aminés tyrosines phosphorylés recrute et active la PI3kinase. La PI3kinase est constituée de deux sous-unités, la sous-unité catalytique p110 et la sous-unité régulatrice p85, et son activation aboutit à la synthèse de seconds messagers lipidiques, les D3-phosphoinositides. Ces seconds messagers se lient aux domaines PH de protéines cytosoliques comme Akt et permettent ainsi leur ancrage membranaire [357]. La voie Pi3-kinase/Akt est impliquée dans l'action proliférative, et anti-apoptotique ainsi que dans la régulation de l'adhésion et la migration cellulaire [325].

### **B.2.4. La voie JAK/STAT**

Les protéines JAK (pour Janus Kinase) sont une famille de tyrosines kinases comportant quatre membres : JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2. Les principaux substrats de ces protéines sont des facteurs de transcription formant la famille STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription). Les protéines JAK sont recrutées aux RCPG et s'activent par autophosphorylation. Les STAT sont phosphorylées par JAK, puis se dimérisent avant d'être transloquées dans le noyau où elles jouent leur rôle de facteur de transcription.

Au sein de notre équipe, des travaux récents ont mis en évidence l'implication du RCCK2 dans l'activation du tandem JAK2/STAT3. L'activation de STAT2 par le RCCK2

requiert le motif NPXXY dans le TM7 du récepteur [362, 363]. Lorsque le RCCK2 est stimulé par la Gastrine, l'activation de JAK2 et STAT3 conduit à la prolifération cellulaire dans les acini des souris *Elas-CCK2*.

La stimulation du RCCK2 active et module d'autres effecteurs qui ne seront pas détaillés ici mais parmi lesquels on peut citer, l'intégrine  $\beta 1$ , ou encore le facteur NF $\kappa$ B/I $\kappa$ B. La modulation de ces différents effecteurs est développée dans la revue de Dusfresne et collègues [325].

## **B.3 Implications physio-pathologiques du RCCK2**

### **B.3.1. Effets physiologiques dépendants du RCCK2**

La CCK et la Gastrine stimulent le récepteur CCK2 qui active un large éventail d'effets cellulaires et physiologiques. C'est le récepteur CCK2 qui transmet les effets de la Gastrine puisqu'il lie ce peptide avec une affinité 500 à 1000 fois supérieure au RCCK1. Ainsi, au niveau du tractus gastrointestinal, le récepteur CCK2 est impliqué dans la sécrétion d'acide gastrique, dans la prolifération, la différenciation et la maturation des glandes gastriques, la sécrétion de glucagon dans les îlots de Langerhans humains, et a certainement un rôle dans le développement pancréatique chez le fœtus.

Le RCCK2, est aussi impliqué dans la modulation de la prise alimentaire par la CCK présente au niveau du système nerveux central. Le RCCK2 est très exprimé au niveau des aires hypothalamiques qui sont un centre de régulation de la prise alimentaire. Cette hypothèse est étayée par l'augmentation de la prise alimentaire inhérente à l'administration d'antagonistes du RCCK2, ou à la délétion du gène du RCCK2 chez les souris [325, 364]. Le RCCK2 a été aussi impliqué dans la régulation de la nociception ; en effet il semble moduler négativement les effets de la morphine.

### **B.3.2. Le récepteur CCK2 et les pathologies associées**

#### **B.3.2.a Le récepteur CCK2 dans les cancers**

Dans le cas des cancers gastriques, la gastrine stimule la croissance tumorale par un mécanisme d'action autocrine dépendant du RCCK2 [325]. L'hypersécrétion de gastrine, ou



une infection par *Helicobacter pylori* peuvent entraîner une hyperacidité de l'estomac et la formation d'ulcères qui pourraient favoriser le développement de cancer de l'estomac.

L'adénocarcinome pancréatique est un cancer de très mauvais pronostic, du fait d'un diagnostic souvent tardif. La lignée cellulaire issue d'un carcinome pancréatique chimio-induit chez le rat exprime le RCCK2 en plus du RCCK1, et sa prolifération est stimulée par la gastrine. Par ailleurs, des lignées cellulaires issues de carcinomes humains expriment ce récepteur de manière endogène. Le modèle de souris transgéniques *ElasCCK2*, développé dans notre laboratoire, exprime le RCCK2 humain dans les acini pancréatiques, et présente des perturbations de l'homéostasie tissulaire en faisant qu'environ 15% de ces animaux développent un cancer du pancréas [365]. Une étude chez l'homme a montré l'expression du récepteur CCK2 chez la plupart des patients présentant un cancer pancréatique. Cette surexpression du CCK2 est également accompagnée de la surexpression de gastrine, ce qui suggère l'existence potentielle d'une boucle autocrine *in vivo* [366].

L'expression du variant d'épissage *RCCK2i4sv* pourrait être associée au développement du cancer du pancréas, car il est retrouvé exprimé dans le tissu pancréatique cancéreux alors qu'il est absent dans le tissu sain adjacent [352].

Dans le cas des tumeurs coliques, les formes précurseurs de la gastrine ont été impliquées dans leur développement mais leur rôle précis et les mécanismes moléculaires responsables de leurs actions, en particulier la présence d'un récepteur spécifique de ces précurseurs différents du RCCK2, font toujours débat au sein de la communauté scientifique [353]. D'autre part, le mutant V286F du RCCK2, aussi découvert chez un patient atteint d'une tumeur colique, est, à ce jour, inactif [367].

La présence du RCCK2 a été observée dans les cancers du poumon à petites cellules, le cancer ovarien, les carcinomes thyroïdiens médullaires, les GIST (gastro intestinale tumor), et d'autres tumeurs neuroendocrines [325]. La surexpression du RCCK2 dans ces tumeurs neuroendocrines est une caractéristique de ces tumeurs qui peut être exploitée dans le ciblage de ses tumeurs par des nanoparticules vectorisées avec la CCK/Gastrine ou des analogues de la CCK/gastrine radiomarqués.

### **B.3.2.b Le récepteur CCK2 dans les pathologies du système nerveux**

Les effets d'attaques de panique ou d'anxiété à la suite de l'administration respectivement de CCK<sub>4</sub> ou de pentagastrine, sont induits par l'action de ces peptides sur le RCCK2. Il a été rapporté une corrélation entre attaques de panique et polymorphisme du gène du RCCK2 chez l'homme. En effet, un polymorphisme concernant un simple nucléotide de la région codant pour le RCCK2, ainsi qu'un polymorphisme de répétition de

CT de la région régulatrice 5' du RCCK2 sont associés à des patients atteints d'attaques de panique [368].

La CCK endogène contribue au développement et à l'expression d'une tolérance antinociceptive lors de traitements chroniques de morphine. La CCK présente une forte activité anti-opioïde dans la modulation de la douleur et des souris invalidées pour le gène du RCCK2. L'utilisation d'antagonistes sélectifs du RCCK2 permettrait de bloquer le développement de la tolérance à la morphine, et potentialiserait l'analgésie induite par la morphine [369].

La dépression pourrait être associée à une hyperactivité du système RCCK2. Le RCCK2 jouerait également un rôle dans le développement de l'attention et de la vigilance [328].

## **C] Mécanismes d'activation du RCCK2**

Notre équipe travaille depuis plusieurs années sur la caractérisation pharmacologique et structurale du RCCK2. Des études se sont notamment focalisées sur le site de liaison de la CCK et de la Gastrine sur le RCCK2 ainsi que sur les mécanismes moléculaires conduisant à l'activation de la phospholipase C.

### **C.1. Acides aminés impliqués dans le site de liaison du RCCK2**

Tous les acides aminés cités dans cette partie ont été obtenus avec la CCK mais des résultats non publiés de notre équipe montrent que la Gastrine présenterait un site de liaison quasi-identique à celui de la CCK au sein du RCCK2. Ces acides aminés ont été identifiés grâce à des approches combinant de la mutagenèse dirigée, l'utilisation de peptides chimiquement modifiés et de la modélisation moléculaire.

#### **C.1.1. Au niveau des boucles extracellulaires**

**ECL1** : Chez le rat, la mutation de la phénylalanine 120, présente dans l'ECL1, provoque une baisse de l'affinité du récepteur pour la CCK [348]. La mutation de la Phe120 ne semble

pas être aussi cruciale pour l'affinité du RCCK2 humain, puisque l'affinité du récepteur humain pour la CCK est seulement quatre fois plus faible que le RCCK2 sauvage [370].

**ECL2** : Des études sur des récepteurs de rat chimériques ont permis l'identification d'une séquence de cinq acides aminés situés dans l'ECL2, critiques pour la liaison de la gastrine [371]. L'histidine 207 du RCCK2 de rat serait déterminante pour la liaison avec la CCK puisqu'elle interagirait avec l'asparagine de la CCK [348] [372]. La contribution de cette His207 chez le RCCK2 humain est cependant beaucoup plus modeste. En effet, la diminution de l'affinité est de 25 fois chez l'homme contre 456 chez le rat [370].

Ces résultats indiquent que la contribution des acides aminés situés dans les boucles extracellulaires est plus importante chez le récepteur de rat que chez le récepteur humain, suggérant que les acides aminés impliqués dans la liaison de haute affinité du récepteur humain sont localisés plus profondément au niveau des domaines transmembranaires.

### **C.1.2. Au niveau des domaines transmembranaires**

**TM1** : L'implication de l'arginine 57 située dans le TM1 dans la liaison de la CCK au RCCK2 de rat, a été mise en évidence à la suite de l'implication d'un acide aminé équivalent dans le récepteur CCK1. Cette arginine interagirait avec la partie N-terminale de la CCK [348]. Cependant, la même mutation dans le RCCK2 humain diminue aussi l'affinité avec un effet plus modeste [370].

**TM4-6** : Deux acides aminés appartenant au TM4 et TM6 ont été identifiés grâce à un modèle moléculaire du RCCK2 basé sur celui de la rhodopsine inactive. Des expériences de mutagenèse dirigée et de liaison ont permis de vérifier l'implication de ces deux acides aminés, la tyrosine 189 et l'asparagine 358, dans la liaison de la CCK au RCCK2 de rat. La tyrosine 189 du TM4 interagirait avec l'amide C-terminale de la CCK via son groupement hydroxyle. L'asparagine 358 du TM6 interagit directement avec le groupe NH<sub>2</sub> carboxyterminale du ligand [373].

Chez le récepteur CCK2 humain, l'asparagine 353 est l'équivalent de l'asp358 du rat, et montre une perte d'affinité lorsqu'elle est mutée, semblable à la perte enregistrée avec la mutation de l'asp358 du rat. A l'inverse, la mutation de la tyrosine 189 affecte moins l'affinité du RCCK2 humain pour la CCK que sur le RCCK2 de rat [370].

**TM6** : L'arginine 356 localisée en haut du TM6 a été impliquée dans la liaison de la CCK au RCCK2. Cette arginine correspond à l'arginine 336 du RCCK1 qui a été elle-même impliquée

dans la liaison de la CCK à ce récepteur. Des expériences de mutagenèse dirigée ont permis d'établir que la charge positive de l'arginine est cruciale pour la liaison de haute affinité de la CCK au RCCK2 [370].

**TM7** : L'histidine 376 située dans le TM7 du RCCK2 humain, est impliquée dans la liaison de la CCK puisque la substitution de la charge positive de cette histidine par une leucine non chargée provoque une diminution de l'affinité de la CCK de trente fois. Chez le rat, la mutation du acide aminé équivalent n'affecte pas l'affinité de la CCK pour le RCCK2 [374, 375].

Tous les acides aminés cités ici, sont impliqués dans le site de liaison de la CCK au RCCK2. Cependant, notre équipe a démontré que les sites de liaisons des ligands non peptidiques du RCCK2 mentionnés antérieurement dans ce chapitre recouvrent en grande partie celui de la CCK [376, 377].

## **C.2. Acides aminés et changements conformationnels impliqués dans l'activation du RCCK2**

Une étude récente de notre équipe propose un mécanisme moléculaire d'activation du RCCK2 lors de la stimulation de la voie phospholipase C par la protéine G<sub>q</sub>. Cette étude se distingue par l'intégration de deux approches complémentaires à savoir la modélisation moléculaire et les expériences pharmacologiques. L'étude compare les modèles moléculaires du RCCK2 dans un état inactif et dans un état actif et retrace grâce à une technique de simulation dynamique moléculaire, les différents changements conformationnels par lesquels le récepteur transite avant d'être stabilisé dans un état actif ou inactif. Ces modèles moléculaires ont permis de mettre en évidence des acides aminés impliqués dans la stabilisation de l'état inactif et d'autres impliqués à l'inverse dans la stabilisation de l'état actif. Le rôle de ces acides aminés a été vérifié par mutagenèse dirigée [35].

*Comparaison des modèles moléculaires et changements conformationnels lors de l'activation.* Afin de comparer les deux modèles inactif et actif du RCCK2, il a d'abord fallu élaborer l'un puis l'autre des modèles. Le modèle du RCCK2 inactif a été élaboré sur la base de la structure du cristal de la rhodopsine inactive. Le complexe RCCK2 : CCK a été conçu sur le modèle du récepteur inactif, afin d'obtenir une conformation active, mais vide. Le

modèle actif intègre différentes données connues sur l'activation des RCPG, comme la rotation du Trp 346 du TM6 lors de l'activation ou de données plus spécifiques du RCCK2, comme les interactions entre les acides aminés impliqués dans le site de liaison de la CCK.

La comparaison des deux modèles représentant l'état inactif et l'état actif permet de mettre en évidence des modifications de la structure globale du récepteur lors de l'activation. L'un des changements majeurs est la rotation de l'hélice transmembranaire 6 dans le sens des aiguilles d'une montre provoquant le rapprochement de l'extrémité extracellulaire du TM6 vers l'hélice transmembranaire 3. Les mouvements de l'hélice 6 sont coordonnés avec ceux de l'hélice 5 et de la partie haute extracellulaire de l'hélice 7, lors de l'activation. Les distances relatives entre les hélices sont modifiées lors de l'activation du RCCK2 et ceci perturbe les réseaux d'interaction stabilisés dans les états extrêmes du récepteur (inactif-actif), particulièrement le réseau d'acides aminés aromatiques entourant le Trp 346 conservé de l'hélice 6.

*Identification d'acides aminés impliqués dans la stabilisation de l'état inactif ou actif.*

La comparaison des modèles moléculaires dans un état inactif ou actif a permis de dégager un certain nombre d'acides aminés potentiellement impliqués dans la stabilisation de l'un ou l'autre de ces deux états. Ces acides aminés ont donc été mutés en alanine puis étudiés d'un point de vue pharmacologique. Cette étude révèle que les acides aminés Met134, Val138, Met186, Leu222, Leu223, Phe227, Trp346 sont impliqués dans la stabilisation de l'état inactif. En effet, la substitution de chacun de ces acides aminés par une alanine conduit à un mutant du RCCK2 présentant une activité basale constitutive augmentée. A l'inverse, les acides aminés Tyr189, Phe342, Tyr350 et Asn353 sont plutôt impliqués dans la stabilisation de l'état actif puisque leur mutation en alanine aboutit à des mutants du RCCK2 dont l'activité basale est significativement réduite.

La liaison de la CCK au RCCK2 en conformation active a été analysée pour déterminer le devenir des interactions d'acides aminés impliqués dans le maintien de la conformation active vide (sans CCK). Par exemple, il a été démontré que l'Asn353 interagit directement avec la CCK alors qu'en absence de CCK, l'Asn353 interagit avec la Tyr189 pour stabiliser la conformation active du RCCK2 vide. Lors de la liaison de la CCK, le pont établi entre Asn353 et la Tyr189 est rompu, ce qui conduit à la formation de liaisons hydrogènes entre ces chaînes latérales et le groupement amide de la CCK. Les autres acides aminés tels que le Trp346, Leu222, Leu223 ou Ph227 qui stabilisent la conformation inactive du récepteur, ne semblent pas être en contact direct avec la CCK, leurs chaînes latérales pointant vers l'extérieur de la poche de liaison du récepteur [35].

### **C.3. Modulation de l'activité du RCCK2**

L'activation du RCCK2 résultant de la liaison de la CCK ou de la Gastrine, aboutit à l'activation de multiples voies de signalisation intracellulaire. Cependant, comme pour les autres RCPG, l'activité de ce récepteur peut être modulée par différents facteurs tels que l'internalisation, la dimérisation ou encore l'action de protéines régulatrices comme les RGS. Il existe peu de données disponibles concernant ces phénomènes pour le RCCK2, mais nous discuterons celles-ci dans cette partie.

#### **C.3.1. L'internalisation du RCCK2**

Il existe une seule étude de Pohl et collègues datant de 1997 sur l'internalisation du récepteur CCK2. Cet article présente des données quantitatives sur l'internalisation du récepteur CCK2 sauvage, d'un récepteur CCK2 délété de son extrémité C-terminale, et d'un récepteur CCK2 possédant toutes les sérines-thréonines de l'extrémité C-terminale mutées en alanine. Les informations importantes de cet article indiquent que le RCCK2 s'internalise rapidement en réponse à une stimulation par la CCK (92% des récepteurs), le C-terminal du RCCK2 semblant jouer un rôle très important puisque la troncature de celui-ci fait chuter le taux des récepteurs internalisés à 26%. Enfin l'absence de phosphorylation des sérines-thréonines provoque également une diminution du taux de RCCK2 internalisés (39%)[378].

Les conclusions de cet article et les connaissances actuelles en matière d'internalisation des RCPG laissent penser que l'internalisation du RCCK2 se fait probablement par l'intermédiaire d'un mécanisme dépendant des  $\beta$ -arrestines. Il est important de noter que le récepteur CCK2 tronqué de son extrémité C-terminale est toujours capable de s'internaliser (26%) ce qui suggère qu'un mécanisme alternatif est potentiellement présent pour assurer l'internalisation du récepteur tronqué.

#### **C.3.2 Dimérisation du RCCK2**

Un seul article fait état de la dimérisation du récepteur CCK2. Le récepteur pourrait s'homodimériser et aussi s'hétérodimériser avec le récepteur CCK1. Cette étude utilise une approche de mesure de distance relative entre les deux récepteurs au moyen de la technique de B.R.E.T dans un système transfecté de manière transitoire. Il est rapporté que le dimère RCCK1-RCCK2 provoque une activation augmentée des voies de signalisation

ainsi qu'une internalisation retardée. Une conséquence de cette potentialisation de l'activation du CCK2 est l'effet prolifératif significativement augmenté par la co-expression des récepteurs CCK1 et CCK2 [379].

Il faut cependant émettre des réserves puisqu'il s'agit d'un système in-vitro où les récepteurs sont surexprimés et, qu'à ce jour, il n'existe aucune preuve de cette hétérodimérisation in-vivo ou dans des lignées cellulaires exprimant de manière endogène les deux récepteurs.

### C.3.3. Interaction du RCCK2 avec RGS

Un travail récent de notre groupe s'est intéressé à la régulation du signal dépendant de la protéine  $G_q$  du RCCK2. Cette étude révèle que l'activité de la phospholipase C stimulée par le RCCK2 est modulée par la RGS2 et RSG4 alors qu'elle est insensible à la RSG8. Le signal phospholipase C est d'ailleurs plus affecté par la RGS2 que par la RSG4. En combinant des approches fonctionnelles, biochimiques et de modélisation moléculaire, ce travail met en évidence une interaction directe entre RGS2 et l'extrémité C-terminale du RCCK2 activé. Les acides aminés Ser 434 et Thr439 de l'extrémité C-terminale du RCCK2 sont particulièrement mis en cause dans l'interaction avec les acides aminés Lys62, Lys63 et Gln67 du domaine N-terminale de la RGS2. Ce travail met en évidence la double reconnaissance des RGS vis-à-vis des protéines G mais aussi du RCPG. En effet, le RCCK2 lie préférentiellement la RGS2 alors que RGS2 et RGS4 sont des RGS qui reconnaissent la protéine  $G_q$  avec une même affinité [380].

*Les différentes données exposées dans ce chapitre, présentent le récepteur CCK2 comme une cible thérapeutique potentielle dans de nombreuses pathologies. Les données connues à ce jour rapportent que les effets physiologiques et pathologiques de ce récepteur passent par l'activation de voies de signalisations cellulaires dépendant de la protéine  $G_q$ . Au vu des connaissances actuelles sur le rôle important des  $\beta$ -arrestines et de l'internalisation dans la signalisation des RCPG, il apparaît maintenant crucial d'étudier ces aspects sur le récepteur CCK2. Une bonne compréhension de l'ensemble de la pharmacologie du récepteur CCK2 permettra d'envisager une optimisation du développement rationnel de ligands synthétiques à visée thérapeutique ou diagnostique et pourrait constituer une preuve de concept pour l'ensemble des RCPG.*





# *Résultats*

## *Expérimentaux*





# **Article I**

**REGULATION OF MEMBRANE CCK-2 RECEPTOR  
BY AGONISTS LEADS TO CLASSIFY PARTIAL  
AGONISTS AS BIASED AGONISTS**

**(Accepté dans JBC, publication prévue pour février 2011)**



## IV. Introduction de l'article I

La présence d'un RCPG à la membrane est fortement régulée, à la fois de manière transitoire mais aussi sur des durées de temps plus longues. Cette régulation membranaire est cruciale pour l'homéostasie du signal des RCPG. Cette homéostasie est perturbée lors de conditions pathologiques et peut être fortement modifiée par des traitements aigus ou chroniques de médicaments. L'internalisation des RCPG induite par leurs agonistes est un mécanisme important qui contribue fortement à cette régulation. L'internalisation des RCPG se fait selon des voies dépendantes ou indépendantes des  $\beta$ -arrestines et de la clathrine. Pour beaucoup de RCPG, l'internalisation est initiée après la désensibilisation des récepteurs par un mécanisme dépendant des GRK et des  $\beta$ -arrestines. Une fois internalisé, le RCPG peut être recyclé rapidement à la membrane, être recyclé lentement ou être dégradé dans les lysosomes.

Des études récentes ont montré que les  $\beta$ -arrestines ont un rôle dans la transduction du signal en plus de leur rôle conventionnel dans la désensibilisation. Ces protéines agissent comme des protéines d'échafaudage pour recruter et favoriser l'activation de nombreuses protéines de la signalisation ce qui aboutit à la modulation de différentes fonctions physiologiques. Les voies de signalisation dépendantes des  $\beta$ -arrestines peuvent être sélectivement activées grâce à des ligands de RCPG dit « biaisés » qui favorisent la stabilisation d'un état conformationnel du RCPG activant ces voies. D'une manière générale, les ligands biaisés sont capables d'activer spécifiquement les voies de signalisation dépendantes des protéines G ou des  $\beta$ -arrestines.

Le récepteur CCK2 fait partie de la famille A des RCPG incluant la Rhodopsine. Ce récepteur lie avec une affinité similaire deux neuropeptides, la cholécystokinine et la gastrine. Ces deux hormones et le récepteur CCK2 sont les sujets d'étude de notre laboratoire depuis plusieurs années. Le RCCK2 est un acteur important dans la régulation des fonctions digestives ainsi que des fonctions centrales dans le cerveau. Le RCCK2 est également impliqué dans des pathologies multiples et plus particulièrement dans les cancers. Il est notamment surexprimé dans de nombreuses tumeurs neuroendocrines.

L'implication du RCCK2 dans des pathologies humaines a conduit différents laboratoires pharmaceutiques à développer des antagonistes de ce récepteur. Certains de ces antagonistes ont fait ou font encore l'objet de développement clinique pour des pathologies comme les troubles du sommeil ou de la sécrétion gastrique. Cependant, des molécules de références caractérisées comme antagonistes possèdent une activité agoniste dans l'estomac et sur des cellules exprimant le RCCK2.

Précédemment, notre équipe a étudié le mécanisme d'activation moléculaire du récepteur CCK2 pour les voies dépendantes de la protéine  $G_q$  ainsi que la régulation de ces voies par des ligands non peptidiques. D'autre part, notre équipe a également montré que le signal issu de la protéine  $G_q$  est régulé par la RSG2 qui interagit directement sur l'extrémité C-terminale du récepteur. L'extrémité C-terminale du RCCK2 serait aussi fortement impliquée dans l'internalisation de ce récepteur.

Cependant, il existe peu de données sur les mécanismes précis de l'internalisation du RCCK2. Considérant les connaissances actuelles sur l'internalisation des RCPG et son impact sur leur signalisation via les  $\beta$ -arrestines, il nous est apparu crucial d'étudier les mécanismes de l'internalisation du RCCK2. Nous avons également caractérisé plusieurs molécules, décrites comme agonistes partiels et agonistes inverses sur l'activation de la protéine  $G_q$ , sur le comportement du récepteur, vis-à-vis de l'internalisation.

Notre modèle cellulaire d'étude est une lignée cellulaire HEK 293, qui est un modèle cellulaire de référence pour l'étude de l'internalisation de RCPG. De plus, cette lignée présente l'avantage d'être facilement transfectable et présente un très bon niveau d'expression de la protéine recombinante. Notre stratégie est basée sur une approche qualitative avec la microscopie confocale qui est complétée par une approche quantitative de cytométrie en flux et de B.R.E.T (Bioluminescence Resonance Energy Transfer). L'analyse du spectre pharmacologique des ligands non peptidiques présentée dans cet article s'est faite en tirant partie des précédentes études sur ces molécules au sein de notre laboratoire.

## REGULATION OF MEMBRANE CHOLECYSTOKININ-2 RECEPTOR BY AGONISTS LEADS TO CLASSIFY PARTIAL AGONISTS AS BIASED AGONISTS

Rémi Magnan, Bernard Masri, Chantal Escrieut, Magali Foucaud, Pierre Cordelier and Daniel Fourmy

INSERM, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unit 858, Institut Fédératif de Recherche, Toulouse, France ; Université de Toulouse 3, Toulouse, France

Running head: human cholecystokinin receptor-2 internalization

Correspondence address: Daniel Fourmy, Inserm U858-I2MR, 1 avenue Jean Poulhès, BP 84225, Unité 858, 31432 Toulouse cedex 4. Email: Daniel.Fourmy@inserm.fr

Given the importance of G-protein-coupled receptors (GPCRs) as pharmacological targets in medicine, efforts directed at understanding the molecular mechanism by which pharmacological compounds regulate their presence at the cell surface is of paramount importance. In this context, using confocal microscopy and Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET), we have investigated internalization and intracellular trafficking of the Cholecystokinin-2 receptor (CCK2R) in response to both natural and synthetic ligands with different pharmacological features. We found that CCK and gastrin which are full agonist on CCK2R-induced inositol phosphate production, stimulate rapidly and abundantly internalization. Internalized CCK2R did not rapidly recycle to plasma membrane but instead was directed to late endosomes/lysosomes. CCK2R endocytosis involves clathrin-coated pits and dynamin, and high affinity and prolonged binding of  $\beta$ -arrestin1 or 2. Partial agonists and antagonists on CCK2R-induced inositol phosphate formation and Extracellular signal-Regulated kinase 1/2 (ERK1/2) phosphorylation did not stimulate CCK2R-internalization nor  $\beta$ -arrestin recruitment to the CCK2R but blocked full-agonist induced internalization and  $\beta$ -arrestin

recruitment. The extreme C-terminal region of the CCK2R and more precisely phosphorylatable residues Ser437-X-Thr-Thr-X-Ser-Thr443 were critical for  $\beta$ -arrestin recruitment. However, this region and  $\beta$ -arrestins were dispensable for CCK2R internalization. In conclusion, this study allowed us to classify the human CCK2R as a member of class B GPCRs with regards to its endocytosis features and identified biased agonists of the CCK2R. These new important insights will allow us to investigate the role of internalized [CCK2R. $\beta$ -arrestin] complexes in cancers expressing this receptor, and to develop new diagnosis and therapeutic strategies targeting this receptor.

As a general hallmark, GPCRs are tightly regulated at the cell surface both acutely and over a long time period. This regulation is thought to be critical to the physiological homeostasis of GPCR signalling which can be disrupted in pathological states and is strongly affected by acute or repeated administration of clinically relevant drugs. Ligand-induced endocytosis is a general and important mechanism contributing to such GPCR regulation (1). For many GPCRs, the initial step of ligand induced internalization also named “desensitization”, involves receptor phosphorylation by GPCRs kinases (GRK) that

selectively phosphorylate agonist-activated receptors. Phosphorylation of the receptor and subsequent binding of nonvisual arrestins prevent subsequent interaction of receptors with G-proteins thus terminating the G-protein-mediated signal. Arrestin-bound receptors are rapidly targeted to the clathrin-coated pits, thereby promoting internalization of receptors (1-4). Alternative mechanisms to those involving recruitment of  $\beta$ -arrestin adaptator and receptor targeting to clathrin-coated pits have been shown to govern internalization of some GPCRs (4,5). Following internalization, receptors may be sorted to different vesicular traffic routes such as, for example, rapid recycling to the cell plasma membrane or slow recycling and degradation into lysosomes. Recently, it has been recognized that in addition to its role in down-regulation of G-protein mediated signal and cell responsiveness, internalization through  $\beta$ -arrestin recruitment represents a means for GPCRs to trigger signalling pathways independently of G-protein coupling (6,7). Importantly, pharmacological agents, named “biased ligands” or “functionally selective ligands”, have been discovered, which activate differentially G-protein dependent and arrestin-dependent signalling pathways (8).

The Cholecystokinin-2 receptor (CCK2R), previously named CCKB/gastrin receptor, belongs to family I of GPCRs which includes rhodopsin (9-11). Its natural ligands are cholecystokinin and gastrin, two structurally related neuropeptides, which bind the CCK2R with the same high affinity. The CCK2R is expressed in the central nervous system and in the gut where it represents the predominant CCK receptor subtype. The CCK2R mediates a

wide spectrum of agonist-induced biological effects including anxiety, pain perception, gastric acid secretion, growth and differentiation of the gastric mucosa (10,12). Activation of wild-type CCK2R and/or expression of a constitutively active variant may contribute to human diseases (10). These findings have stimulated interest in the identification of antagonists of CCK2R. To date, a large panel of chemically distinct CCK2R antagonists have been discovered and used to assess the functions mediated by CCK2R in animals and humans (13). Furthermore, several of these compounds have reached clinical evaluation stages for indications such as anxiety and panic disorders, sleep disorders, drug dependence, pain, gastro-oesophagus reflux and gastric secretion disorders (13). However, some reference molecules believed to be pure antagonists turned out to be endowed with some agonist activity in the stomach and pancreas as well as cells expressing CCK1R or CCK2R (14).

In previous works, we investigated the intrinsic activation mechanism of the CCK2R and the regulation of this activity by different ligands (15-17). This led us to understand how two structurally close non peptide ligands display opposite activities (partial agonist and inverse agonist) (16). Moreover, we delineated the role and mechanism of action of Regulators of G protein Signaling-2 (RGS-2) in CCK2R-induced inositol phosphate production (17). However, the mechanism and consequences of CCK2R regulation at the cell surface by its natural ligands or by synthetic ligands is not precisely known so far (18,19).

In this current study, given the importance of cell surface regulation of GPCR by



pharmacological agents, we investigated the mechanisms whereby the CCK2R is regulated after stimulation by its natural agonist ligand CCK or after exposure to several synthetic ligands displaying distinct pharmacological activity with respect to CCK2R-mediated production of inositol phosphates. Results from this study led us to classify the CCK2R as a member of class B GPCR with respect to its endocytosis features. Furthermore, this study led to identification of biased agonists which are partial agonist on CCK2R-induced inositol phosphate production and antagonists on  $\beta$ -arrestins recruitment and subsequent receptor endocytosis. The C-terminal region of the CCK2R and more precisely phosphorylatable motif Ser437-X438-Thr439-Thr440-X441-Ser442-Thr443 were identified as critical determinants for  $\beta$ -arrestin recruitment. However, this motif and  $\beta$ -arrestins were dispensable for CCK2R internalization. By providing new important insights into the regulation mechanism of the CCK2R by natural agonists and pharmacological agents, this study represents a solid basis to investigate the contribution of internalized [CCK2R. $\beta$ -arrestin] complexes to CCK2R-induced intracellular signalling in cancer cells which endogenously express this receptor. It will also allow us to develop new diagnosis and therapeutic strategies based on the targeting of the CCK2R.

### Experimental procedures

*Materials*- Sulfated [Thr28,Nle31]-CCK 25-33 and [Leu15]-sulfated gastrin 1-17 were synthesized as described previously (20) and

are referred to as CCK and gastrin.  $^{125}$ I-Sodium (2000 Ci/mmol) and [myo-3H]inositol (5  $\mu$ Ci/ml) were from GE Healthcare (Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). CCK was conjugated with Bolton-Hunter reagent, purified, and radioiodinated as described previously (21) and is referred to as  $^{125}$ I-CCK. Alexa Fluor 647 labeled-CCK was obtained according to the procedure described recently for Glucose Insulinotropic Polypeptide and was referred to as Alexa F 647-CCK (22).

The following synthetic ligands of the CCK2R, PD135,158 (23), JB93,182 and JB93,242 were used (24). A specific inhibitor of dynamin, dynasore (Calbiochem), an inhibitor of clathrin dependent uptake, chlorpromazine (Sigma-Aldrich) and an inhibitor of recycling, monensin (Sigma-Aldrich) were also used.

The cDNAs encoding CCK2R, green fluorescent protein (GFP) tagged CCK2R and *Renilla* luciferase (Rluc) fused CCK2R were generated by subcloning respectively the CCK2R cDNA in pcDNA5/FTR (Invitrogen), pEGFP-N1 (BD biosciences clontech), pRluc-N1(h) (Perkin Elmer). DsRed tagged Rab5, DsRed tagged Rab11 and DsRed tagged Rab7 were obtained from Addgene ([www.addgene.org](http://www.addgene.org)). Green fluorescent protein (GFP) tagged  $\beta$ -arrestin1, yellow fluorescent protein (YFP) tagged  $\beta$ -arrestin1 and yellow fluorescent protein (YFP) tagged  $\beta$ -arrestin2 were generous gifts from Marc Caron (Duke University Medical Center, Durham, USA). Green fluorescent protein (GFP) tagged  $\beta$ -arrestin2, kindly given by Robert Lefkowitz (Duke University Medical Center, Durham, USA), was subsequently subcloned in pcDNA5/FRT. All mutant receptor cDNAs

and the two green fluorescent protein (GFP) tagged dominant negative V53D- $\beta$ -arrestin1 and V54D- $\beta$ -arrestin2 were constructed by oligonucleotide-directed mutagenesis (Quik

Change™ site-directed mutagenesis kit, Stratagene, France) using human CCK2R cDNAs cloned in the pcDNA5/FRT vector and green fluorescent protein tagged  $\beta$ -arrestin1 and  $\beta$ -arrestin2 as templates respectively.

*Cell lines*- HEK 293 cells stably expressing the CCK2R (Flp-In™ CCK2R-293) and  $\beta$ -arrestin2-GFP (Flp-In™  $\beta$ -arrestin2-GFP-293) were obtained using the Flp-In™ system (Invitrogen). Flp-In™ 293 cells containing a FRT (Flp Recombination Target) in their genome were purchased from Invitrogen and cotransfected with pcDNA5/FRT vector carrying CCK2R or  $\beta$ -arrestin2-GFP and the Flp recombinase expression vector pOG44 that mediates integration of the CCK2R-pcDNA5/FRT vector into the genome via Flp Recombination Target (FRT) sites. Cells that acquired the CCK2R-pcDNA5/FRT vector or  $\beta$ -arrestin2-GFP-pcDNA5/FRT vector were selected using hygromycin B (100 $\mu$ g/ml, Sigma). MEF cells, wild type and double knock-out for  $\beta$ -arrestins were generous gifts from Robert Lefkowitz (Duke University Medical Center, Durham). Flp-In™ 293 cells, HEK 293 T cells, MEF cells, Flp-In™  $\beta$ -arrestin2-GFP-293 and Flp-In™ CCK2R-293 cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's medium supplemented with 10% of FBS, in a humidified atmosphere at 95% air and 5% CO<sub>2</sub>.

*Generation of MEF cells expressing the CCK2R*- Replication defective, self-inactivating lentiviral vectors were generated in

a BSL-3 facility (BiviC core vector production, IFR 150, Toulouse, France) through transient transfection of HEK 293FT cells with packaging and lentiviral vector plasmids using polyethylenimine (PEI). Lentiviral vectors were concentrated by centrifugation using Vivaspin columns and stored at -80°C. All batches were checked to be replicative virus-free. The viral titers were determined on HT1080 cells and expressed in transduction unit per ml (TU/ml). In addition, vector concentrations were quantified by p24 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Innotest, Ingen, Paris). To generate MEF cells expressing the CCK2R, cells were incubated with the lentiviral vectors (Multiplicity Of Infection = 1) for 24 hours and subsequently selected with Zeocin® (Invivogen, Toulouse, France) at 25  $\mu$ g/ml for 2 weeks. Efficiency of viral transduction and selection was estimated by measuring the percentage of cells expressing GFP by flow cytometry analysis. Expression of CCK2R was assessed by binding Alexa F 647-CCK.

*Phospho-ERK and  $\beta$ -arrestin immunoblots*- Cells were washed with ice-cold buffer A (50 mM Hepes, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 100 mM NaF, 2 mM orthovanadate, pH 7.5) and homogenized in 200  $\mu$ l of lysis buffer (buffer A containing 1% Triton X-100, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 20  $\mu$ M leupeptin, 100 IU/ml Trasylol) for 15 min at 4°C. The solutes were clarified by centrifugation at 12,000  $\times$  g for 10 min at 4°C. The samples were then washed twice with 30 mM Hepes buffer, pH 7.5, containing 30 mM NaCl and 0.1% Triton X-100, resuspended in SDS sample buffer, and boiled for 5 min. Whole cell lysates

were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Proteins were transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Immobilon, Millipore). Membranes were blocked with saline buffer (1 mM Tris, 14 mM NaCl, pH 7.4) containing 5% nonfat dried milk and incubated overnight with the phospho-ERK1/2 antibody (1:500, Cell signaling, ref. 9106) or  $\beta$ -arrestin antibody (1:300, BD bioscience, ref 610550). Membranes were washed three times with saline buffer containing 5% nonfat dried milk and incubated with secondary antibody anti-mouse (1:5000e) for 3 hours at room temperature. Membranes were washed three times with saline buffer containing 5% nonfat dried milk and incubated with a chemoluminescence HRP western blotting kit substrate (SuperSignal West Pico Substrate, Pierce, ref 34079) for 5 minutes before the membrane was unveiled.

*Receptor binding assay*- Cells were plated onto 10-cm culture dishes and grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% FBS in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37 °C. After overnight incubation, cells were transfected with 1  $\mu$ g/plate (excepted when mentioned) of pcDNA5/FRT, pEGFP-N1 and pRluc-N1 (h) vectors containing the cDNA for the wild-type or mutated CCK2Rs using a Fugene® 6 transfection reagent (Roche). Cells were transferred to 24-well plates 24 hours after transfection. HEK 293 cells stably expressing CCK2R (Flp-In<sup>TM</sup>CCK2R-293) were directly plated onto 24-well plates. Approximately 24 hours after transfer to 24-well plates, binding assays were performed using <sup>125</sup>I-CCK according to the protocol previously described in detail (16). Receptor density (B<sub>max</sub>) and *K<sub>d</sub>*

were calculated from homologous <sup>125</sup>I-CCK competition binding experiments using Ligand software (Kell, Cambridge, UK). *K<sub>i</sub>* for competitors were calculated using the non-linear curve fitting software GraphPad Prism (San Diego, CA)

*Inositol Phosphate Production Assay*- Cells were plated onto 10-cm culture dishes and grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% FBS in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37 °C. After overnight incubation, cells were transfected with 1  $\mu$ g/plate (excepted when mentioned) of pcDNA5/FRT, pEGFP-N1 and pRluc-N1(h) vectors containing the cDNA for the wild-type, mutated CCK2 receptors or  $\beta$ -arrestin1 and  $\beta$ -arrestin2 using a Fugene® 6 transfection reagent (Roche). Cells were transferred to 24-well plates 24 hours after transfection. HEK 293 cells stably expressing CCK2R (Flp-In<sup>TM</sup>CCK2R-293) were directly plated onto 24-well plates. Approximately 24 hours after transfer to 24-well plates and after overnight incubation in DMEM containing 2 $\mu$ Ci/ml of myo-[2-3H]inositol (specific activity, 10–25 Ci/mmol, PerkinElmer Life Sciences), Inositol phosphate production was determined as described previously (16).

*Confocal fluorescence microscopy*- Flp-In<sup>TM</sup>CCK2R-293, Flp-In<sup>TM</sup>  $\beta$ -arrestin2-GFP-293 and Flp-In<sup>TM</sup> 293 cells were plated onto poly-L-lysine (Sigma-Aldrich) coated 4-wells Lab-Tek chambered coverglass (#155383, Nunc) and grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% FBS in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37 °C. After overnight incubation, cells were transfected with 0.5 $\mu$ g/well of pcDNA5/FRT containing cDNA encoding GFP tagged CCK2R, mutated

CCK2R,  $\beta$ -arrestin1-GFP,  $\beta$ -arrestin2-GFP, K44A dynamin, V53D dominant negative  $\beta$ -arrestin1-GFP, and V54D dominant negative  $\beta$ -arrestin-GFP using a Fugene® 6 transfection reagent (Roche). For colocalization experiments, vectors containing cDNA encoding GFP tagged CCK2R and Rab5-DsRed or Rab11-DsRed or Rab7-DsRed were cotransfected using the same method with 0.5 $\mu$ g/well for GFP tagged CCK2R and 1 $\mu$ g/well for Rabs-DsRed proteins. 24 hours after transfection, the DMEM medium was replaced by Phosphate Buffered Saline (PBS) calcium and magnesium free prior to stimulation. Cells were stimulated with appropriate ligand, and images of GFP, DsRed or Alexa Fluor 647 fluorescence, were collected by using single- or double-line excitation (respectively 488 nm, 543nm, 633nm) on a Zeiss Laser Scanning Microscope (LSM-510). For  $\beta$ -arrestin1-GFP and  $\beta$ -arrestin2-GFP membrane recruitment experiments, time series over a 5 min period were performed (pictures were taken every 30 seconds) and the decrease of cytoplasmic fluorescence was measured using the Region of interest (ROI) function of LSM-510 software.

*Internalization assay by flow cytometry-* Flp-In<sup>TM</sup>CCK2R-293 cells were plated onto poly-L-lysine (Sigma-Aldrich) coated 6-wells plates and grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% FBS in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37°C. After overnight incubation, cells were treated with CCK (0.1  $\mu$ M) or synthetic ligands (1 $\mu$ M) in DMEM containing HEPES (20mM) at various times. Following stimulation, bound ligand was dissociated from the cells 3 times with

DMEM/HEPES (20mM) and the remaining receptors at the cell membrane were labeled using saturating concentration of Alexa F 647-CCK (1 $\mu$ M) for 2.5 hours on ice. Cells were washed twice with PBS 0.1% BSA. Cells were detached from 6-wells plates and transferred to FACS tubes. Cell-associated fluorescence was determined using a BD FACSCalibur<sup>TM</sup> flow cytometer, with Flp-In<sup>TM</sup> 293 that do not express CCK2R as a negative control.

*Recycling assay by flow cytometry-* Flp-In<sup>TM</sup>CCK2R-293 cells were plated onto poly-L-lysine (Sigma-Aldrich) coated 6-wells plates and grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% FBS in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37 °C. After overnight incubation, cells were treated with 0.1  $\mu$ M CCK in DMEM/HEPES (20mM) for 1 hour at 37°C. Following stimulation, cells were washed 3 times with DMEM/HEPES. The receptors at the cell surface were labeled using Alexa F 647-CCK (1 $\mu$ M) for 45 min at 37°C at various time (1 hrs, 2 hrs, 3 hrs) after the end of the CCK stimulation. Binding of Alexa F 647-CCK was carried out in the presence of dynasore (80  $\mu$ M) in order to block internalization and possible fast recycling during this step of receptor quantification.

*BRET studies-* HEK 293 T or Flp-In<sup>TM</sup> 293 cells were plated onto 10-cm culture dishes and grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% FBS in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37 °C. After overnight incubation, cells were transfected with 0.2 $\mu$ g of Rluc tagged CCK2R (wild type or mutants) and 10 $\mu$ g of either  $\beta$ -arrestin1-YFP or  $\beta$ -arrestin2 using polyethylenimine (PEI) transfection reagent (Polyplus) or Fugene® 6 transfection reagent (Roche). 24 hours after

transfection cells were plated in 96-wells clear bottom plates (Corning) at a density of 100.000 cells per well in phenol red free DMEM. After overnight incubation, the phenol red free medium was removed from HEK293T cells and replaced by Phosphate Buffer Saline (PBS). The BRET assay was initiated by adding 10  $\mu$ l of the cell-permeant substrate specific for Renilla luciferase, coelenterazine h to the well to yield a final concentration of 5  $\mu$ M. The agonist/antagonist activity of the compounds was measured by adding them to the well 5 min after the Rluc substrate. Readings started 10 min after the addition of Rluc substrate. BRET experiments were performed at room temperature in a Mithras LB940 instrument (Berthold) that allows the sequential integration of the signals detected in the 465 to 505nm and 515 to 555 nm windows using filters with the appropriate band pass and by using MicroWin 2000 software. For titration experiments, the acceptor/donor ratio was calculated as described previously (25). For time course analysis of the interactions between CCK2R and  $\beta$ -arrestin1/2 interactions, coelenterazine H was added 10 min before the addition of PBS, CCK or compounds. Readings were then collected at 12.5 seconds intervals for the next 20 min.

## RESULTS

*Characterization of Flp-In<sup>TM</sup>CCK2R-293 cells.* To investigate the regulation of the CCK2R at the cell surface, we established a HEK 293 cell line which permanently expressed the human CCK2R and which was named Flp-In<sup>TM</sup>CCK2R-293. Homologous

competition binding studies with these cells indicated that expressed CCK2R bound <sup>125</sup>I-CCK with a dissociation constant (Kd) of  $4.8 \pm 1.0$  nM and a maximum binding capacity of  $1.98 \pm 0.18$  pmol/ $10^6$  cells. The CCK2R displayed a typical CCK2R-like pharmacology as shown by high inhibition constant of selective CCK2R ligands (Ki : gastrin:  $13.2 \pm 1.5$  nM; JB93,242:  $40.6 \pm 4.7$  nM; JB93,182:  $4.2 \pm 0.3$  nM; PD135,158:  $11.7 \pm 0.8$  nM) and low inhibition constant of the specific CCK1R antagonist SR27,897 (Ki  $\geq 10$   $\mu$ M) (Fig. 1A,B). Furthermore, the CCK2R efficiently coupled with phospholipase C as shown by the dose-response curve for CCK-induced inositol phosphate production (EC<sub>50</sub>:  $4.0 \pm 0.4$  nM, maximal production:  $\approx 50$ -fold the basal after 1 hour of stimulation). In agreement with our previous results (14,16), JB93,242 and PD135,158 behaved as partial agonists with respect to inositol phosphate turnover. These two compounds showed efficacies which represented 22 % and 42 % of that of the full agonists CCK and gastrin (Fig. 1C). However, JB93,182 which acted as a partial inverse agonist on COS-7 cells over-expressing the CCK2R did not exhibit this activity in Flp-In<sup>TM</sup>CCK2R-293 due to the lack of detectable basal constitutive activity of the CCK2R in HEK cells (14)(Fig. 1C). Finally, the effect of nonpeptide ligands on ERK1/2 phosphorylation was evaluated since the activation of the CCK2R is recognized to trigger this signalling pathway (10). As illustrated on Fig 1D, CCK-stimulated phosphorylation of ERK1/2 was rapid and sustained over time. JB93,182, JB93,242 and PD135,158 also stimulated phosphorylation. Autoradiography scanning indicated that maximal ERK1/2 phosphorylation achieved with JB93,182,

JB93,242 and PD135,158 represented approximately 15, 30 and 60-70 % of the maximum achieved with CCK, respectively (not illustrated).

*Characterization of CCK2R internalization-* Endocytosis and trafficking of the CCK2R was traced using fluorescent CCK2R (CCK2R-GFP) and fluorescent CCK (Alexa F 647-CCK). Prior to the use of these tools, biological experiments were carried out in order to check their pharmacological features (supplementary data, Fig. 1A and B). When transiently expressed in HEK 293 cells, CCK2R-GFP bound  $^{125}\text{I}$ -CCK with a dissociation constant of  $1.15 \pm 0.20$  nM (versus  $1.17 \pm 0.25$  nM for CCK2R) and efficiently stimulated production of inositol phosphates after CCK stimulation ( $\text{EC}_{50}$ :  $2.00 \pm 0.23$  nM versus  $0.53 \pm 0.04$  nM for CCK2R). Furthermore, Alexa F 647-CCK competed with  $^{125}\text{I}$ -CCK to CCK2R similarly to unmodified CCK (Ki:  $2.4 \pm 0.1$  nM for Alexa F 647-CCK versus Kd:  $4.8 \pm 1.0$  for CCK).

Confocal microscopy observation of living HEK 293 cells transiently expressing CCK2R-GFP showed that CCK2R was expressed uniformly at the cell surface as was identified the unmodified CCK2R immediately after its labelling by Alexa F 647-CCK (Fig. 2). However, soon after addition of CCK or Alexa F 647-CCK, the membrane fluorescence was relocated in numerous membrane clusters and progressively enters the interior of the cells in punctuate peripheral vesicles. The number of these fluorescent vesicles continuously increased to the detriment of membrane fluorescence while they became more widely distributed within the cytoplasm, including in

perinuclear areas, over the time. During CCK2R internalization, the ligand remained trapped together with the receptor in endocytotic vesicles for periods of time as long as 3 hours (Fig. 2, merged panels). Gastrin or CCK-mediated internalization was blocked by incubating the cells at 4°C. PD135,158, a partial agonist of the CCK2R exhibiting about 40% of maximal CCK-induced inositol phosphate production (Fig. 1C) did not stimulate internalization of CCK2R-GFP, even at supramaximal concentrations, but fully inhibited CCK-induced internalization of CCK2R-GFP. The non peptide ligands of the CCK2R, JB93,242 and JB 93,182 characterized as a partial agonist and an antagonist/inverse agonist, respectively, were also unable to stimulate CCK2R-GFP internalization, and abolished internalization of the receptor induced by CCK (Fig. 2B). The CCK1R antagonist SR27,897 neither induced CCK2R-GFP internalization nor prevented receptor internalization induced by CCK. Lastly, gastrin stimulated CCK2R-GFP internalization as did CCK.

CCK2R internalization was quantified by measuring binding of Alexa F 647-CCK to transfected cells pre-stimulated with CCK for different times. As shown on Fig. 3A, pre-stimulation with CCK resulted in a rapid decrease of the amount of fluorescent CCK bound to the cells indicating that CCK2R progressively internalized during pre-stimulation with CCK. Half of the CCK2R population was not accessible to Alexa F 647-CCK after 60 min of incubation, a result in satisfactory agreement with confocal microscopy observations (Fig. 2A). In contrast, pre-stimulations with PD135,158,

JB93,242 or JB 93,182 did not significantly alter the presence of CCK2R at the cell surface. We further examined the possibility of the population of CCK2R at the cell surface containing a pool of recycled CCK2R in addition to CCK2R that have not yet been internalized. For this purpose, Flp-In<sup>TM</sup> CCK2R-293 cells stimulated with 0.1  $\mu$ M CCK at 37°C for 60 min were then incubated at 37°C for various times in absence of CCK, after which CCK2R density was measured using Alexa F 647-CCK. As illustrated on Fig. 3B, for times up to 3 hours, the binding of Alexa F 647-CCK remained stable, which suggested that internalized CCK2R was not significantly recycled at the cell surface within this period of time. This absence of apparent CCK2R recycling within a period shorter than 3 hours was confirmed in experiments aimed at quantification of internalization in the presence of the recycling inhibitor, monensin, which had no significant impact on receptor density at the plasma membrane after a challenge with CCK (Fig. 3B). However, as expected, in the presence of monensin, the size of endocytosis vesicles increased (26).

The trafficking and fate of internalized CCK2R under prolonged stimulation was investigated by co-expressing CCK2R-GFP and fluorescent Rab proteins which are small GTPases regulating intracellular trafficking between functionally distinct membrane compartments within the cell (27). As shown on Fig. 4, following addition of CCK, CCK2R-GFP immediately and exclusively co-localized in Rab5-illuminated vesicles likely corresponding to early endosomes. Indeed, co-localization with Rab5 was seen in 40% of cells immediately after addition of CCK, it

was maximum (100%) after 1 hour and decreased to 70% at 2 hours. Localization of CCK2R-GFP in late endosomes or lysosomes containing Rab7 was observed at times longer than 5-6 hours post-stimulation (80% of cells with co-localization). Localization of CCK2R-GFP to slow recycling endosomes expressing Rab11 was obvious at times longer than 2 hours (85% cells with co-localization) and was maintained for times up to 6 h (100% cells with co-localization). These co-localization experiments are in line with results indicating that internalized CCK2R was not rapidly recycled to the cell surface but was directed to late endosomes for possible slow recycling or degradation.

*CCK2R internalization involves the GTPase dynamin and clathrin-coated pits*  
Internalization of many GPCR following agonist stimulation occurs through clathrin-coated pits and involves recruitment of  $\beta$ -arrestins, the clathrin adaptator AP-2 and the GTPase dynamin (1). We therefore tested whether the CCK2R used this major route for internalization. The dependency of CCK2R internalization to dynamin was investigated by using the dynamin inhibitor, dynasore (28) which efficiently abolished internalization as shown by cell membrane labelling by Alexa F 647-CCK (Fig. 5A). In the presence of chlorpromazine, an inhibitor of clathrin-coated pits formation (29), at a concentration (100  $\mu$ M) which inhibits Alexa-F 488-transferrin endocytosis (not illustrated), CCK2R labelled by Alexa F 647-CCK failed to internalize (Fig. 5A). Hence, CCK2R internalization in HEK cells is dependent on the membrane GTPase dynamin and most likely occurs through clathrin-coated pits.

*CCK2R internalization involves  $\beta$ -arrestins-* In order to verify whether non visual  $\beta$ -arrestins are involved in CCK2R internalization, we first expressed  $\beta$ -arrestin1-GFP or  $\beta$ -arrestin2-GFP in Flp-In<sup>TM</sup> CCK2R-293 cells. In absence of stimulation, arrestin2-GFP was localized uniformly in the cytoplasm of the cells (Fig. 5B).  $\beta$ -arrestin1-GFP was also located in the cytoplasm and slightly in the nucleus (Fig. 2 of supplementary data). The addition of CCK caused rapid illumination (at 5 min) of the cell periphery by the green proteins supporting the translocation of cytosolic  $\beta$ -arrestin2-GFP or  $\beta$ -arrestin1-GFP to the plasma membrane. This recruitment of  $\beta$ -arrestins to the plasma membrane was quantified by measuring the decrease of cytosolic fluorescence. As shown on figure 5C, kinetics of  $\beta$ -arrestin2-GFP or  $\beta$ -arrestin1-GFP recruitment to the plasma membrane were similar and so rapid that half of tagged arrestins initially seen in the cytoplasm were recruited to the plasma membrane within 200 seconds. After longer times of incubation with CCK,  $\beta$ -arrestin2-GFP or  $\beta$ -arrestin1-GFP were observed as intracellular fluorescent circles resembling endosomes (Fig. 5B and 2 of supplementary data). It is worth noting that double-labeling of endocytotic vesicles by both  $\beta$ -arrestins-GFP and Alexa F 647-CCK lasted for long periods of time (supplementary data, Fig. 3). Conversely, stimulations by the partial agonists PD135,158, JB93,242 or the inverse agonist JB 93,182 did not cause translocation of  $\beta$ -arrestin2-GFP or  $\beta$ -arrestin1-GFP to the cell surface (supplementary data, Fig. 2 shown for time 5 min).

Over-expression of dominant negative of  $\beta$ -arrestin1 or 2 (DN- $\beta$ -arrestin1 or 2) significantly diminished CCK2R endocytosis (Fig. 5D). Indeed, after 30 min of incubation with Alexa-F 647-CCK, in cells overexpressing DN- $\beta$ -arrestin1 or 2, Alexa-labeled CCK2R mostly remained trapped in punctuated structures at the plasma membrane (see Fig. 5D and 2 for comparison). Some Alexa-labeled CCK2R were also observed intra-cellularly where they co-localized with DN- $\beta$ -arrestin1-GFP or DN- $\beta$ -arrestin2-GFP. Strikingly, co-expression of both dominant negative of  $\beta$ -arrestin1 or 2 efficiently abolished CCK2R internalization (Fig. 5D). Conversely, over-expression of  $\beta$ -arrestin1 and 2 accelerated CCK2R internalization (not illustrated). Collectively, these experiments support that the two non-visual  $\beta$ -arrestin1 and 2 are involved in CCK2R endocytosis.

*$\beta$ -arrestins are directly recruited by CCK2R upon stimulation by full agonists-* Since  $\beta$ -arrestins were involved in CCK-induced CCK2R internalization and were recruited to the plasma membrane prior to CCK2R internalization, we determined whether recruitment of  $\beta$ -arrestins was due to a direct interaction with the CCK2R and occurred only under full agonist stimulation. For this purpose, BRET assay was performed using CCK2R-Rluc as the BRET donor and  $\beta$ -arrestin2-YFP or  $\beta$ -arrestin1-YFP as the BRET acceptors co-expressed in HEK 293 cells. Control binding experiments and inositol phosphate assays showed that CCK2R-Rluc displayed identical pharmacological features as the untagged CCK2R, since dissociation constant (Kd) of CCK binding was  $0.90 \pm 0.21$  nM and, EC<sub>50</sub> for production of inositol



phosphates was  $1.3 \pm 0.31$  nM (Fig. 1C and D of supplementary data). Additionally, stimulation of CCK2R-Rluc by CCK caused recruitment of  $\beta$ -arrestin2-YFP or  $\beta$ -arrestin1-YFP to plasma membrane and underwent rapid internalization as depicted by fluorescent tracing using Alexa F 647-CCK (data not shown). Together, these results allowed us to use CCK2R-Rluc to monitor  $\beta$ -arrestin recruitment to the CCK2R by BRET.

BRET titration curve between CCK2R-Rluc and  $\beta$ -arrestin2-YFP or  $\beta$ -arrestin1-YFP (Fig. 6A) indicated that in both unstimulated and CCK-stimulated HEK 293 cells, the BRET donor (CCK2R-Rluc) was progressively associated and finally saturated with BRET acceptor ( $\beta$ -arrestin2-YFP or  $\beta$ -arrestin1-YFP) in the presence of increasing quantities of the latter. In the presence of  $0.1 \mu\text{M}$  CCK, the BRET signal reached 8-10-fold that measured in the absence of CCK. Kinetics of BRET showed that half of maximal recruitment of  $\beta$ -arrestins to the CCK2R occurred 30 seconds after addition of CCK or gastrin and this recruitment remained relatively stable for at least 20 min, which is in line with confocal microscopy observations and quantifications. In contrast, stimulation by PD135,158, JB93,242 or JB 93,182 did not cause any significant change in BRET signal (Fig. 6B). Recruitment of  $\beta$ -arrestins to the CCK2R induced by CCK or gastrin was dose-dependent, with  $\text{EC}_{50}$ :  $26.1 \pm 3.1$  nM and  $10.5 \pm 3.3$  nM, respectively (Fig. 6C). These values were slightly higher than the values of the dissociation constants of the peptides determined in binding experiments (4.8 and 13.2 nM). Finally, ligands which did not stimulate  $\beta$ -arrestin recruitment to the CCK2R

dose-dependently inhibited CCK-induced BRET signal (PD135,158,  $\text{IC}_{50}$ :  $95.9 \pm 8.0$  nM, Fig. 6D and data not shown).

*The C-terminal region of CCK2R is critical for  $\beta$ -arrestin recruitment but not for CCK2R-internalization-* In many GPCR, key residues involved in recruitment of  $\beta$ -arrestins and receptor internalization are phosphorylatable amino acids located in the C-terminal region of the receptor (30). We therefore constructed a large series of CCK2R in order to identify those residues. Control experiments were conducted to verify that potency and efficacy of truncated and mutated CCK2R on G-protein dependent signalling pathway, *ie.* inositol phosphate production, were retained. Results depicted in Table 1 of supplementary data indicate that all the mutants responded to CCK with potencies similar to that of the wild-type CCK2R, although several truncated and mutated receptors exhibited enhanced maximal responses relative to the wild-type receptor.

Truncated CCK2R at residue 409, 429 and 439 and a CCK2R mutant having all Ser and Thr residues from the C-terminal region substituted by Ala (namely  $\Delta 409$ -CCK2R,  $\Delta 429$ -CCK2R,  $\Delta 439$ -CCK2R and polyA-CCK2R, respectively) (Fig. 7A) were assayed by confocal microscopy for their ability to internalize and recruit GFP-tagged- $\beta$ -arrestins. We observed that  $\Delta 409$ -CCK2R,  $\Delta 429$ -CCK2R and  $\Delta 439$ -CCK2R as well as polyA-CCK2R only slightly recruited  $\beta$ -arrestin2-GFP or  $\beta$ -arrestin1-GFP (Fig. 7B). However, all three truncated and polyA mutated CCK2R significantly internalized after stimulation by Alexa F 647-CCK (Fig. 7B). Remarkably, unlike with the wild-type CCK2R, no

colocalization could be observed between internalized CCK2R and  $\beta$ -arrestin2-GFP in cells expressing  $\Delta$ 409-CCK2R,  $\Delta$ 429-CCK2R,  $\Delta$ 439-CCK2R or polyA-CCK2R suggesting that these CCK2R variants would internalize through a  $\beta$ -arrestin-independent mechanism. We next evaluated whether this potential alternative mechanism still involved clathrin coated-pits. Results on Fig. 7B show efficient inhibition of internalization in the presence of the clathrin inhibitor, chlorpromazine. We further verified the possibility of the wild-type CCK2R internalizing in the absence of  $\beta$ -arrestins by expressing the CCK2R in  $\beta$ -arrestin1/2 double knock-out MEF cells. As illustrated on Fig. 7C, internalization of Alexa-labeled CCK2R was evident and abundant immediately after the stimulation, supporting the existence of an arrestin-independent mechanism for CCK2R-internalization.

Since the above results support that a region down-stream residue 409 in the CCK2R is essential for  $\beta$ -arrestin recruitment, we aimed at identifying more precisely residues or motifs involved. Results from BRET experiments with CCK2R-RLuc mutated on serine and/or threonine in the C-terminal tail indicated that double mutations of Thr427/Ser429 or Ser432/Ser434 and single mutation of residues Thr440 or Thr443 did not significantly affect recruitment of  $\beta$ -arrestin2-YFP to the receptor (Fig. 7E). In contrast, single mutation of Ser437, Thr439 or Ser442 as well as double mutation of Ser442/Thr443 decreased significantly BRET between CCK2R-RLuc and  $\beta$ -arrestin2-YFP. Simultaneous mutation of Ser437-Thr339-Thr440 or Ser437-Thr339-Thr440-Ser442-Thr443 caused equal maximal decrease in BRET signal (Fig. 7C

and D). This data highlights the crucial importance of sequence Ser437-X438-Thr439-Thr440-X441-Ser442-Thr443 for recruitment of  $\beta$ -arrestin2 to the CCK2R.

All together, this data indicates that: 1) amino acids crucial for  $\beta$ -arrestin recruitment to the CCK2R and which participate in arrestin-dependent internalization corresponds to Ser437-X438-Thr439-Thr440-X441-Ser442

-Thr443 located in the C-terminal region of the CCK2R; 2) truncated and poly-Ala mutated CCK2R and the wild-type CCK2R in cells lacking  $\beta$ -arrestins, can efficiently use an alternative mechanism to  $\beta$ -arrestin recruitment for their internalization process; this alternative mechanism most likely involves clathrin coated-pits and amino acids outside the C-terminal region of the CCK2R.

## DISCUSSION

In our effort to gain insight into the functioning and regulation of the CCK2R which is a GPCR of crucial importance in the central nervous system and in peripheral organs (10,12), we undertook the current study. We demonstrated that the CCK2R internalizes rapidly and abundantly in response to stimulation by the two equipotent natural agonists of the receptor, CCK or gastrin. Absence of rapid recycling and colocalization of internalized receptors with fluorescent Rab-7 and Rab-11 supports targeting of internalized CCK2R to late endosomes or lysosomes for slow recycling or degradation. Although fluorescent CCK or gastrin remained trapped in endocytotic vesicles over times as long as 6 hours, we do not know if the peptidic

ligands were still intact and bound to internalized CCK2R at these times or if they were degraded by proteases. Other studies have shown that substance P, Calcitonin gene-related peptide and somatostatin are degraded in acidified early endosomes following internalization with their cognate receptors (32). Interestingly, it was suggested that retention of ligand integrity or ligand degradation may impact signalling triggered by internalized GPCR (33).

Internalization of GPCRs can occur through two main membrane structures, caveoles and clathrin-coated pits. Here, we show that chlorpromazine, a chemical inhibitor of clathrin-coated pits formation strongly affected receptor internalization supporting recruitment of membrane CCK2R to clathrin-coated pits for their subsequent endocytosis. Furthermore, CCK2R internalization was blocked by dynasore, an inhibitor of the mechanochemical enzyme dynamin, which thus appears to play a key role in the fission of CCK2R-containing endosomes (28). Several lines of evidence show the involvement of  $\beta$ -arrestin1 and 2 in the internalization of the CCK2R: GFP-tagged-arrestins were translocated from cytosol to the plasma membrane after CCK or gastrin stimulation; GFP-tagged-arrestins co-localized with the CCK2R during endocytosis; over-expression of both  $\beta$ -arrestin1 and -2 dominant negative efficiently abolished CCK2R internalization; BRET experiments confirmed agonist-stimulated recruitment of  $\beta$ -arrestin1 and 2 to the CCK2R.

Previous study of agonist-mediated translocation of  $\beta$ -arrestins to GPCRs identified two classes of GPCRs (34). Members of class A which includes  $\beta_2$ -adrenergic receptor,  $\mu$ -

Opioid receptor, Endothelin type1 receptor bind  $\beta$ -arrestin2 with a higher affinity than  $\beta$ -arrestin1 whereas members of class B comprising Angiotensin II type 1A receptor, Vasopressin2 receptor, Substance P receptor bind both  $\beta$ -arrestin 1 and 2 with similar high affinities (34). Subsequently, the affinity with which GPCRs bind arrestins was related to the degree of receptor phosphorylation by GRK, the intracellular trafficking and cellular signal triggered by internalized GPCRs (35). In the current study, confocal microscopy analysis of translocation of fluorescent  $\beta$ -arrestin1 or 2 to the plasma membrane indicated that recruitment of both  $\beta$ -arrestin1 and 2 to the CCK2R occurs with rigorously identical kinetics. Moreover, both  $\beta$ -arrestin1 and 2 remained stably associated to endocytotic vesicles along the time. This data was confirmed, at molecular level, by BRET measurements which account for proximity ( $\leq 10$  nm) or direct interaction of two partner proteins. In these BRET experiments, binding affinities of the two  $\beta$ -arrestins for the CCK2R as judged by BRET<sub>50</sub> were similar, and BRET signal remained almost stable for times longer than 20 min confirming that presence of  $\beta$ -arrestins at the periphery of endocytotic vesicles was the result of a stable and direct interaction with the CCK2R. These converging results lead us to classify the CCK2R to class B of GPCRs.

The importance of the C-terminal region of the CCK2R, and more precisely of phosphorylatable Ser/Thr within this region, for  $\beta$ -arrestin recruitment and receptor internalization, was further evaluated by analysing the behaviour of C-terminally truncated and mutated CCK2R. We found that

determinants for  $\beta$ -arrestin binding to the CCK2R reside in motif Ser437-Tyr438-Thr439-Thr440-Ile441-Ser442-Thr443 which is frequently found in GPCRs (30,35). It is not known if three or more residues of this motif are phosphorylated upon CCK stimulation as BRET results agree with the view that three phosphates is the threshold number for  $\beta$ -arrestin binding to GPCRs (35).

Strikingly, we observed that in cells co-expressing polyA-CCK2R and YFP- or GFP-tagged  $\beta$ -arrestins, a weak translocation of  $\beta$ -arrestins from the cytosol to the plasma membrane was still observed under CCK stimulation and 35 % of maximal signal BRET could be measured between  $\beta$ -arrestin2 and the CCK2R mutant having five Ser/Thr substituted in alanine. Internalization of the Alexa 647 F-labeled CCK2R was not abolished by C-terminal tail deletion nor by exchanging all serine and threonine residues for an alanine, even in conditions of normal endogenous expression of  $\beta$ -arrestins in HEK cells. However, with these CCK2R variants, no colocalization of fluorescent  $\beta$ -arrestins with internalized receptors could be observed. To explain this result, one may suggest that modified CCK2R within the C-terminal region form relatively unstable complexes with arrestins that would dissociate at or near the plasma membrane, as observed for GPCRs of group A (34). Alternatively, internalization of the CCK2R could switch from a  $\beta$ -arrestin-dependent to a  $\beta$ -arrestin-independent mechanism when crucial determinants for binding of this adaptator ( $\beta$ -arrestin) are lacking on the receptor. The observation of abundant internalization of the CCK2R in MEF- $\beta$ -arrestin1/2<sup>-/-</sup> and its inhibition by

chlorpromazine strongly supports this second switch hypothesis.

Precedent exists showing that deletion of the distal carboxy-terminal region the A2b adenosine receptor switched internalization from an arrestin- and clathrin-dependent to an arrestin- and clathrin-independent pathway (36). Furthermore, the requirement of  $\beta$ -arrestin for receptor internalization is much dependent on the type of GPCR. For instance, whereas the  $\beta$ 2-adrenergic receptor does not internalize in MEF- $\beta$ -arrestin1/2<sup>-/-</sup> cells, the protease-activated receptor-1, the formyl peptide receptor and the urotensin-II receptor internalize normally in these cells and near 20% of angiotensin AT1A receptor still internalizes (37-40). Basal constitutive internalization of the ghrelin receptor is arrestin-independent whereas agonist stimulated is arrestin-dependent (41).

GPCRs which internalize through clathrin-coated-pits independently of  $\beta$ -arrestins can use the heterotetrameric complex AP-2 that connects cargo molecules directly to clathrin. AP-2 is able to recruit molecules through  $\mu$ 2 or  $\alpha$ / $\sigma$ 2 subunit interactions with tyrosine-based (YXX $\Phi$ ) or dileucine ([DE]XXXL[LI]) motifs, which are most often located on C-terminal region of GPCRs. Such mechanisms were reported, for instance, for P2X4 purinergic receptor, PAR1 protease-activated receptor and CXCR2 chemokine receptor (42-44). In the case of CCK2R, an analysis of amino acid sequence highlights presence of two tyrosine-based sorting signals which might be responsible for binding of the CCK2R with  $\mu$ 2-subunit of AP-2 complex. These are located in the third intracellular loop at positions 246-249 (YLGL) and 294-297 (YVQL). Future studies

will examine if these motifs or other not yet identified mechanisms are responsible for  $\beta$ -arrestin-independent internalization of the CCK2R, and if the  $\beta$ -arrestin-independent pathway of internalization is employed in parallel with the  $\beta$ -arrestin-dependent one in the physiological context.

Pioneering work quantified internalization of the rat CCK2R in NIH 3T3 cells and showed importance of C-terminal tail and serine/threonine residues (18). Although this study did not investigate the role played by arrestins, the results also suggested contribution to internalization of regions of the CCK2R outside the C-terminal tail. This view agrees with the general molecular basis whereby  $\beta$ -arrestins bind to agonist-activated through multiple sites of interaction on both the receptor and  $\beta$ -arrestins which were termed “activation-recognition” and “phosphorylation-recognition” sites (35,45,46).

Results from the current study reinforce the importance of C-terminal tail of the CCK2R for its down-stream signalling and regulation. We previously documented interaction of the C-terminal region of the CCK2R with RGS-2, SHP-2 phosphatase or phospholipase-C  $\gamma$ 1 (17,47,48). The motif involved in functional binding of SHP2 phosphatase and phospholipase-C  $\gamma$ 1 to the CCK2R is an ITIM motif containing Tyr438 which, once phosphorylated, recruits signalling proteins containing SH2 domain(s). We suggested that the binding of CCK2R to the SH2 domain of phospholipase-C  $\gamma$ 1 in the pancreas of mice overexpressing the CCK2R may participate in the development of preneoplastic lesions and pancreatic cancer (49). Concerning interaction of Regulator of G-protein Signaling-2 (RGS-2),

we demonstrated that it involves Ser434 and Thr439, requires phosphorylation of these residues and serves for RGS2 recognition by the CCK2R (17).

The current study also provides new important pharmacological data on the CCK2R since it allowed identification of biased ligands of this receptor. Indeed, we show that, unlike CCK and gastrin which are full agonists with respect to inositol phosphate production, partial agonists PD135,158 or JB93,242 on the G-protein dependent pathway as well as the antagonist JB93,182 did not promote receptor internalization and were unable to stimulate recruitment of  $\beta$ -arrestins. However, these three non peptide ligands acted as antagonists on CCK-induced recruitment of  $\beta$ -arrestins to the CCK2R and its internalization. All three ligands, PD135,158, JB93,242 and, more surprisingly JB93,182 stimulated ERK1/2 phosphorylation. Delineation of the precise mechanism linking binding of these ligands to the CCK2R with ERK activation will require further investigations. However, based on BRET and confocal microscopy data showing inability of these ligands to stimulate  $\beta$ -arrestin recruitment and CCK2R internalization, it is unlikely that these two events are involved. Most likely, ERK activation by PD135,158 and JB93,242 would be a consequence of phospholipase-C activation (10). The mechanism leading to ERK1/2 activation by JB93,182 remains unexplained since this compound did not stimulate phospholipase-C nor  $\beta$ -arrestin recruitment. Hence, PD135,158 and JB93,242 meet criteria of biased ligands of the CCK2R since they are capable of stimulating a typical G-dependent signalling pathway but are unable to stimulate  $\beta$ -arrestin

recruitment and receptor internalization. JB93182 is another type of biased ligand capable of stimulating ERK1/2 phosphorylation but unable to stimulate  $\beta$ -arrestin recruitment and receptor internalization. These findings may have a significant impact on the pharmacology of the CCK2R and cognate strategies to target it. In the recent period, biased ligands for GPCRs such as, for example adrenergic, dopamine, angiotensin II receptors have been identified and shown to present pharmacological and therapeutic interests (25,50-52). The CCK2R joins this group of GPCRs. To explain why PD135,158 and JB93,242 stimulate production of inositol phosphates but could not induce  $\beta$ -arrestin recruitment to the CCK2R, we suggest that conformations of the CCK2R stabilized by CCK or by the two partial non peptide agonists are distinct and promote phospholipase-C with different efficacies, and only the state stabilized by the full agonists CCK or gastrin is able to promote  $\beta$ -arrestin recruitment. This view agrees with the general concept that is now well supported by experimental data, whereby GPCRs exist in multiple distinct conformational states which can be stabilized by selective ligands and which present distinct signalling profiles (8).

Our work represents a solid basis to evaluate the contribution of internalized-CCK2R to CCK2R-induced intracellular signalling. The finding that CCK2R expressed in HEK cells remains bound to  $\beta$ -arrestins during intracellular trafficking suggests that part of CCK2R-induced signalling and effects may be dependent on  $\beta$ -arrestins. Biased ligands identified in the current study should be able to block  $\beta$ -arrestin-dependent signalling and

effects down-stream the CCK2R. This is of high importance since the CCK2R is expressed in a large variety of cancers and, according to a previous study, undergoes internalization in gastric, pancreatic and colonic cell lines which endogenously express this receptor (19).

#### FOOTNOTES

We greatly appreciate the gifts of plasmids encoding GFP tagged  $\beta$ -arrestin1, YFP tagged  $\beta$ -arrestin1 and YFP tagged  $\beta$ -arrestin2, from Marc Caron (Duke University Medical Center, Durham, USA) as well as GFP tagged  $\beta$ -arrestin2 and MEF cells, wild type and knock-out for  $\beta$ -arrestins, from Robert Lefkowitz (Duke University Medical Center, Durham). The work was supported by Grants from Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC N° 4870) and Ligue Nationale Contre le Cancer (comité 31). Bernard Masri was recipient of a European Marie Curie outgoing international fellowship (FP6-2005-Mobility6).

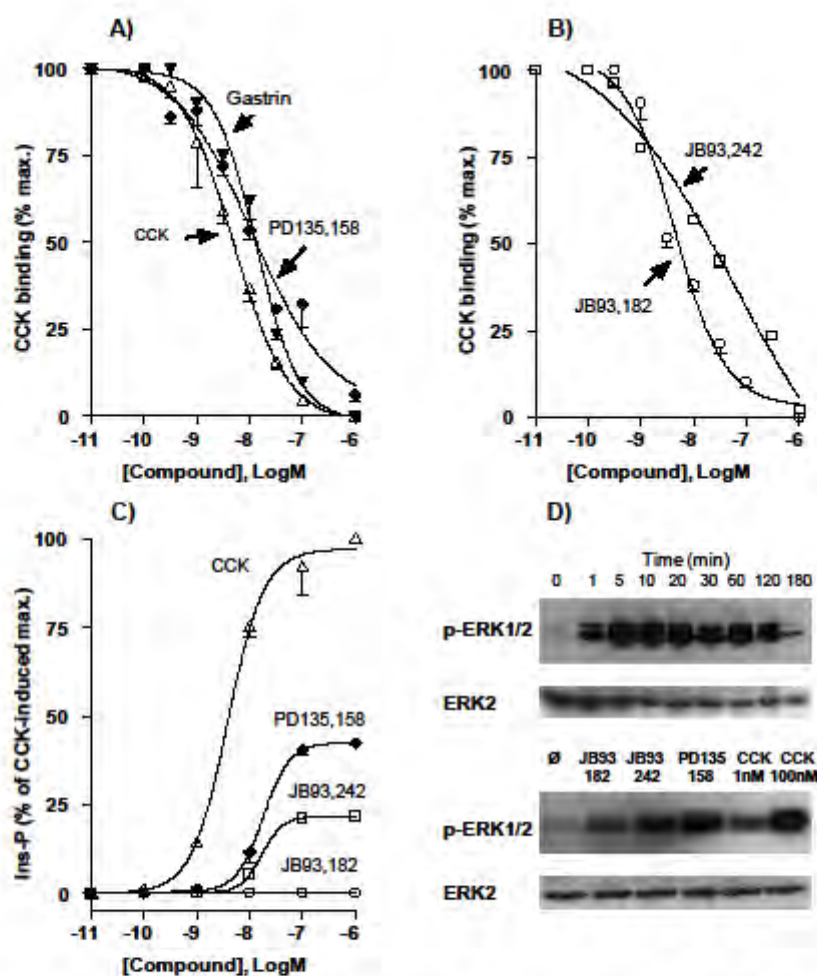
## REFERENCES

1. Hanyaloglu, A. C., and von Zastrow, M. (2008) *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **48**, 537-568
2. Traub, L. M. (2009) *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(9), 583-596
3. Marchese, A., Paing, M. M., Temple, B. R., and Trejo, J. (2008) *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **48**, 601-629
4. Ferguson, S. S. (2001) *Pharmacol Rev* **53**(1), 1-24
5. Mayor, S., and Pagano, R. E. (2007) *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(8), 603-612
6. von Zastrow, M., and Sorkin, A. (2007) *Curr Opin Cell Biol* **19**(4), 436-445
7. Sorkin, A., and Von Zastrow, M. (2002) *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(8), 600-614
8. Rajagopal, S., Rajagopal, K., and Lefkowitz, R. J. (2010) *Nat Rev Drug Discov* **9**(5), 373-386
9. Wank, S. A., Pisegna, J. R., and de Weerth, A. (1992) *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(18), 8691-8695
10. Dufresne, M., Seva, C., and Fourmy, D. (2006) *Physiol Rev* **86**(3), 805-847
11. Kopin, A. S., Lee, Y. M., McBride, E. W., Miller, L. J., Lu, M., Lin, H. Y., Kolakowski, L. F., Jr., and Beinborn, M. (1992) *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(8), 3605-3609
12. Noble, F., Wank, S. A., Crawley, J. N., Bradwejn, J., Seroogy, K. B., Hamon, M., and Roques, B. P. (1999) *Pharmacol Rev* **51**(4), 745-781
13. Herranz, R. (2003) *Med Res Rev* **23**(5), 559-605
14. Foucaud, M., Tikhonova, I. G., Langer, I., Escrieut, C., Dufresne, M., Seva, C., Maigret, B., and Fourmy, D. (2006) *Mol Pharmacol* **69**(3), 680-690
15. Marco, E., Foucaud, M., Langer, I., Escrieut, C., Tikhonova, I. G., and Fourmy, D. (2007) *J Biol Chem* **282**(39), 28779-28790
16. Foucaud, M., Marco, E., Escrieut, C., Low, C., Kalindjian, B., and Fourmy, D. (2008) *J Biol Chem* **283**(51), 35860-35868
17. Langer, I., Tikhonova, I. G., Boulegue, C., Esteve, J. P., Vatinel, S., Ferrand, A., Moroder, L., Robberecht, P., and Fourmy, D. (2009) *Mol Pharmacol* **75**(3), 502-513
18. Pohl, M., Silvente-Poirot, S., Pisegna, J. R., Tarasova, N. I., and Wank, S. A. (1997) *J Biol Chem* **272**(29), 18179-18184
19. Tarasova, N. I., Wank, S. A., Hudson, E. A., Romanov, V. I., Czerwinski, G., Resau, J. H., and Michejda, C. J. (1997) *Cell Tissue Res* **287**(2), 325-333
20. Moroder, L., Wilschowitz, L., Gemeiner, M., Gohring, W., Knof, S., Scharf, R., Thamm, P., Gardner, J. D., Solomon, T. E., and Wunsch, E. (1981) *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **362**(7), 929-942

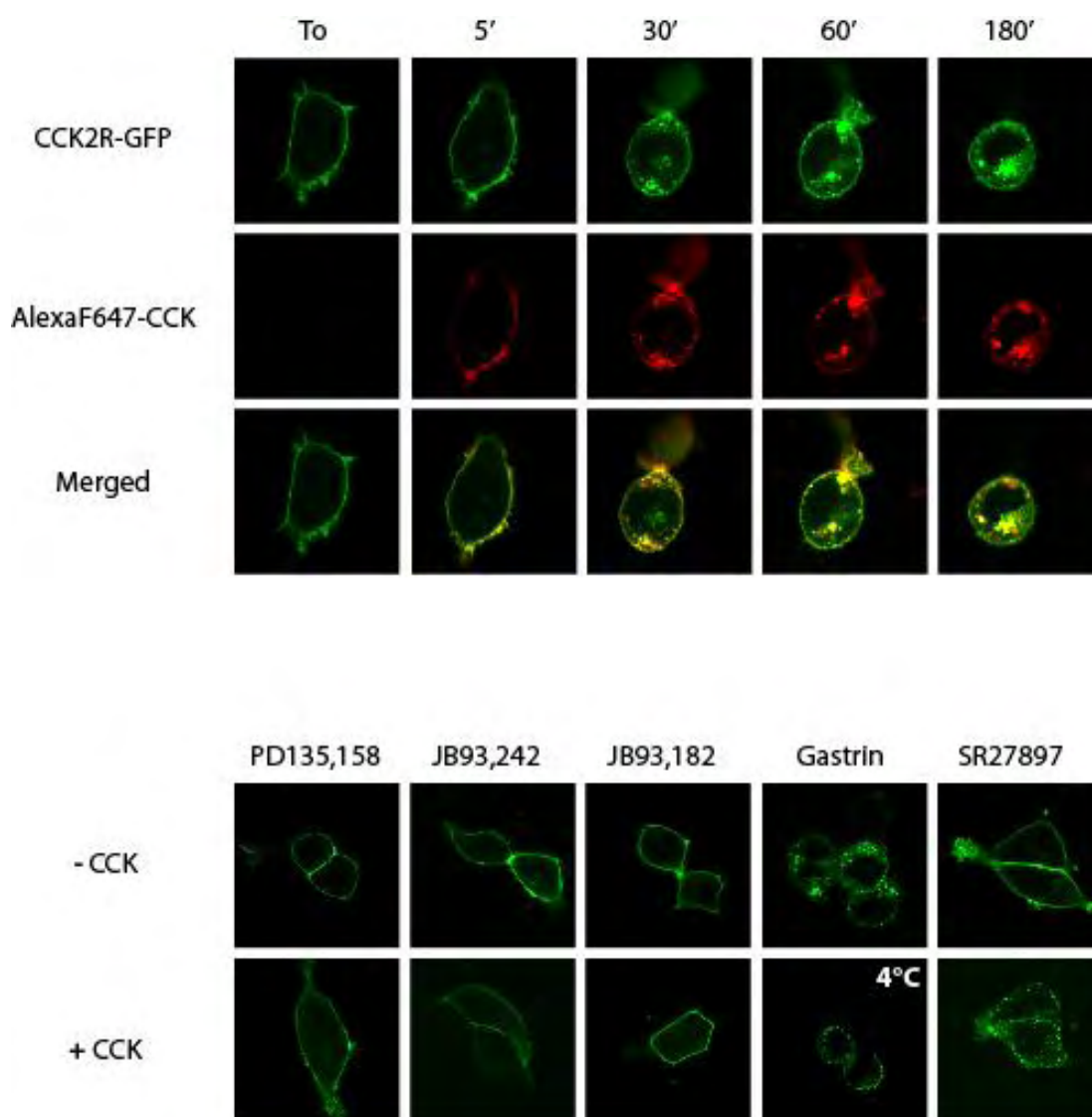
21. Fourmy, D., Lopez, P., Poirot, S., Jimenez, J., Dufresne, M., Moroder, L., Powers, S. P., and Vaysse, N. (1989) *Eur J Biochem* **185**(2), 397-403
22. Yaqub, T., Tikhonova, I. G., Lattig, J., Magnan, R., Laval, M., Escrieut, C., Boulegue, C., Hewage, C., and Fourmy, D. (2009) *Mol Pharmacol* **77**(4), 547-558
23. Hughes, J., Boden, P., Costall, B., Domeney, A., Kelly, E., Horwell, D. C., Hunter, J. C., Pinnock, R. D., and Woodruff, G. N. (1990) *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(17), 6728-6732
24. Kalindjian, S. B., Dunstone, D. J., Low, C. M., Pether, M. J., Roberts, S. P., Tozer, M. J., Watt, G. F., and Shankley, N. P. (2001) *J Med Chem* **44**(8), 1125-1133
25. Masri, B., Salahpour, A., Didriksen, M., Ghisi, V., Beaulieu, J. M., Gainetdinov, R. R., and Caron, M. G. (2008) *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(36), 13656-13661
26. Mollenhauer, H. H., Morre, D. J., and Rowe, L. D. (1990) *Biochim Biophys Acta* **1031**(2), 225-246
27. Stenmark, H. (2009) *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(8), 513-525
28. Macia, E., Ehrlich, M., Massol, R., Boucrot, E., Brunner, C., and Kirchhausen, T. (2006) *Dev Cell* **10**(6), 839-850
29. Wang, L. H., Rothberg, K. G., and Anderson, R. G. (1993) *J Cell Biol* **123**(5), 1107-1117
30. Oakley, R. H., Laporte, S. A., Holt, J. A., Barak, L. S., and Caron, M. G. (2001) *J Biol Chem* **276**(22), 19452-19460
31. Calebiro, D., Nikolaev, V. O., Persani, L., and Lohse, M. J. (2010) *Trends Pharmacol Sci* **31**(5), 221-228
32. Cottrell, G. S., Padilla, B. E., Amadesi, S., Poole, D. P., Murphy, J. E., Hardt, M., Roosterman, D., Steinhoff, M., and Bunnett, N. W. (2009) *J Biol Chem* **284**(33), 22411-22425
33. Roosterman, D., Kempkes, C., Cottrell, G. S., Padilla, B. E., Bunnett, N. W., Turck, C. W., and Steinhoff, M. (2008) *Endocrinology* **149**(5), 2200-2207
34. Oakley, R. H., Laporte, S. A., Holt, J. A., Caron, M. G., and Barak, L. S. (2000) *J Biol Chem* **275**(22), 17201-17210
35. Gurevich, V. V., and Gurevich, E. V. (2006) *Pharmacol Ther* **110**(3), 465-502
36. Mundell, S. J., Matharu, A. L., Nisar, S., Palmer, T. M., Benovic, J. L., and Kelly, E. (2010) *Br J Pharmacol* **159**(3), 518-533
37. Kohout, T. A., Lin, F. S., Perry, S. J., Conner, D. A., and Lefkowitz, R. J. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(4), 1601-1606
38. Paing, M. M., Stutts, A. B., Kohout, T. A., Lefkowitz, R. J., and Trejo, J. (2002) *J Biol Chem* **277**(2), 1292-1300
39. Vines, C. M., Revankar, C. M., Maestas, D. C., LaRusch, L. L., Cimino, D. F., Kohout, T. A., Lefkowitz, R. J., and Prossnitz, E. R. (2003) *J Biol Chem* **278**(43), 41581-41584
40. Giebing, G., Tolle, M., Jurgensen, J., Eichhorst, J., Furkert, J., Beyermann, M., Neuschafer-Rube, F., Rosenthal, W., Zidek, W., van der Giet, M., and Oksche, A. (2005) *Circ Res* **97**(7), 707-715



41. Holliday, N. D., Holst, B., Rodionova, E. A., Schwartz, T. W., and Cox, H. M. (2007) *Mol Endocrinol* **21**(12), 3100-3112
42. Royle, S. J., Bobanovic, L. K., and Murrell-Lagnado, R. D. (2002) *J Biol Chem* **277**(38), 35378-35385
43. Paing, M. M., Johnston, C. A., Siderovski, D. P., and Trejo, J. (2006) *Mol Cell Biol* **26**(8), 3231-3242
44. Fan, G. H., Yang, W., Wang, X. J., Qian, Q., and Richmond, A. (2001) *Biochemistry* **40**(3), 791-800
45. Lan, H., Teeter, M. M., Gurevich, V. V., and Neve, K. A. (2009) *Mol Pharmacol* **75**(1), 19-26
46. Ouedraogo, M., Lecat, S., Rochdi, M. D., Hachet-Haas, M., Matthes, H., Gicquiaux, H., Verrier, S., Gaire, M., Glasser, N., Mely, Y., Takeda, K., Bouvier, M., Galzi, J. L., and Bucher, B. (2008) *Traffic* **9**(3), 305-324
47. Arnould, M., Tassa, A., Ferrand, A., Archer, E., Esteve, J. P., Penalba, V., Portolan, G., Escherich, A., Moroder, L., Fourmy, D., Seva, C., and Dufresne, M. (2004) *FEBS Lett* **568**(1-3), 89-93
48. Vatinel, S., Ferrand, A., Lopez, F., Kowalski-Chauvel, A., Esteve, J. P., Fourmy, D., Dufresne, M., and Seva, C. (2006) *Biochim Biophys Acta* **1763**(10), 1098-1107
49. Bierkamp, C., Kowalski-Chauvel, A., Dehez, S., Fourmy, D., Pradayrol, L., and Seva, C. (2002) *Oncogene* **21**(50), 7656-7670
50. Rajagopal, K., Lefkowitz, R. J., and Rockman, H. A. (2005) *J Clin Invest* **115**(11), 2971-2974
51. Rajagopal, K., Whalen, E. J., Violin, J. D., Stiber, J. A., Rosenberg, P. B., Premont, R. T., Coffman, T. M., Rockman, H. A., and Lefkowitz, R. J. (2006) *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(44), 16284-16289
52. Drake, M. T., Violin, J. D., Whalen, E. J., Wisler, J. W., Shenoy, S. K., and Lefkowitz, R. J. (2008) *J Biol Chem* **283**(9), 5669-5676

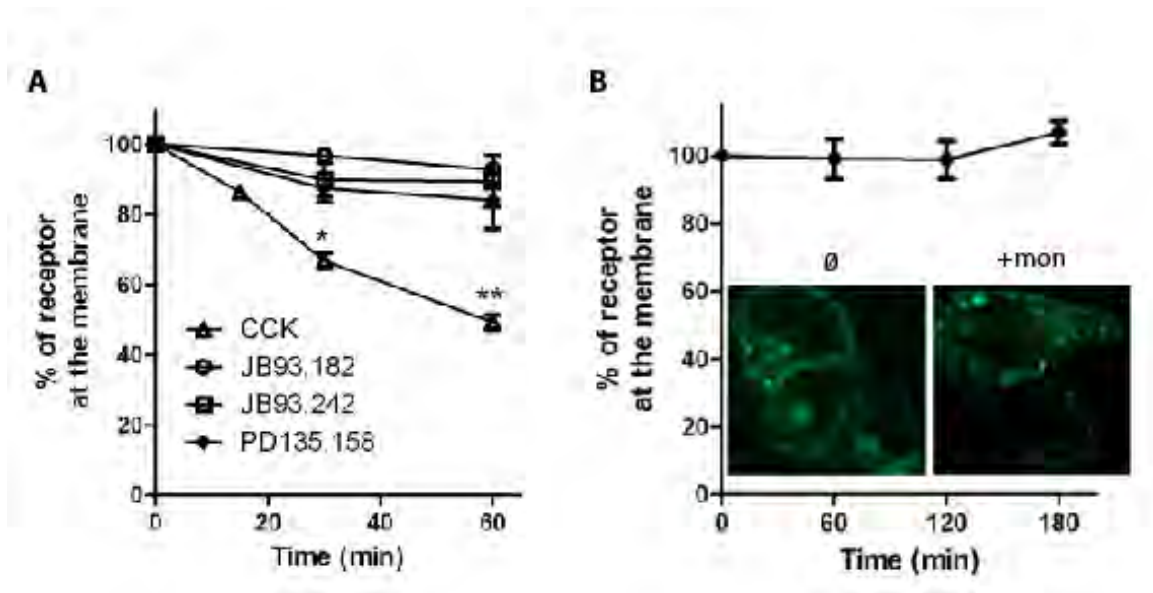


**Fig. 1:** Pharmacological features of the CCK2R expressed in Flp-In™CCK2R-293 cells. Inhibition binding (panel A and B) was carried out by incubating radio-iodinated CCK in the presence of increasing concentration of competitor as described in experimental procedure section. Calculated dissociation constant ( $K_d$ ) for CCK was  $4.8 \pm 1.0$  nM and inhibition constants ( $K_i$ ) were: gastrin:  $13.2 \pm 1.5$  nM; PD135,158:  $11.7 \pm 0.8$  nM; JB93,242:  $40.6 \pm 4.7$  nM; JB93,182:  $4.2 \pm 0.3$  nM. Inositol phosphate production (C) was measured after 60 min of stimulation with CCK or synthetic compounds. Concentrations giving half-maximal production ( $EC_{50}$ ) were: CCK:  $4.0 \pm 0.4$  nM, PD135,158:  $18.0 \pm 0.9$  nM, JB93342:  $17.0 \pm 1.2$  nM. Results are the mean  $\pm$  SEM of 3-5 experiments. In (D), ERK1/2 activation was measured after stimulation with CCK (0.1  $\mu$ M) for various times (upper gel) or with JB93,182, JB932,42 or PD135,158 (10  $\mu$ M) or with CCK (1 nM, 100 nM) for 5 min. Autoradiographies of electrophoresis gels are representative of two others.



**Fig. 2: Confocal microscopy imaging of stimulated CCK2R internalization in HEK cells.**

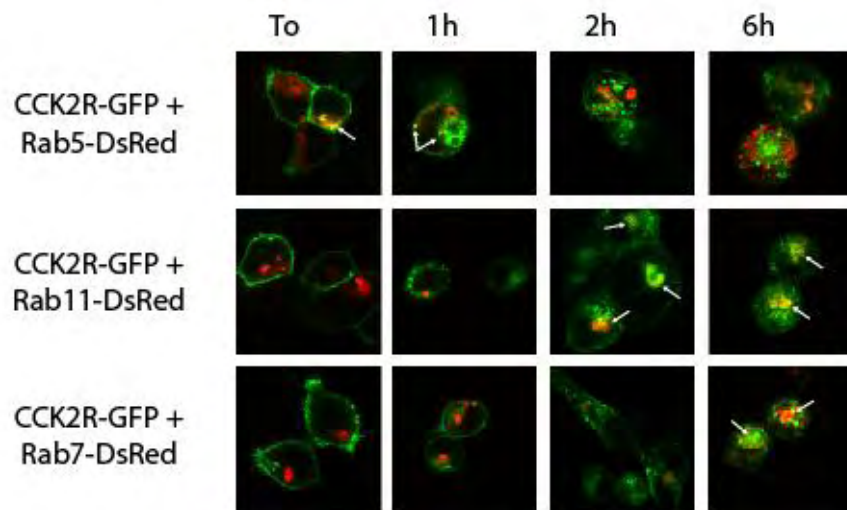
HEK cells were transfected with CCK2R-GFP and were incubated at 37°C with Alexa F 647- CCK for increasing times (top panels) or with different pharmacological agents for 30 min: partial agonists of the CCK2R on inositol phosphate turn-over (PD135,158, JB93,242, 10  $\mu$ M), an inverse agonist (JB93,182, 10  $\mu$ M), the full agonist of the CCK2R (gastrin, 0.1  $\mu$ M) or an antagonist of the CCK1R (SR27,897, 10  $\mu$ M) alone or in combination with 0.1  $\mu$ M CCK (bottom panels). The images show internalization of CCK2R-GFP following stimulation by full agonists CCK and gastrin but not other compounds, including potent partial agonists on inositol phosphate turn-over which behave as antagonists on CCK2R internalization. Merged images show co-localization of Alexa F 647-CCK with CCK2R-GFP over time. Images are representative of at least 3 separate experiments.



**Fig. 3: Quantification of internalization and absence of rapid recycling of CCK2R in HEK cells Flp-In™CCK2R-293.**

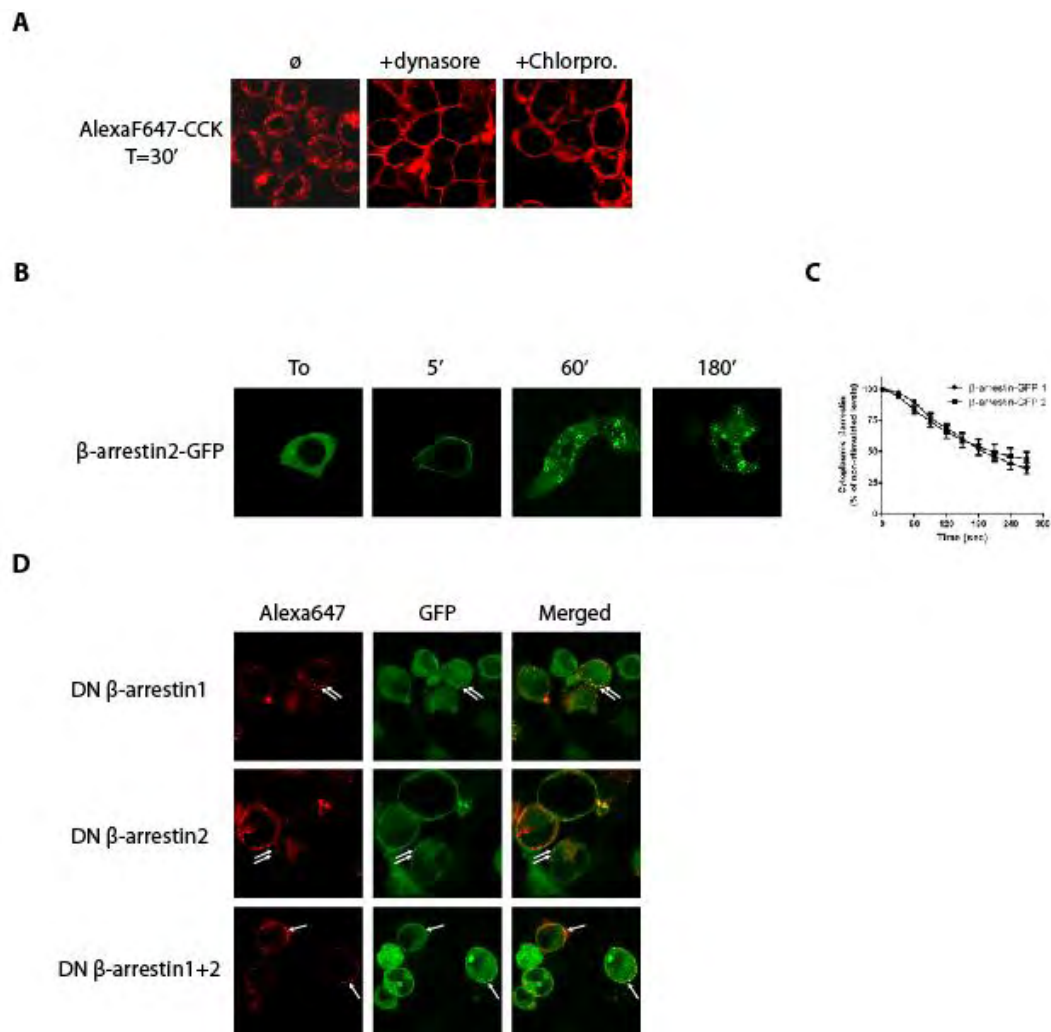
**Panel A:** quantification of internalization. Cells were pre-incubated with CCK (0,1µM) and different pharmacological agents at 37°C for the times indicated and, after washing out non-internalized ligand, were incubated with Alexa F 647-CCK at a saturating concentration (1 µM) for quantification of membrane CCK2R.

**Panel B:** recycling. Cells were treated with CCK (0.1 µM) for 1 hour, washed several times and incubated with Alexa F 647-CCK (1 µM) for 45 min. at 1 hour, 2 hours or 3 hours after the end of CCK stimulation. Confocal microscopy images are inserted to show lack of effect of recycling



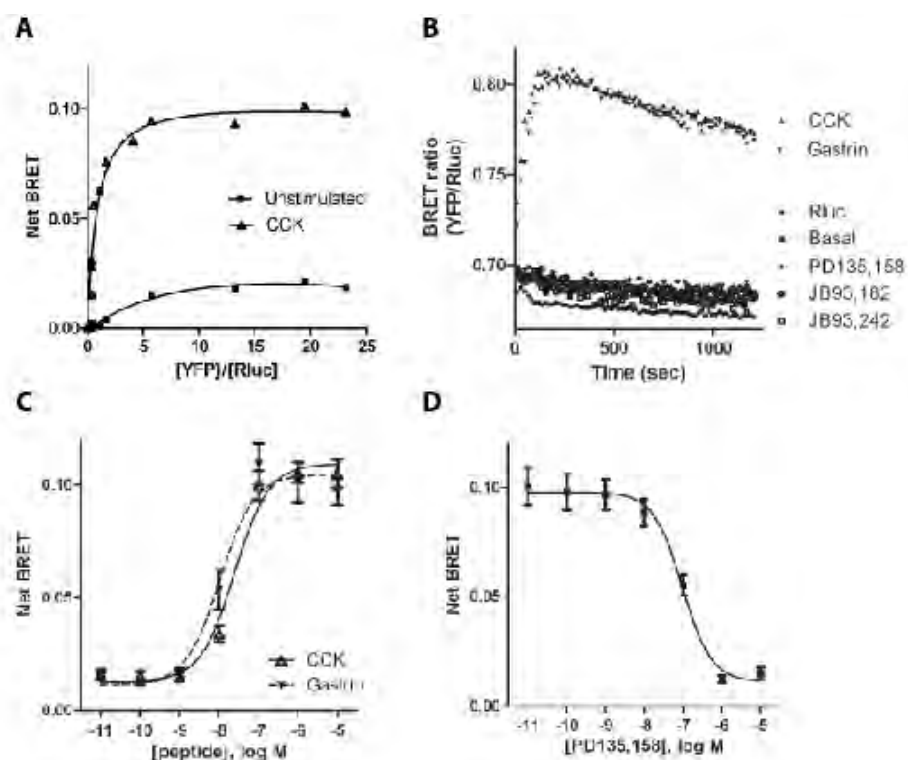
**Fig. 4: Confocal microscopy imaging of intracellular trafficking of internalized CCK2R.**

HEK cells were transfected with cDNA encoding CCK2R-GFP and Rab5-DsRed, Rab11-DsRed or Rab7-DsRed. Images were captured at the times indicated after stimulation by CCK (0.1  $\mu$ M). Arrows show predominant co-localization of CCK2R with Rab5 in early endosomes at initial steps of internalization (T0 and 1 h), whereas strong co-localization with Rab7 in late endosomes was observed at 5-6 hours. Co-localization with Rab11 in recycling endosomes was observed at times longer than 2 h. Each image is representative of 5-7 observations from 3 separate experiments.



**Fig. 5: Confocal microscopy evidence for an involvement of dynamin, clathrin and  $\beta$ -arrestins in CCK-stimulated CCK2R internalization.**

**Panel A:** HEK cells Flp-In<sup>TM</sup>CCK2R-293 were incubated with Alexa F 647-CCK (0.1  $\mu$ M) in the presence of the dynamin inhibitor (dynasore, 80  $\mu$ M) or the inhibitor of clathrin coated-pits formation (chlorpromazine, 50  $\mu$ M). **Panel B:** Flp-In<sup>TM</sup>CCK2R-293 cells transfected with  $\beta$ -arrestin1-GFP or  $\beta$ -arrestin2-GFP were stimulated with CCK (0.1  $\mu$ M) for the times indicated. Images show rapid translocation of  $\beta$ -arrestin2-GFP from cytosol to plasma membrane later followed by appearance of fluorescent labelled vesicles. **Panel C:** measurement of the decrease of cytosolic fluorescence showing that  $\beta$ -arrestin1 or 2-GFP recruitment to the plasma membrane was rapid and identical (50% of decrease at 200 sec.) **Panel D:** Flp-In<sup>TM</sup>CCK2R-293 were transfected with dominant negative  $\beta$ -arrestin1-GFP or/and  $\beta$ -arrestin2-GFP. Confocal microscopy images show that over-expression of dominant negative  $\beta$ -arrestin 1 or 2 significantly altered CCK2R internalization and expression of both  $\beta$ -arrestin 1 and 2 blocked internalization in HEK cells. Images are representative of at least 3 separate experiments.



**Fig. 6: BRET assays showing direct recruitment of  $\beta$ -arrestins to CCK2R stimulated by full agonists but not partial agonists.**

**Panel A)** BRET titration curve for the  $\beta$ -arrestin recruitment to CCK2R was measured in HEK 293 cells expressing a constant amount of CCK2R-Rluc and increasing amounts of  $\beta$ -arrestin2-YFP, stimulated by 0.1  $\mu$ M CCK or not stimulated. Net BRET is expressed as a function of the acceptor/donor ratio and is measured 300 sec after addition of CCK. Specificity of BRET signal between CCK2R-RLuc and  $\beta$ -arrestin2-YFP was confirmed in experiments showing absence of BRET signal expressing both CCK2R-Rluc and free YFP (results not shown).

**Panel B)** Kinetic of  $\beta$ -arrestin2 recruitment to CCK2R after treatment by full agonists CCK and gastrin (0.1  $\mu$ M), partial agonists PD135,158 and JB93,242 (10 $\mu$ M), and inverse agonist JB93,182 (10  $\mu$ M).

**Panel C)** Dose-response curves for CCK- and gastrin-stimulation of  $\beta$ -arrestin recruitment to CCK2R. D) Dose-response curve for inhibition by PD135,158 of CCK-stimulated recruitment  $\beta$ -arrestin recruitment to CCK2R. HEK cells were stimulated for 300 sec by 0.1  $\mu$ M CCK in the absence or in the presence of increasing concentrations of PD135,158 before BRET measurements. Results are expressed as net BRET as described in “experimental procedure” section. Data are the mean  $\pm$  SEM of 4-6 independent experiments, each performed in duplicate.

**Fig. 7: Evidence that the C-terminal region of the CCK2R is critical for  $\beta$ -arrestin recruitment to CCK2R and that this interaction is dispensable for CCK2R internalization.**

**Panel A:** sequence of C-terminal region of the CCK2R and positions where CCK2R was truncated ( $\Delta$ 409-CCK2R,  $\Delta$ 429-CCK2R,  $\Delta$ 439-CCK2R) or mutated (all Ser and Thr residues were substituted in Ala (polyA-CCK2R)).

**Panel B:** Flp-In<sup>TM</sup>  $\beta$ -arrestin2-GFP-293 transfected with CCK2R constructs or Flp-In<sup>TM</sup> 293 cells co-transfected with  $\beta$ -arrestin1-GFP were stimulated with 0.1  $\mu$ M Alexa 647 F-CCK. Images were captured at different times (illustrated for 30 min), showing that although  $\beta$ -arrestin recruitment was almost abolished by C-terminal truncation or mutation of the CCK2R, endocytosis remained abundant and dependent on clathrin coated-pits since it was blocked by chlorpromazine.

**Panel C:** wild-type MEF cells and MEF cells  $\beta$ -arrestin1/2<sup>-/-</sup> expressing the CCK2R were incubated with Alexa F 647-CCK for the times indicated. Images show intensive internalization of the labelled CCK2R in the two cell lines. Immunoblots show absence of  $\beta$ -arrestin1 or 2 in  $\beta$ -arrestin1/2<sup>-/-</sup> MEF cells.

**Panel D and E:** effects of Threonine/Serine single or multiple mutations on CCK-stimulated  $\beta$ -arrestin recruitment to the CCK2R (panel D: dose/response curves, panel E, BRET recruitment induced by 0.1  $\mu$ M CCK). BRET experiments were performed at least in triplicate according to protocole in Fig. 6.

Images are representative of at least 3 separate experiments. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  compared to the wild-type CCK2R.



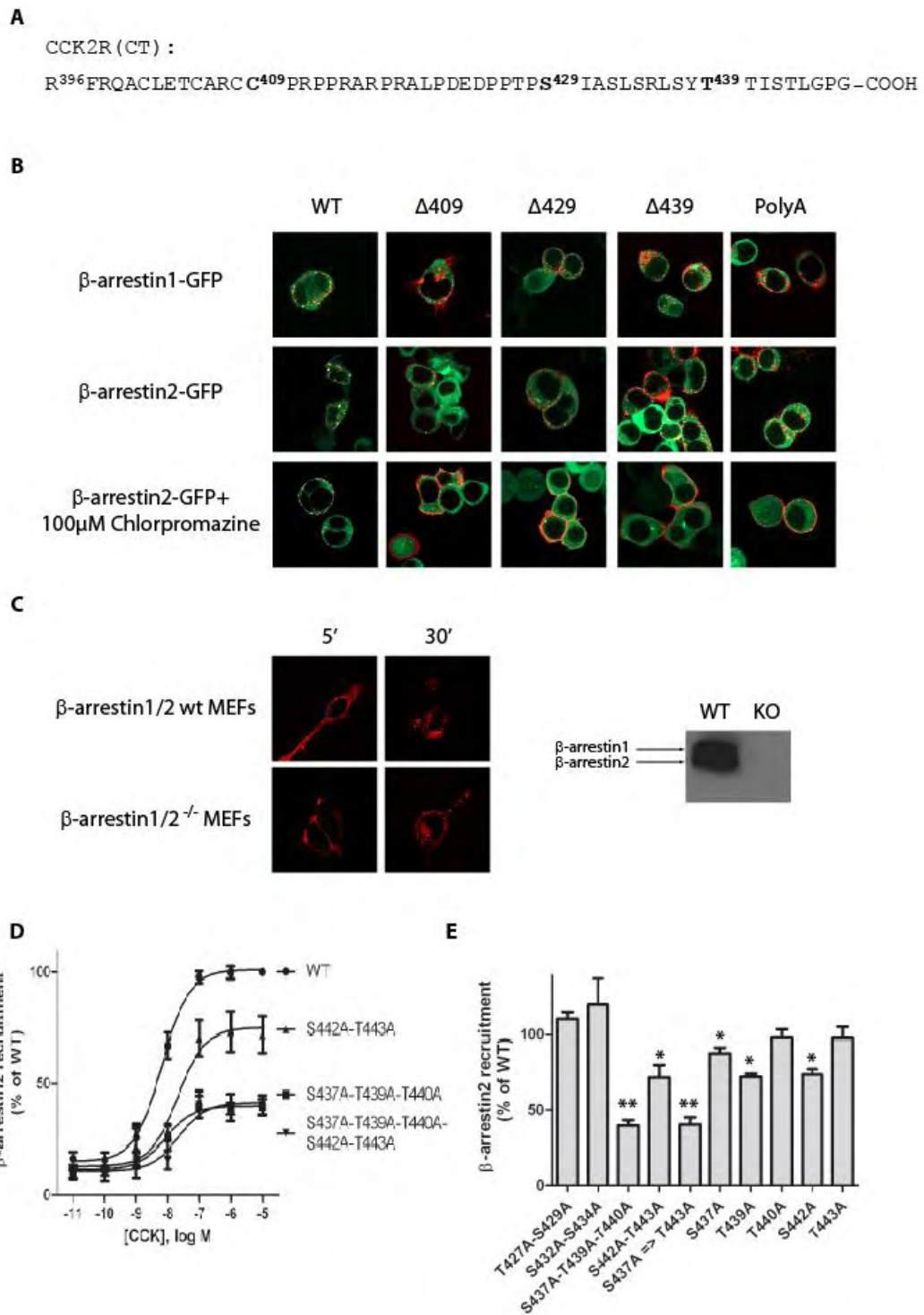
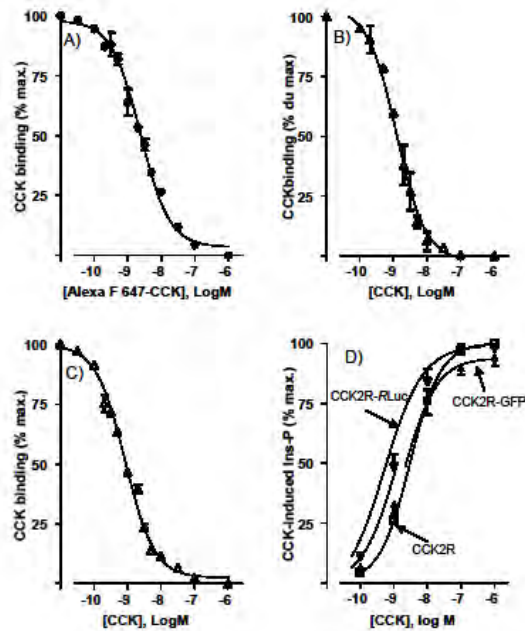
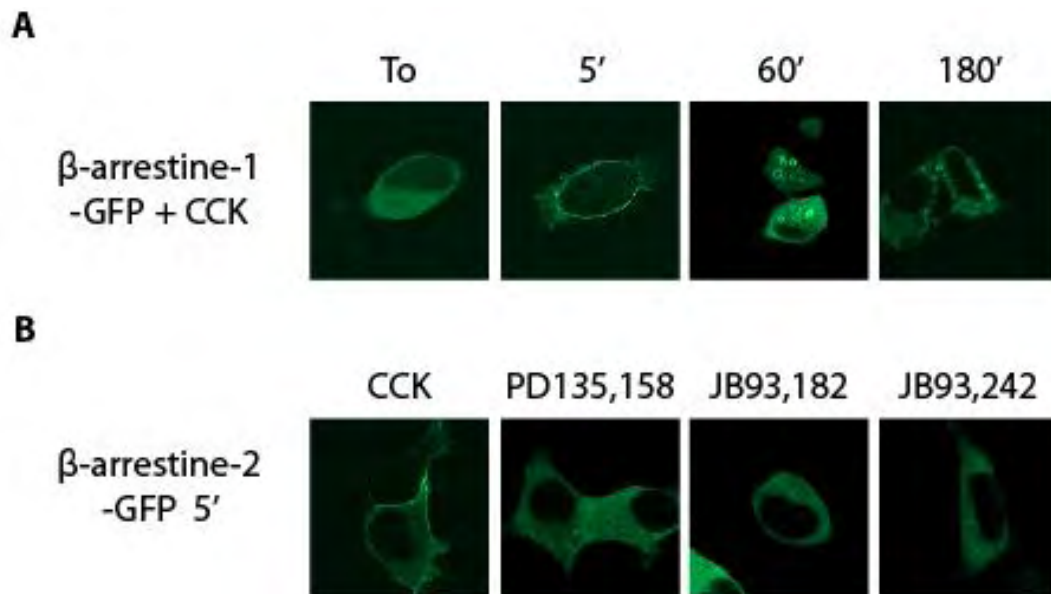


Figure 7

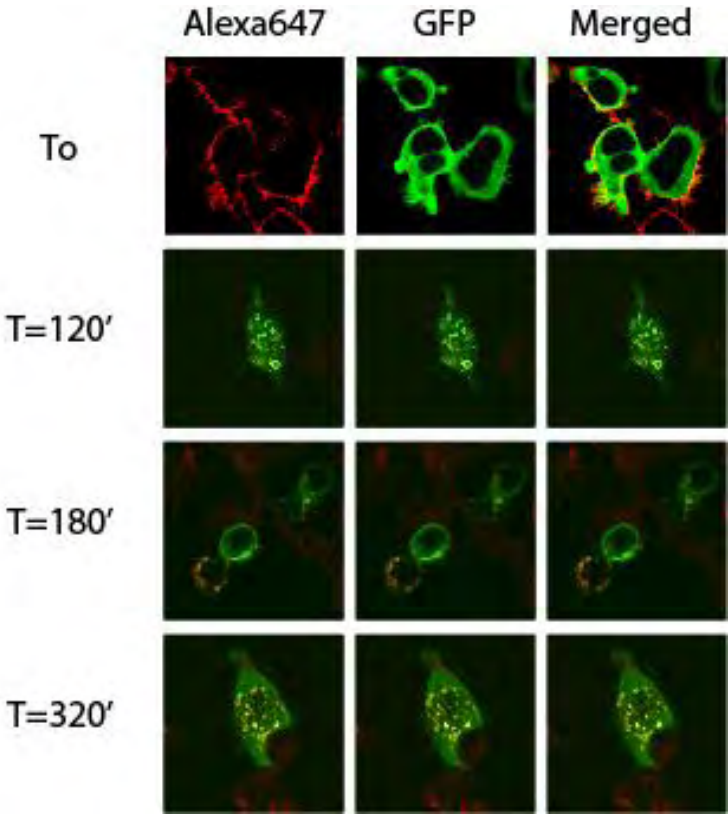


### Supplementary data, Fig. 1: Characterization of pharmacological and biological tools.

**Panel A:** competition binding between  $^{125}\text{I}$ -CCK and Alexa F 647-CCK to CCK2R expressed in HEK 293 cells ( $K_i$ :  $2.4 \pm 0.12$  nM for Alexa F 647-CCK versus  $K_d$ :  $4.8 \pm 1.0$  for CCK). **Panel B:** competition binding between  $^{125}\text{I}$ -CCK and CCK to CCK2R-GFP expressed in HEK 293 cells. CCK2R-GFP bound  $^{125}\text{I}$ -CCK with a dissociation constant ( $K_d$ ) of  $1.15 \pm 0.20$  nM (versus  $1.17 \pm 0.25$  nM for CCK2R). **Panel C:** competition binding between  $^{125}\text{I}$ -CCK and CCK to CCK2R-RLuc expressed in HEK 293 cells. CCK2R-RLuc bound  $^{125}\text{I}$ -CCK with a dissociation constant ( $K_d$ ) of  $0.90 \pm 0.21$  nM. **Panel D:** CCK-stimulated inositol phosphate production in HEK 293 cells expressing the Wild-type CCK2R ( $\text{EC}_{50}$ :  $3.1 \pm 0.4$  nM) or CCK2R-GFP ( $\text{EC}_{50}$ :  $2.0 \pm 0.2$ ) or CCK2R-RLuc ( $\text{EC}_{50}$ :  $1.3 \pm 0.3$  nM). Results are the mean  $\pm$  SEM of 3-4 experiments.



**Supplementary data, Fig. 2:** confocal microscopy evidence for CCK-induced recruitment of  $\beta$ -arrestin1 to CCK2R (**panel A**) and absence of stimulation of this recruitment with PD135,158, JB93,182 or JB93242 (**panel B**). Experimental conditions as in Fig. 5. Images are representative of at least 3 separate experiments



**Supplementary data, Fig. 3:** confocal microscopy evidence for co-localization of Alexa F 647-CCKlabeledCCK2R with  $\beta$ -arrestin-2-GFP during endocytosis and intracellular trafficking.

Supplementary data, table I: Summary of biological potency and efficacy of truncated and mutated CCK2R on CCK-induced inositol phosphate production

\*values were previously determined on Cos-7 cells expressing transiently the CCK2R (17)

All other values were calculated from dose-response curves performed in triplicate on HEK cells expressing transiently CCK2R

	EC <sub>50</sub> (nM)	Emax (% CCK2R)
CCK2R	0.53 ± 0.04	100
CCK2R-RLuc	1.30 ± 0.31	98 ± 1
CCK2R-GFP	2.00 ± 0.23	94 ± 4
Δ409-CCK2R	0.16 ± 0.05	200 ± 8 *
Δ429-CCK2R	0.12 ± 0.04	207 ± 8 *
Δ439-CCK2R	0.22 ± 0.03	166 ± 3 *
T427A- CCK2R	0.73 ± 0.05	97 ± 5
S429A-CCK2R	0.66 ± 0.08	117 ± 14
S432A-CCK2R	0.51 ± 0.05	98 ± 3 *
S434A- CCK2R	0.44 ± 0.04	95 ± 3 *
S437A- CCK2R	0.61 ± 0.08	94 ± 3 *
T439A- CCK2R	0.48 ± 0.03	99 ± 4 *
T440A- CCK2R	0.84 ± 0.08	105 ± 7
S442A- CCK2R	0.48 ± 0.09	111 ± 8
T443A- CCK2R	0.59 ± 0.04	103 ± 14
T427A/S429A-CCK2R	0.47 ± 0.05	125 ± 8
S432A/S434A-CCK2R	0.53 ± 0.08	113 ± 5
S442A/T443A-CCK2R	0.74 ± 0.03	139 ± 9
S437A/T439A/T440A-CCK2R	0.66 ± 0.07	130 ± 15
S437A/T439A/T440A/S442A/T443A-CCK2R	0.62 ± 0.01	178 ± 23
polyA-CCK2R	0.78 ± 0.07	137 ± 5

## IV. Conclusions de l'article I

Cette étude avait pour but de caractériser l'internalisation du récepteur CCK2, ainsi que d'étudier la régulation pharmacologique de ce phénomène par différents ligands. L'internalisation du RCCK2 a été observée grâce à un récepteur CCK2 fusionné à une protéine GFP, stimulé par différents ligands dont une CCK couplée à un fluorophore AlexaFluor647. Une quantification du nombre de récepteurs toujours présents à la membrane après une stimulation par des ligands a été réalisée grâce à une analyse de la liaison de CCK-AlexaFluor647 par cytométrie en flux. La même approche expérimentale nous a également permis de mesurer le recyclage des récepteurs à la membrane après une heure d'internalisation du RCCK2.

Nos résultats montrent, qu'après une stimulation par la CCK ou par la Gastrine, le récepteur CCK2 s'internalise rapidement et de manière abondante dans les cellules. Le ligand semble rester lié au récepteur lors de l'internalisation dans la cellule comme le montre la colocalisation du récepteur CCK2-GFP avec la CCK-AlexaFluor647. Les études de recyclage de cytométrie en flux ou l'utilisation d'un inhibiteur du recyclage, la monensine, montrent que le RCCK2 n'est pas recyclé rapidement à la membrane plasmique. Nous avons donc entrepris de déterminer le trafic vésiculaire emprunté par le RCCK2 lors de son internalisation par l'utilisation des protéines RabGTPases fusionnées à une protéine fluorescente DsRed. Nos résultats montrent que le RCCK2 utilise une voie faisant intervenir des vésicules exprimant Rab5 au début de l'internalisation du récepteur. Puis environ deux heures après la stimulation, le RCCK2 est situé dans des vésicules de recyclage lent, exprimant Rab11. La colocalisation du récepteur avec Rab11 s'étend jusqu'à six heures après stimulation. A partir de cinq à six heures, on détecte également une colocalisation du récepteur avec les Rab7 indiquant qu'une partie des récepteurs est dirigée vers les lysosomes.

Nos résultats démontrent que l'internalisation du RCCK2 est un phénomène dépendant de la petite GTPase dynamine et de la clathrine. En effet, l'utilisation d'un inhibiteur de dynamine, la dynasore, ou d'un inhibiteur des voies dépendantes de la clathrine, la chlorpromazine, provoque une forte inhibition de l'internalisation.

L'implication des  $\beta$ -arrestines dans l'internalisation du RCCK2 a été étudiée. Nos résultats démontrent une interaction directe des deux  $\beta$ -arrestines fusionnées à une protéine YFP avec le récepteur CCK2 fusionné à une *renilla luciferase* par la technique de B.R.E.T qui rend compte d'une distance relative entre ces deux protéines de fusion. Le recrutement des  $\beta$ -arrestine1-GFP et  $\beta$ -arrestine2-GFP du cytoplasme au récepteur membranaire a également été constaté et quantifié en microscopie confocale. Le récepteur recrute les deux

$\beta$ -arrestines avec une affinité similaire. Les  $\beta$ -arrestines-GFP colocalisent avec le ligand CCK-AlexaFluor internalisé, pendant de longues périodes, sous la forme de grosses vésicules. De plus, les  $\beta$ -arrestines contribuent à l'internalisation du récepteur CCK2 puisque la surexpression de dominant négatif des  $\beta$ -arrestines inhibe l'entrée du ligand CCK-AlexaFluor647 dans la cellule. Cependant, l'internalisation du récepteur CCK2 dans des cellules MEF invalidées pour les deux  $\beta$ -arrestines est rapide et également abondante suggérant qu'un mécanisme alternatif se met en place lors de l'absence des  $\beta$ -arrestines. Un tel mécanisme pourrait nécessiter une interaction directe entre le récepteur et un adaptateur comme AP2 ou encore faire intervenir une voie d'internalisation indépendante de la clathrine comme les cavéolines.

Le rôle de l'extrémité C-terminale a ensuite été analysé. Des récepteurs mutants et tronqués ont été créés puis l'internalisation et le recrutement des  $\beta$ -arrestines ont été étudiés. Il apparaît que l'extrémité C-terminale du RCCK2 est particulièrement importante pour le recrutement des  $\beta$ -arrestines, mais beaucoup moins pour l'internalisation du récepteur. En effet, des récepteurs, dont les motifs sérine/thréonine de la partie distale de l'extrémité C-terminale du récepteur sont mutés ou tronqués, voient leur capacité à recruter les  $\beta$ -arrestines fortement affectée, alors qu'ils présentent tous une internalisation prononcée. Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse de la mise en place potentielle de mécanismes alternatifs aux  $\beta$ -arrestines dans l'internalisation du RCCK2. **L'ensemble des résultats obtenus nous permet de qualifier le récepteur CCK2 comme appartenant à la Classe B des RCPG vis-à-vis de l'internalisation.**

Dans le contexte de la découverte récente de l'agonisme biaisé entre l'activation des protéines G et le recrutement  $\beta$ -arrestines, et compte tenu des précédents travaux de l'équipe sur la caractérisation de différents ligands non peptidiques du RCCK2, il nous a semblé important d'étudier les effets de certains ligands non peptidiques sur l'internalisation et le recrutement des  $\beta$ -arrestines. Le JB93,242 et le PD135,158 ont été sélectionnés car précédemment caractérisés comme agonistes partiels sur l'activation de la voie PLC. Le JB93,182 a été sélectionné pour sa très haute similarité de structure avec JB93,242 (un groupement méthyle les différencie) alors qu'il possède une activité agoniste inverse sur l'activation de la voie PLC. Nous avons également caractérisé l'activité de ces trois composés sur l'activation de la voie MAPkinase en réponse au RCCK2. De manière attendue, le PD135,158 et JB93,242 sont agonistes partiels sur la voie des MAPKinase. A notre surprise le JB93,182 possède aussi une activité agoniste partielle sur cette voie. L'étude du recrutement  $\beta$ -arrestines et de l'internalisation du RCCK2 révèle que ces trois composés ne stimulent ni le recrutement des  $\beta$ -arrestines, ni l'internalisation du RCCK2. En revanche, tous les trois inhibent le recrutement des  $\beta$ -arrestines et l'internalisation du

récepteur induit par la CCK. Les composés PD135,158, JB93,182 et JB93,242 sont donc en réalité des ligands biaisés envers la protéine G, puisqu'ils activent des voies dépendantes des protéines G mais agissent en antagonistes sur le recrutement des  $\beta$ -arrestines et l'internalisation du RCCK2.

Cette étude consacrée à l'internalisation du récepteur CCK2 et montre l'existence de ligands biaisés de ce récepteur. D'autres ligands non peptidiques ont été testés au début de travail mais les résultats particuliers sur ceux-ci ont été à l'origine d'une autre étude relaté dans le second article.

Le présent article caractérise en outre les mécanismes de l'internalisation du RCCK2 et montre pour la première fois l'implication des  $\beta$ -arrestines dans ce processus d'internalisation du RCCK2. Ceci pose bien évidemment la question du rôle des  $\beta$ -arrestines dans la signalisation du RCCK2, en particulier dans la voie MAPKinase induite par ce récepteur. Il constitue donc une base prometteuse pour une étude sur la contribution des  $\beta$ -arrestines dans le signal MAPKinase du RCCK2 que nous avons d'ores et déjà initiée, avec des résultats qui sont présentés dans le chapitre « résultats supplémentaires ».







# **Article II**

**TWO DISTINCT CONFORMATIONAL STATES  
OF THE CCK2R ARE ASSOCIATED WITH  
PHOSPHOLIPASE-C ACTIVATION OR  $\beta$ -  
ARRESTIN2 RECRUITMENT**

(En préparation)



## V Introduction de l'article II

La signalisation émise par un RCPG est fortement dépendante de la localisation du récepteur dans la cellule. Les RCPG membranaires émettent un signal qui est transmis par l'intermédiaire des protéines G après une stimulation par un agoniste naturel ou synthétique. L'activation des protéines G, par le RCPG activé, conduit à la désensibilisation du récepteur par un mécanisme faisant intervenir les GRK et les  $\beta$ -arrestines. Les RCPG internalisés sont capables d'activer des voies de signalisation par un mécanisme dépendant des  $\beta$ -arrestines dont notamment la voie des MAPKinases ou la voie PI3kinase. L'importance physiologique du signal des RCPG dépendant des  $\beta$ -arrestines est illustrée par différents exemples présentés dans l'introduction bibliographique.

Plus récemment, des ligands, nommés « ligands biaisés », ont été découverts et peuvent sélectivement activer des voies de signalisation d'un RCPG dépendantes des protéines G ou des  $\beta$ -arrestines. De plus, une étude parue en 2010 sur le récepteur Angiotensine II AT1a, montre le potentiel thérapeutique de l'utilisation des ligands biaisés in vivo [311].

Le RCCK2, est un RCPG qui possède deux ligands naturels, la CCK et la Gastrine. La stimulation du RCCK2 par un agoniste conduit à l'activation de nombreuses voies de signalisation qui sont détaillées dans l'introduction bibliographique. Le RCCK2 est impliqué dans différents processus physiologiques et physiopathologiques qui ont été mentionnés auparavant dans cette thèse. Des travaux antérieurs de l'équipe ont permis de délimiter le site de liaison des ligands naturels et synthétiques au RCCK2 [370] ainsi que de caractériser l'importance de motifs conservés (E/DRY, NPXXY) et d'acides aminés seuls dans la stabilisation de l'état du RCCK2 responsable de l'activation de la phospholipase C (PLC) [35, 363, 381]. Ces données ont permis de comprendre comment deux ligands du RCCK2, JB93,182 et JB93,242, structurellement très proches, stabilisent préférentiellement une conformation inactive ou active du récepteur et sont donc respectivement agoniste inverse et agoniste partiel [376]. Dans le premier article présenté dans cette thèse, nous avons étudié les mécanismes de l'internalisation du RCCK2 induite par la CCK qui font intervenir le recrutement des  $\beta$ -arrestines au récepteur. De manière intéressante, cette étude nous a permis de classer des agonistes partiels sur la voie PLC comme des agonistes biaisés puisque la stimulation du récepteur par ces composés n'induit pas de recrutement des  $\beta$ -arrestines.

Le phénomène d'agonisme biaisé est une conséquence directe du modèle d'activation multi-états des RCPG. Cette capacité des RCPG de pouvoir adopter une

multitude de conformations actives implique de facto l'existence de ligands capables de préférentiellement stabiliser ces différentes conformations. Des études sur les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques ont réussi à démontrer l'existence de conformations distinctes du récepteur spécifiques du ligand utilisé [277, 382]. De plus, très récemment et pour la première fois, un RCPG, le CXCR4, a été cristallisé en présence de son ligand naturel [383]. Cependant, il n'existe pas à ce jour de données expérimentales démontrant qu'une conformation recrutant les  $\beta$ -arrestines est distincte de celle couplée aux protéines G.

Dans cette étude, notre objectif est de déterminer s'il existe un état conformationnel du RCCK2 recrutant les  $\beta$ -arrestines distinct de celui responsable du signal dépendant de la protéine  $G_q$ . Pour ce faire, un volet de l'article concerne l'étude pharmacologique de l'état recrutant les  $\beta$ -arrestines et de l'état activant la voie PLC. L'autre volet de l'article s'attache à montrer d'un point de vue structural que l'état du RCCK2 recrutant les  $\beta$ -arrestines peut être spécifiquement stabilisé par certains acides aminés du récepteur.

## TWO DISTINCT CONFORMATIONAL STATES OF THE CCK2R ARE ASSOCIATED WITH PHOSPHOLIPASE-C ACTIVATION OR B-ARRESTIN2 RECRUITMENT

Rémi Magnan, Chantal Escricut, Fan Niu, Bernard Masri and Daniel Fourmy

INSERM, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unit 858, Institut Fédératif de Recherche, Toulouse, France ; Université de Toulouse 3, Toulouse, France

Running title: a unique conformation of the CCK2R recruits  $\beta$ -arrestin2.

Address correspondence: Daniel Fourmy, Inserm U858-I2MR, 1 avenue Jean Poulhès, BP 84225, Unité 858, 31432 Toulouse cedex 4. Email: Daniel.Fourmy@inserm.fr

Aside its role in desensitization of G-protein mediated signal, internalization through  $\beta$ -arrestin recruitment is a means for GPCRs to trigger signals independent of G-protein coupling. “Biased ligands” activate differentially G-protein dependent and arrestin-dependent signaling pathways. So far, the existence of two distinct cognate conformational states of GPCR is only based on structural data regarding C-terminal tail of GPCRs. Previously, we investigated the mechanism of activation of the CCK2R leading to phospholipase-C stimulation (Ins-P production) and its regulation by ligands (Marco, *J Biol Chem*, 2007). In the current work, we characterized the conformational state of the CCK2R bound to  $\beta$ -arrestin2. Test of CCK2R antagonists for their ability to competitively inhibit recruitment of  $\beta$ -arrestin2-YFP to the CCK2R-Rluc by BRET identified a ligand which was devoid of capability to induce  $\beta$ -arrestin2 recruitment and to inhibit CCK-induced recruitment of  $\beta$ -arrestin2 whereas it competitively inhibited CCK-stimulated Ins-P with a high potency. Furthermore, contribution of residues of TMH previously shown as involved in the binding/activation site of the CCK2R was evaluated on  $\beta$ -

arrestin2 recruitment. Mutants were identified that exhibited differential shifts (Fmut) on CCK-induced-Ins-P and  $\beta$ -arrestin2 recruitment or that stimulated Ins-P production with the same efficacy as the WT-CCK2R but bound weakly  $\beta$ -arrestin2. Mutation of several residues within the orthosteric binding site restored inhibitory action of GV150,013X on  $\beta$ -arrestin2 recruitment. First results on ligand-docking and molecular modelling highlighted crucial importance of several residues from TMH 3, 6 and 7 in the stabilization of CCK2R state recruiting  $\beta$ -arrestin2. To our knowledge, these are the first data showing that conformational states of a GPCR responsible for G-protein coupling or  $\beta$ -arrestin binding can be structurally distinguished at binding site and TMH levels.

Seven-transmembrane-receptors (7TMRs), also termed G-protein coupled receptors (GPCRs) are the most common class of receptors with  $\approx 850$  members identified in the human genome and about 30% of commercialized therapeutic agents targeting only  $\approx 30$  members of this superfamily. Until very recently, biological effects resulting from activation of GPCRs by natural or synthetic

agonists were considered as consecutive from the sole activation of coupled-cognate heterotrimeric G protein that promote intracellular signalling down-stream the membrane receptors. G-protein-dependent signals of GPCRs are regulated according to a general mechanism involving desensitization of membrane receptors followed by their internalization (1). For many GPCRs, desensitization involves receptor phosphorylation by GPCRs kinases (GRK) that selectively phosphorylate serine/threonine residues of agonist-activated receptors. Phosphorylation of the receptors and subsequent binding of nonvisual arrestins cause uncoupling of receptors to G-proteins thus terminating the G-protein-mediated signal. Arrestin-bound receptors are rapidly targeted to the clathrin-coated pits, thereby promoting internalization of receptors (1-4).

Recently, it has been recognized that in addition to its role in down-regulation of G-protein mediated signal and cell responsiveness, internalization through  $\beta$ -arrestin recruitment represents a mean for GPCRs to trigger signaling pathways independent of G-protein coupling (5, 6). Signalling pathways independent of G-proteins, but dependent of  $\beta$ -arrestins such as activation of ERK1/2, Src and PI3K pathways are now considered of physiological relevance (6, 7). Importantly, pharmacological agents, named “biased ligands” or “functionally selective ligands”, have been discovered, which activate differentially G-protein dependent or  $\beta$ -arrestin-dependent signaling pathways (8, 9). Therapeutical benefit of biased activity of ligands has been proposed (8, 10, 11).

The Cholecystokinin (CCK)-2 receptor (CCK2R) is a member of family I of GPCRs, mediating central and peripheral effects of two important structurally related neuropeptides, Cholecystokinin and gastrin (12). Previously, we delineated CCK2R binding site for natural and synthetic ligands (13) and we

characterized the importance of conserved motifs (E/DRY, NPXXY) and individual residues for the stabilization of the state of the CCK2R responsible for the stimulation of phospholipase-C (14-16)(Fig. 1A). This knowledge was applied to understand how two structurally very similar ligands preferentially stabilize inactive or active states of this receptor and therefore display inverse or partial agonist, respectively (17). Very recently, investigations of mechanisms underlying ligand-induced internalization of the CCK2R and recruitment of  $\beta$ -arrestins allowed us to classify partial agonists on  $G_{\alpha q}$ -protein-dependent signal as biased agonists since they were unable to recruit  $\beta$ -arrestins and stimulate CCK2R internalization (Magnan, *J Biol Chem, in press*). The phenomenon of biased agonism is a property of ligand-GPCR complex whereby a GPCR exists in several signalling conformations which are preferentially stabilized by selective ligands (Fig. 1B). Recently, X-ray structure resolution of crystallized liganded-GPCRs has been achieved (18). However, experimental evidences supporting that conformation of GPCR recruiting  $\beta$ -arrestins is distinct to that coupled to heterotrimeric G protein are still lacking.

In the current study, we aimed to determine whether conformational states responsible for  $G_{\alpha q}$ -protein-dependent signal or recruiting  $\beta$ -arrestins are distinguishable at activation and binding site levels which comprise residues from transmembrane helices. For this purpose, we pharmacologically analyzed state of the CCK2R recruiting  $\beta$ -arrestin2 in comparison to that activating phospholipase-C using structurally related and unrelated non-peptide ligands of the CCK2R (19)(Fig. 1C). A non-peptide ligand, which is a competitive antagonist on CCK2R-induced phospholipase-C activation but inefficient on CCK2R-induced  $\beta$ -arrestin2 recruitment was identified. Furthermore, we generated fusion proteins constituted of CCK2R mutants and the BRET



donor Renilla Luciferase (RLuc) in order to monitor recruitment of  $\beta$ -arrestin2 to structurally modified CCK2Rs. Amino-acids in transmembrane helices 3, 6 and 7 were identified as more crucial for CCK2R-induced  $\beta$ -arrestin2 recruitment than for phospholipase-C activation. The mutation of several residues within the CCK2R binding cavity or chemical modification of this antagonist restored its inhibitory capability on CCK2R-induced  $\beta$ -arrestin2 recruitment. These pharmacological and site-directed mutagenesis data and their integration in the modelled structure of CCK2R demonstrate that state of CCK2R recruiting  $\beta$ -arrestin2 is structurally distinct to that responsible for phospholipase-C activation.

### Experimental procedure

*Materials-* Sulfated [Thr28,Nle31]-CCK 25-33 was synthesized as described previously (20) and are referred to as CCK.  $^{125}$ I-Sodium (2000 Ci/mmol) and [myo-3H]inositol (5  $\mu$ Ci/ml) were from GE Healthcare (Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). CCK was conjugated with Bolton-Hunter reagent, purified, and radioiodinated as described previously (21) and is referred to as  $^{125}$ I-CCK. Alexa Fluor 647 labeled-CCK was obtained according to the procedure described recently for Glucose Insulinotropic Polypeptide and was referred to as Alexa F 647-CCK (22).

The following synthetic ligands of the CCK2R were used PD135,158 (23), L365,260 (24) and GV150,013X (25). The cDNAs encoding CCK2R, green fluorescent protein (GFP) tagged CCK2R and *Renilla* luciferase (RLuc) fused CCK2R were generated by subcloning respectively the CCK2R cDNA in pcDNA5/FTR (Invitrogen), pEGFP-N1 (BD biosciences clontech), pRLuc-N1(h) (Perkin Elmer). Yellow fluorescent protein (YFP) tagged  $\beta$ -arrestin2 was a generous gift from

Marc Caron (Duke University Medical Center, Durham, USA). Green fluorescent protein (GFP) tagged  $\beta$ -arrestin2, kindly given by Robert Lefkowitz (Duke University Medical Center, Durham, USA), was subsequently subcloned in pcDNA5/FRT. All mutant receptor cDNAs were constructed by oligonucleotide-directed mutagenesis (Quik Change™ site-directed mutagenesis kit, Stratagene, France) using human CCK2R cDNAs cloned in the pcDNA5/FRT vector as template.

*Cell lines-* HEK 293 cells stably expressing the CCK2R (Flp-In™ CCK2R-293) were obtained using the Flp-In™ system (Invitrogen). Flp-In™ 293 cells containing a FRT (Flp Recombination Target) in their genome were purchased from Invitrogen and cotransfected with pcDNA5/FRT vector carrying CCK2R or  $\beta$ -arrestin2-GFP and the Flp recombinase expression vector pOG44 that mediates integration of the CCK2R-pcDNA5/FRT vector into the genome via Flp Recombination Target (FRT) sites. Cells that acquired the CCK2R-pcDNA5/FRT vector were selected using hygromycin B (100 $\mu$ g/ml, Sigma). Flp-In™ 293 cells, HEK 293 T cells, and Flp-In™ CCK2R-293 cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's medium supplemented with 10% of FBS, in a humidified atmosphere at 95% air and 5% CO<sub>2</sub>.

*Receptor binding assay using radio-labeled CCK-* Cells were plated onto 10-cm culture dishes and grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% FBS in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37 °C. After overnight incubation, cells were transfected with 1  $\mu$ g/plate (excepted when mentioned) of pcDNA5/FRT, pEGFP-N1 and pRLuc-N1 (h) vectors containing the cDNA for the wild-type or mutated CCK2Rs using a Fugene® 6 transfection reagent (Roche). Cells were transferred to 24-well plates 24 h after

transfection. HEK 293 cells stably expressing CCK2R (Flp-In<sup>TM</sup>CCK2R-293) were directly plated onto 24-well plates. Approximately 24 h after transfer to 24-well plates, binding assays were performed using <sup>125</sup>I-CCK according to the protocol previously described in detail (17). Receptor density (Bmax) and *K<sub>d</sub>* were calculated from homologous <sup>125</sup>I-CCK competition binding experiments using Ligand software (Kell, Cambridge, UK). *K<sub>i</sub>* for competitors were calculated using the non-linear curve fitting software GraphPad Prism (San Diego, CA).

*Receptor binding assay by flow cytometry-* Flp-In<sup>TM</sup>CCK2R-293 cells were plated onto poly-L-lysine (Sigma-Aldrich) coated 6-wells plates and grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% FBS in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37 °C. After overnight incubation, cells were incubated with Alexa F 647-CCK (0.1 μM) alone or in the presence of competitors in DMEM/HEPES (20mM) for 1 hour at 37°C. Following incubation, cells were washed 3 times with cold PBS. Cell-associated fluorescence was determined using a BD FACSCalibur<sup>TM</sup> flow cytometer, with Flp-In<sup>TM</sup> 293 that do not express CCK2R as a negative control.

*Inositol Phosphate Production Assay-* Cells were plated onto 10-cm culture dishes and grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% FBS in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37 °C. After overnight incubation, cells were transfected with 1 μg/plate (excepted when mentioned) of pcDNA5/FRT, pEGFP-N1 and pRluc-N1(h) vectors containing the cDNA for the wild-type, mutated CCK2 receptors or β-arrestin1 and β-arrestin2 using a Fugene® 6 transfection reagent (Roche). Cells were transferred to 24-well plates 24h after transfection. HEK 293 cells stably expressing

CCK2R (Flp-In<sup>TM</sup>CCK2R-293) were directly plated onto 24-well plates. Approximately 24 h after transfer to 24-well plates and after overnight incubation in DMEM containing 2μCi/ml of myo-[2-3H]inositol (specific activity, 10–25 Ci/mmol, PerkinElmer Life Sciences), Inositol phosphate production was determined as described previously (17).

*Confocal fluorescence microscopy-* Flp-In<sup>TM</sup>CCK2R-293, and Flp-In<sup>TM</sup> 293 cells were plated onto poly-L-lysine (Sigma-Aldrich) coated 4-wells Lab-Tek chambered coverglass (#155383, Nunc) and grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% FBS in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37 °C. After overnight incubation, cells were transfected with 0.5μg/well of pcDNA5/FRT containing cDNA encoding GFP tagged CCK2R or mutated CCK2R, β-arrestin2-GFP using a Fugene® 6 transfection reagent (Roche). 24h after transfection, the DMEM medium was replaced by Phosphate Buffered Saline (PBS) calcium and magnesium free prior to stimulation. Cells were stimulated with appropriate ligand, and images of GFP, were collected by using single line excitation (488 nm) on a Zeiss Laser Scanning Microscope (LSM-510).

*BRET studies-* HEK 293 T or Flp-In<sup>TM</sup> 293 cells were plated onto 10-cm culture dishes and grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% FBS in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37 °C. After overnight incubation, cells were transfected with 0.2μg of Rluc tagged CCK2R (wild type or mutants) and 10μg of β-arrestin2 using polyethylenimine (PEI) transfection reagent (Polyplus). 24 h after transfection cells were plated in 96-wells clear bottom plates (Corning) at a density of 100.000 cells per well in phenol red free DMEM. After overnight incubation, the phenol red free medium was removed from HEK293T cells

and replaced by Phosphate Buffer Saline (PBS). The BRET assay was started by adding 10  $\mu$ l of the cell-permeant substrate specific for Renilla luciferase, coelenterazine h to the well to yield a final concentration of 5  $\mu$ M. The agonist/antagonist activity of the compounds was measured by adding those 5 min after or 30 min before the Rluc substrate. Records started 10 min after the addition of Rluc substrate. BRET experiments were performed at room temperature in a Mithras LB940 instrument (Berthold) that allows the sequential integration of the signals detected in the 465 to 505nm and 515 to 555 nm windows using filters with the appropriate band pass and by using MicroWin 2000 software. For titration experiments, the acceptor/donor ratio was calculated as described previously (26). For time course analysis of the interactions between CCK2R and  $\beta$ -arrestin1/2 interactions, coelenterazine H was added 10 min before the addition of PBS, CCK or compounds. Readings were then collected at 12.5 seconds intervals for the next 20 min.

## RESULTS

*CCK2R state recruiting  $\beta$ -arrestin2 is insensitive to a competitive antagonist on CCK2R state activating phospholipase-C.* The CCK2R couples to G $\alpha$ q following CCK or gastrin stimulation (14). We used inositol phosphate measurements to account for this G $\alpha$ q-dependent signal in HEK cells. We recently showed that accumulation of inositol phosphates was time- and concentration-dependent (Magnan, *J Biol Chem, in press*). The state of the CCK2R responsible for G $\alpha$ q-dependent stimulation of phospholipase-C was named CCK2R\* (Fig. 1B). On the other hand, following CCK stimulation,  $\beta$ -arrestin2 was rapidly recruited to the CCK2R as demonstrated by translocation of  $\beta$ -arrestin2-GFP from the cytoplasm to the plasma membrane, and specific increase of BRET signal between CCK2R-RLuc and  $\beta$ -arrestin2-

YFP (Magnan, *J Biol Chem, in press*). BRET kinetics and co-localization images indicated that complexes formed between CCK2R and  $\beta$ -arrestin2 were stable over the time (Magnan, *J Biol Chem, in press*). The state of the CCK2R recruiting  $\beta$ -arrestin2 was termed CCK2R $^{\beta}$  (Fig. 1B).

In our attempt to pharmacologically distinguish CCK2R states coupled to G $\alpha$ q or recruiting  $\beta$ -arrestin2, (CCK2R\* and CCK2R $^{\beta}$ , Fig.1B), we studied in detail the ability of 3 ligands of the CCK2R to inhibit CCK-stimulated production of inositol phosphates or  $\beta$ -arrestin2 recruitment in HEK cells. Inositol phosphate production stimulated with 10 nM CCK was dose-dependently inhibited by PD135,158, L365,260 and GV150,013X (Fig. 2A). Strikingly,  $\beta$ -arrestin2 recruitment to the CCK2R was dose-dependently inhibited by PD135,158 and L365,260 but not by GV150,013X suggesting that GV150,013X was unable to compete with CCK to CCK2R $^{\beta}$  state recruiting  $\beta$ -arrestin2 (Fig. 2B). We further characterized pharmacological features of L365,260 and GV150,013X which are two structurally related compounds, and PD135,158 a pseudo-peptidic ligand, by performing Schild plot analysis of inhibition. As illustrated on Fig. 3, CCK dose-response curves for inositol phosphate production were rightward shifted in the presence of increasing concentrations of PD135,158, L365,260 or GV150,013X and reached the same maximal response. Schild plot analysis of these results yielded pA<sub>2</sub> values of 7.82, 7.46, and 7.38 respectively. CCK dose-response curves for BRET were also rightward shifted in the presence of increasing concentrations of PD135,158 or L365,260 giving pA<sub>2</sub> of 7.79 and 8.15, respectively. These data strongly support that L365,260 and PD135,158 inhibit both CCK-induced phospholipase-C activation and  $\beta$ -arrestin2 recruitment by/to the CCK2R in a competitive fashion and with close potencies. These results are in agreement with those which previously showed binding of these ligands to the orthosteric binding site of

the CCK2R\* (19). In contrast, GV150,013X remained unable to affect CCK-stimulated BRET signal due to recruitment of  $\beta$ -arrestin2 to the CCK2R, thus confirming the absence of inhibition observed in experiments from Fig. 2B.

We next examined whether possible differences in binding kinetics of CCK and GV150,013X to the CCK2R $^{\beta}$  could explain the lack of inhibition of GV150,013X on BRET signal. For this purpose, we pre-incubated L365,260, GV150,013X or PD135,158 with HEK cells expressing the CCK2R for 30 min before the addition of CCK. We found (supplementary data, Fig. 1). GV150,013X did not shift CCK stimulatory curves but dose-dependently decreased maximum BRET responses. This pattern of effect suggests that GV150,013X does not interact directly with CCK2R $^{\beta}$  recruiting  $\beta$ -arrestin2 but instead prevented conversion of the CCK2R from a conformational state (CCK2R\* or CCK2R $^{\circ}$ ) sensitive to GV150,013X but not recruiting  $\beta$ -arrestin2, to a conformational state insensitive to GV150,013X and recruiting  $\beta$ -arrestin2 (CCK2R $^{\beta}$ , Fig. 1B).

We investigated whether a population of CCK2R insensitive to GV150,013X but sensitive to PD135,158 or L365,260 could be identified in HEK cells by performing binding experiments using radio-labelled CCK or fluorescent CCK.  $^{125}$ I-CCK binding to HEK cells expressing the CCK2R revealed a single affinity class of binding sites having a dissociation constant of 1,37 nM. This binding was dose-dependently and fully inhibited by PD135,158, L365,260, or GV150,013X with IC<sub>50</sub> of 4.06 nM, 9.19 nM and 3.60 nM, respectively (Fig. 4A). In line with these results, binding of Alexa F 647-CCK (used at 100 nM) to HEK cells was dose-dependently and fully inhibited by PD135,158 or L365,260 (Fig. 4B). In contrast, this binding was only partially inhibited by GV150,013X as a fraction of binding representing 30% of total binding remained not displaced in the presence

of 10  $\mu$ M GV150,013X. This fraction of GV150,013X-insensitive CCK binding was however fully displaced in the presence of PD135,158, L365,260 or YM022 (only shown for YM022, Fig. 4C). Hence, CCK2R binding sites presenting a low affinity for CCK and unable to bind GV150,013X are identified in HEK cells. These CCK2R binding sites likely corresponded to CCK2R $^{\beta}$  state recruiting  $\beta$ -arrestin2.

We further pharmacologically explored CCK2R $^{\beta}$  binding sites recruiting  $\beta$ -arrestin2 but insensitive to GV150,013X by looking at CCK2R internalization as CCK2R-induced  $\beta$ -arrestin2 recruitment is a molecular event involved in receptor internalization and trafficking (Magnan, *J Biol Chem, in press*). We found that PD135,158 or L365,260 efficiently inhibited CCK-induced internalization of GFP tagged CCK2R whereas GV150,013X did not inhibit it (Fig. 5). However, when added 30 min before CCK, GV150,013X at a supramaximal concentration inhibited internalization of the GFP tagged CCK2R, which is in agreement with the action of GV150,013X on displacement of the equilibrium towards CCK2R\* and CCK2R $^{\circ}$  states (Fig. 1B).

Together, these convergent pharmacological and binding data support the conclusion that CCK2R $^{\beta}$  responsible for  $\beta$ -arrestin2 recruitment and CCK2R internalization do not bind to GV150,013X at the difference of PD135,158 and L365,260 which can act on CCK2R $^{\beta}$  as competitive antagonists.

*Mutations within activation and binding sites of the CCK2R affect differentially G-protein dependant signal or  $\beta$ -arrestin2 recruitment.* The above pharmacological results support that structure of CCK2R orthosteric site was different in CCK2R\* state activating phospholipase-C and CCK2R $^{\beta}$  state recruiting  $\beta$ -arrestin2. Moreover, we previously

identified amino acids of the CCK2R involved in the stabilization of CCK2R<sup>o</sup> and CCK2R\* states (16). Since most of these amino acids are located in transmembrane helices within or near the orthosteric binding site of the receptor, we hypothesized that they could also participate in the conversion from the CCK2R\* state to the CCK2R<sup>β</sup> state. In order to verify this hypothesis, we compared the effect of the mutation of these amino acids on phospholipase-C activation and β-arrestin2 recruitment. Results from CCK-stimulated dose-response curves for CCK2R mutants bearing Rluc moiety at the receptor C-terminus are listed in table 1 (see also Fig. 6 and Fig. 2, supplementary data). In agreement with the contribution of several residues in the recognition of CCK by the CCK2R (12)(Fig. 1A), several mutants responded to CCK with decreased potencies relative to the wild-type CCK2R (Fmut values). Strikingly, the mutation of residues Met134, His207, Trp346, Asn353, Arg356, His376 and Tyr380 affected differently potency of CCK to stimulate phospholipase-C or recruit β-arrestin2. Indeed, the exchange of these amino acids for an alanine caused shifts of CCK potency on phospholipase-C activation of 4.1, 85, 10.7, 87.1, 63.5, 358 and 88.9-fold, respectively, whereas it caused shifts in CCK potency on β-arrestin2 recruitment of 1.4, 16.1, 2.4, 18.7, 10.4, 38.0 and 12.4-fold, respectively. This suggests that these amino acids contributed less to recognition of CCK by CCK2R<sup>β</sup> relative to CCK2R\*. All CCK2R mutants stimulated activation of phospholipase-C with the same efficacy as the wild-type CCK2R as maximal responses were not significantly different. In contrast, mutants M134A-, W346A-, H207A, N353A-, R356A-, H376A- and Y380A-CCK2R stimulated recruitment of β-arrestin2 with significant decreased efficacies (net BRET) relative to the wild-type CCK2R. These decreases in net BRET were confirmed by titration curves carried out with CCK2R mutants M134A, W346A, H376A and Y380A. Indeed, values for BRET max (net BRET in the presence of a saturating

concentration of β-arrestin2-YFP) representing 46, 58, 78 and 57% of the value achieved with the wild-type CCK2R were obtained (Fig. 3 supplementary data). Importantly, BRET<sub>50</sub> values (ratio β-arrestin2-YFP/CCK2R-Luc giving 50% of maximum BRET) only slightly changed. Furthermore control experiments indicated that expression level of all mutants (excepted T111A, W346A) measured by quantification of the RLuc luminescence represented between 80 and 110% of that for the wild-type CCK2R (Fig. 4, Supplementary data). These mutagenesis data strongly support that amino acids Met134 of helix III, Trp346, Asn353 and Arg356 of helix VI, and His376, Tyr380 of helix VII are preferentially involved in the stabilization of the CCK2R<sup>β</sup> state.

Since the mutation of certain amino acids within or near the binding site of the CCK2R modified ability of the receptor to recruit β-arrestin2, we evaluated whether these mutations could modify the ability of ligands such as PD135,158, L365,260 and GV150013X to interfere with β-arrestin2 recruitment induced by CCK. As illustrated on Fig. 7, GV150013X which was unable to inhibit recruitment of β-arrestin2 to the wild-type CCK2R partially inhibited β-arrestin2 recruitment to mutants M186A-, L222A-, N353A-, T354A- and R356A-CCK2R. Activity of L365,260 and PD135,158 on these mutants remained unchanged and the mutation of other amino acids of the binding/activation sites did not change the activity of CCK2R ligands (Fig. 5, Supplementary data).

## DISCUSSION

In this study we explored the conformational state of the CCK2R which recruits β-arrestin2. This study was initiated following the finding that two partial agonists, PD135,158 and JB93,242 on CCK2R-induced inositol phosphate formation and Extracellular signal-Regulated kinase 1/2 (ERK1/2) phosphorylation could not stimulate CCK2R-

internalization or  $\beta$ -arrestin recruitment to the CCK2R but blocked full-agonist induced internalization and  $\beta$ -arrestin recruitment. To explain this result, we proposed that conformations of the CCK2R stabilized by CCK or by the two partial agonists are distinct and promote phospholipase-C with different efficacies, but only the state stabilized by the full agonists CCK or gastrin is able to promote  $\beta$ -arrestin recruitment (Magnan, *J Biol Chem, in press*). However, the view whereby the CCK2R can adopt a conformation recruiting  $\beta$ -arrestin distinguishable from that activating phospholipase-C needed a clear demonstration.

Here, we provided converging pharmacological and structural data which represent strong proofs that CCK2R state recruiting  $\beta$ -arrestin2 (termed CCK2R <sup>$\beta$</sup> ) is structurally distinct from CCK2R state responsible for phospholipase-C though G $\alpha$ q coupling (termed CCK2R\*), as differences were demonstrated at the orthosteric binding site formed by transmembrane helices of the receptor. To our knowledge, such data have never been reported before.

BRET results showed that CCK-induced formation of CCK2R <sup>$\beta$</sup>  was competitively reversed by the two structurally unrelated ligand PD135,158 and L365,260 but not by GV150,013X, whereas CCK-stimulation of CCK2R\* was competitively reversed by the three ligands. The competitive nature of the three ligands on CCK2R\* fits with previous data indicating that these compounds occupy a part of the orthosteric binding site on the CCK2R\* and overlap binding site of CCK (19). The existence of a unique CCK2R <sup>$\beta$</sup>  conformation was further supported by findings showing binding of CCK to a fraction of CCK2R binding sites which could not bind GV150,013X; in line with this result, GV150,013X was unable to competitively block CCK-induced CCK2R internalization which is a process previously demonstrated to involve  $\beta$ -arrestins (Magnan, *J Biol Chem, in press*).

Site-directed mutagenesis results showed that certain amino acids of the orthosteric binding site contributed less to recognition of CCK by CCK2R <sup>$\beta$</sup>  relative to recognition by CCK2R\*. These were His207, Trp346, Asn353, Arg356, His376 and Tyr380. Strikingly, each of these amino acids was required to fully stabilize CCK2R <sup>$\beta$</sup>  by CCK since mutation of the amino acids strongly diminished (40 to 50%) maximum  $\beta$ -arrestin2 binding to the CCK2R measured by BRET. Moreover, Met134, a residue of helix III, recognized as of minor importance for binding of CCK (16), appeared as crucial for stabilization of CCK2R <sup>$\beta$</sup>  by CCK, as maximum recruitment of  $\beta$ -arrestin2 by this mutant reached 34-46% of that of the wild-type CCK2R. It is worthy to note that binding affinity of  $\beta$ -arrestin2 for the CCK2R was not significantly affected by M134A mutation.

Decreases of maximum BRET observed with CCK2R mutants can be interpreted as reflecting an increase of the distance between or relative orientation of, RLuc and YFP moieties sited on C-terminal end of the CCK2R and  $\beta$ -arrestin2, respectively. Alternatively, BRET decreases can reflect smaller amounts of  $\beta$ -arrestin2-YFP bound to CCK2R-RLuc. Preliminary experiments aimed at quantification of the recruitment of  $\beta$ -arrestin2-GFP to the wild-type and mutated CCK2R by confocal microscopy showed a decrease of  $\beta$ -arrestin2 recruitment to the plasma membrane of cells expressing M134A-CCK2R (not illustrated). Therefore, BRET drops observed with some mutants most likely resulted from changes in the CCK2R conformation causing a loss of its capability to bind  $\beta$ -arrestin2, but not couple to G $\alpha$ q. Such selective effects of mutations support the view that exists two distinct conformational states of the CCK2R, the CCK2R\* activation phospholipase-C and the CCK2R <sup>$\beta$</sup>  recruiting  $\beta$ -arrestin2. These two states are distinguishable by GV150,013X.

Decreases of  $\beta$ -arrestin2 recruitment to mutated CCK2R must be examined in light of our current knowledge regarding the molecular basis whereby  $\beta$ -arrestins bind to agonist-activated GPCRs. Indeed, for many GPCRs, G-protein-dependent signal triggered by agonist binding is immediately followed by action of GPCRs kinases (GRK) that selectively phosphorylate serine/threonine residues of the agonist-activated receptors. Phosphorylation of the receptors causes subsequent binding of nonvisual arrestins. Experimental and structural data from the literature support a mechanism of binding involving multiple sites of interaction on both the receptor and  $\beta$ -arrestins. These binding sites were termed “activation-recognition” and “phosphorylation-recognition” sites (27, 28). Experimental data from this study on the CCK2R indicating that mutations in helices III, VI and VII affected selectively CCK-induced recruitment of  $\beta$ -arrestin2 can therefore be interpreted as a result of modifications of activation-recognition or phosphorylation-recognition sites on the CCK2R, or both. According to previous site-directed mutagenesis data, and as found for many GPCRs, phosphorylation of serine and threonine residues of the C-terminal region of the CCK2R is required for full recruitment of  $\beta$ -arrestin2 (27) (Magnan, *J Biol Chem*, *in press*).

Another important issue raised by this study concerns the role of residue Met134 which is not important for binding of CCK and CCK-induced phospholipase-C activation but which is crucial for CCK-induced  $\beta$ -arrestin2 recruitment. Previously, Met134 was identified as a residue playing a central role in the conversion from CCK2R<sup>o</sup> to CCK2R<sup>\*</sup>. In the CCK2R<sup>o</sup>, Met134 side-chain forms a network of interactions with side-chains of Tyr380 and His376 which have been identified as important amino acids of the CCK2R binding site, strongly contributing to stabilization of the CCK-induced CCK2R<sup>\*</sup>. Additionally, Met134 participates in the relative position of

helix VI to helix III through hydrophobic interactions with Trp346, a conserved residue which rotates during conversion from CCK2R<sup>o</sup> to CCK2R<sup>\*</sup>. Strikingly, all these amino acids are individually key contributors of  $\beta$ -arrestin2 recruitment indicating that, for its stabilization, CCK2R<sup>o</sup> conformation requires all interactions between CCK pharmacophore and amino acids of orthosteric binding site of the CCK2R, with Met134 contributing to maintenance of the network of interaction. This conclusion may explain why partial agonists on CCK2R-induced phospholipase-C activation such as JB93,242 and PD135,158 are unable to induce recruitment of  $\beta$ -arrestin2: due to their small size, these compounds interact with a limited number of determinants within the binding site that is not sufficient to stabilize CCK2R<sup>o</sup> conformation (see Fig. 8). In line with such an hypothesis, we suggest that determinants required for binding of GV150,013V in the orthosteric binding site in the CCK2R<sup>\*</sup> are not anymore available or do not present a correct geometry for it binding with a sufficient affinity in the CCK2R<sup>o</sup> state. The reason why amino acids such as Met186, Leu222, Asn353, Thr354 and Arg356 rescued partly ability of GV150,013X to compete on CCK2R<sup>o</sup> state will need further investigations using molecular modeling.

Obviously, current results supporting the existence of the two distinct conformations of the CCK2R, one responsible for G $\alpha_q$ -dependent activation of phospholipase-C and one responsible for  $\beta$ -arrestin2 will be reinforced by future works. Firstly, the intrinsic efficacy of all mutants to recruit  $\beta$ -arrestin2 will be determined by BRET and confocal microscopy. Secondly, phosphorylation of mutated CCK2R exhibiting decreases in  $\beta$ -arrestin2 recruitment will be assayed. Finally, structural modifications of GV150,013X are being carried out in order to related structure of this compound to its ability to distinguish different states of the CCK2R, especially CCK2R<sup>\*</sup> and CCK2R<sup>o</sup> states.

To our knowledge, there is no precedent demonstrating conformation of a GPCR responsible for G-dependent signalling differs to that recruiting  $\beta$ -arrestin2 at the orthosteric binding site formed by transmembrane helices of the receptor. However, direct evidence that related biased activity of ligands with different positions of the C-terminal region of the  $\beta$ 2-adrenergic receptor relative to the bottom of helix VI was reported (29). The investigators used fluorescence resonance energy transfer (FRET) to detect ligand-induced structural changes in the distance between two positions on the beta(2)-AR C-terminus and cysteine 265 at the cytoplasmic end of helix VI. All ligands induced an increase in FRET between the proximal C-terminal FAsH site and Cys-265. Interestingly ligands known to induce arrestin-dependent ERK activation, including the catecholamine agonists and the inverse agonist IC1118551 caused a decrease in FRET between the distal FAsH site and Cys-265, whereas other ligands had no effect or induced a small increase in FRET. The authors concluded that ligand-induced conformational changes may be relevant to arrestin-dependent regulation and signaling (29). On the other hand, evidence was provided that beta-arrestin can adopt multiple "active" conformations and phosphorylation-deficient mutants of the receptors are also capable of directing similar conformational changes in beta-arrestin as is the wild-type receptor (30).

In conclusion, this study provided pharmacological and structural evidences that a GPCR, the CCK2R can adopt two distinct conformations to either trigger G-protein signaling or beta-arrestin2 recruitment. These conformations are distinguishable at the orthosteric binding site which comprises transmembrane helices. These findings may have future impact as it can be anticipated that CCK2R-induced recruitment of beta-arrestin2 most likely contributes to signaling in physiological or pathophysiological contexts.

## FOOTNOTES

We greatly appreciate the gifts of plasmids encoding YFP tagged  $\beta$ -arrestin2, from Marc Caron (Duke University Medical Center, Durham, USA) as well as GFP tagged  $\beta$ -arrestin2 from Robert Lefkowitz (Duke University Medical Center, Durham). We thank Dr Romina D'Angelo for assistance and advice with imaging (*Cellular Imaging Facility IFR150-Ranguel/TRI Plateform*). The work was supported by Grants from Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC N° 4870) and Ligue Nationale Contre le Cancer (comité 31). Bernard Masri was recipient of a European Marie Curie outgoing international fellowship (FP6-2005-Mobility 6).

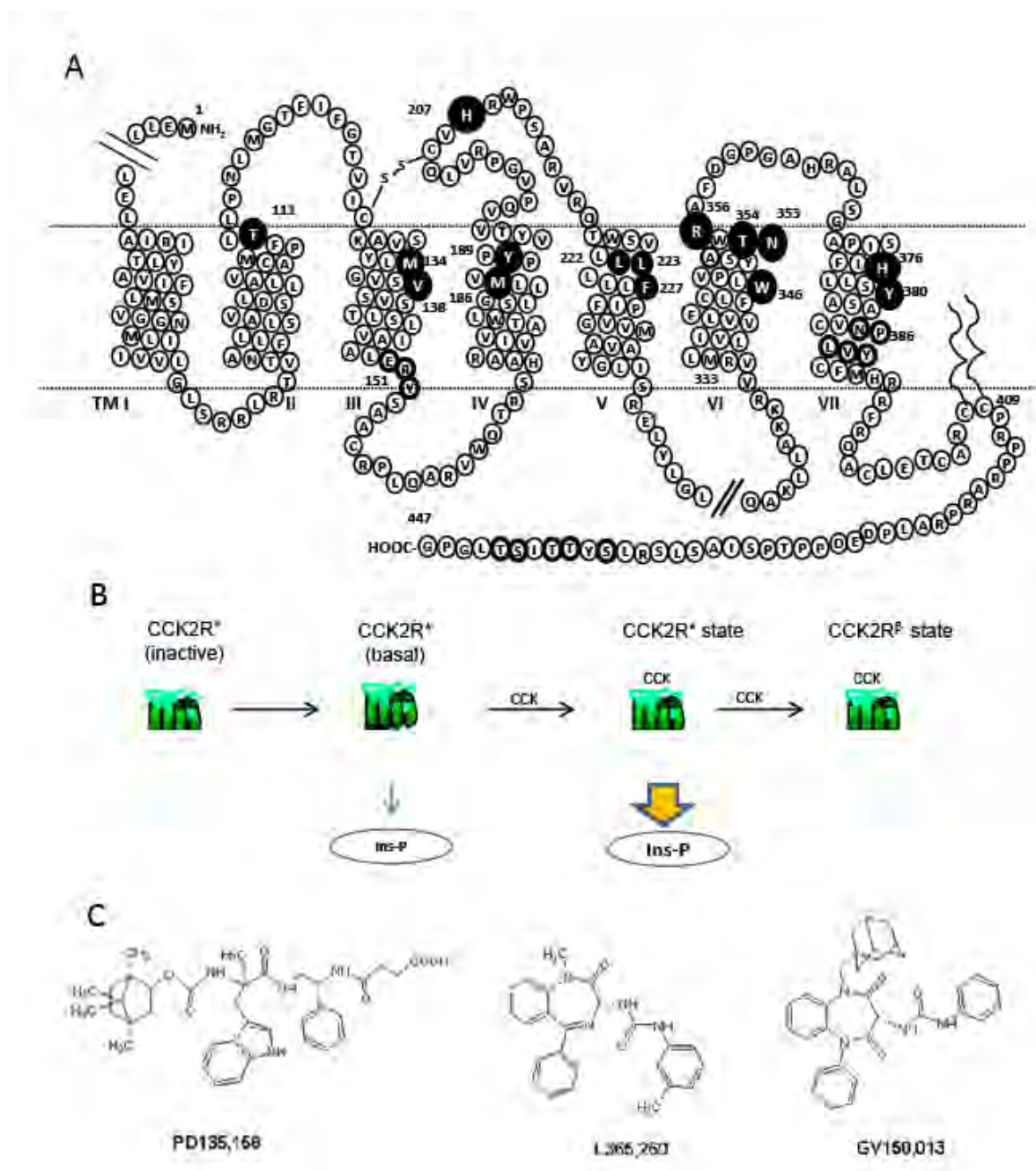


**References:**

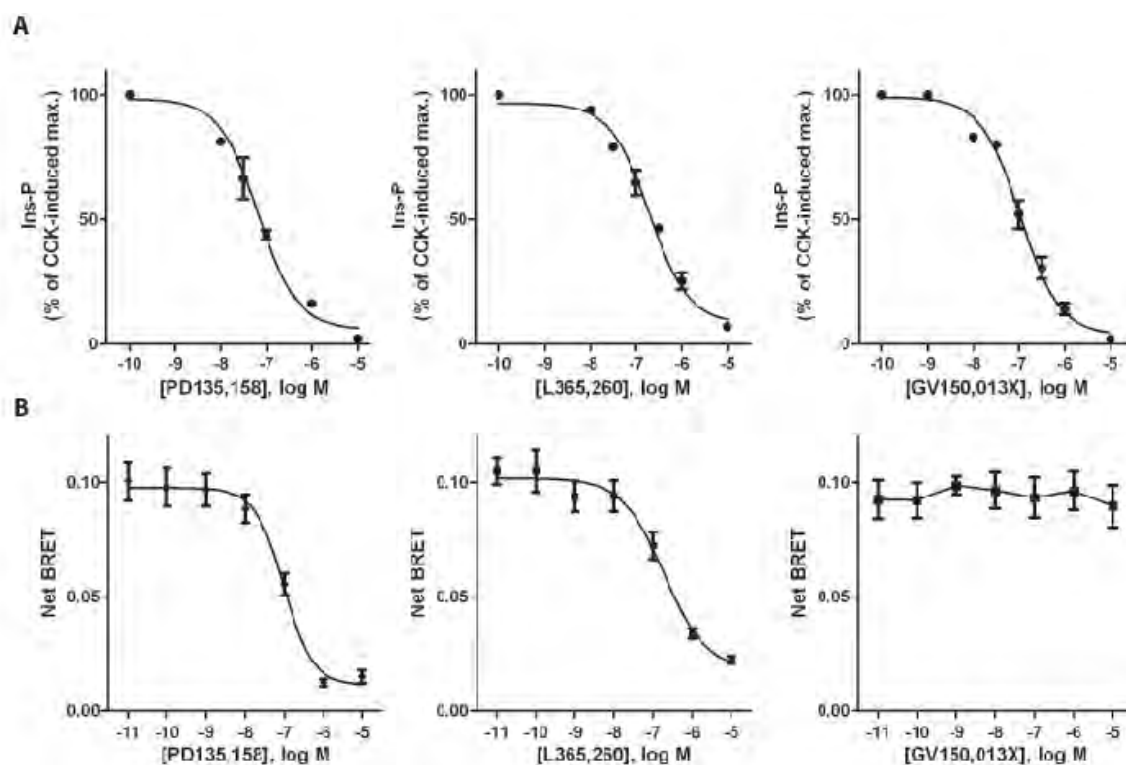
1. **Hanyaloglu AC, von Zastrow M** 2008 Regulation of GPCRs by endocytic membrane trafficking and its potential implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 48:537-568
2. **Traub LM** 2009 Tickets to ride: selecting cargo for clathrin-regulated internalization. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:583-596
3. **Marchese A, Paing MM, Temple BR, Trejo J** 2008 G protein-coupled receptor sorting to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 48:601-629
4. **Ferguson SS** 2001 Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* 53:1-24
5. **Lefkowitz RJ, Shenoy SK** 2005 Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science* 308:512-517
6. **Defea KA** Beta-arrestins as regulators of signal termination and transduction: How do they determine what to scaffold? *Cell Signal*
7. **Luttrell LM, Gesty-Palmer D** Beyond desensitization: physiological relevance of arrestin-dependent signaling. *Pharmacol Rev* 62:305-330
8. **Rajagopal S, Rajagopal K, Lefkowitz RJ** 2010 Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Drug Discov* 9:373-386
9. **Kenakin T, Miller LJ** Seven transmembrane receptors as shapeshifting proteins: the impact of allosteric modulation and functional selectivity on new drug discovery. *Pharmacol Rev* 62:265-304
10. **Violin JD, Dewire SM, Yamashita D, Rominger DH, Nguyen L, Schiller K, Whalen EJ, Gowen M, Lark MW** Selectively Engaging {beta}-Arrestins at the Angiotensin II Type 1 Receptor Reduces Blood Pressure and Increases Cardiac Performance. *J Pharmacol Exp Ther* 335:572-579
11. **Rajagopal K, Lefkowitz RJ, Rockman HA** 2005 When 7 transmembrane receptors are not G protein-coupled receptors. *J Clin Invest* 115:2971-2974
12. **Dufresne M, Seva C, Fourmy D** 2006 Cholecystokinin and gastrin receptors. *Physiol Rev* 86:805-847
13. **Langer I, Tikhonova IG, Travers MA, Archer-Lahlou E, Escrieut C, Maigret B, Fourmy D** 2005 Evidence that interspecies polymorphism in the human and rat cholecystokinin receptor-2 affects structure of the binding site for the endogenous agonist cholecystokinin. *J Biol Chem* 280:22198-22204
14. **Gales C, Kowalski-Chauvel A, Dufour MN, Seva C, Moroder L, Pradayrol L, Vaysse N, Fourmy D, Silvente-Poirot S** 2000 Mutation of Asn-391 within the conserved NPXXY motif

- of the cholecystokinin B receptor abolishes Gq protein activation without affecting its association with the receptor. *J Biol Chem* 275:17321-17327
15. **Gales C, Sanchez D, Poirot M, Pyronnet S, Buscail L, Cussac D, Pradayrol L, Fourmy D, Silvente-Poirot S** 2003 High tumorigenic potential of a constitutively active mutant of the cholecystokinin 2 receptor. *Oncogene* 22:6081-6089
  16. **Marco E, Foucaud M, Langer I, Escrieut C, Tikhonova IG, Fourmy D** 2007 Mechanism of activation of a G protein-coupled receptor, the human cholecystokinin-2 receptor. *J Biol Chem* 282:28779-28790
  17. **Foucaud M, Marco E, Escrieut C, Low C, Kalindjian B, Fourmy D** 2008 Linking non-peptide ligand binding mode to activity at the human cholecystokinin-2 receptor. *J Biol Chem* 283:35860-35868
  18. **Wu B, Chien EY, Mol CD, Fenalti G, Liu W, Katritch V, Abagyan R, Brooun A, Wells P, Bi FC, Hamel DJ, Kuhn P, Handel TM, Cherezov V, Stevens RC** Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science* 330:1066-1071
  19. **Foucaud M, Tikhonova IG, Langer I, Escrieut C, Dufresne M, Seva C, Maignret B, Fourmy D** 2006 Partial agonism, neutral antagonism, and inverse agonism at the human wild-type and constitutively active cholecystokinin-2 receptors. *Mol Pharmacol* 69:680-690
  20. **Moroder L, Wilschowitz L, Gemeiner M, Gohring W, Knof S, Scharf R, Thamm P, Gardner JD, Solomon TE, Wunsch E** 1981 [Cholecystokinin-pancreozymin synthesis. Synthesis of [28-threonine,31-norleucine]- and [28-threonine,31-leucine]cholecystokinin-pancreozymin-(25-33)-nonapeptide]. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 362:929-942
  21. **Fourmy D, Lopez P, Poirot S, Jimenez J, Dufresne M, Moroder L, Powers SP, Vaysse N** 1989 A new probe for affinity labelling pancreatic cholecystokinin receptor with minor modification of its structure. *Eur J Biochem* 185:397-403
  22. **Yaquib T, Tikhonova IG, Lattig J, Magnan R, Laval M, Escrieut C, Boulegue C, Hewage C, Fourmy D** Identification of determinants of glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor that interact with N-terminal biologically active region of the natural ligand. *Mol Pharmacol* 77:547-558
  23. **Hughes J, Boden P, Costall B, Domeney A, Kelly E, Horwell DC, Hunter JC, Pinnock RD, Woodruff GN** 1990 Development of a class of selective cholecystokinin type B receptor antagonists having potent anxiolytic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:6728-6732
  24. **Bock MG, DiPardo RM, Evans BE, Rittle KE, Whitter WL, Veber DE, Anderson PS, Freidinger RM** 1989 Benzodiazepine gastrin and brain cholecystokinin receptor ligands: L-365,260. *J Med Chem* 32:13-16
  25. **Ursini A, Capelli AM, Carr RA, Cassara P, Corsi M, Curcuruto O, Curotto G, Dal Cin M, Davalli S, Donati D, Feriani A, Finch H, Finizia G, Gaviraghi G, Marien M, Pentassuglia G, Polinelli S, Ratti E, Reggiani AM, Tarzia G, Tedesco G, Tranquillini ME, Trist DG, Van Amsterdam FT** 2000 Synthesis and SAR of new 5-phenyl-3-ureido-1,5-benzodiazepines as cholecystokinin-B receptor antagonists. *J Med Chem* 43:3596-3613

26. **Masri B, Salahpour A, Didriksen M, Ghisi V, Beaulieu JM, Gainetdinov RR, Caron MG** 2008 Antagonism of dopamine D2 receptor/beta-arrestin 2 interaction is a common property of clinically effective antipsychotics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:13656-13661
27. **Gurevich VV, Gurevich EV** 2006 The structural basis of arrestin-mediated regulation of G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther* 110:465-502
28. **Lan H, Teeter MM, Gurevich VV, Neve KA** 2009 An intracellular loop 2 amino acid residue determines differential binding of arrestin to the dopamine D2 and D3 receptors. *Mol Pharmacol* 75:19-26
29. **Granier S, Kim S, Shafer AM, Ratnala VR, Fung JJ, Zare RN, Kobilka B** 2007 Structure and conformational changes in the C-terminal domain of the beta2-adrenoceptor: insights from fluorescence resonance energy transfer studies. *J Biol Chem* 282:13895-13905
30. **Shukla AK, Violin JD, Whalen EJ, Gesty-Palmer D, Shenoy SK, Lefkowitz RJ** 2008 Distinct conformational changes in beta-arrestin report biased agonism at seven-transmembrane receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:9988-9993



**Fig. 1: Representation of CCK2R and ligands.** A) Serpentine representation of the human CCK2R. Amino acids previously identified as participating to orthosteric binding site and/or activation site as well as the endocytosis motif in the C-terminal region are depicted and numbered. B) Schematic representation of the equilibrium governing transition from inactive state of the CCK2R (CCK2R<sup>in</sup>) to state activating phospholipase-C (CCK2R<sup>α</sup>) or state recruiting β-arrestin2 (CCK2R<sup>β</sup>). B) Ligands used in the current study

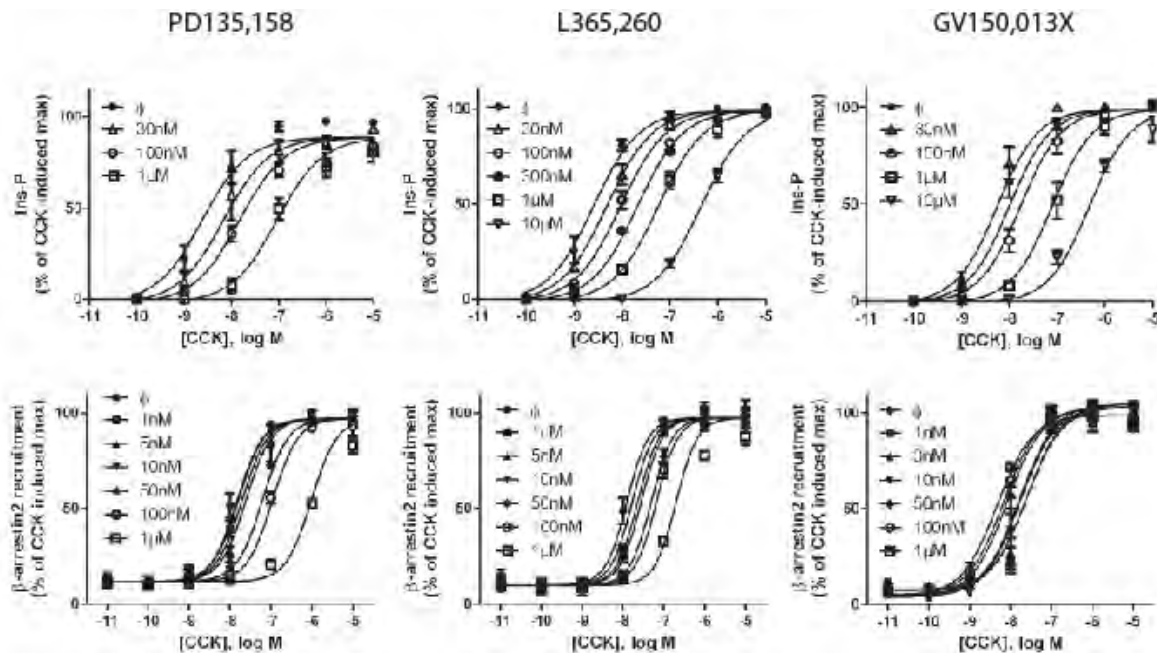


**Fig. 2: Effect of antagonists of the CCK2R on CCK-stimulated phospholipase-C activation (A) and  $\beta$ -arrestin2 recruitment (B).**

A) HEK cells expressing CCK2R were stimulated by 10 nM CCK alone or in the presence of increasing concentrations of PD135,158, L265,260 or GV150,013X for 60 min, afterwards inositol phosphates were assayed. Results are expressed as the percent of inositol phosphate production achieved with 10 nM CCK.

B) HEK cells expressing the CCK2R were transfected with plasmid encoding YFP- $\beta$ -arrestin2. 48 post-transfection, cells were stimulated for 300 sec with 100 nM CCK in the absence or in the presence of increasing concentrations of PD135,158, L365,260 or GV150,013X before BRET measurements. Results are expressed as net BRET as described in “experimental procedure” section.

Data are the mean  $\pm$  SEM of 3-4 independent experiments, each performed in duplicate.

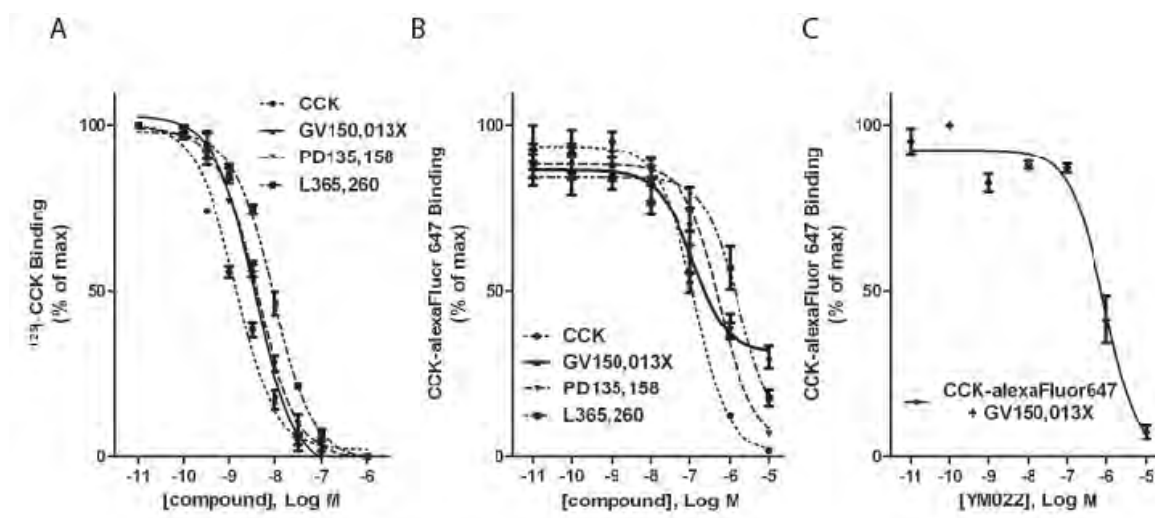


**Fig. 3: Schild plot pharmacological analysis of CCK-stimulated phospholipase-C activation (A) and  $\beta$ -arrestin2 recruitment (B).**

A) HEK cells expressing CCK2R were stimulated by increasing concentrations of CCK alone or in combination with PD135,158, L265,260 or GV150,013X at indicated concentrations for 60 min, afterwards inositol phosphates were assayed.

Results were expressed as the percent of inositol phosphate production achieved with CCK alone and are the mean  $\pm$  SEM of 4 independent experiments, each performed in duplicate.

B) HEK cells expressing the CCK2R were transfected with plasmid encoding YFP- $\beta$ -arrestin2. 48 post-transfection, cells were stimulated for 300 sec by increasing concentrations of CCK alone or in combination with PD135,158, L265,260 or GV150,013X at indicated concentrations before BRET measurements. Results are expressed as net BRET as described in “experimental procedure” section. Data are the mean  $\pm$  SEM of 4-6 independent experiments, each performed in duplicate.

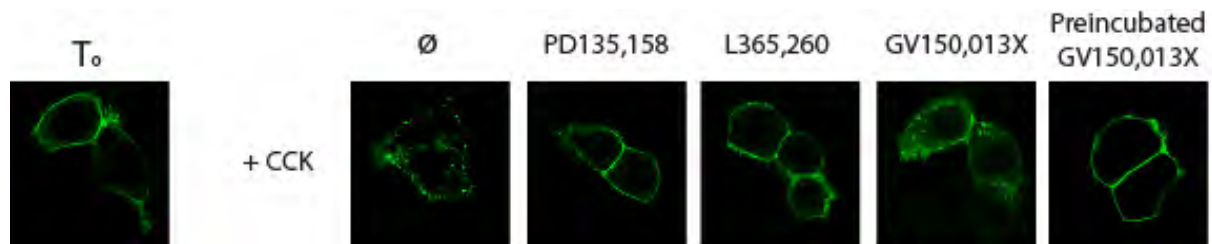


**Fig. 4: Pharmacological analysis of CCK binding to CCK2R**

A) Inhibition of binding was carried out by incubating radio-iodinated CCK (60-80 pM) alone or in the presence of increasing concentrations of competitors for 60 min, as described in the experimental procedure section. Calculated dissociation constant ( $K_d$ ) for CCK was  $1,37 \pm 0,47$  nM and  $IC_{50}$  were: PD135,158:  $4,06 \pm 1,02$  nM; L365,260:  $9,19 \pm 1,12$  nM; GV150013X:  $3,60 \pm 0,30$  nM. Results are expressed as the percent of maximal specific binding (determined in the presence of  $1 \mu\text{M}$  CCK) in the absence of competitor and are the mean  $\pm$  SEM of 3-5 experiments.

B) Inhibition of binding was carried out by incubating Alexa F-647-CCK ( $0,1 \mu\text{M}$ ) in the presence of increasing concentrations of competitors for 60 min, as described in the experimental procedure section. Specific binding was assayed by flow cytometry and results were expressed as the percent of maximal specific binding in the absence of competitor and are the mean  $\pm$  SEM of 3-4 experiments.

C) Inhibition of residual CCK binding assayed in the presence of GV150013X by the specific antagonist of the CCK2R, YM022. HEK cells expressing the CCK2R were incubated with Alexa F-647-CCK ( $0,1 \mu\text{M}$ ) in the presence of GV150,013X ( $10 \mu\text{M}$ ) and increasing concentration of YM022. Nonspecific binding was determined in the presence of CCK  $10 \mu\text{M}$ .



**Fig. 5: Pharmacological inhibition of CCK-stimulated internalization of CCK2R in HEK cells.**

HEK cells transfected with CCK2R-GFP were incubated at 37°C with CCK (100 nM) alone or with PD135,158, L365,260 or GV150013X (10 µM) added at the same time as CCK or 30 min before the addition of CCK (only shown with GV150,013X). Images are representative of at least 5 separate observations on two different batches of cells.

**Fig. 6: Effect of mutations within activation and binding sites of the CCK2R on CCK-induced phospholipase-C activation (A) and β-arrestin2 recruitment (B).**

A) HEK cells expressing wild-type or mutated CCK2R-Rluc were stimulated by increasing concentrations of CCK for 60 min afterwards inositol phosphate production was assayed. Results were expressed as the percent of maximal inositol phosphate production achieved with CCK on the wild-type CCK2R and are the mean ± SEM of 3-4 independent experiments, each performed in duplicate.

B) HEK cells expressing wild-type or mutated CCK2R-Rluc were co-transfected with plasmid encoding YFP- β-arrestin2. 48 post-transfection, cells were stimulated for 300 sec by increasing concentrations of CCK before BRET measurements. Results are expressed as percent of net BRET with wild-type CCK2R. Data are the mean ± SEM of 3-4 independent experiments, each performed in duplicate.



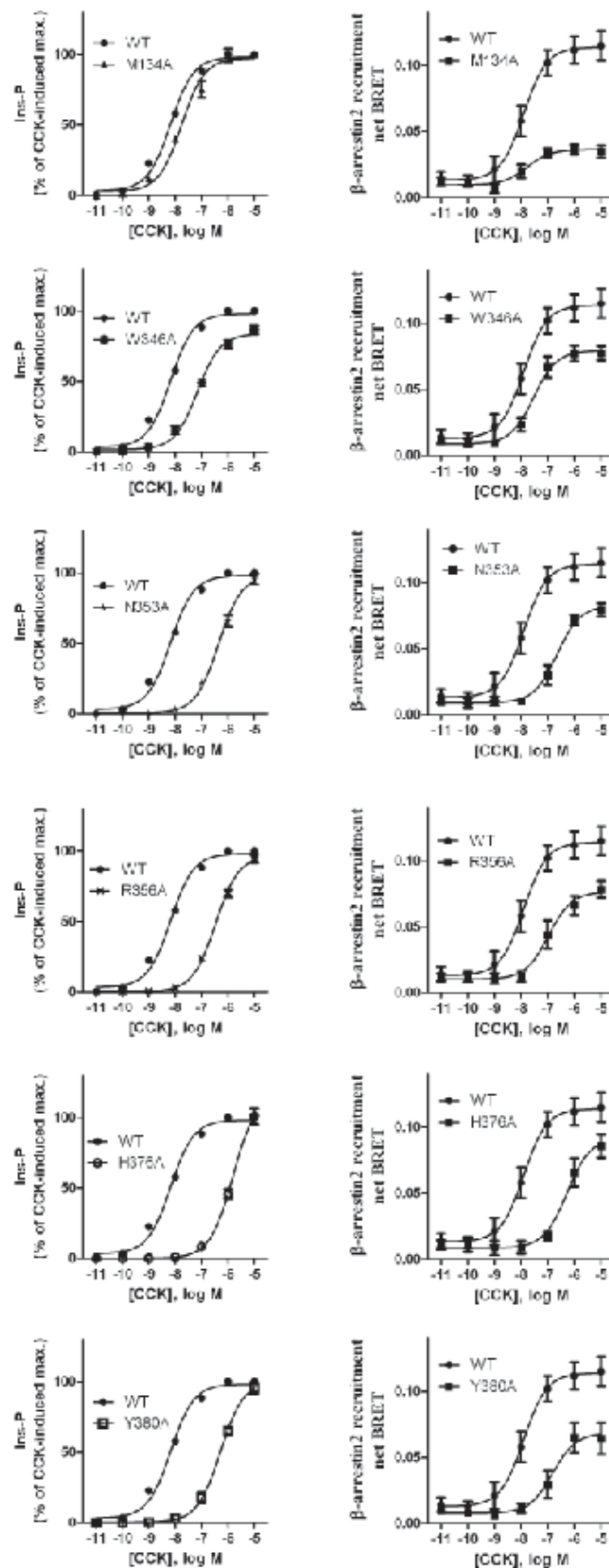
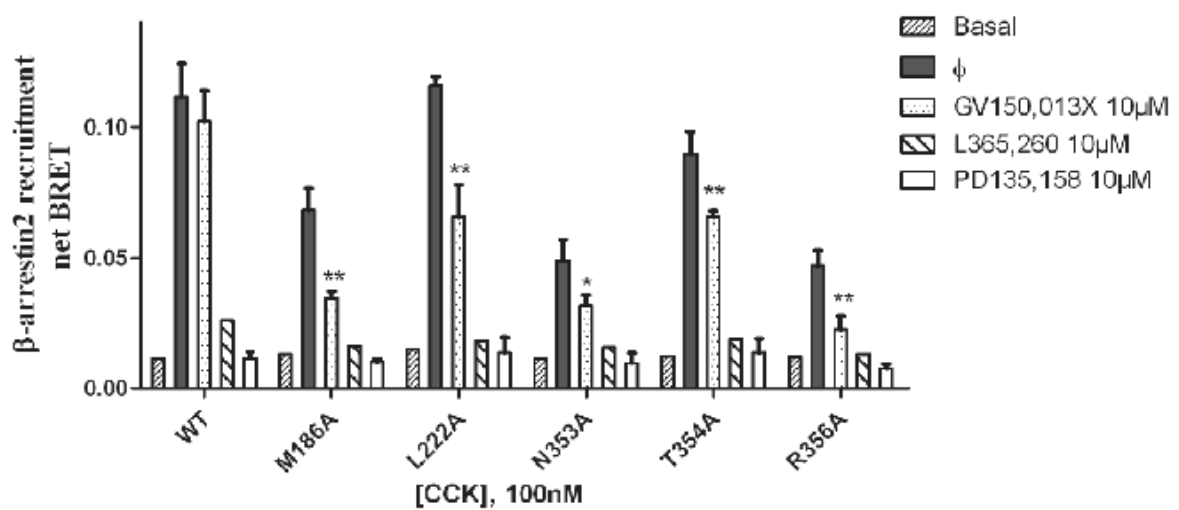
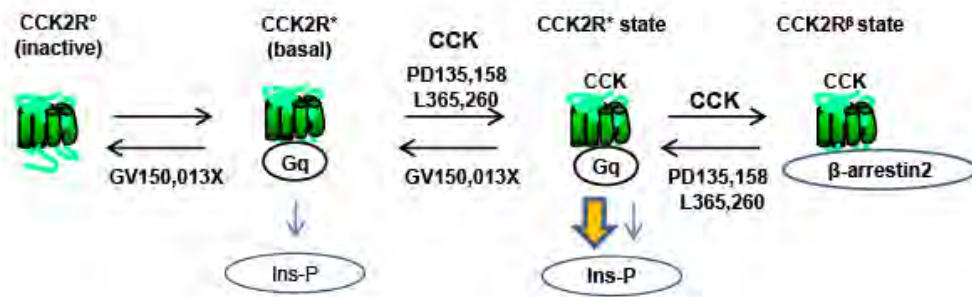


Figure 6

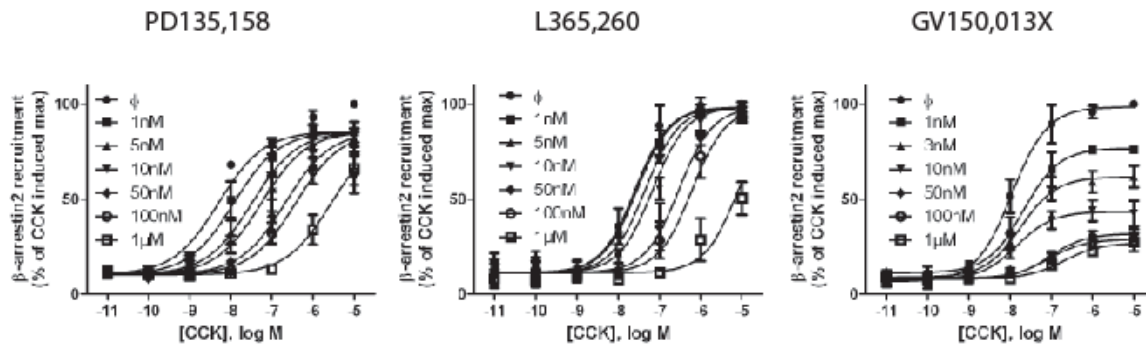


**Fig. 7: Effect of mutations within activation and binding site of the CCK2R on the ability of antagonists to interfere with  $\beta$ -arrestin2 recruitment to CCK2R.**

HEK cells expressing wild-type or mutated CCK2R-Rluc were co-transfected with plasmid encoding YFP-  $\beta$ -arrestin2. 48 post-transfection, cells were stimulated for 300 sec with CCK alone or combined with antagonists GV150,013X, L365,260, PD135,158 before BRET measurements. Results are expressed as net BRET achieved with each CCK2R. Data are the mean  $\pm$  SEM of 3-4 independent experiments, each performed in duplicate.



**Fig.8: Schematic representation of the equilibrium governing transition from inactive state of the CCK2R (CCK2R°) to state activating phospholipase-C (CCK2R\*) or state recruiting β-arrestin2 (CCK2Rβ).** Based on findings of the current study, the role of CCK and compounds GV150,013X, L365,260, PD135,158 in the stabilization of the different states is shown. L365,260, PD135,158 are biased ligands having partial agonist activity on PLC activation (Magnan, J Biol Chem, in press). According to the current data, these compounds are also competitive antagonist on CCK-induced β-arrestin2 recruitment. GV150,013X is an inverse agonist on COS-7 cells expressing the CCK2R (19). This compound is a competitive antagonist on CCK-induced PLC activation but is ineffective on CCK-induced β-arrestin2 recruitment.



**Supplementary data, Fig 1: Schild plot pharmacological analysis of CCK-stimulated phospholipase-C activation and on  $\beta$ -arrestin2 recruitment.**

A) HEK cells expressing CCK2R were stimulated by increasing concentrations of CCK alone or in combination with PD135,158, L265,260 or GV150,013X at indicated concentrations for 60 min afterwards inositol phosphates were assayed. B) HEK cells expressing the CCK2R were transfected with plasmid encoding YFP- $\beta$ -arrestin2. 48 post-transfection, cells were stimulated for 300 sec by increasing concentrations of CCK alone or in combination with PD135,158, L265,260 or GV150,013X at indicated concentrations before BRET measurements. Results are expressed as net BRET as described in “experimental procedure” section. Data are the mean  $\pm$  SEM of 4-6 independent experiments, each performed in duplicate.

**Supplementary data, Fig 2: Effect of mutations within activation and binding sites of the CCK2R on CCK-induced phospholipase-C activation (A) and  $\beta$ -arrestin2 recruitment (B).**

A) HEK cells expressing wild-type or mutated CCK2R-Rluc were stimulated by increasing concentrations of CCK for 60 min afterwards inositol phosphate production was assayed. Results were expressed as the percent of maximal inositol phosphate production achieved with CCK on the wild-type CCK2R and are the mean  $\pm$  SEM of 3-4 independent experiments, each performed in duplicate.

B) HEK cells expressing wild-type or mutated CCK2R-Rluc were co-transfected with plasmid encoding YFP-  $\beta$ -arrestin2. 48 post-transfection, cells were stimulated for 300 sec by increasing concentrations of CCK before BRET measurements. Results are expressed as percent of net BRET with wild-type CCK2R. Data are the mean  $\pm$  SEM of 3-4 independent experiments, each performed in duplicate.

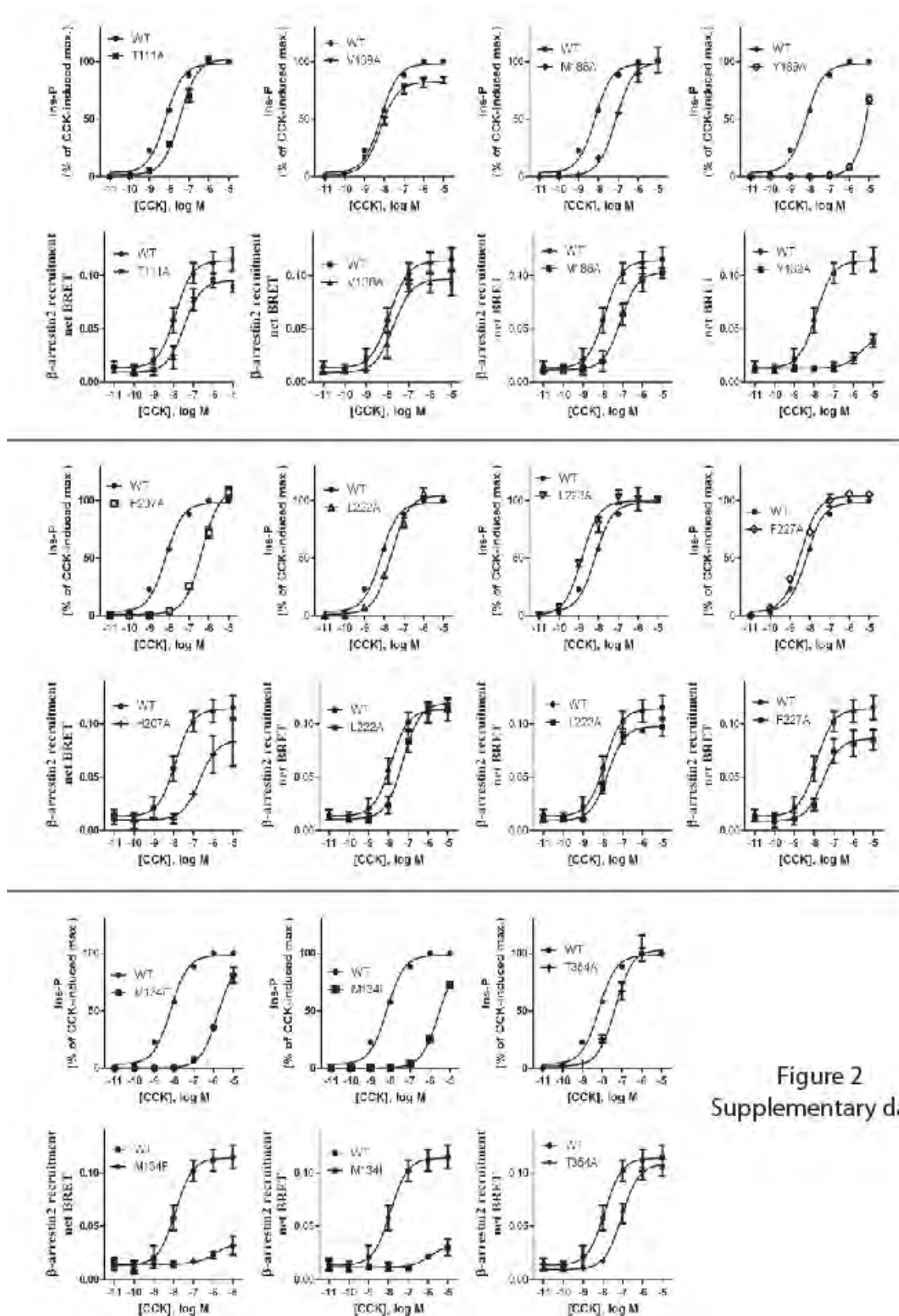
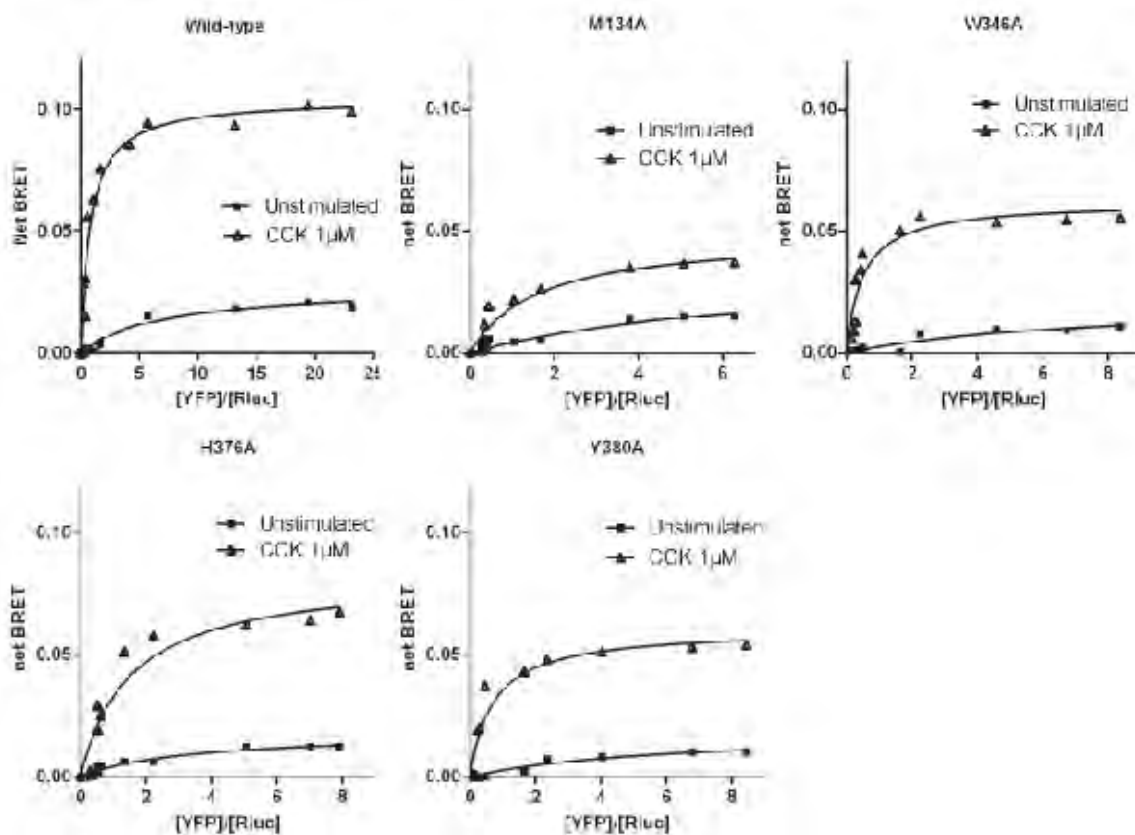


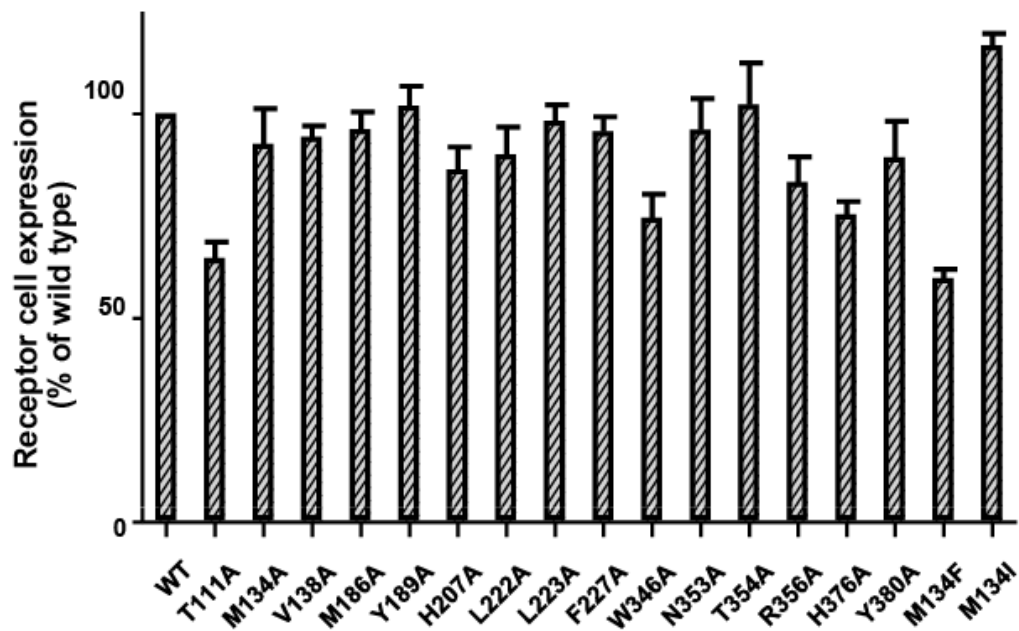
Figure 2  
Supplementary data

	Wild-Type	M134A	W346A	H376A	Y380A
BRET(50) (u.a.)	0,796	1,600	0,484	1,533	0,702
BRET max (netBRET)	0,104	0,048	0,061	0,082	0,060



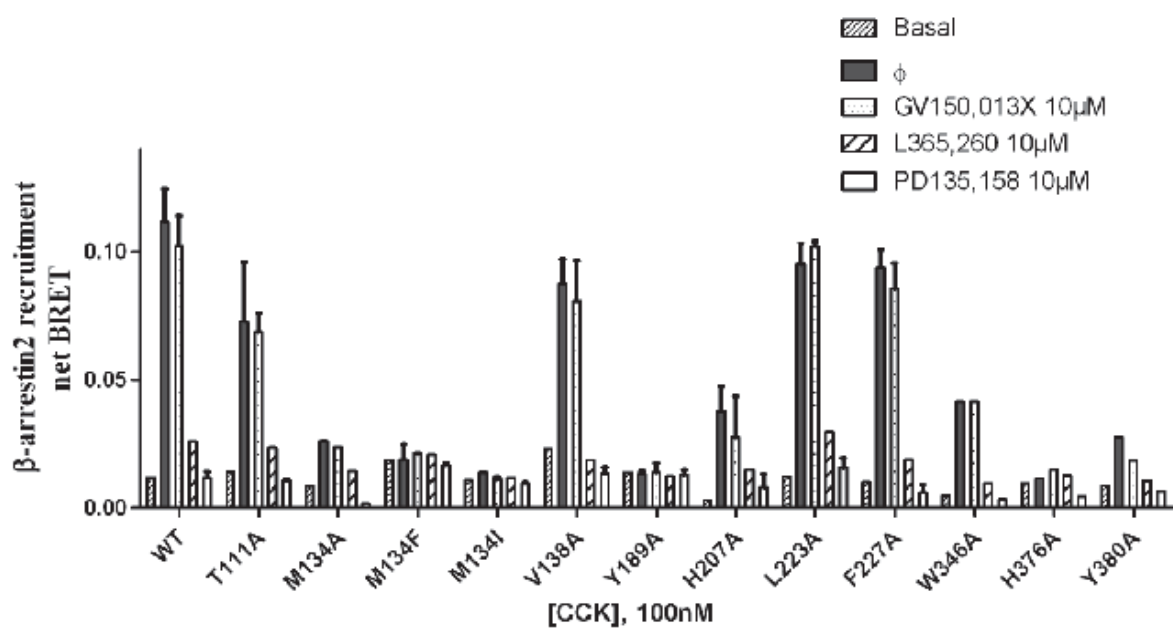
**Supplementary data, Fig. 3: BRET titration curve for the  $\beta$ -arrestin recruitment to CCK2R.**

BRET was measured in HEK 293 cells expressing a constant amount of CCK2R-Rluc and increasing amounts of  $\beta$ -arrestin2-YFP, stimulated by 0.1  $\mu$ M CCK or not stimulated. Net BRET is expressed as a function of the acceptor/donor ratio and is measured 300 sec after addition of CCK. Specificity of BRET signal between CCK2R-Rluc and  $\beta$ -arrestin2-YFP was confirmed in experiments showing absence of BRET signal expressing both CCK2R-Rluc and free YFP (results not shown).



#### Supplementary data, Fig 4: Expression of wild-type and mutated CCK2R in HEK cells

HEK cells expressing wild-type or mutated CCK2R-Rluc were co-transfected with plasmid encoding YFP-  $\beta$ -arrestin2. 48 post-transfection. Expression of wild-type or mutated receptors in cells was measured by quantification of RLuc luminescence according to the protocol used for BRET titration curve. The luminescence readings of RLuc tagged receptors were collected in parallel of each BRET experiment.



**Supplementary data, Fig. 5: Effect of mutations within activation and binding site of the CCK2R on the ability of antagonists to interfere with  $\beta$ -arrestin2 recruitment to CCK2R.**

HEK cells expressing wild-type or mutated CCK2R-Rluc were co-transfected with plasmid encoding YFP-  $\beta$ -arrestin2. 48 post-transfection, cells were stimulated for 300 sec with CCK alone or combined with antagonists GV150,013X, L365,260, PD135,158 before BRET measurements. Results are expressed as net BRET achieved with each CCK2R. Data are the mean  $\pm$  SEM of 3-4 independent experiments, each performed in duplicate.



## V Conclusion de l'article II

Cette étude avait pour objectif de déterminer si la conformation du RCCK2 qui recrute les  $\beta$ -arrestines est distincte de la conformation qui active la voie PLC par l'intermédiaire de la protéine Gq. Dans la première étude de cette thèse, nous avons montré que le RCCK2 recrutait les deux  $\beta$ -arrestines et que ce recrutement pouvait être inhibé par des ligands biaisés, notamment le PD135,158. L'existence de ligands biaisés du RCCK2 suggère l'existence d'un état conformationnel spécifique recrutant les  $\beta$ -arrestines.

Afin de distinguer de manière pharmacologique les états conformationnels recrutant les  $\beta$ -arrestines et activant la voie PLC, nous avons étudié la capacité de trois ligands du RCCK2 à inhiber la production d'inositols phosphates et le recrutement de la  $\beta$ -arrestine2 dans des cellules HEK 293. Comme le montrent nos résultats, les trois ligands, PD135,158, L365,260 et GV150,013X sont capables d'inhiber la production d'inositols phosphates induite par la CCK de manière dépendante de la dose. A notre surprise, le PD135,158 et le L365,260 sont capables d'inhiber de manière dépendante de la dose le recrutement de la  $\beta$ -arrestine2 alors que le GV150,013X en est incapable quelque soit la dose utilisée. Ceci suggère que le GV150,013X n'est pas capable de se lier à la conformation du RCCK2 recrutant les  $\beta$ -arrestines.

Nous avons poussé plus loin cette étude pharmacologique en conduisant une analyse de Schild sur l'inhibition de la production d'inositols phosphates et du recrutement de la  $\beta$ -arrestine2. Nos résultats montrent que les ligands PD135,158 et L365,260 sont des inhibiteurs compétitifs de la production d'inositols phosphates et du recrutement de la  $\beta$ -arrestine2 induits par la CCK. Ces résultats sont en accord avec une étude précédente de l'équipe qui décrit la liaison de ces deux composés au niveau du site orthostérique du RCCK2 [337]. En revanche, le GV150,013X est toujours incapable d'inhiber le recrutement de la  $\beta$ -arrestine2 induit par la CCK alors qu'il inhibe la production d'inositols phosphates de manière compétitive.

Une des explications possibles de l'absence d'inhibition du GV150,013X sur le recrutement de la  $\beta$ -arrestine2 pouvait être une différence de cinétique de liaison entre la CCK et le GV150,013X. Afin d'étudier cette hypothèse, nous avons préincubé le PD135,158, L365,260 et GV150,013X pendant trente minutes avant d'induire le recrutement de la  $\beta$ -arrestine2 par la CCK. A notre surprise, le GV150,013X provoque uniquement une diminution du BRET maximum de manière dépendante de la dose. Cet effet suggère que le GV150,013X n'interagit pas avec la conformation recrutant la  $\beta$ -arrestine2 mais plutôt qu'il inhibe le déplacement de l'équilibre de la population de RCCK2 d'une conformation active

sensible à GV150,013X et ne recrutant pas la  $\beta$ -arrestine2, vers une conformation active, insensible à GV150,013X et recrutant la  $\beta$ -arrestine2.

Afin de vérifier notre hypothèse d'un déplacement d'équilibre inhibé par GV150,013X du fait de sa sélectivité pour la conformation du RCCK2 ne recrutant pas la  $\beta$ -arrestine2, nous avons conduit des études d'inhibition de liaison à faibles et fortes concentrations de CCK. Pour de faibles concentrations en CCK, les trois ligands inhibent totalement la liaison de la  $^{125}\text{I}$ -CCK de manière dépendante de la dose. Pour de fortes concentrations en CCK, le PD135,158 et le L365,260 inhibent totalement la liaison de la CCK de manière dépendante de la dose. En revanche, le GV150,013X inhibe partiellement la liaison de la CCK à forte concentration puisqu'une fraction représentant 30 % de la liaison totale de CCK-AlexaFluor 647 (100nM) n'est pas déplacée par le GV150,013X à une concentration de 10 $\mu\text{M}$ . Cette fraction insensible à GV150,013X est par contre complètement déplacée par le PD135,158, le L365,260 et le YM022 (antagoniste possédant une très forte affinité pour le RCCK2). Ainsi, le GV150,013X est incapable de se lier à une certaine catégorie de sites dans la population du RCCK2 qui sont de basse affinité pour la CCK. Ainsi nos données suggèrent que ces sites de basse affinité pourraient correspondre à l'état recrutant la  $\beta$ -arrestine2.

Nous avons également vérifié que nous pouvions reproduire nos données sur un mécanisme plus intégré, en observant l'inhibition de l'internalisation du RCCK2-GFP. Comme attendu, le GV150,013X n'était pas capable d'inhiber l'internalisation du RCCK2-GFP induite par la CCK alors que le PD135,158 et le L365,260 l'inhibaient. Cependant, quand le GV150,013X est préincubé pendant 30 minutes à une concentration de 10 $\mu\text{M}$ , l'internalisation induite par la CCK est inhibée, ce qui est en accord avec l'action du GV150,013X sur le déplacement d'équilibre vers des états qui ne recrutent pas les  $\beta$ -arrestines.

En résumé, ces données pharmacologiques montrent que le GV150,013X est un antagoniste compétitif sélectif d'un état du RCCK2 qui ne recrute pas la  $\beta$ -arrestine2. Ceci suggère donc qu'il existe une différence structurale entre l'état recrutant les  $\beta$ -arrestines et l'état activant la voie PLC.

En suivant la stratégie utilisée lors de l'étude de notre équipe sur l'activation du RCCK2, nous avons cherché à identifier des acides aminés impliqués dans la stabilisation de l'état recrutant la  $\beta$ -arrestine2 [35]. Dans cette étude, les différents acides aminés impliqués dans l'activation sont près ou à l'intérieur du site de liaison de la CCK, et nous avons émis l'hypothèse que ceux-ci pourraient aussi être impliqués dans le passage de l'état activant la PLC vers l'état recrutant la  $\beta$ -arrestine2. Nos résultats montrent que la mutation des acides aminés Met134, His207, Trp346, Asn353, Arg356, His376 and Tyr380 en alanine affecte différemment la puissance ( $\text{EC}_{50}$ ) de la CCK à stimuler la PLC que le recrutement de

la  $\beta$ -arrestine2. En effet, nos données suggèrent que ces acides aminés contribuent moins à la reconnaissance de la CCK dans l'état recrutant la  $\beta$ -arrestine2 que dans l'état activant la PLC. Par contre, alors que toutes ces mutations n'affectent pas l'efficacité de la CCK à activer la PLC, elles affectent fortement l'efficacité de la CCK à recruter les  $\beta$ -arrestines. L'ensemble de ces données de mutagenèse montrent que les acides aminés Met134 du TM3, Trp346, Asn353 et Arg356 du TM6 et His376, Tyr380 du TM7 sont essentiellement impliqués dans la stabilisation de l'état recrutant les  $\beta$ -arrestines.

Puisque des mutations d'acides aminés proches ou à l'intérieur du site de liaison modifient la capacité du récepteur à recruter la  $\beta$ -arrestine2, nous avons examiné leur impact sur la capacité des trois ligands PD135,158, L365,260 et GV150,13X à inhiber le recrutement de la  $\beta$ -arrestine2 induit par la CCK. Nos résultats montrent que, bien que le GV150,013X n'inhibe pas le recrutement de la  $\beta$ -arrestine2 du récepteur sauvage, il inhibe partiellement celui de certains récepteurs mutés. En effet, la mutation des acides aminés Met186, Leu222, Asn353, Thr354, et Arg356 en alanine restaure la sensibilité du récepteur au GV150,013X vis-à-vis du recrutement de la  $\beta$ -arrestine2. Ces mutations n'ont par contre aucun effet sur l'action du PD135,158 et du L365,260. Ces résultats confirment que le GV150,013X ne reconnaît pas la conformation du RCCK2 qui recrute la  $\beta$ -arrestine mais démontre qu'une modification structurale du récepteur peut restaurer la liaison de ce composé au RCCK2.

L'ensemble de ces données pharmacologiques et de mutagenèse dirigée sont en faveur de l'existence d'une conformation du RCCK2 recrutant les  $\beta$ -arrestines structurellement distincte de la conformation activant la protéine  $G_q$ . Cependant, des expériences complémentaires seront nécessaires pour achever ce travail. Par exemple, le recrutement des  $\beta$ -arrestines est décrit comme étant dépendant de la conformation adoptée par le RCPG et de l'état de phosphorylation du récepteur. Dans notre étude, la Met134 est l'acide aminé qui semble le plus impliqué dans la stabilisation de l'état recrutant les  $\beta$ -arrestines et il serait intéressant de connaître l'état de phosphorylation de ce récepteur. En effet, quelle est l'origine de la perte du recrutement lorsque cette méthionine 134 est mutée ? Est-ce dû à la perte de la phosphorylation du motif de sérines/thréonines dans la partie distale de l'extrémité C-terminale ou dû à la conformation générale du récepteur qui est perturbée ? Pour répondre à cette question, deux approches sont envisagées avec, d'une part, l'étude du profil de phosphorylation des sérines/thréonines de l'extrémité C-terminale du mutant M134A et, d'autre part, l'utilisation d'un récepteur M134A possédant les sérines/thréonines, impliquées dans le recrutement des  $\beta$ -arrestines, mutées en acides glutamiques afin de mimer la phosphorylation de ces sérines/thréonines.

Par ailleurs, nos données montrent l'implication de la Met134 et la Tyr380 dans la stabilisation de la conformation recrutant la  $\beta$ -arrestine2, or selon le modèle moléculaire du RCCK2 établi précédemment, il pourrait y avoir une interaction entre ces deux acides aminés. Notre hypothèse est que l'interaction entre la Met 134 et la Tyr 380 stabiliserait la conformation du RCCK2 recrutant les  $\beta$ -arrestines. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons construit un récepteur possédant la Met134 et la Tyr380 mutées en histidine afin de créer une interaction forte entre ces deux acides aminés. Ce récepteur double mutant, M134H-Y380H, n'a pas encore été testé mais devrait l'être très prochainement. Si notre hypothèse est vérifiée nous devrions obtenir un récepteur recrutant la  $\beta$ -arrestine2 de manière constitutive.

Le GV150,013X et le L365,260 sont très proches d'un point de vue structural étant donné qu'ils sont tous les deux des dérivés de benzodiazépines. Des résultats préliminaires de ces deux composés dans le modèle moléculaire du RCCK2 montrent une orientation tout à fait différente et suggèrent que le groupement adamantane du GV150,013X, absent chez le L365,260, provoque une gêne stérique et exerce une contrainte sur la liaison de ce composé au RCCK2. Pour vérifier notre hypothèse, nous faisons actuellement synthétiser par des chimistes un analogue du GV150,013X dont le groupement adamantane a été remplacé par un groupement méthyle. Si notre hypothèse est correcte, l'analogue du GV150,013X dépourvu de groupement adamantane devrait pouvoir inhiber le recrutement de la  $\beta$ -arrestine2 induit par la CCK.

Enfin, toute cette étude a été réalisée sur le recrutement de la  $\beta$ -arrestine2 alors que nous démontrons plus haut dans le premier article que le RCCK2 recrute les deux  $\beta$ -arrestines avec la même affinité. Pour une question de temps, nous ne pouvions mener toute l'étude sur le recrutement des deux  $\beta$ -arrestines en parallèle. Cependant, les expériences d'inhibition du recrutement des  $\beta$ -arrestines avec les ligands PD135,158, L365,260 et GV150,013X ont également été réalisées pour la  $\beta$ -arrestine1 et les résultats sont similaires à ceux obtenus avec la  $\beta$ -arrestine2. Le GV150,013X n'est pas capable d'inhiber le recrutement de la  $\beta$ -arrestine1 ce qui laisse penser que l'ensemble de nos conclusions sur le recrutement de la  $\beta$ -arrestine2 pourrait également être applicable sur le recrutement de la  $\beta$ -arrestine1.

En résumé, nos données présentent, pour la première fois, une conformation d'un RCPG recrutant les  $\beta$ -arrestines différente au niveau des domaines transmembranaires de la conformation activant les protéines G.





# Résultats supplémentaires

**I- Implication des  $\beta$ -arrestines dans la signalisation  
MAPKinase induite par le RCCK2**

**II- Internalisation d'un RCPG indépendante des  
 $\beta$ -arrestines, le cas du récepteur GIP**





## **A] Implication des $\beta$ -arrestines dans le signal MAPKinase induit par le RCCK2**

Les RCPG sont capables d'activer des voies de signalisation grâce au recrutement des  $\beta$ -arrestines. Parmi ces voies de signalisation dépendantes des  $\beta$ -arrestines, on trouve la voie MAPKinase dont les  $\beta$ -arrestines favorisent le maintien de la phosphorylation des ERK1/2 sur des longues périodes de temps, provoquant la séquestration cytoplasmique de ces ERK1/2 et empêchant ainsi leur action transcriptionnelle.

Dans le cas du RCCK2, nous présentons des résultats indiquant que ce récepteur s'internalise en recrutant les  $\beta$ -arrestines. Le RCCK2 interagit directement avec les deux  $\beta$ -arrestines et reste associé sur de longues périodes de temps. De plus, l'activation des ERK1/2 par le RCCK2 montre l'existence d'une phase tardive, persistante de phosphorylation des ERK (entre une heure et trois heures). Ainsi, il est tentant de faire l'hypothèse que la phase tardive de phosphorylation des ERK est en partie dépendante du recrutement des  $\beta$ -arrestines au RCCK2.

Afin, de vérifier cette hypothèse, nous avons voulu étudier l'activation de la voie MAPKinase par le RCCK2 dans un système cellulaire dépourvu des  $\beta$ -arrestines. Pour ce faire, nous avons utilisé des cellules MEF invalidées pour les deux  $\beta$ -arrestines, généreusement données par le groupe de Robert J. Lefkowitz, et nous y avons introduit de manière stable le gène codant pour le RCCK2. Ces cellules ont également été utilisées pour étudier l'implication des  $\beta$ -arrestines dans l'internalisation du RCCK2 avec des résultats qui sont présentés dans le premier article. Dans ce chapitre, nous détaillerons certains aspects techniques de la génération de ces cellules MEF invalidées pour les  $\beta$ -arrestines exprimant le RCCK2 de manière stable, ainsi que les résultats obtenus pendant l'étude de l'activation de la voie MAPKinase.

### **A.1 Génération des cellules MEF invalidées pour les $\beta$ -arrestines exprimant le RCCK2**

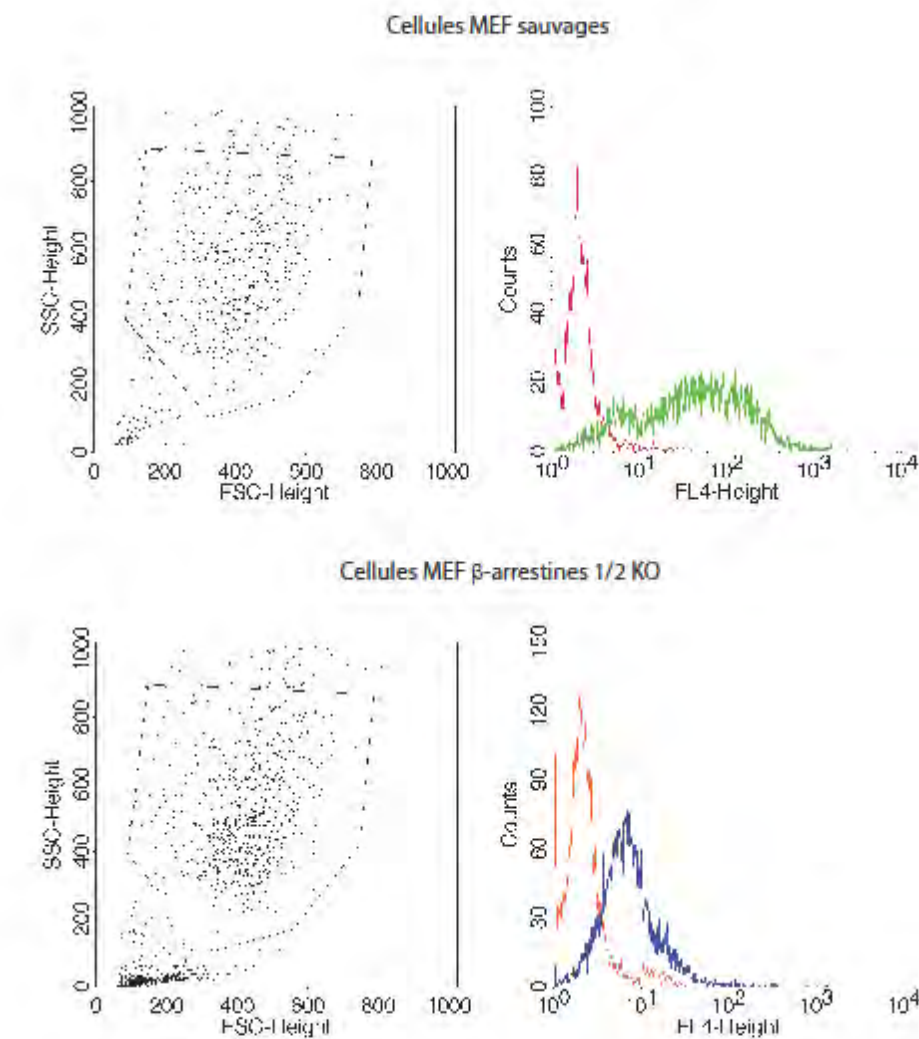
Peu de temps après la réception des cellules MEF invalidées pour les deux  $\beta$ -arrestines, nous avons tenté de transfecter ces cellules de manière transitoire avec le récepteur CCK2. Toutes nos tentatives de transfection transitoire sont restées infructueuses avec un rendement de transfection, mesuré par liaison de CCK-AlexaFluor 647 en cytométrie en flux, compris entre 0,5 et 1 cellule transfectée pour 100 non transfectées. Dès

lors, notre stratégie a été d'introduire le gène du RCCK2 de manière stable dans ces cellules en utilisant un système de vecteur lentiviral.

Pour mener à bien cette stratégie, nous nous sommes appuyés sur l'expérience solide du docteur Pierre Cordelier, présent au sein de notre institut, dans le domaine des vecteurs lentiviraux. Ce type de vecteurs lentiviraux constituent l'un des thèmes de recherche principaux du Dr Pierre Cordelier dans le contexte de la thérapie génique comme traitement dans le cancer du pancréas. Les vecteurs lentiviraux sont des virus non répliquatifs mais intégratifs dérivés du virus HIV dont l'enveloppe naturelle qui prédétermine le tropisme aux lymphocytes T, a été modifiée afin de lui conférer un tropisme multi-cellulaires et multi-espèces. Ces vecteurs sont difficiles de manipulation, mais présentent l'avantage d'avoir un pouvoir infectieux très élevé, permettant d'intégrer de manière stable un gène dans un grand nombre de lignées cellulaires difficilement transfectables.

Le RCCK2 a été sous-cloné dans un plasmide lentiviral, pCDH-CMV-GFP, codant pour une protéine GFP. Ce plasmide a ensuite été tri-transfecté dans des cellules HEK 293 FT avec les composants d'enveloppe et les composants transactivateurs du virus nécessaires à la génération des particules virales. 48 heures après transfection, les milieux de cultures des cellules transfectées, contenant les particules lentivirales, ont été collectés et concentrés par centrifugation dans des colonnes « Vivaspin » pour être stockés à -80°C. Le titre viral a été déterminé sur des cellules HT1090 et exprimé en unité de transduction par ml (TU/mL) et la concentration de vecteur a été quantifiée par un test ELISA de la protéine de capsid p24. L'ensemble de ces manipulations ont été réalisées en laboratoire de haute sécurité P3 de l'IFR150 sur le site de l'hôpital de Rangueil. Les cellules MEF sauvages et invalidées pour les  $\beta$ -arrestines ont ensuite été incubées avec les vecteurs lentiviraux (Multiplicity Of Infection=1) pendant 24h.

L'expression du RCCK2 a été estimée en mesurant la liaison de la CCK-AlexaFluor 647 par cytométrie en flux. D'autre part, l'expression de la GFP rend également compte de l'efficacité de la transduction virale. La [figure 21](#) présente les profils d'expression du RCCK2 et de la GFP dans les cellules MEF sauvages et dans les cellules MEF invalidées pour les  $\beta$ -arrestines. La première constatation est que les profils d'expression du RCCK2 chez les MEF sauvages et chez les MEF invalidées pour les  $\beta$ -arrestines sont hétérogènes. En effet, l'expression du RCCK2 chez les MEF sauvage est supérieure à celle des MEF invalidées pour les  $\beta$ -arrestines. Ce résultat a posé un problème puisque notre objectif était de mettre en évidence une différence d'activation des ERK1/2 par le RCCK2 imputable à l'absence de



**Figure 21 : Profils d'expression du RCCK2 dans les lignées MEF par cytométrie en flux**

L'expression du récepteur a été déterminé en mesurant la liaison de la CCK-AlexaFluor 647 aux cellules MEF précédemment transduites avec des vecteurs lentiviraux contenant le RCCK2. Les figures de gauche montrent les cellules sélectionnées pour la mesure. Les figures de droite montrent le nombre de cellules (counts) par rapport à l'intensité de fluorescence à la longueur d'onde d'émission de l'AlexaFluor 647 (FL4-Height). Les courbes rouge et orange représentent respectivement les cellules non transduites, sans RCCK2. La courbe verte représente l'intensité des cellules MEF sauvages transduites avec le RCCK2. La courbe bleue représente l'intensité de fluorescence des MEF invalidées pour les  $\beta$ -arrestines transduites avec le RCCK2.

$\beta$ -arrestines et non pas à une différence d'expression du RCCK2 entre ces deux lignées cellulaires.

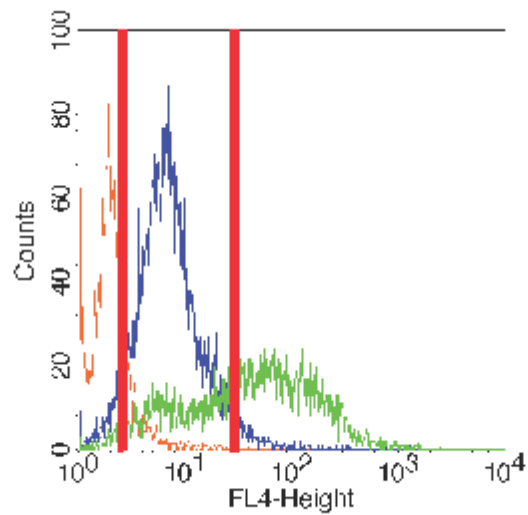
Pour résoudre ce problème d'hétérogénéité d'expression, nous avons eu recours à un trieur de cellules. Nos deux lignées cellulaires MEF, exprimant le RCCK2 de manière hétérogène, ont été marquées avec de la CCK-AlexaFluor 647 puis une fenêtre d'intensité de fluorescence commune correspondant à un niveau d'expression identique entre les deux lignées a été sélectionnée et a constitué la base du tri cellulaire. Comme le montre la [figure 22](#), seules les cellules présentes dans cette fenêtre d'intensité de fluorescence ont été récupérées par le trieur assurant ainsi un niveau d'expression homogène entre ces deux lignées cellulaires. L'expression du RCCK2 sur ces cellules MEF sauvages et invalidées pour les  $\beta$ -arrestines ainsi triées a été vérifiée par cytométrie en flux ([figure 23](#)).

## **A.2 Implication des $\beta$ -arrestines dans l'activation des ERK1/2 par le RCCK2**

L'activation de la voie MAPKinase sur les cellules MEF sauvages et invalidées pour les  $\beta$ -arrestines mais exprimant le RCCK2 a été étudiée par l'étude de la phosphorylation des ERK1/2 en réponse à une stimulation du récepteur par la CCK, avec la technique de « western blot » selon le protocole décrit dans l'article I. La cinétique de phosphorylation des ERK1/2 des cellules MEF sauvages est comparable à celle obtenue sur les cellules Flp-In HEK 293 exprimant le RCCK2 de manière stable, ce qui nous permet de valider l'utilisation de ces lignées MEF ([figure 24](#)).

La comparaison de la cinétique d'activation des ERK1/2 des cellules MEF sauvages avec celle des cellules MEF invalidées pour les  $\beta$ -arrestines montrent une phase tardive, de une heure à trois heures après stimulation, plus intense chez les MEF invalidées que chez les MEF sauvages ([figure 24](#))(n=3). Ceci indique que l'absence de  $\beta$ -arrestines favoriserait le maintien de la phosphorylation des ERK1/2 après stimulation du RCCK2 par la CCK et ceci étant exactement l'inverse de notre hypothèse et des données expérimentales obtenues sur d'autres RCPG dans des études similaires.

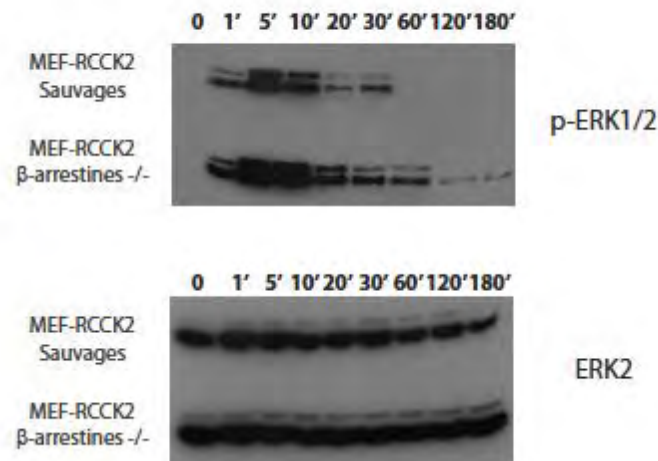
L'étude expérimentale s'est, pour le moment, arrêtée à ce stade là. Cependant, une étude sur l'implication des  $\beta$ -arrestines dans l'activation des ERK1/2 par le récepteur LPA pourrait expliquer ce résultat surprenant. En effet, dans les cellules MEF invalidées pour les  $\beta$ -arrestines, la stimulation du récepteur LPA provoque une phase tardive de phosphorylation plus intense que chez les cellules MEF sauvages, comme nous l'avons obtenue. Les auteurs ont démontré par la suite qu'en l'absence de  $\beta$ -arrestines, le récepteur LPA active les

**Figure 22: Représentation de la fenêtre d'intensité lors du tri cellulaire**

Le graphe montre le profil d'expression du RCCK2 déterminé par mesure de l'intensité de fluorescence de la CCK-AlexaFluor 647 liée aux cellules MEF. En orange, les cellules MEF non transduites, sans RCCK2. En bleu, les cellules MEF invalidées pour les  $\beta$ -arrestines transduites avec le RCCK2. En vert, les cellules MEF sauvages transduites avec le RCCK2. La fenêtre d'intensité de fluorescence encadrée par les deux traits rouge, représente la fenêtre d'expression du RCCK2 qui a servi de critère d'exclusion principal lors du tri cellulaire. Cette fenêtre est une représentation schématique d'illustration du procédé mais elle ne correspond pas à la fenêtre réellement utilisée lors du tri.

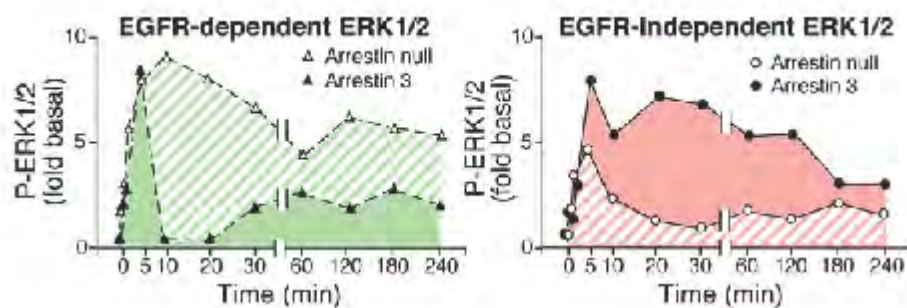
ERK1/2 par transactivation du récepteur EGF et que ce mécanisme est prédominant dans les cellules MEF invalidées. La réintroduction de la  $\beta$ -arrestine 2 suffit à réduire de manière significative la durée du signal ERK1/2 dépendant de la transactivation du récepteur EGF. Ainsi, lorsque le récepteur EGF est inhibé, la phase tardive de phosphorylation des ERK1/2 en l'absence de  $\beta$ -arrestine apparaît beaucoup plus faible qu'en présence de  $\beta$ -arrestines confirmant le rôle activateur des  $\beta$ -arrestines dans la voie MAPKinase (figure 25) [224].

Ce travail sur l'implication des  $\beta$ -arrestines dans l'activation de la voie MAPKinase par le RCCK2 sera donc poursuivi, avec comme premier objectif d'étudier l'état de phosphorylation des ERK1/2 entre les lignées MEF sauvages et invalidées en présence d'un inhibiteur du récepteur EGF. Une approche parallèle à celle-ci, consisterait à étudier les différences d'activation des ERK1/2 entre un RCCK2 sauvage et un RCCK2 muté présentant un recrutement des  $\beta$ -arrestines défectueux, comme le récepteur muté sur les cinq dernières thréonine-sérine de l'extrémité C-terminale ou tronqué en amont de cette même région. Enfin, ces cellules MEF pourront également servir à étudier l'implication des  $\beta$ -arrestines dans les effets transcriptionnels induits par le RCCK2 en comparant les profils de transcription de divers gènes dans ces deux lignées, par des techniques de PCRarray.



#### Figure 24: Cinétique de phosphorylation des ERK après stimulation par la CCK

Les cellules MEF sauvages ou invalidées pour les  $\beta$ -arrestines1/2 ( $-/-$ ) exprimant le RCCCK2 de manière stable ont été stimulées avec 100nM de CCK à différents temps. Après analyse par Western Blot en utilisant un anticorps anti- phosphoERK1/2 (dilution 1/500) la membrane est incubée pendant 5 minutes avec le substrat de la HRP (horse radish peroxydase) puis un film est exposé à la membrane pendant 10 secondes avant la révélation du film. En haut, Dans les cellules invalidées pour les  $\beta$ -arrestines la phosphorylation des ERK est soutenue entre 1h et 3h alors que cette phase est absente dans les cellules sauvages. En bas, le contrôle de quantité déposée dans chaque puits avec les ERK2 totaux contenus dans la cellule.



**Figure 25: Profils de phosphorylation des ERK1/2 après stimulation du récepteur LPA dans les cellules MEF**

A gauche, le graphe représente la phosphorylation des ERK en nombre de fois par rapport au cellules non stimulés. Dans les cellules MEF invalidées pour les  $\beta$ -arrestines (arrestin null), le mécanisme majoritaire de l'activation des ERK est la transactivation du récepteur EGF par un mécanisme dépendant des protéines G (vert hachuré). Quand la  $\beta$ -arrestine2 est réintroduite, la phosphorylation des ERK est fortement réduite (vert solide) reflétant la désensibilisation du signal dépendant des protéines G par un mécanisme dépendant des  $\beta$ -arrestines. A droite, la phosphorylation des ERK, indépendante de la transactivation du récepteur EGF, est minoritaire dans les cellules invalidées pour les  $\beta$ -arrestines. Dans les cellules sauvages, on retrouve une phosphorylation des ERK forte et soutenue au cours du temps, indépendante de la transactivation du récepteur EGF mais dépendante des  $\beta$ -arrestines. (D'après Kendall RT & Luttrell LM, 2010)



## **B] Internalisation d'un RCPG indépendante des $\beta$ -arrestines, le cas du récepteur GIP.**

Dans ce chapitre, nous présentons des données sur l'étude préliminaire de l'internalisation d'un autre RCPG, le récepteur du GIP (glucose-dependent insulinotropic polypeptide). A mon arrivée au laboratoire, ce récepteur faisait déjà l'objet d'une étude dans le contexte d'une thèse portant sur le site de liaison du peptide GIP au récepteur GIP [384]. Les données préliminaires que j'ai obtenues au cours de ma 2<sup>ème</sup> année de thèse sur le récepteur GIP ont constitué un sujet de recherche pour une étudiante ingénieur qui a pris la suite de ce travail pendant plus d'un an, ainsi que pour une étudiante en Master Recherche qui continue actuellement le travail.

### **B.1 Brève introduction bibliographique : le GIP et son récepteur, le RGIP.**

Le GIP est une hormone constituée de 42 acides aminés sécrétée par les cellules K du duodénum proximal. Le GIP stimule la sécrétion d'insuline par les cellules pancréatiques après ingestion des aliments. Le GIP et une autre hormone incrétine, le GLP-1 (glucagon peptide like-1), sont responsables d'environ 50 à 70% de la sécrétion d'insuline postprandiale (effet incrétine). Cet effet « incrétine » est strictement dépendant du glucose et est crucial pour le maintien de l'homéostasie glucidique. Le GIP accroît cet effet en stimulant la transcription et la traduction du gène de la proinsuline et en inhibant la production de glucose hépatique. Ainsi, le GIP et le récepteur GIP sont d'un grand intérêt pharmacologique particulièrement pour l'identification et la synthèse de nouvelles molécules pour le traitement du diabète de type II et de l'obésité.

Le récepteur du GIP fait partie de la classe B des RCPG qui inclut notamment les récepteurs sécrétine, VIP, PTH et calcitonine. Ce récepteur est exprimé dans différents organes et systèmes tels que le pancréas, le tissu adipeux, l'estomac, l'hypophyse, l'intestin grêle, le cœur, les testicules, la rate, le thymus, les poumons, les os, la trachée, ainsi que les cellules endothéliales. La structure du récepteur GIP présente des différences significatives avec le récepteur CCK2. En effet, des récepteurs de la classe B présentent une extrémité N-terminale assez longue qui contient six cystéines formant des ponts disulfures, ainsi qu'une troisième boucle intracellulaire très courte. Notons que la composition en sérine-thréonine de l'extrémité C-terminale du récepteur GIP est très différente du récepteur CCK2, en particulier

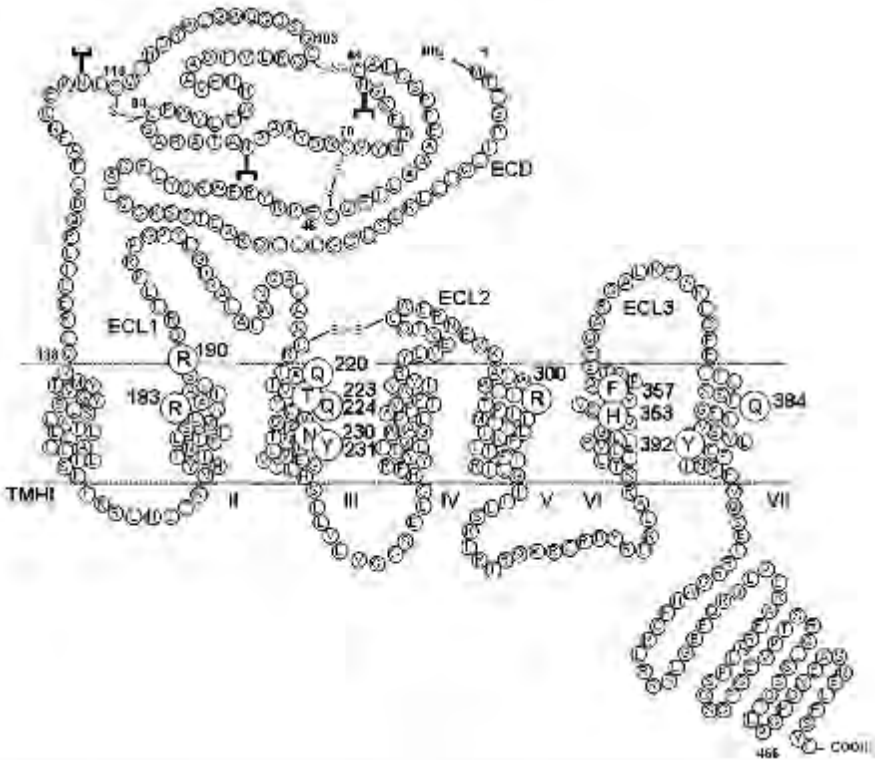


Figure 26: Représentation schématique du récepteur GIP (d'après Yaquib *et al* 2010)

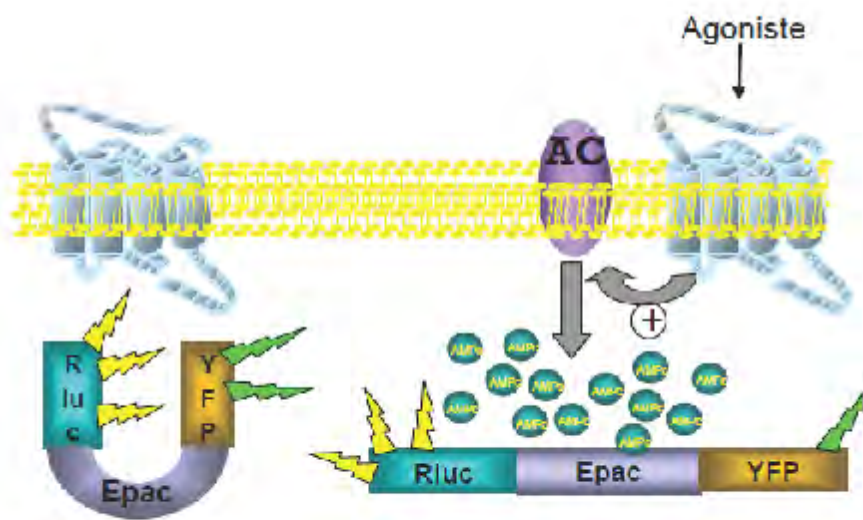
les motifs de sérine-thréonine présents chez le RCCK2 ne sont pas retrouvés chez le RGIP ([figure 26](#)). A ce jour, une seule étude fait état de l'implication de deux sérines 426 et 427 situées dans l'extrémité C-terminale du récepteur dans l'internalisation du RGIP après stimulation par son ligand naturel [385].

## **B.2 Etude de l'internalisation du récepteur GIP: Approches expérimentales**

L'étude de l'internalisation du récepteur GIP s'est faite en parallèle de l'étude de l'internalisation du RCCK2, et par conséquent les mêmes systèmes cellulaires et approches expérimentales (microscopie confocale, BRET), ont été utilisés. De la même manière que pour la lignée Flp-In<sup>TM</sup> HEK 293 exprimant de manière stable le RCCK2, le récepteur GIP a été sous-cloné dans le vecteur pcDNA5 puis co-transfecté avec le vecteur pOG44 exprimant la FRT recombinase dans les cellules Flp-In<sup>TM</sup> HEK 293 qui contiennent un site FRT (Flp recombinaison target). La recombinase assure la recombinaison et l'insertion du gène d'intérêt, ici le RGIP, dans un locus unique identique dans le génome de toutes les cellules transfectées. La sélection des cellules ayant incorporées le RGIP est ensuite réalisée en ajoutant de l'hygromycine dans le milieu de culture pendant 15 jours.

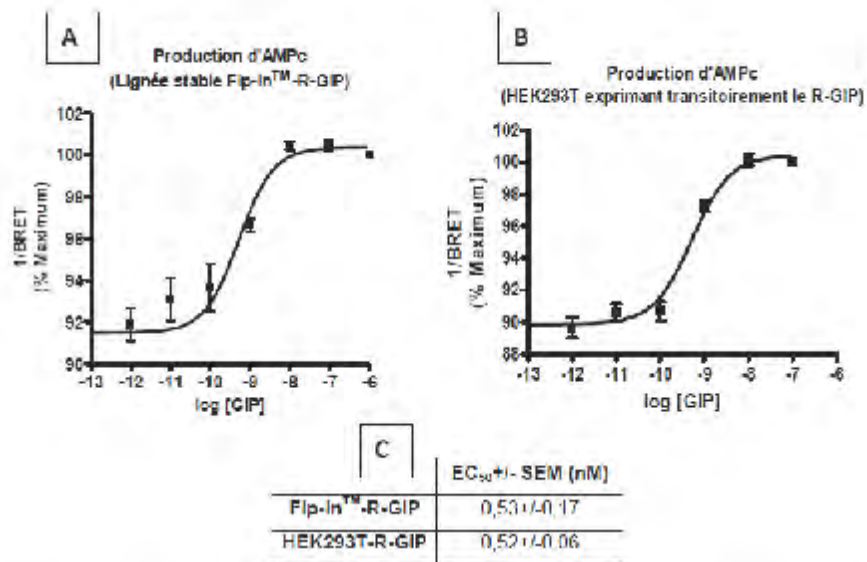
La caractérisation pharmacologique de cette lignée a été réalisée par des études de liaison du GIP au RGIP et des études d'activité biologique. Le déplacement de liaison de GIP couplé à un fluorophore AlexaFluor 647 (GIP-AlexaFLuor 647) par du GIP non fluorescent, a été quantifié par cytométrie en flux. L'activité biologique du RGIP est évaluée en mesurant l'activité AMPc en quantifiant en BRET l'activation de la protéine EPAC. En effet, lorsque la voie de l'AMPc est activée, la protéine EPAC, portant en extrémité N-terminale une Renilla Luciferase (RLuc) et en extrémité C-terminale une protéine fluorescente YFP, subit des changements conformationnels qui éloignent la RLuc de la YFP, provoquant une diminution du signal BRET. Ainsi, la diminution du signal BRET rend compte de l'activation de la voie  $G_s$  par le RGIP. Les cellules HEK 293 exprimant le RGIP de manière stable et transitoire présentent une EC50 similaire (0,5nM) ce qui est comparable aux EC50 obtenues par mesure de l'AMPc tritié, dans la première étude de notre équipe sur le RGIP ([figure 27 et 28](#)) [384].

Le couplage du peptide GIP à l'AlexaFluor 647 a été réalisé suivant le même protocole que le couplage de la CCK à l'AlexaFluor 647 détaillé dans l'article I. Après la réaction de couplage, les espèces chimiques ont été séparées par HPLC, et le pic d'absorption à 280nm correspondant au GIP couplé à l'AlexaFluor 647 a été élué à seize



**Figure 27: Schéma explicatif du principe de mesure de la production d'AMPc par BRET avec la protéine Epac**

A gauche, le récepteur est dans un état basal, la protéine Epac est dans une conformation qui permet une proximité entre la Renilla Luciferase (RLuc) et la YFP générant un signal BRET en présence du substrat de la RLuc. A droite, le récepteur est stimulé par un agoniste, la production d'AMPc par l'adénylate cyclase (AC) est activé. L'augmentation de la concentration d'AMPc active la protéine Epac qui perd sa conformation d'origine provoquant l'éloignement de RLuc vis-à-vis de la YFP et donc une diminution du signal BRET. Ainsi, la diminution du signal BRET intramolécule de la protéine Epac rend compte de la production d'AMPc.



**Figure 28: Comparaison de l'activité biologique de production d'AMPc par des lignées HEK 293 exprimant le RGIP de manière stable ou de manière transitoire**

A) Dose réponse de production d'AMPc mesuré par BRET intramolécule de la protéine Epac sur des cellules HEK 293 exprimant le RGIP de manière stable. B) Dose réponse de production d'AMPc mesuré par BRET intramolécule de la protéine Epac sur des cellules HEK 293 exprimant le RGIP de manière transitoire. C) Tableau des EC50.

minutes. L'activité biologique du GIP-AlexaFluor 647 a été validée. Des analyses du peptide GIP-AlexaFluor 647 ont permis de déterminer que l'AlexaFluor est couplé au niveau de la lysine 30 du GIP [384].

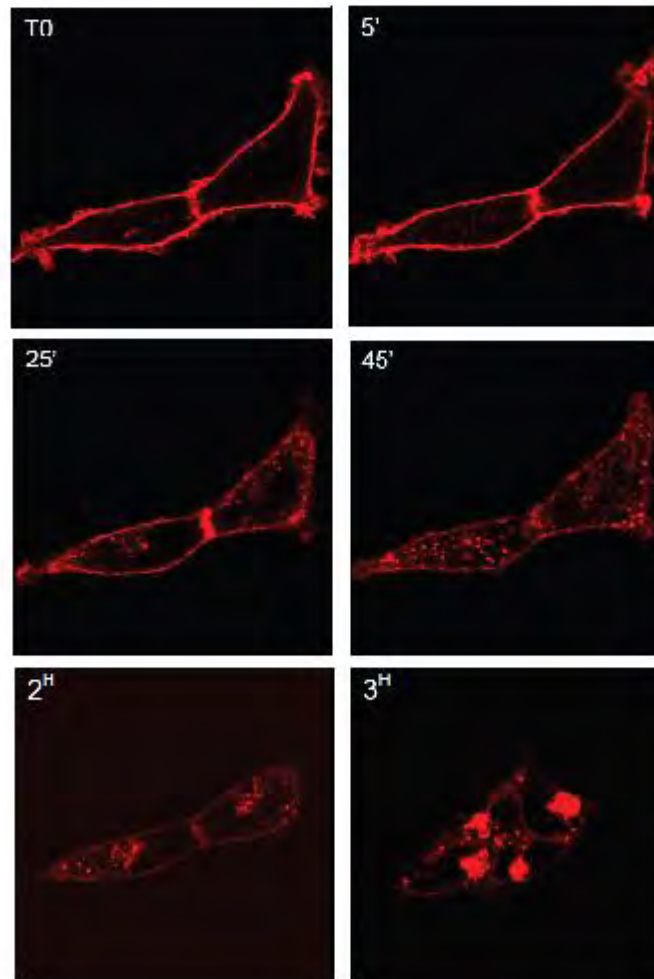
### B.3 Résultats préliminaires

**Le GIP-AlexaFluor 647 s'internalise massivement dans les cellules exprimant le récepteur GIP.** Dès la mise en présence des cellules HEK 293 exprimant le RGIP avec le GIP-AlexaFluor 647, la fluorescence rouge du GIP-AlexaFluor 647 éclaire toute la membrane plasmique puis très rapidement (une à deux minutes), la membrane se fragmente en petits « spots » qui rentrent progressivement et de manière massive à l'intérieur de la cellule. L'internalisation du GIP-AlexaFluor 647 traduit l'internalisation du récepteur RGIP bien que cela n'apporte pas d'indications sur le comportement du récepteur après son internalisation. Est-il recyclé rapidement à la membrane ou reste-t-il associé au ligand ([figure 29](#)) ?

**L'internalisation du RGIP est un phénomène dépendant de la dynamine.** De la même manière qu'avec le récepteur CCK2, nous avons utilisé l'inhibiteur de la petite GTPase dynamine, la dynasore. L'utilisation de cet inhibiteur provoque une inhibition de l'internalisation du GIP-AlexaFluor 647 sans toutefois empêcher l'apparition de points distincts à la membrane plasmique, probablement représentatifs de groupes de récepteurs rassemblés au niveau de zones de formation de vésicules d'endocytose. Le phénomène est durablement inhibé tant que la dynasore est présente dans le milieu de culture ([figure 30](#)).

**L'internalisation du RGIP est un phénomène dépendant de la clathrine.** L'inhibiteur des voies dépendantes de la clathrine, la chlorpromazine, utilisée dans le cadre de l'étude sur l'internalisation du RCCK2 a également été utilisée lors de l'internalisation du RGIP. La chlorpromazine inhibe l'assemblage du manteau de clathrine réduisant ainsi le nombre de puits recouverts de clathrine. L'usage de la chlorpromazine inhibe fortement mais pas totalement l'internalisation du GIP-AlexaFluor 647 indiquant que l'internalisation du RGIP implique la clathrine mais n'exclut pas l'existence de voies alternatives ([figure 31](#)).

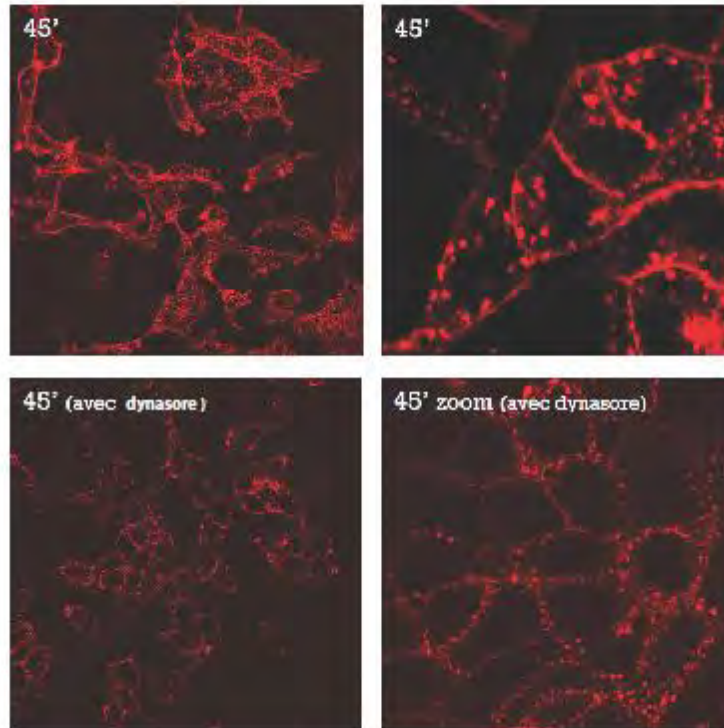
**Le RGIP ne recrute pas les  $\beta$ -arrestines lors de son internalisation.** Les cellules HEK 293 exprimant de manière stable le RGIP ont été transfectées de manière transitoire soit avec la  $\beta$ -arrestine1-GFP soit avec la  $\beta$ -arrestine2-GFP puis stimulées avec du GIP-AlexaFluor 647. Aucune des deux  $\beta$ -arrestines ne sont transloquées à la membrane lors de l'internalisation du GIP-AlexaFluor 647 indiquant que le RGIP ne semble pas recruter les  $\beta$ -arrestines lors de son internalisation. Les observations microscopiques ne permettent pas non plus de mettre en évidence une colocalisation entre le GIP-AlexaFluor 647 internalisé et les  $\beta$ -arrestines-GFP cytoplasmiques ([figure 32](#)). Par ailleurs, un récepteur GIP fusionné à



**Figure 29: internalisation du ligand GIP-AlexaFLUOR 647 dans des cellules HEK 293 exprimant le RGIP de manière stable**

L'internalisation du ligand démarre rapidement avec la formation de zones en forme de granulets à la membrane dès 5 minutes. Au cours du temps les vésicules d'internalisation sont bien distribuées dans la cellule. Ces vésicules finissent par se concentrer dans certaines zones de la cellule qui semblent être périnucléaires.

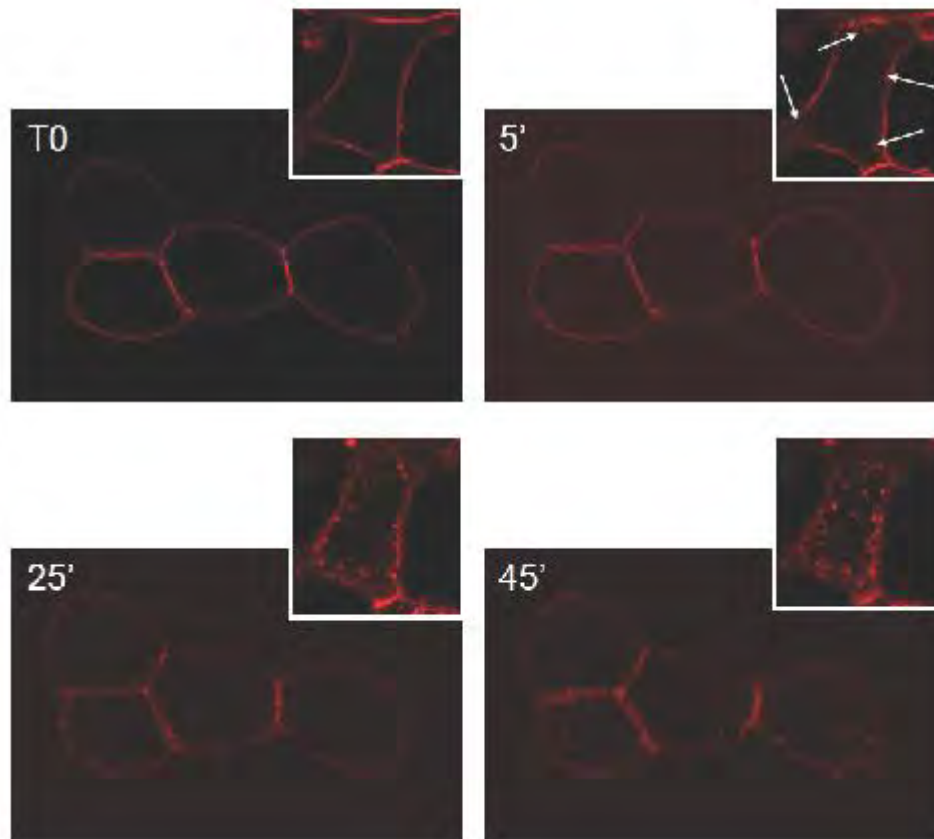




**Figure 30: Internalisation du GIP-AlexaFluor 647 dans des cellules HEK 293 exprimant le RGIP de manière stable en présence de dynasore.**

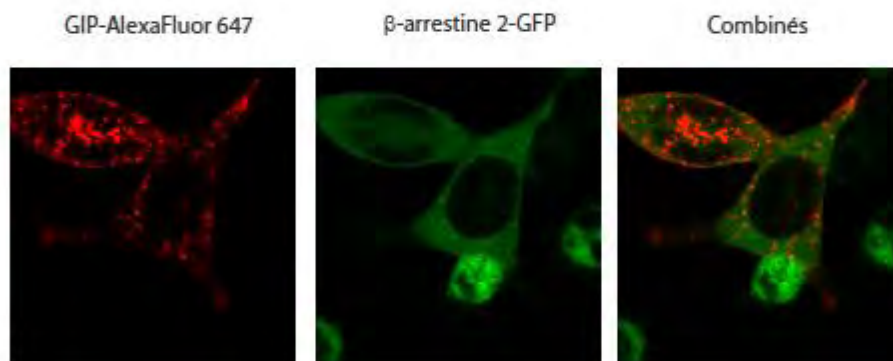
A gauche, un plan d'ensemble est présenté de cellules HEK 293 exprimant le RGIP de manière stable après 45 minutes de stimulation par le GIP-AlexaFluor 647 en absence (image du haut) ou en présence (image du bas) d'un inhibiteur de la dynamine, la dynasore (80 $\mu$ M). A droite, images des grossissement des photos de gauche, où l'on peut voir l'internalisation du ligand fluorescent sur des cellules sans dynasore (en haut) alors que le ligand est bloqué à la membrane ou dans des zones pérимembranaires en présence de la dynasore (en bas).





**Figure 31: Internalisation du GIP-AlexaFluor 647 sur des cellules HEK 293 exprimant le RGIP de manière stable en présence de chlorpromazine.**

Les photos de grande taille montrent l'internalisation au cours du temps du ligand GIP-AlexaFluor 647 dans les cellules HEK 293 exprimant le RGIP de manière stable en présence d'un inhibiteur des voies d'internalisation dépendante de la clathrine, la chlorpromazine. Les photos de petite taille représentent l'internalisation dans les mêmes conditions en absence de chlorpromazine.



**Figure 31: Internalisation du ligand GIP-AlexaFluor 647 dans des cellules HEK 293 exprimant la  $\beta$ -arrestine 2 de manière stable et le RGIP de manière transitoire**

Les images représentent l'internalisation du ligand GIP-AlexaFluor 647 dans des cellules exprimant la  $\beta$ -arrestine 2 et le RGIP. Les photos ont été prises après un temps de stimulation de 1 heure. Le ligand GIP-alexa 647 est très bien internalisé alors que la  $\beta$ -arrestine2 est restée diffuse dans le cytoplasme. Il n'y a pas de colocalisation entre la  $\beta$ -arrestine 2-GFP et le GIP-AlexaFluor 647.

une Renilla Luciferase a été construit et validé d'un point de vue fonctionnel. Des études de BRET entre le RGIP-RLuc et les  $\beta$ -arrestines-YFP ont été conduites et révèlent qu'il n'y a pas d'interaction directe entre le récepteur et les  $\beta$ -arrestines.

#### **B.4. Conclusion et poursuite de l'étude**

Ces résultats préliminaires indiquent que le RGIP s'internalise selon une voie dépendante de la dynamine et de la clathrine mais qu'il ne recrute pas les  $\beta$ -arrestines lors de son endocytose. Il est important de bien faire la différence entre l'internalisation du ligand et l'internalisation du récepteur lui-même. Jusqu'à présent, toutes ces données préliminaires portent sur le suivi du ligand GIP-AlexaFluor 647 ; nous n'avons donc pas d'informations directes sur le RGIP lui-même. L'étudiante qui a pris la suite de cette étude en 2009-2010, s'est alors attachée à construire un récepteur du GIP fusionné à une protéine GFP afin de pouvoir suivre ce récepteur en microscopie confocale. Le RGIP-GFP n'est pas encore disponible à ce jour, puisque les nombreuses versions de RGIP fusionné à la GFP présentent toutes un phénotype non fonctionnel, soit qu'elles sont piégées dans des vésicules intracellulaires et absentes de la membrane, soit qu'elles sont incapables d'être internalisées. Il reste donc à mettre au point cette construction qui sera très utile pour la suite de l'étude. Cependant, des données très récentes, obtenues par une autre étudiante qui a repris cette étude, montrent une colocalisation entre la petite chaîne de la clathrine fusionnée à la GFP et le GIP-AlexaFluor 647, ce qui renforce notre conviction que la clathrine est impliquée dans le mécanisme d'internalisation du RGIP.

Il semble donc que le RGIP s'internalise selon une voie dépendante de la clathrine sans pour autant recruter les  $\beta$ -arrestines. Il existe des exemples similaires dans la littérature dont nous avons discuté dans le chapitre « internalisation des RCPG indépendantes des  $\beta$ -arrestines ». En effet, certains de ces RCPG s'internalisent grâce à une interaction directe de leur extrémité C-terminale avec la sous-unité AP2 au niveau de sites consensus Y-X-X- $\phi$  (ou X est n'importe quel acide aminé, et  $\phi$  un acide aminé hydrophobe) situés sur le récepteur. Le RGIP contient plusieurs de ces motifs dans son extrémité C-terminale. La suite de cette étude aura pour but d'étudier l'internalisation des récepteurs GIP mutés sur chacun de ces motifs ainsi que des récepteurs GIP tronqués de l'extrémité C-terminale. Enfin, une approche de BRET entre le RGIP-RLuc et la sous-unité  $\mu$  d'AP2-YFP est également envisagée afin de vérifier cette hypothèse d'interaction directe entre GIPR et AP2.



*Conclusions Générales  
et Perspectives*



Les RCPG sont impliqués dans de nombreuses pathologies et constituent de ce fait la cible d'environ 30% des médicaments actuellement commercialisés. Le rôle de ces médicaments est de moduler l'action de ces récepteurs et notamment leurs signaux intracellulaires. La stimulation d'un RCPG par un agoniste conduit à l'activation des protéines G qui elles-mêmes initient des voies de signalisation intracellulaires. La transduction du signal dépendante des protéines G se déroule depuis la membrane plasmique de la cellule et est suivie de la désensibilisation et de l'internalisation du RCPG activé. L'internalisation des RCPG joue un rôle fondamental dans la régulation du signal généré par les protéines G puisque ce phénomène régule la disponibilité membranaire des récepteurs. De plus, le devenir du récepteur internalisé est très variable et peut être recyclé de manière rapide ou lente ou également être dirigé vers les lysosomes pour y être dégradé. Sur l'ensemble de la population d'un récepteur internalisé, une fraction peut être recyclée alors qu'une autre peut être dégradée et cela par différents mécanismes qui se mettent en place de manière séquentielle dans le temps. Le mode d'internalisation et le devenir du récepteur internalisé sont des paramètres essentiels de l'homéostasie du RCPG, leur étude est donc nécessaire pour appréhender la pharmacologie d'un récepteur.

La pharmacologie et le développement de ligands synthétiques des RCPG ont longtemps été basés uniquement sur l'activation des protéines G, considérées comme les seuls effecteurs directs des récepteurs. Depuis ces cinq dernières années, le rôle des  $\beta$ -arrestines dans la médiation du signal des RCPG a véritablement révolutionné la vision classique de transduction du signal des RCPG. La découverte de ligands biaisés, capables de cibler spécifiquement ces voies de signalisation dépendantes des  $\beta$ -arrestines, laisse entrevoir des perspectives significatives dans le domaine de la pharmacologie des RCPG et, à plus long terme, dans le développement de nouvelles molécules thérapeutiques.

Le RCCK2 est un récepteur physiologiquement important et il est aussi impliqué dans des pathologies nerveuses, gastriques et dans des cancers. Ce récepteur est donc une cible pharmacologique et un grand nombre de molécules synthétiques ciblant ce récepteur sont disponibles. Précédemment, le RCCK2 a fait l'objet d'études intensives au sein de notre laboratoire dans le but de déterminer les sites de liaison des neuropeptides naturels et de ligands synthétiques, et aussi de comprendre les mécanismes d'activation du récepteur en réponse à ces ligands. Ces études ont notamment permis d'analyser en détail les changements conformationnels du récepteur opérés lors de l'activation de la protéine  $G_q$ . Ces analyses ont également abouti à l'optimisation d'un modèle moléculaire du RCCK2 en accord avec les données expérimentales. Cependant, à mon arrivée dans le laboratoire, très peu de données étaient disponibles sur la régulation membranaire de ce récepteur en

réponse à différents ligands naturels ou synthétiques. L'objectif de ma thèse a donc été de déterminer les mécanismes d'internalisation de ce récepteur et le devenir du RCCK2 internalisé ainsi que de m'intéresser à la régulation pharmacologique de ces phénomènes.

Cette étude s'intégrait tout à fait dans la thématique de l'équipe. En effet, une collaboration était déjà établie avec le Pr Jean-Claude Reubi (Institut de Pathologie de l'Université de Berne, Suisse) qui développe des analogues radioactifs de la CCK avec, pour objectif, le ciblage diagnostique et thérapeutique de tumeurs neuroendocrines surexprimant le RCCK2. D'autre part, un projet alternatif naissait dans notre laboratoire ayant pour but de vectoriser des nanoparticules avec la CCK afin de cibler ces tumeurs surexprimant le RCCK2. Dans ce contexte, et en vue de l'optimisation de ces outils diagnostics et potentiellement thérapeutiques, il était important d'étudier les mécanismes de régulation membranaire de ce récepteur.

Dans un premier volet de notre étude, nous nous sommes attachés à déterminer les mécanismes d'internalisation du récepteur RCCK2 et le devenir du récepteur internalisé. Il ressort que l'internalisation du RCCK2 après la stimulation par la CCK ou la Gastrine est un mécanisme dépendant de la clathrine et de la dynamine. Comme beaucoup d'autres RCPG, le RCCK2 emprunte des voies dépendantes de la clathrine, toutefois nos résultats n'excluent pas que d'autres voies parallèles, comme la voie dépendante des cavéoles, ne jouent également un rôle minoritaire. Une fois internalisé, le RCCK2 n'est pas recyclé de manière rapide à la membrane mais est recyclé très lentement en passant par des zones périnucléaires de la cellule et est également dégradé dans les lysosomes. La connaissance du trafic du RCCK2 sera exploitée dans le contexte du ciblage diagnostique et thérapeutiques des tumeurs surexprimant le récepteur. En effet, dans ce contexte, l'accumulation maximale de ligands radioactifs ou vectorisés à des nanoparticules dans la cellule, sur de longues périodes, est recherchée ; or nous montrons que la CCK-AlexaFluor 647 et le RCCK2 colocalisent très longtemps et majoritairement dans des vésicules de recyclage lent. L'impact de la dégradation lysosomale d'une petite fraction de récepteur, sur la stabilité des ligands radioactifs ou vectorisés avec des nanoparticules, devra être étudié.

Dans notre étude, nous mettons en évidence l'implication des  $\beta$ -arrestines dans l'internalisation du RCCK2. Les deux  $\beta$ -arrestines sont recrutées au récepteur avec des affinités similaires, et restent associées au récepteur sur de longues durées de temps. L'ensemble des données permet de classer le RCCK2 dans la classe B des RCPG par rapport à ses caractéristiques liées à l'internalisation. Nous avons également identifié un motif de cinq sérines/thréonines responsables de la liaison des  $\beta$ -arrestines dans la partie distale de l'extrémité C-terminale du RCCK2. Ce motif de sérines/thréonines retrouvé sur le RCCK2 est, à l'exception de la première sérine en position 437, identique à celui (T-T-I-S-T)



porté par le récepteur de l'oxytocine (OTR) [151]. L'implication partielle de chacune de ces cinq sérines/thréonines est compatible avec l'idée qu'au moins trois sérines/thréonines sont nécessaires pour garantir une interaction optimale entre la  $\beta$ -arrestine et l'extrémité C-terminale d'un RCPG. L'identification de ce motif de sérine/thréonine a été déterminée en utilisant la  $\beta$ -arrestine2 et il conviendrait de vérifier que ce motif joue également le même rôle pour la  $\beta$ -arrestine1. D'autre part, nous avons toujours observé une liaison résiduelle des  $\beta$ -arrestines à un RCCK2 dépourvu d'extrémité C-terminale ou déplété de toutes les sérine/thréonines de son extrémité C-terminale. Ceci suggère qu'il existe un autre site d'interaction des  $\beta$ -arrestines sur le RCCK2 qui n'est pas sur son extrémité C-terminale. Il serait intéressant d'étudier la contribution de la troisième boucle intracellulaire contenant de nombreuses sérines/thréonines dans la liaison des  $\beta$ -arrestines au RCCK2. De plus, le profil de phosphorylation du RCCK2 par les GRK n'a pas été directement étudié et pourrait constituer un volet de la poursuite de cette étude.

Compte tenu des études antérieures de l'équipe sur le mode de liaison et d'action des différents ligands synthétiques du RCCK2 et de la découverte récente des ligands biaisés, il apparaissait important d'étendre l'étude en s'intéressant au comportement de ces ligands synthétiques sur le recrutement des  $\beta$ -arrestines au RCCK2. Nous avons sélectionné dans le premier article deux agonistes partiels le PD135,158 et le JB93,242 sur la voie PLC et la voie MAPKinase qui agissent comme antagonistes sur le recrutement des  $\beta$ -arrestines, démontrant pour la première fois l'existence de ligands biaisés du récepteur RCCK2. De plus, nous présentons également le JB93,183 très proche d'un point de vue structural du JB93,242, qui se comporte comme un antagoniste de la voie phospholipase C, un agoniste partiel sur la voie MAPKinase et un antagoniste sur le recrutement des  $\beta$ -arrestines. Ce composé présente un profil pharmacologique très atypique puisqu'il active la voie MAPKinase alors qu'il inhibe la voie PLC qui est dépendante de la protéine  $G_q$ . Une explication pourrait être que le signal MAPKinase du RCCK2 soit en partie dépendant de la protéine  $G_i$  dont le couplage au RCCK2 a été précédemment rapporté, et que le JB93,183 stabilise préférentiellement la conformation du RCCK2 couplé à la protéine  $G_i$  [386].

Le premier article relate la découverte de l'implication des  $\beta$ -arrestines dans l'internalisation du RCCK2 dépendante du ligand et la découverte de l'existence de ligands biaisés de ce récepteur. Ainsi, et afin de valoriser l'existence de ligands biaisés au RCCK2, nous avons entrepris l'étude de l'implication des  $\beta$ -arrestines dans la signalisation induite par le RCCK2. Nos résultats montrent que les  $\beta$ -arrestines jouent un rôle dans la voie MAPKinase induite par le RCCK2. Le rôle précis, activateur ou inhibiteur, des  $\beta$ -arrestines et la relation des  $\beta$ -arrestines avec la transactivation du récepteur EGF dans l'activation des

MAPKinase par le RCCK2 seront à déterminer lors de la poursuite de cette étude préliminaire. L'action des ligands biaisés JB93,183, JB93,242 et PD135,158 sur l'activation de la voie MAPKinase par le RCCK2 sera également étudiée et contribuera à déterminer les différentes composantes du signal MAPKinase (protéine Gq, protéine Gi,  $\beta$ -arrestines ?) induit par ce récepteur.

Une autre étude préliminaire a porté le récepteur du GIP (RGIP) qui est une cible pharmacologique notamment dans le traitement des diabètes de type II. Ce travail est à replacer dans le contexte historique de notre équipe où le travail de thèse d'un étudiant avait pour but de déterminer le mode d'activation du RGIP de manière similaire au travail réalisé sur le RCCK2. Le RGIP possède un mode de liaison et d'activation sensiblement différent de celui du RCCK2 et il était donc hautement probable qu'il soit également différent du RCCK2 d'un point de vue des mécanismes d'internalisation. Nos résultats préliminaires montrent en effet que le RGIP s'internalise sans recruter les  $\beta$ -arrestines tout en conservant l'utilisation d'un mécanisme dépendant de la clathrine. L'hypothèse la plus probable est que le RGIP recrute directement l'adaptateur AP2 par des motifs spécifiques de son extrémité C-terminale ou de ses boucles intracellulaires. La vérification de cette hypothèse en mesurant le recrutement direct de la chaîne  $\mu$ -AP2 au RGIP par BRET fait partie du projet de l'étudiante qui continue cette étude. Des approches de mutagenèse dirigée visant à modifier les sites d'interaction potentiels d'AP2 sur le RGIP sont également en cours. Il serait aussi intéressant de comparer le mécanisme d'action du RGIP avec le mécanisme alternatif d'internalisation du RCCK2 qui se met en place en l'absence des  $\beta$ -arrestines et avec les RCCK2 tronqués.

A l'heure actuelle, peu de RCPG présentant une internalisation indépendante des  $\beta$ -arrestines sont recensés. Les quelques RCPG recensés, comme par exemple le récepteur GABA<sub>A</sub>, et le RGIP de notre étude, posent la question des mécanismes de désensibilisation de ce type de récepteur [171]. Pour la plupart des RCPG dont l'internalisation implique les  $\beta$ -arrestines, la désensibilisation est assurée par les GRK et/ou PKA/PKC. On pourrait alors faire l'hypothèse que ces récepteurs s'internalisant sans le concours des  $\beta$ -arrestines pourraient être désensibilisés exclusivement par PKA/ PKC. Cependant, une étude montre que la GRK2 et la  $\beta$ -arrestine1 sont impliquées dans la désensibilisation du signal AMPc induit par le RGIP [387]. Les auteurs remarquent aussi que l'internalisation du RGIP n'est pas affectée par la surexpression de la GRK2, de la  $\beta$ -arrestine1 ou du dominant négatif de la  $\beta$ -arrestine1, ce qui est en accord avec nos résultats. Ils constatent également que le récepteur est phosphorylé par la GRK2. En résumé, si l'on considère cette étude et nos propres résultats, le signal du RGIP est désensibilisé par la phosphorylation de la GRK2 et

par l'action de la  $\beta$ -arrestine1, mais sans recrutement direct des  $\beta$ -arrestines au récepteur, alors que l'internalisation du RGIP se fait par un mécanisme clathrine dépendant et indépendant des  $\beta$ -arrestines. Les  $\beta$ -arrestines jouent certainement un rôle indirect dans la désensibilisation du RGIP à un autre niveau que celui de l'extrémité C-terminale du récepteur, contrairement au récepteur RCCK2 où les  $\beta$ -arrestines jouent un rôle direct dans la désensibilisation, l'internalisation et aussi probablement dans la transmission du signal.

Le RGIP présente un profil atypique en termes de désensibilisation et d'internalisation : or la désensibilisation du RGIP conduit à l'inhibition de la sécrétion d'insuline induite par ce récepteur dans des cellules  $\beta$  du pancréas [387]. Il est donc crucial de déterminer précisément les mécanismes de désensibilisation et d'internalisation du RGIP ainsi que le rôle exact des  $\beta$ -arrestines dans ces deux phénomènes. Ce travail est d'ores et déjà engagé dans l'équipe.

Dans le premier volet de l'étude sur le RCCK2 présenté dans le premier article, nous avons identifié trois agonistes biaisés le PD135,158, le JB93,183 et le JB93,242. Ces résultats suggéraient l'existence d'une conformation du RCCK2 recrutant les  $\beta$ -arrestines distincte de celle stimulant la voie PLC. Une conformation des RCPG recrutant les  $\beta$ -arrestines distincte de celle activant les protéines G est d'un point de vue conceptuel bien accepté, cependant, il n'existe aucune donnée expérimentale démontrant l'existence d'une telle conformation.

Le second volet de notre étude s'attache à vérifier cette hypothèse en considérant que, si elle est vérifiée, la conformation du RCCK2 recrutant les  $\beta$ -arrestines pourrait être sélectivement reconnue par certains ligands pharmacologiques. Nos résultats montrent que le GV150,013X ne reconnaît pas la conformation du RCCK2 recrutant les  $\beta$ -arrestines alors qu'il agit comme un antagoniste compétitif sur la voie PLC. De plus, le GV150,013X stabilise un état conformationnel du RCCK2 qui ne recrute pas les  $\beta$ -arrestines et provoque un déplacement d'équilibre en enrichissant la population de cette conformation.

Ces données suggèrent donc que certains acides aminés sont potentiellement plus impliqués dans la stabilisation de la conformation du RCCK2 recrutant les  $\beta$ -arrestines que dans celle de la conformation activant la protéine  $G_q$ . Notre étude basée sur la mutagenèse dirigée a permis d'identifier les acides aminés Met134, Trp346, Asn353, Arg353, His376, et Tyr380 qui sont préférentiellement impliqués dans l'état du RCCK2 recrutant la  $\beta$ -arrestine 2. La méthionine 134 est l'acide aminé qui semble le plus impliqué dans la stabilisation de cet état, or celui-ci n'est pas impliqué dans le site de liaison de la CCK ni dans l'activation du RCCK2 pour stimuler la voie PLC. A l'état basal, la méthionine 134 forme un réseau d'interactions avec la tyrosine 380 et l'histidine 376, qui sont toutes les deux impliquées dans

le site de liaison de la CCK, et qui contribuent fortement à la stabilisation de l'état activant la protéine G<sub>q</sub>. De plus, la méthionine 134 participe au positionnement du TM7 par rapport au TM3 par une interaction avec le tryptophane 346, un acide aminé conservé, qui pivote pendant l'activation du RCCK2. Toutes ces données indiquent que la conformation recrutant les  $\beta$ -arrestines requiert pour sa stabilisation toutes les interactions entre la CCK et les acides aminés du site de liaison orthostérique du RCCK2 avec la méthionine occupant un rôle central dans le maintien de ce réseau d'interactions. Cette interprétation peut expliquer pourquoi des agonistes partiels sur la voie PLC et/ou MAPKinase comme JB93,183, JB93,242 et PD135,158 ne sont pas capables d'induire le recrutement de la  $\beta$ -arrestine2 : en raison de leur petite taille, ces composés n'interagissent qu'avec un nombre limité de ces acides aminés dans le site de liaison et ceci n'est pas suffisant pour stabiliser l'état du RCCK2 recrutant la  $\beta$ -arrestine 2.

Nous proposons que les déterminants requis pour la liaison de GV150,013X dans le site de liaison de l'état activant la protéine G<sub>q</sub> ne sont plus disponibles ou ne présentent plus la géométrie requise pour la liaison du GV150,013X à l'état recrutant les  $\beta$ -arrestines. La mutation des acides aminés Met186, Leu222, Asn353, Thr354 et Arg356 pourrait démasquer des acides aminés ou réorganiser la géométrie des déterminants requis pour la liaison du GV150,013X ce qui restaure partiellement l'inhibition du recrutement de la  $\beta$ -arrestine 2.

Cependant, certaines interrogations demeurent : quel est l'état de phosphorylation du mutant de la méthionine 134, quelle est la particularité structurale du GV150,013X l'empêchant de reconnaître l'état recrutant la  $\beta$ -arrestine2, ou encore de quelle manière les acides aminés Met186, Leu222, Asn353, Thr354 et Arg356 contribuent à la resensibilisation de la conformation recrutant les  $\beta$ -arrestines au GV150,013X ? Les études de phosphorylation du RCCK2 et l'utilisation du GV150,013X chimiquement modifié, qui sont en cours de réalisation au sein de l'équipe, apporteront très probablement des réponses.

En résumé, nous présentons pour la première fois des données pharmacologiques et structurales qui sont clairement en faveur de l'existence d'une conformation d'un RCPG recrutant les  $\beta$ -arrestines distincte de celle activant les protéines G. Ces données constituent une preuve de concept et contribuent à la validation du modèle théorique d'activation multi-états des RCPG dont la conséquence la plus importante est l'agonisme biaisé.

Compte tenu de tous ces acquis, les perspectives globales de l'équipe vont s'orienter vers la détermination des différentes implications des  $\beta$ -arrestines dans le signal du RCCK2. En effet, notre étude préliminaire s'est cantonnée à explorer le rôle des  $\beta$ -arrestines dans l'activation de la voie MAPkinase, mais la littérature disponible sur le sujet, présentée dans l'introduction bibliographique, présente une multitude d'implications des  $\beta$ -arrestines dans la

transmission du signal des RCPG. Le RCCK2 est lui-même responsable de la stimulation de multiples voies de signalisation et l'utilisation de la lignée MEF invalidées pour les  $\beta$ -arrestines exprimant de manière stable le RCCK2 permet d'envisager un grand nombre d'études et notamment l'analyse par PCRarray de l'implication des  $\beta$ -arrestines dans la transcription de gènes cibles induite par le RCCK2.

D'autre part, le projet sur le RGIP sera également un des points forts de la thématique de l'équipe puisque l'exploration des mécanismes de désensibilisation et d'internalisation est actuellement en cours dans le laboratoire. De plus, l'équipe démarre un projet en collaboration avec des chimistes, des modélisateurs moléculaires et des physiologistes qui a pour but de développer des antagonistes synthétiques du RGIP. Le panel de molécules synthétiques disponibles à l'issue de ce projet d'un an pourra éventuellement permettre d'étudier la régulation pharmacologique d'internalisation du RGIP en se basant sur ce travail de thèse.

Les techniques développées dans le laboratoire lors de cette thèse, comme le BRET, la cytométrie en flux et la microscopie confocale sont, et continueront à être, exploitées par les différents membres de l'équipe autant sur le projet RGIP que sur l'étude de thèse de portant sur la vectorisation des nanoparticules dans le ciblage de tumeurs neuroendocrines surexprimant le RCCK2.

Enfin, nos données constituent une avancée dans la compréhension de l'homéostasie du RCCK2 et contribuent également à valider la stratégie de développement rationnel de ligands biaisés pour la voie des  $\beta$ -arrestines qui ouvre de nouveaux horizons dans le domaine de la pharmacologie des RCPG.



# *Bibliographie*





1. Ehrlich, P. (1956) The collected Papers of Paul Ehrlich in four volumes including a complete bibliography, *Histology, Biochemistry and Pathology*. 1, 65-98.
2. Ehrlich, P. (1957) The collected Papers of Paul Ehrlich in four volumes including a complete bibliography, *Immunology and Cancer Research*. 2, 107-125.
3. Ehrlich, P. M., J. (1957) The collected Papers of Paul Ehrlich in four volumes including a complete bibliography, *Immunology and Cancer Research*. 2, 205-212.
4. Langley, J. N. (1905) On the reaction of cells and of nerve-endings to certain poisons, chiefly as regards the reaction of striated muscle to nicotine and to curari, *J. Physiol*. 33, 374-413.
5. Clark, A. J. (1933) The mode of action of drugs on cells, *Edward Arnold & Co., London*.
6. Caron, M. G., Srinivasan, Y., Pitha, J., Kocielek, K. & Lefkowitz, R. J. (1979) Affinity chromatography of the beta-adrenergic receptor, *J Biol Chem*. 254, 2923-7.
7. Dixon, R. A., Kobilka, B. K., Strader, D. J., Benovic, J. L., Dohlman, H. G., Frielle, T., Bolanowski, M. A., Bennett, C. D., Rands, E., Diehl, R. E., Mumford, R. A., Slater, E. E., Sigal, I. S., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. & Strader, C. D. (1986) Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin, *Nature*. 321, 75-9.
8. Schioth, H. B. & Fredriksson, R. (2005) The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective, *Gen Comp Endocrinol*. 142, 94-101.
9. Chung, S., Funakoshi, T. & Civelli, O. (2008) Orphan GPCR research, *Br J Pharmacol*. 153 Suppl 1, S339-46.
10. Rafferty, C. N., Cassim, J. Y. & McConnell, D. G. (1977) Circular dichroism, optical rotatory dispersion, and absorption studies on the conformation of bovine rhodopsin in situ and solubilized with detergent, *Biophys Struct Mech*. 2, 227-320.
11. Nathans, J. & Hogness, D. S. (1983) Isolation, sequence analysis, and intron-exon arrangement of the gene encoding bovine rhodopsin, *Cell*. 34, 807-14.
12. Henderson, R. & Unwin, P. N. (1975) Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy, *Nature*. 257, 28-32.
13. Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Le Trong, I., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., Yamamoto, M. & Miyano, M. (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor, *Science*. 289, 739-45.
14. Rasmussen, S. G., Choi, H. J., Rosenbaum, D. M., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Edwards, P. C., Burghammer, M., Ratnala, V. R., Sanishvili, R., Fischetti, R. F., Schertler, G. F., Weis, W. I. & Kobilka, B. K. (2007) Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor, *Nature*. 450, 383-7.
15. Warne, T., Serrano-Vega, M. J., Baker, J. G., Moukhametzianov, R., Edwards, P. C., Henderson, R., Leslie, A. G., Tate, C. G. & Schertler, G. F. (2008) Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor, *Nature*. 454, 486-91.
16. Jaakola, V. P., Griffith, M. T., Hanson, M. A., Cherezov, V., Chien, E. Y., Lane, J. R., Ijzerman, A. P. & Stevens, R. C. (2008) The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist, *Science*. 322, 1211-7.
17. Kumari, T., Pant, B. & Pardasani, K. R. (2009) A model for the evaluation of domain based classification of GPCR, *Bioinformatics*. 4, 138-42.
18. Kolakowski, L. F., Jr. (1994) GCRDb: a G-protein-coupled receptor database, *Receptors Channels*. 2, 1-7.
19. Horn, F., Bettler, E., Oliveira, L., Campagne, F., Cohen, F. E. & Vriend, G. (2003) GPCRDB information system for G protein-coupled receptors, *Nucleic Acids Res*. 31, 294-7.
20. Bockaert, J. & Pin, J. P. (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success, *EMBO J*. 18, 1723-9.
21. Rovati, G. E., Capra, V. & Neubig, R. R. (2007) The highly conserved DRY motif of class A G protein-coupled receptors: beyond the ground state, *Mol Pharmacol*. 71, 959-64.

## Bibliographie

22. Ceresa, B. P. & Limbird, L. E. (1994) Mutation of an aspartate residue highly conserved among G-protein-coupled receptors results in nonreciprocal disruption of alpha 2-adrenergic receptor-G-protein interactions. A negative charge at amino acid residue 79 forecasts alpha 2A-adrenergic receptor sensitivity to allosteric modulation by monovalent cations and fully effective receptor/G-protein coupling, *J Biol Chem.* *269*, 29557-64.
23. Flanagan, C. A. (2005) A GPCR that is not "DRY", *Mol Pharmacol.* *68*, 1-3.
24. Miller, L. J., Dong, M., Harikumar, K. G. & Gao, F. (2007) Structural basis of natural ligand binding and activation of the Class II G-protein-coupled secretin receptor, *Biochem Soc Trans.* *35*, 709-12.
25. Pin, J. P., Galvez, T. & Prezeau, L. (2003) Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors, *Pharmacol Ther.* *98*, 325-54.
26. Pantages, E. & Dulac, C. (2000) A novel family of candidate pheromone receptors in mammals, *Neuron.* *28*, 835-45.
27. Nakagawa, T., Sakurai, T., Nishioka, T. & Touhara, K. (2005) Insect sex-pheromone signals mediated by specific combinations of olfactory receptors, *Science.* *307*, 1638-42.
28. Josefsson, L. G. (1999) Evidence for kinship between diverse G-protein coupled receptors, *Gene.* *239*, 333-40.
29. Prabhu, Y. & Eichinger, L. (2006) The Dictyostelium repertoire of seven transmembrane domain receptors, *Eur J Cell Biol.* *85*, 937-46.
30. Wang, H. Y., Liu, T. & Malbon, C. C. (2006) Structure-function analysis of Frizzleds, *Cell Signal.* *18*, 934-41.
31. Malbon, C. C. (2004) Frizzleds: new members of the superfamily of G-protein-coupled receptors, *Front Biosci.* *9*, 1048-58.
32. Costanzi, S., Siegel, J., Tikhonova, I. G. & Jacobson, K. A. (2009) Rhodopsin and the others: a historical perspective on structural studies of G protein-coupled receptors, *Curr Pharm Des.* *15*, 3994-4002.
33. Bissantz, C., Bernard, P., Hibert, M. & Rognan, D. (2003) Protein-based virtual screening of chemical databases. II. Are homology models of G-Protein Coupled Receptors suitable targets?, *Proteins.* *50*, 5-25.
34. Archer, E., Maigret, B., Escrieut, C., Pradayrol, L. & Fourmy, D. (2003) Rhodopsin crystal: new template yielding realistic models of G-protein-coupled receptors?, *Trends Pharmacol Sci.* *24*, 36-40.
35. Marco, E., Foucaud, M., Langer, I., Escrieut, C., Tikhonova, I. G. & Fourmy, D. (2007) Mechanism of activation of a G protein-coupled receptor, the human cholecystokinin-2 receptor, *J Biol Chem.* *282*, 28779-90.
36. Day, P. W., Rasmussen, S. G., Parnot, C., Fung, J. J., Masood, A., Kobilka, T. S., Yao, X. J., Choi, H. J., Weis, W. I., Rohrer, D. K. & Kobilka, B. K. (2007) A monoclonal antibody for G protein-coupled receptor crystallography, *Nat Methods.* *4*, 927-9.
37. Cherezov, V., Rosenbaum, D. M., Hanson, M. A., Rasmussen, S. G., Thian, F. S., Kobilka, T. S., Choi, H. J., Kuhn, P., Weis, W. I., Kobilka, B. K. & Stevens, R. C. (2007) High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor, *Science.* *318*, 1258-65.
38. Rosenbaum, D. M., Cherezov, V., Hanson, M. A., Rasmussen, S. G., Thian, F. S., Kobilka, T. S., Choi, H. J., Yao, X. J., Weis, W. I., Stevens, R. C. & Kobilka, B. K. (2007) GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta2-adrenergic receptor function, *Science.* *318*, 1266-73.
39. Costanzi, S. (2008) On the applicability of GPCR homology models to computer-aided drug discovery: a comparison between in silico and crystal structures of the beta2-adrenergic receptor, *J Med Chem.* *51*, 2907-14.
40. Shacham, S., Topf, M., Avisar, N., Glaser, F., Marantz, Y., Bar-Haim, S., Noiman, S., Naor, Z. & Becker, O. M. (2001) Modeling the 3D structure of GPCRs from sequence, *Med Res Rev.* *21*, 472-83.
41. Shacham, S., Marantz, Y., Bar-Haim, S., Kalid, O., Warshaviak, D., Avisar, N., Inbal, B., Heifetz, A., Fichman, M., Topf, M., Naor, Z., Noiman, S. & Becker, O. M. (2004) PREDICT modeling and in-silico screening for G-protein coupled receptors, *Proteins.* *57*, 51-86.
42. Becker, O. M., Dhanoa, D. S., Marantz, Y., Chen, D., Shacham, S., Cheruku, S., Heifetz, A., Mohanty, P., Fichman, M., Sharadendu, A., Nudelman, R., Kauffman, M. & Noiman, S. (2006) An

- integrated in silico 3D model-driven discovery of a novel, potent, and selective amidosulfonamide 5-HT<sub>1A</sub> agonist (PRX-00023) for the treatment of anxiety and depression, *J Med Chem.* 49, 3116-35.
43. Parthier, C., Reedtz-Runge, S., Rudolph, R. & Stubbs, M. T. (2009) Passing the baton in class B GPCRs: peptide hormone activation via helix induction?, *Trends Biochem Sci.* 34, 303-10.
44. Robison, G. A. & Sutherland, E. W. (1971) Cyclic AMP and the function of eukaryotic cells: an introduction, *Ann N Y Acad Sci.* 185, 5-9.
45. Walsh, D. A., Perkins, J. P. & Krebs, E. G. (1968) An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle, *J Biol Chem.* 243, 3763-5.
46. Rodbell, M., Birnbaumer, L., Pohl, S. L. & Krans, H. M. (1971) The glucagon-sensitive adenylyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. V. An obligatory role of guanylnucleotides in glucagon action, *J Biol Chem.* 246, 1877-82.
47. Ross, E. M. & Gilman, A. G. (1977) Resolution of some components of adenylate cyclase necessary for catalytic activity, *J Biol Chem.* 252, 6966-9.
48. Gilman, A. G. (1987) G proteins: transducers of receptor-generated signals, *Annu Rev Biochem.* 56, 615-49.
49. Northup, J. K., Sternweis, P. C., Smigel, M. D., Schleifer, L. S., Ross, E. M. & Gilman, A. G. (1980) Purification of the regulatory component of adenylate cyclase, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77, 6516-20.
50. Robishaw, J. D. & Berlot, C. H. (2004) Translating G protein subunit diversity into functional specificity, *Curr Opin Cell Biol.* 16, 206-9.
51. Milligan, G. & Kostenis, E. (2006) Heterotrimeric G-proteins: a short history, *Br J Pharmacol.* 147 Suppl 1, S46-55.
52. Hermans, E. (2003) Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors, *Pharmacol Ther.* 99, 25-44.
53. Grammatopoulos, D. K., Randevara, H. S., Levine, M. A., Kanellopoulou, K. A. & Hillhouse, E. W. (2001) Rat cerebral cortex corticotropin-releasing hormone receptors: evidence for receptor coupling to multiple G-proteins, *J Neurochem.* 76, 509-19.
54. Wong, S. K. (2003) G protein selectivity is regulated by multiple intracellular regions of GPCRs, *Neurosignals.* 12, 1-12.
55. Ulloa-Aguirre, A., Stanislaus, D., Janovick, J. A. & Conn, P. M. (1999) Structure-activity relationships of G protein-coupled receptors, *Arch Med Res.* 30, 420-35.
56. Chicchi, G. G., Graziano, M. P., Koch, G., Hey, P., Sullivan, K., Vicario, P. P. & Cascieri, M. A. (1997) Alterations in receptor activation and divalent cation activation of agonist binding by deletion of intracellular domains of the glucagon receptor, *J Biol Chem.* 272, 7765-9.
57. Moro, O., Lamah, J., Hogger, P. & Sadee, W. (1993) Hydrophobic amino acid in the i2 loop plays a key role in receptor-G protein coupling, *J Biol Chem.* 268, 22273-6.
58. Burstein, E. S., Spalding, T. A. & Brann, M. R. (1998) The second intracellular loop of the m5 muscarinic receptor is the switch which enables G-protein coupling, *J Biol Chem.* 273, 24322-7.
59. Okamoto, T. & Nishimoto, I. (1992) Detection of G protein-activator regions in M4 subtype muscarinic, cholinergic, and alpha 2-adrenergic receptors based upon characteristics in primary structure, *J Biol Chem.* 267, 8342-6.
60. Chen, X. P., Yang, W., Fan, Y., Luo, J. S., Hong, K., Wang, Z., Yan, J. F., Chen, X., Lu, J. X., Benovic, J. L. & Zhou, N. M. (2010) Structural determinants in the second intracellular loop of the human cannabinoid CB(1) receptor mediate selective coupling to G(s) and G(i), *Br J Pharmacol.*
61. Wess, J., Bonner, T. I., Dorje, F. & Brann, M. R. (1990) Delineation of muscarinic receptor domains conferring selectivity of coupling to guanine nucleotide-binding proteins and second messengers, *Mol Pharmacol.* 38, 517-23.
62. Liggett, S. B., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. & Hnatowich, M. (1991) Coupling of a mutated form of the human beta 2-adrenergic receptor to Gi and Gs. Requirement for multiple cytoplasmic domains in the coupling process, *J Biol Chem.* 266, 4816-21.
63. Conchon, S., Barrault, M. B., Miserey, S., Corvol, P. & Clauser, E. (1997) The C-terminal third intracellular loop of the rat AT1A angiotensin receptor plays a key role in G protein coupling specificity and transduction of the mitogenic signal, *J Biol Chem.* 272, 25566-72.

## Bibliographie

64. Nanoff, C., Koppensteiner, R., Yang, Q., Fuerst, E., Ahorn, H. & Freissmuth, M. (2006) The carboxyl terminus of the G $\alpha$ -subunit is the latch for triggered activation of heterotrimeric G proteins, *Mol Pharmacol.* **69**, 397-405.
65. Wess, J. (1998) Molecular basis of receptor/G-protein-coupling selectivity, *Pharmacol Ther.* **80**, 231-64.
66. O'Dowd, B. F., Hnatowich, M., Regan, J. W., Leader, W. M., Caron, M. G. & Lefkowitz, R. J. (1988) Site-directed mutagenesis of the cytoplasmic domains of the human beta 2-adrenergic receptor. Localization of regions involved in G protein-receptor coupling, *J Biol Chem.* **263**, 15985-92.
67. Jin, H., Zastawny, R., George, S. R. & O'Dowd, B. F. (1997) Elimination of palmitoylation sites in the human dopamine D1 receptor does not affect receptor-G protein interaction, *Eur J Pharmacol.* **324**, 109-16.
68. Anavi-Goffer, S., Fleischer, D., Hurst, D. P., Lynch, D. L., Barnett-Norris, J., Shi, S., Lewis, D. L., Mukhopadhyay, S., Howlett, A. C., Reggio, P. H. & Abood, M. E. (2007) Helix 8 Leu in the CB1 cannabinoid receptor contributes to selective signal transduction mechanisms, *J Biol Chem.* **282**, 25100-13.
69. Pankevych, H., Korkhov, V., Freissmuth, M. & Nanoff, C. (2003) Truncation of the A1 adenosine receptor reveals distinct roles of the membrane-proximal carboxyl terminus in receptor folding and G protein coupling, *J Biol Chem.* **278**, 30283-93.
70. Fukushima, Y., Asano, T., Takata, K., Funaki, M., Ogiwara, T., Anai, M., Tsukuda, K., Saitoh, T., Katagiri, H., Aihara, M., Matsuhashi, N., Oka, Y., Yazaki, Y. & Sugano, K. (1997) Role of the C terminus in histamine H2 receptor signaling, desensitization, and agonist-induced internalization, *J Biol Chem.* **272**, 19464-70.
71. Wong, S. K., Parker, E. M. & Ross, E. M. (1990) Chimeric muscarinic cholinergic: beta-adrenergic receptors that activate G<sub>s</sub> in response to muscarinic agonists, *J Biol Chem.* **265**, 6219-24.
72. Gales, C. & Bouvier, M. (2007) [New talk between receptor and trimeric G proteins: "an intertwined body dance"], *Med Sci (Paris).* **23**, 1031-4.
73. Tolkovsky, A. M. & Levitzki, A. (1978) Mode of coupling between the beta-adrenergic receptor and adenylate cyclase in turkey erythrocytes, *Biochemistry.* **17**, 3795.
74. Gales, C., Van Durm, J. J., Schaak, S., Pontier, S., Percherancier, Y., Audet, M., Paris, H. & Bouvier, M. (2006) Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes, *Nat Struct Mol Biol.* **13**, 778-86.
75. Oldham, W. M. & Hamm, H. E. (2008) Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors, *Nat Rev Mol Cell Biol.* **9**, 60-71.
76. Hill, S. J. & Baker, J. G. (2003) The ups and downs of G<sub>s</sub>- to G<sub>i</sub>-protein switching, *Br J Pharmacol.* **138**, 1188-9.
77. Janz, J. M. & Farrens, D. L. (2004) Rhodopsin activation exposes a key hydrophobic binding site for the transducin alpha-subunit C terminus, *J Biol Chem.* **279**, 29767-73.
78. Schwindinger, W. F., Miric, A., Zimmerman, D. & Levine, M. A. (1994) A novel G<sub>s</sub> alpha mutant in a patient with Albright hereditary osteodystrophy uncouples cell surface receptors from adenylate cyclase, *J Biol Chem.* **269**, 25387-91.
79. Kapoor, N., Menon, S. T., Chauhan, R., Sachdev, P. & Sakmar, T. P. (2009) Structural evidence for a sequential release mechanism for activation of heterotrimeric G proteins, *J Mol Biol.* **393**, 882-97.
80. McIntire, W. E., MacCleery, G. & Garrison, J. C. (2001) The G protein beta subunit is a determinant in the coupling of G<sub>s</sub> to the beta 1-adrenergic and A2a adenosine receptors, *J Biol Chem.* **276**, 15801-9.
81. Hou, Y., Azpiazu, I., Smrcka, A. & Gautam, N. (2000) Selective role of G protein gamma subunits in receptor interaction, *J Biol Chem.* **275**, 38961-4.
82. Jian, X., Clark, W. A., Kowalak, J., Markey, S. P., Simonds, W. F. & Northup, J. K. (2001) Gbetagamma affinity for bovine rhodopsin is determined by the carboxyl-terminal sequences of the gamma subunit, *J Biol Chem.* **276**, 48518-25.
83. Ciarkowski, J., Witt, M. & Slusarz, R. (2005) A hypothesis for GPCR activation, *J Mol Model.* **11**, 407-15.

## Bibliographie

84. Rondard, P., Iiri, T., Srinivasan, S., Meng, E., Fujita, T. & Bourne, H. R. (2001) Mutant G protein alpha subunit activated by Gbeta gamma: a model for receptor activation?, *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**, 6150-5.
85. Cherfils, J. & Chabre, M. (2003) Activation of G-protein Galpha subunits by receptors through Galpha-Gbeta and Galpha-Ggamma interactions, *Trends Biochem Sci.* **28**, 13-7.
86. Oldham, W. M., Van Eps, N., Preininger, A. M., Hubbell, W. L. & Hamm, H. E. (2007) Mapping allosteric connections from the receptor to the nucleotide-binding pocket of heterotrimeric G proteins, *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**, 7927-32.
87. Van Eps, N., Oldham, W. M., Hamm, H. E. & Hubbell, W. L. (2006) Structural and dynamical changes in an alpha-subunit of a heterotrimeric G protein along the activation pathway, *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**, 16194-9.
88. Heck, M. & Hofmann, K. P. (2001) Maximal rate and nucleotide dependence of rhodopsin-catalyzed transducin activation: initial rate analysis based on a double displacement mechanism, *J Biol Chem.* **276**, 10000-9.
89. Bunemann, M., Frank, M. & Lohse, M. J. (2003) Gi protein activation in intact cells involves subunit rearrangement rather than dissociation, *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**, 16077-82.
90. Digby, G. J., Lober, R. M., Sethi, P. R. & Lambert, N. A. (2006) Some G protein heterotrimers physically dissociate in living cells, *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**, 17789-94.
91. Siehler, S. (2009) Regulation of RhoGEF proteins by G12/13-coupled receptors, *Br J Pharmacol.* **158**, 41-9.
92. Luttrell, L. M., Della Rocca, G. J., van Biesen, T., Luttrell, D. K. & Lefkowitz, R. J. (1997) Gbetagamma subunits mediate Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. A scaffold for G protein-coupled receptor-mediated Ras activation, *J Biol Chem.* **272**, 4637-44.
93. Clapham, D. E. & Neer, E. J. (1997) G protein beta gamma subunits, *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **37**, 167-203.
94. Hildebrandt, J. D. (1997) Role of subunit diversity in signaling by heterotrimeric G proteins, *Biochem Pharmacol.* **54**, 325-39.
95. Sjogren, B., Blazer, L. L. & Neubig, R. R. (2010) Regulators of G protein signaling proteins as targets for drug discovery, *Prog Mol Biol Transl Sci.* **91**, 81-119.
96. Sibley, D. R. & Lefkowitz, R. J. (1985) Molecular mechanisms of receptor desensitization using the beta-adrenergic receptor-coupled adenylate cyclase system as a model, *Nature.* **317**, 124-9.
97. Yu, S. S., Lefkowitz, R. J. & Hausdorff, W. P. (1993) Beta-adrenergic receptor sequestration. A potential mechanism of receptor resensitization, *J Biol Chem.* **268**, 337-41.
98. Bouvier, M., Hausdorff, W. P., De Blasi, A., O'Dowd, B. F., Kobilka, B. K., Caron, M. G. & Lefkowitz, R. J. (1988) Removal of phosphorylation sites from the beta 2-adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization, *Nature.* **333**, 370-3.
99. Hausdorff, W. P., Bouvier, M., O'Dowd, B. F., Irons, G. P., Caron, M. G. & Lefkowitz, R. J. (1989) Phosphorylation sites on two domains of the beta 2-adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization, *J Biol Chem.* **264**, 12657-65.
100. Lohse, M. J., Lefkowitz, R. J., Caron, M. G. & Benovic, J. L. (1989) Inhibition of beta-adrenergic receptor kinase prevents rapid homologous desensitization of beta 2-adrenergic receptors, *Proc Natl Acad Sci U S A.* **86**, 3011-5.
101. Lohse, M. J., Benovic, J. L., Codina, J., Caron, M. G. & Lefkowitz, R. J. (1990) beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function, *Science.* **248**, 1547-50.
102. Diviani, D., Lattion, A. L. & Cotecchia, S. (1997) Characterization of the phosphorylation sites involved in G protein-coupled receptor kinase- and protein kinase C-mediated desensitization of the alpha1B-adrenergic receptor, *J Biol Chem.* **272**, 28712-9.
103. Zhang, N., Hodge, D., Rogers, T. J. & Oppenheim, J. J. (2003) Ca<sup>2+</sup>-independent protein kinase Cs mediate heterologous desensitization of leukocyte chemokine receptors by opioid receptors, *J Biol Chem.* **278**, 12729-36.

## Bibliographie

104. Strasser, R. H., Sibley, D. R. & Lefkowitz, R. J. (1986) A novel catecholamine-activated adenosine cyclic 3',5'-phosphate independent pathway for beta-adrenergic receptor phosphorylation in wild-type and mutant S49 lymphoma cells: mechanism of homologous desensitization of adenylate cyclase, *Biochemistry*. *25*, 1371-7.
105. Benovic, J. L., Mayor, F., Jr., Somers, R. L., Caron, M. G. & Lefkowitz, R. J. (1986) Light-dependent phosphorylation of rhodopsin by beta-adrenergic receptor kinase, *Nature*. *321*, 869-72.
106. Dorn, G. W., 2nd. (2009) GRK mythology: G-protein receptor kinases in cardiovascular disease, *J Mol Med*. *87*, 455-63.
107. Pitcher, J. A., Inglese, J., Higgins, J. B., Arriza, J. L., Casey, P. J., Kim, C., Benovic, J. L., Kwatra, M. M., Caron, M. G. & Lefkowitz, R. J. (1992) Role of beta gamma subunits of G proteins in targeting the beta-adrenergic receptor kinase to membrane-bound receptors, *Science*. *257*, 1264-7.
108. Nakata, H., Kameyama, K., Haga, K. & Haga, T. (1994) Location of agonist-dependent-phosphorylation sites in the third intracellular loop of muscarinic acetylcholine receptors (m2 subtype), *Eur J Biochem*. *220*, 29-36.
109. Pitcher, J., Lohse, M. J., Codina, J., Caron, M. G. & Lefkowitz, R. J. (1992) Desensitization of the isolated beta 2-adrenergic receptor by beta-adrenergic receptor kinase, cAMP-dependent protein kinase, and protein kinase C occurs via distinct molecular mechanisms, *Biochemistry*. *31*, 3193-7.
110. Krupnick, J. G. & Benovic, J. L. (1998) The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. *38*, 289-319.
111. Krasel, C., Bunemann, M., Lorenz, K. & Lohse, M. J. (2005) Beta-arrestin binding to the beta2-adrenergic receptor requires both receptor phosphorylation and receptor activation, *J Biol Chem*. *280*, 9528-35.
112. Penela, P., Murga, C., Ribas, C., Tutor, A. S., Peregrin, S. & Mayor, F., Jr. (2006) Mechanisms of regulation of G protein-coupled receptor kinases (GRKs) and cardiovascular disease, *Cardiovasc Res*. *69*, 46-56.
113. Premont, R. T. & Gainetdinov, R. R. (2007) Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins, *Annu Rev Physiol*. *69*, 511-34.
114. Penela, P., Murga, C., Ribas, C., Lafarga, V. & Mayor, F., Jr. (2010) The complex G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) interactome unveils new physiopathological targets, *Br J Pharmacol*. *160*, 821-32.
115. Salcedo, A., Mayor, F., Jr. & Penela, P. (2006) Mdm2 is involved in the ubiquitination and degradation of G-protein-coupled receptor kinase 2, *EMBO J*. *25*, 4752-62.
116. Chen, Y., Long, H., Wu, Z., Jiang, X. & Ma, L. (2008) EGF transregulates opioid receptors through EGFR-mediated GRK2 phosphorylation and activation, *Mol Biol Cell*. *19*, 2973-83.
117. Budd, D. C., McDonald, J. E. & Tobin, A. B. (2000) Phosphorylation and regulation of a Gq/11-coupled receptor by casein kinase 1alpha, *J Biol Chem*. *275*, 19667-75.
118. Luo, J., Busillo, J. M. & Benovic, J. L. (2008) M3 muscarinic acetylcholine receptor-mediated signaling is regulated by distinct mechanisms, *Mol Pharmacol*. *74*, 338-47.
119. Jala, V. R., Shao, W. H. & Haribabu, B. (2005) Phosphorylation-independent beta-arrestin translocation and internalization of leukotriene B4 receptors, *J Biol Chem*. *280*, 4880-7.
120. Daaka, Y., Luttrell, L. M. & Lefkowitz, R. J. (1997) Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A, *Nature*. *390*, 88-91.
121. Tran, T. M., Friedman, J., Baameur, F., Knoll, B. J., Moore, R. H. & Clark, R. B. (2007) Characterization of beta2-adrenergic receptor dephosphorylation: Comparison with the rate of resensitization, *Mol Pharmacol*. *71*, 47-60.
122. Mathiesen, J. M. & Ramirez, M. T. (2006) The metabotropic glutamate receptor 4 is internalized and desensitized upon protein kinase C activation, *Br J Pharmacol*. *148*, 279-90.
123. Namkung, Y. & Sibley, D. R. (2004) Protein kinase C mediates phosphorylation, desensitization, and trafficking of the D2 dopamine receptor, *J Biol Chem*. *279*, 49533-41.
124. Xiang, B., Yu, G. H., Guo, J., Chen, L., Hu, W., Pei, G. & Ma, L. (2001) Heterologous activation of protein kinase C stimulates phosphorylation of delta-opioid receptor at serine 344, resulting in beta-arrestin- and clathrin-mediated receptor internalization, *J Biol Chem*. *276*, 4709-16.

## Bibliographie

125. Cho, E. Y., Cho, D. I., Park, J. H., Kurose, H., Caron, M. G. & Kim, K. M. (2007) Roles of protein kinase C and actin-binding protein 280 in the regulation of intracellular trafficking of dopamine D3 receptor, *Mol Endocrinol.* **21**, 2242-54.
126. Kelly, E., Bailey, C. P. & Henderson, G. (2008) Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization, *Br J Pharmacol.* **153 Suppl 1**, S379-88.
127. Yuan, N., Friedman, J., Whaley, B. S. & Clark, R. B. (1994) cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C consensus site mutations of the beta-adrenergic receptor. Effect on desensitization and stimulation of adenylyl cyclase, *J Biol Chem.* **269**, 23032-8.
128. Seibold, A., Williams, B., Huang, Z. F., Friedman, J., Moore, R. H., Knoll, B. J. & Clark, R. B. (2000) Localization of the sites mediating desensitization of the beta(2)-adrenergic receptor by the GRK pathway, *Mol Pharmacol.* **58**, 1162-73.
129. Tran, T. M., Friedman, J., Qunaibi, E., Baameur, F., Moore, R. H. & Clark, R. B. (2004) Characterization of agonist stimulation of cAMP-dependent protein kinase and G protein-coupled receptor kinase phosphorylation of the beta2-adrenergic receptor using phosphoserine-specific antibodies, *Mol Pharmacol.* **65**, 196-206.
130. Torrecilla, I., Spragg, E. J., Poulin, B., McWilliams, P. J., Mistry, S. C., Blaukat, A. & Tobin, A. B. (2007) Phosphorylation and regulation of a G protein-coupled receptor by protein kinase CK2, *J Cell Biol.* **177**, 127-37.
131. Volovyk, Z. M., Wolf, M. J., Prasad, S. V. & Rockman, H. A. (2006) Agonist-stimulated beta-adrenergic receptor internalization requires dynamic cytoskeletal actin turnover, *J Biol Chem.* **281**, 9773-80.
132. Wolfe, B. L. & Trejo, J. (2007) Clathrin-dependent mechanisms of G protein-coupled receptor endocytosis, *Traffic.* **8**, 462-70.
133. Xu, Z. Q., Zhang, X. & Scott, L. (2007) Regulation of G protein-coupled receptor trafficking, *Acta Physiol (Oxf).* **190**, 39-45.
134. Ferguson, S. S., Menard, L., Barak, L. S., Koch, W. J., Colapietro, A. M. & Caron, M. G. (1995) Role of phosphorylation in agonist-promoted beta 2-adrenergic receptor sequestration. Rescue of a sequestration-defective mutant receptor by beta ARK1, *J Biol Chem.* **270**, 24782-9.
135. Krupnick, J. G., Santini, F., Gagnon, A. W., Keen, J. H. & Benovic, J. L. (1997) Modulation of the arrestin-clathrin interaction in cells. Characterization of beta-arrestin dominant-negative mutants, *J Biol Chem.* **272**, 32507-12.
136. Goodman, O. B., Jr., Krupnick, J. G., Santini, F., Gurevich, V. V., Penn, R. B., Gagnon, A. W., Keen, J. H. & Benovic, J. L. (1996) Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor, *Nature.* **383**, 447-50.
137. Kern, R. C., Kang, D. S. & Benovic, J. L. (2009) Arrestin2/clathrin interaction is regulated by key N- and C-terminal regions in arrestin2, *Biochemistry.* **48**, 7190-200.
138. Rodemer, C. & Haucke, V. (2008) Clathrin/AP-2-dependent endocytosis: a novel playground for the pharmacological toolbox?, *Handb Exp Pharmacol.* **105**, 105-22.
139. Laporte, S. A., Oakley, R. H., Zhang, J., Holt, J. A., Ferguson, S. S., Caron, M. G. & Barak, L. S. (1999) The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis, *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**, 3712-7.
140. Laporte, S. A., Oakley, R. H., Holt, J. A., Barak, L. S. & Caron, M. G. (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**, 23120-6.
141. Moore, C. A., Milano, S. K. & Benovic, J. L. (2007) Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins, *Annu Rev Physiol.* **69**, 451-82.
142. Fessart, D., Simaan, M., Zimmerman, B., Comeau, J., Hamdan, F. F., Wiseman, P. W., Bouvier, M. & Laporte, S. A. (2007) Src-dependent phosphorylation of beta2-adaptin dissociates the beta-arrestin-AP-2 complex, *J Cell Sci.* **120**, 1723-32.
143. Traub, L. M. (2009) Tickets to ride: selecting cargo for clathrin-regulated internalization, *Nat Rev Mol Cell Biol.* **10**, 583-96.

## Bibliographie

144. Puthenveedu, M. A. & von Zastrow, M. (2006) Cargo regulates clathrin-coated pit dynamics, *Cell*. **127**, 113-24.
145. Mundell, S. J., Luo, J., Benovic, J. L., Conley, P. B. & Poole, A. W. (2006) Distinct clathrin-coated pits sort different G protein-coupled receptor cargo, *Traffic*. **7**, 1420-31.
146. Gaidarov, I., Krupnick, J. G., Falck, J. R., Benovic, J. L. & Keen, J. H. (1999) Arrestin function in G protein-coupled receptor endocytosis requires phosphoinositide binding, *EMBO J*. **18**, 871-81.
147. Milano, S. K., Kim, Y. M., Stefano, F. P., Benovic, J. L. & Brenner, C. (2006) Nonvisual arrestin oligomerization and cellular localization are regulated by inositol hexakisphosphate binding, *J Biol Chem*. **281**, 9812-23.
148. Ahn, S., Maudsley, S., Luttrell, L. M., Lefkowitz, R. J. & Daaka, Y. (1999) Src-mediated tyrosine phosphorylation of dynamin is required for beta2-adrenergic receptor internalization and mitogen-activated protein kinase signaling, *J Biol Chem*. **274**, 1185-8.
149. Oakley, R. H., Laporte, S. A., Holt, J. A., Caron, M. G. & Barak, L. S. (2000) Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors, *J Biol Chem*. **275**, 17201-10.
150. Anborgh, P. H., Seachrist, J. L., Dale, L. B. & Ferguson, S. S. (2000) Receptor/beta-arrestin complex formation and the differential trafficking and resensitization of beta2-adrenergic and angiotensin II type 1A receptors, *Mol Endocrinol*. **14**, 2040-53.
151. Oakley, R. H., Laporte, S. A., Holt, J. A., Barak, L. S. & Caron, M. G. (2001) Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled receptor-beta-arrestin complexes after receptor endocytosis\*, *J Biol Chem*. **276**, 19452-60.
152. Roosterman, D., Cottrell, G. S., Schmidlin, F., Steinhoff, M. & Bunnett, N. W. (2004) Recycling and resensitization of the neurokinin 1 receptor. Influence of agonist concentration and Rab GTPases, *J Biol Chem*. **279**, 30670-9.
153. Tulipano, G., Stumm, R., Pfeiffer, M., Kreienkamp, H. J., Holtt, V. & Schulz, S. (2004) Differential beta-arrestin trafficking and endosomal sorting of somatostatin receptor subtypes, *J Biol Chem*. **279**, 21374-82.
154. Hoffmann, C., Ziegler, N., Reiner, S., Krasel, C. & Lohse, M. J. (2008) Agonist-selective, receptor-specific interaction of human P2Y receptors with beta-arrestin-1 and -2, *J Biol Chem*. **283**, 30933-41.
155. Shenoy, S. K., McDonald, P. H., Kohout, T. A. & Lefkowitz, R. J. (2001) Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin, *Science*. **294**, 1307-13.
156. Perroy, J., Pontier, S., Charest, P. G., Aubry, M. & Bouvier, M. (2004) Real-time monitoring of ubiquitination in living cells by BRET, *Nat Methods*. **1**, 203-8.
157. Shenoy, S. K. & Lefkowitz, R. J. (2003) Trafficking patterns of beta-arrestin and G protein-coupled receptors determined by the kinetics of beta-arrestin deubiquitination, *J Biol Chem*. **278**, 14498-506.
158. Oakley, R. H., Laporte, S. A., Holt, J. A., Barak, L. S. & Caron, M. G. (1999) Association of beta-arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization, *J Biol Chem*. **274**, 32248-57.
159. Shenoy, S. K., Barak, L. S., Xiao, K., Ahn, S., Berthouze, M., Shukla, A. K., Luttrell, L. M. & Lefkowitz, R. J. (2007) Ubiquitination of beta-arrestin links seven-transmembrane receptor endocytosis and ERK activation, *J Biol Chem*. **282**, 29549-62.
160. Shenoy, S. K., Modi, A. S., Shukla, A. K., Xiao, K., Berthouze, M., Ahn, S., Wilkinson, K. D., Miller, W. E. & Lefkowitz, R. J. (2009) Beta-arrestin-dependent signaling and trafficking of 7-transmembrane receptors is reciprocally regulated by the deubiquitinase USP33 and the E3 ligase Mdm2, *Proc Natl Acad Sci U S A*. **106**, 6650-5.
161. Ozawa, K., Whalen, E. J., Nelson, C. D., Mu, Y., Hess, D. T., Lefkowitz, R. J. & Stamler, J. S. (2008) S-nitrosylation of beta-arrestin regulates beta-adrenergic receptor trafficking, *Mol Cell*. **31**, 395-405.
162. Paing, M. M., Johnston, C. A., Siderovski, D. P. & Trejo, J. (2006) Clathrin adaptor AP2 regulates thrombin receptor constitutive internalization and endothelial cell resensitization, *Mol Cell Biol*. **26**, 3231-42.



## Bibliographie

163. Lecat, S., Ouedraogo, M., Cherrier, T., Noulet, F., Ronde, P., Glasser, N., Galzi, J. L., Mely, Y., Takeda, K. & Bucher, B. (2011) Contribution of a tyrosine-based motif to cellular trafficking of wild-type and truncated NPY Y(1) receptors, *Cell Signal*. **23**, 228-38.
164. Berglund, M. M., Schober, D. A., Statnick, M. A., McDonald, P. H. & Gehlert, D. R. (2003) The use of bioluminescence resonance energy transfer 2 to study neuropeptide Y receptor agonist-induced beta-arrestin 2 interaction, *J Pharmacol Exp Ther*. **306**, 147-56.
165. Royle, S. J., Qureshi, O. S., Bobanovic, L. K., Evans, P. R., Owen, D. J. & Murrell-Lagnado, R. D. (2005) Non-canonical YXXGPhi endocytic motifs: recognition by AP2 and preferential utilization in P2X4 receptors, *J Cell Sci*. **118**, 3073-80.
166. Fan, G. H., Yang, W., Wang, X. J., Qian, Q. & Richmond, A. (2001) Identification of a motif in the carboxyl terminus of CXCR2 that is involved in adaptin 2 binding and receptor internalization, *Biochemistry*. **40**, 791-800.
167. Gabilondo, A. M., Hegler, J., Krasel, C., Boivin-Jahns, V., Hein, L. & Lohse, M. J. (1997) A dileucine motif in the C terminus of the beta2-adrenergic receptor is involved in receptor internalization, *Proc Natl Acad Sci U S A*. **94**, 12285-90.
168. Diviani, D., Lattion, A. L., Abuin, L., Staub, O. & Cotecchia, S. (2003) The adaptor complex 2 directly interacts with the alpha 1b-adrenergic receptor and plays a role in receptor endocytosis, *J Biol Chem*. **278**, 19331-40.
169. Fraile-Ramos, A., Kohout, T. A., Waldhoer, M. & Marsh, M. (2003) Endocytosis of the viral chemokine receptor US28 does not require beta-arrestins but is dependent on the clathrin-mediated pathway, *Traffic*. **4**, 243-53.
170. Kumar, S., Kralic, J. E., O'Buckley, T. K., Grobin, A. C. & Morrow, A. L. (2003) Chronic ethanol consumption enhances internalization of alpha1 subunit-containing GABAA receptors in cerebral cortex, *J Neurochem*. **86**, 700-8.
171. Smith, K. R., McAinsh, K., Chen, G., Arancibia-Carcamo, I. L., Haucke, V., Yan, Z., Moss, S. J. & Kittler, J. T. (2008) Regulation of inhibitory synaptic transmission by a conserved atypical interaction of GABA(A) receptor beta- and gamma-subunits with the clathrin AP2 adaptor, *Neuropharmacology*. **55**, 844-50.
172. Mayor, S. & Pagano, R. E. (2007) Pathways of clathrin-independent endocytosis, *Nat Rev Mol Cell Biol*. **8**, 603-12.
173. Wyse, B. D., Prior, I. A., Qian, H., Morrow, I. C., Nixon, S., Muncke, C., Kurzchalia, T. V., Thomas, W. G., Parton, R. G. & Hancock, J. F. (2003) Caveolin interacts with the angiotensin II type 1 receptor during exocytic transport but not at the plasma membrane, *J Biol Chem*. **278**, 23738-46.
174. Chini, B. & Parenti, M. (2004) G-protein coupled receptors in lipid rafts and caveolae: how, when and why do they go there?, *J Mol Endocrinol*. **32**, 325-38.
175. Okamoto, T., Schlegel, A., Scherer, P. E. & Lisanti, M. P. (1998) Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane, *J Biol Chem*. **273**, 5419-22.
176. Razani, B., Rubin, C. S. & Lisanti, M. P. (1999) Regulation of cAMP-mediated signal transduction via interaction of caveolins with the catalytic subunit of protein kinase A, *J Biol Chem*. **274**, 26353-60.
177. Hurley, J. H. & Emr, S. D. (2006) The ESCRT complexes: structure and mechanism of a membrane-trafficking network, *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. **35**, 277-98.
178. Raiborg, C., Bremnes, B., Mehlum, A., Gillooly, D. J., D'Arrigo, A., Stang, E. & Stenmark, H. (2001) FYVE and coiled-coil domains determine the specific localisation of Hrs to early endosomes, *J Cell Sci*. **114**, 2255-63.
179. Raiborg, C., Bache, K. G., Mehlum, A., Stang, E. & Stenmark, H. (2001) Hrs recruits clathrin to early endosomes, *EMBO J*. **20**, 5008-21.
180. Williams, R. L. & Urbe, S. (2007) The emerging shape of the ESCRT machinery, *Nat Rev Mol Cell Biol*. **8**, 355-68.
181. Babst, M., Wendland, B., Estepa, E. J. & Emr, S. D. (1998) The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function, *EMBO J*. **17**, 2982-93.

## Bibliographie

182. Nabhan, J. F., Pan, H. & Lu, Q. (2010) Arrestin domain-containing protein 3 recruits the NEDD4 E3 ligase to mediate ubiquitination of the beta2-adrenergic receptor, *EMBO Rep.* **11**, 605-11.
183. Slagsvold, T., Marchese, A., Brech, A. & Stenmark, H. (2006) CISK attenuates degradation of the chemokine receptor CXCR4 via the ubiquitin ligase AIP4, *EMBO J.* **25**, 3738-49.
184. Marchese, A., Raiborg, C., Santini, F., Keen, J. H., Stenmark, H. & Benovic, J. L. (2003) The E3 ubiquitin ligase AIP4 mediates ubiquitination and sorting of the G protein-coupled receptor CXCR4, *Dev Cell.* **5**, 709-22.
185. Tanowitz, M. & Von Zastrow, M. (2002) Ubiquitination-independent trafficking of G protein-coupled receptors to lysosomes, *J Biol Chem.* **277**, 50219-22.
186. Hanyaloglu, A. C. & von Zastrow, M. (2008) Regulation of GPCRs by endocytic membrane trafficking and its potential implications, *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **48**, 537-68.
187. Marley, A. & von Zastrow, M. (2010) Dysbindin promotes the post-endocytic sorting of G protein-coupled receptors to lysosomes, *PLoS One.* **5**, e9325.
188. Wang, Y., Zhou, Y., Szabo, K., Haft, C. R. & Trejo, J. (2002) Down-regulation of protease-activated receptor-1 is regulated by sorting nexin 1, *Mol Biol Cell.* **13**, 1965-76.
189. Gullapalli, A., Wolfe, B. L., Griffin, C. T., Magnuson, T. & Trejo, J. (2006) An essential role for SNX1 in lysosomal sorting of protease-activated receptor-1: evidence for retromer-, Hrs-, and Tsg101-independent functions of sorting nexins, *Mol Biol Cell.* **17**, 1228-38.
190. Cong, M., Perry, S. J., Hu, L. A., Hanson, P. I., Claing, A. & Lefkowitz, R. J. (2001) Binding of the beta2 adrenergic receptor to N-ethylmaleimide-sensitive factor regulates receptor recycling, *J Biol Chem.* **276**, 45145-52.
191. Gage, R. M., Matveeva, E. A., Whiteheart, S. W. & von Zastrow, M. (2005) Type I PDZ ligands are sufficient to promote rapid recycling of G Protein-coupled receptors independent of binding to N-ethylmaleimide-sensitive factor, *J Biol Chem.* **280**, 3305-13.
192. Gage, R. M., Kim, K. A., Cao, T. T. & von Zastrow, M. (2001) A transplantable sorting signal that is sufficient to mediate rapid recycling of G protein-coupled receptors, *J Biol Chem.* **276**, 44712-20.
193. Trejo, J. (2005) Internal PDZ ligands: novel endocytic recycling motifs for G protein-coupled receptors, *Mol Pharmacol.* **67**, 1388-90.
194. Tanowitz, M. & von Zastrow, M. (2003) A novel endocytic recycling signal that distinguishes the membrane trafficking of naturally occurring opioid receptors, *J Biol Chem.* **278**, 45978-86.
195. Gardner, L. A., Naren, A. P. & Bahouth, S. W. (2007) Assembly of an SAP97-AKAP79-cAMP-dependent protein kinase scaffold at the type 1 PSD-95/DLG/ZO1 motif of the human beta(1)-adrenergic receptor generates a receptosome involved in receptor recycling and networking, *J Biol Chem.* **282**, 5085-99.
196. Hanyaloglu, A. C., McCullagh, E. & von Zastrow, M. (2005) Essential role of Hrs in a recycling mechanism mediating functional resensitization of cell signaling, *EMBO J.* **24**, 2265-83.
197. Zerial, M. & McBride, H. (2001) Rab proteins as membrane organizers, *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2**, 107-17.
198. Stenmark, H. (2009) Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic, *Nat Rev Mol Cell Biol.* **10**, 513-25.
199. Seachrist, J. L. & Ferguson, S. S. (2003) Regulation of G protein-coupled receptor endocytosis and trafficking by Rab GTPases, *Life Sci.* **74**, 225-35.
200. Seachrist, J. L., Anborgh, P. H. & Ferguson, S. S. (2000) beta 2-adrenergic receptor internalization, endosomal sorting, and plasma membrane recycling are regulated by rab GTPases, *J Biol Chem.* **275**, 27221-8.
201. Bremnes, T., Paasche, J. D., Mehlum, A., Sandberg, C., Bremnes, B. & Attramadal, H. (2000) Regulation and intracellular trafficking pathways of the endothelin receptors, *J Biol Chem.* **275**, 17596-604.
202. Seachrist, J. L., Laporte, S. A., Dale, L. B., Babwah, A. V., Caron, M. G., Anborgh, P. H. & Ferguson, S. S. (2002) Rab5 association with the angiotensin II type 1A receptor promotes Rab5 GTP binding and vesicular fusion, *J Biol Chem.* **277**, 679-85.

## Bibliographie

203. Bucci, C., Thomsen, P., Nicoziani, P., McCarthy, J. & van Deurs, B. (2000) Rab7: a key to lysosome biogenesis, *Mol Biol Cell*. **11**, 467-80.
204. Pfister, C., Chabre, M., Plouet, J., Tuyen, V. V., De Kozak, Y., Faure, J. P. & Kuhn, H. (1985) Retinal S antigen identified as the 48K protein regulating light-dependent phosphodiesterase in rods, *Science*. **228**, 891-3.
205. Benovic, J. L., Kuhn, H., Weyand, I., Codina, J., Caron, M. G. & Lefkowitz, R. J. (1987) Functional desensitization of the isolated beta-adrenergic receptor by the beta-adrenergic receptor kinase: potential role of an analog of the retinal protein arrestin (48-kDa protein), *Proc Natl Acad Sci U S A*. **84**, 8879-82.
206. Ferguson, S. S. (2001) Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling, *Pharmacol Rev*. **53**, 1-24.
207. Gurevich, V. V. & Gurevich, E. V. (2006) The structural basis of arrestin-mediated regulation of G-protein-coupled receptors, *Pharmacol Ther*. **110**, 465-502.
208. Charest, P. G., Terrillon, S. & Bouvier, M. (2005) Monitoring agonist-promoted conformational changes of beta-arrestin in living cells by intramolecular BRET, *EMBO Rep*. **6**, 334-40.
209. Gurevich, V. V. & Benovic, J. L. (1993) Visual arrestin interaction with rhodopsin. Sequential multisite binding ensures strict selectivity toward light-activated phosphorylated rhodopsin, *J Biol Chem*. **268**, 11628-38.
210. Vishnivetskiy, S. A., Hosey, M. M., Benovic, J. L. & Gurevich, V. V. (2004) Mapping the arrestin-receptor interface. Structural elements responsible for receptor specificity of arrestin proteins, *J Biol Chem*. **279**, 1262-8.
211. Vishnivetskiy, S. A., Francis, D., Van Eps, N., Kim, M., Hanson, S. M., Klug, C. S., Hubbell, W. L. & Gurevich, V. V. (2010) The role of arrestin alpha-helix I in receptor binding, *J Mol Biol*. **395**, 42-54.
212. Luttrell, L. M., Ferguson, S. S., Daaka, Y., Miller, W. E., Maudsley, S., Della Rocca, G. J., Lin, F., Kawakatsu, H., Owada, K., Luttrell, D. K., Caron, M. G. & Lefkowitz, R. J. (1999) Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes, *Science*. **283**, 655-61.
213. Xiao, K., McClatchy, D. B., Shukla, A. K., Zhao, Y., Chen, M., Shenoy, S. K., Yates, J. R., 3rd & Lefkowitz, R. J. (2007) Functional specialization of beta-arrestin interactions revealed by proteomic analysis, *Proc Natl Acad Sci U S A*. **104**, 12011-6.
214. Miller, W. E., Maudsley, S., Ahn, S., Khan, K. D., Luttrell, L. M. & Lefkowitz, R. J. (2000) beta-arrestin1 interacts with the catalytic domain of the tyrosine kinase c-SRC. Role of beta-arrestin1-dependent targeting of c-SRC in receptor endocytosis, *J Biol Chem*. **275**, 11312-9.
215. Penela, P., Elorza, A., Sarnago, S. & Mayor, F., Jr. (2001) Beta-arrestin- and c-Src-dependent degradation of G-protein-coupled receptor kinase 2, *EMBO J*. **20**, 5129-38.
216. Zimmerman, B., Simaan, M., Lee, M. H., Luttrell, L. M. & Laporte, S. A. (2009) c-Src-mediated phosphorylation of AP-2 reveals a general mechanism for receptors internalizing through the clathrin pathway, *Cell Signal*. **21**, 103-10.
217. DeFea, K. A., Vaughn, Z. D., O'Bryan, E. M., Nishijima, D., Dery, O. & Bunnett, N. W. (2000) The proliferative and antiapoptotic effects of substance P are facilitated by formation of a beta -arrestin-dependent scaffolding complex, *Proc Natl Acad Sci U S A*. **97**, 11086-91.
218. Galet, C. & Ascoli, M. (2008) Arrestin-3 is essential for the activation of Fyn by the luteinizing hormone receptor (LHR) in MA-10 cells, *Cell Signal*. **20**, 1822-9.
219. Yang, M., Zhang, H., Voyno-Yasenetskaya, T. & Ye, R. D. (2003) Requirement of Gbetagamma and c-Src in D2 dopamine receptor-mediated nuclear factor-kappaB activation, *Mol Pharmacol*. **64**, 447-55.
220. DeFea, K. A., Zalevsky, J., Thoma, M. S., Dery, O., Mullins, R. D. & Bunnett, N. W. (2000) beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2, *J Cell Biol*. **148**, 1267-81.
221. Luttrell, L. M., Roudabush, F. L., Choy, E. W., Miller, W. E., Field, M. E., Pierce, K. L. & Lefkowitz, R. J. (2001) Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds, *Proc Natl Acad Sci U S A*. **98**, 2449-54.

## Bibliographie

222. Jafri, F., El-Shewy, H. M., Lee, M. H., Kelly, M., Luttrell, D. K. & Luttrell, L. M. (2006) Constitutive ERK1/2 activation by a chimeric neurokinin 1 receptor-beta-arrestin1 fusion protein. Probing the composition and function of the G protein-coupled receptor "signalsome", *J Biol Chem.* **281**, 19346-57.
223. Lee, M. H., El-Shewy, H. M., Luttrell, D. K. & Luttrell, L. M. (2008) Role of beta-arrestin-mediated desensitization and signaling in the control of angiotensin AT1a receptor-stimulated transcription, *J Biol Chem.* **283**, 2088-97.
224. Gesty-Palmer, D., El Shewy, H., Kohout, T. A. & Luttrell, L. M. (2005) beta-Arrestin 2 expression determines the transcriptional response to lysophosphatidic acid stimulation in murine embryo fibroblasts, *J Biol Chem.* **280**, 32157-67.
225. Tohgo, A., Choy, E. W., Gesty-Palmer, D., Pierce, K. L., Laporte, S., Oakley, R. H., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. & Luttrell, L. M. (2003) The stability of the G protein-coupled receptor-beta-arrestin interaction determines the mechanism and functional consequence of ERK activation, *J Biol Chem.* **278**, 6258-67.
226. Ge, L., Ly, Y., Hollenberg, M. & DeFea, K. (2003) A beta-arrestin-dependent scaffold is associated with prolonged MAPK activation in pseudopodia during protease-activated receptor-2-induced chemotaxis, *J Biol Chem.* **278**, 34418-26.
227. DeWire, S. M., Kim, J., Whalen, E. J., Ahn, S., Chen, M. & Lefkowitz, R. J. (2008) Beta-arrestin-mediated signaling regulates protein synthesis, *J Biol Chem.* **283**, 10611-20.
228. Ahn, S., Shenoy, S. K., Wei, H. & Lefkowitz, R. J. (2004) Differential kinetic and spatial patterns of beta-arrestin and G protein-mediated ERK activation by the angiotensin II receptor, *J Biol Chem.* **279**, 35518-25.
229. Song, X., Coffa, S., Fu, H. & Gurevich, V. V. (2009) How does arrestin assemble MAPKs into a signaling complex?, *J Biol Chem.* **284**, 685-95.
230. Willoughby, E. A. & Collins, M. K. (2005) Dynamic interaction between the dual specificity phosphatase MKP7 and the JNK3 scaffold protein beta-arrestin 2, *J Biol Chem.* **280**, 25651-8.
231. Beaulieu, J. M., Sotnikova, T. D., Marion, S., Lefkowitz, R. J., Gainetdinov, R. R. & Caron, M. G. (2005) An Akt/beta-arrestin 2/PP2A signaling complex mediates dopaminergic neurotransmission and behavior, *Cell.* **122**, 261-73.
232. Wang, P. & DeFea, K. A. (2006) Protease-activated receptor-2 simultaneously directs beta-arrestin-1-dependent inhibition and Galphaq-dependent activation of phosphatidylinositol 3-kinase, *Biochemistry.* **45**, 9374-85.
233. Wang, P., Kumar, P., Wang, C. & DeFea, K. A. (2007) Differential regulation of class IA phosphoinositide 3-kinase catalytic subunits p110 alpha and beta by protease-activated receptor 2 and beta-arrestins, *Biochem J.* **408**, 221-30.
234. Goel, R., Phillips-Mason, P. J., Raben, D. M. & Baldassare, J. J. (2002) alpha-Thrombin induces rapid and sustained Akt phosphorylation by beta-arrestin1-dependent and -independent mechanisms, and only the sustained Akt phosphorylation is essential for G1 phase progression, *J Biol Chem.* **277**, 18640-8.
235. Gao, H., Sun, Y., Wu, Y., Luan, B., Wang, Y., Qu, B. & Pei, G. (2004) Identification of beta-arrestin2 as a G protein-coupled receptor-stimulated regulator of NF-kappaB pathways, *Mol Cell.* **14**, 303-17.
236. Witherow, D. S., Garrison, T. R., Miller, W. E. & Lefkowitz, R. J. (2004) beta-Arrestin inhibits NF-kappaB activity by means of its interaction with the NF-kappaB inhibitor Ikbalpha, *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**, 8603-7.
237. Perry, S. J., Baillie, G. S., Kohout, T. A., McPhee, I., Magiera, M. M., Ang, K. L., Miller, W. E., McLean, A. J., Conti, M., Houslay, M. D. & Lefkowitz, R. J. (2002) Targeting of cyclic AMP degradation to beta 2-adrenergic receptors by beta-arrestins, *Science.* **298**, 834-6.
238. Ma, L. & Pei, G. (2007) Beta-arrestin signaling and regulation of transcription, *J Cell Sci.* **120**, 213-8.
239. Boularan, C., Scott, M. G., Bourougaa, K., Bellal, M., Esteve, E., Thuret, A., Benmerah, A., Tramier, M., Coppey-Moisan, M., Labbe-Jullie, C., Fahraeus, R. & Marullo, S. (2007) beta-arrestin 2

## Bibliographie

- oligomerization controls the Mdm2-dependent inhibition of p53, *Proc Natl Acad Sci U S A.* *104*, 18061-6.
240. Xiao, K., Sun, J., Kim, J., Rajagopal, S., Zhai, B., Villen, J., Haas, W., Kovacs, J. J., Shukla, A. K., Hara, M. R., Hernandez, M., Lachmann, A., Zhao, S., Lin, Y., Cheng, Y., Mizuno, K., Ma'ayan, A., Gygi, S. P. & Lefkowitz, R. J. (2010) Global phosphorylation analysis of beta-arrestin-mediated signaling downstream of a seven transmembrane receptor (7TMR), *Proc Natl Acad Sci U S A.* *107*, 15299-304.
241. Luttrell, L. M. & Gesty-Palmer, D. (2010) Beyond desensitization: physiological relevance of arrestin-dependent signaling, *Pharmacol Rev.* *62*, 305-30.
242. Baylor, D. A. & Burns, M. E. (1998) Control of rhodopsin activity in vision, *Eye (Lond).* *12 ( Pt 3b)*, 521-5.
243. Beaulieu, J. M., Marion, S., Rodriguiz, R. M., Medvedev, I. O., Sotnikova, T. D., Ghisi, V., Wetsel, W. C., Lefkowitz, R. J., Gainetdinov, R. R. & Caron, M. G. (2008) A beta-arrestin 2 signaling complex mediates lithium action on behavior, *Cell.* *132*, 125-36.
244. Gainetdinov, R. R., Bohn, L. M., Sotnikova, T. D., Cyr, M., Laakso, A., Macrae, A. D., Torres, G. E., Kim, K. M., Lefkowitz, R. J., Caron, M. G. & Premont, R. T. (2003) Dopaminergic supersensitivity in G protein-coupled receptor kinase 6-deficient mice, *Neuron.* *38*, 291-303.
245. Lymperopoulos, A., Rengo, G., Zincarelli, C., Kim, J., Soltys, S. & Koch, W. J. (2009) An adrenal beta-arrestin 1-mediated signaling pathway underlies angiotensin II-induced aldosterone production in vitro and in vivo, *Proc Natl Acad Sci U S A.* *106*, 5825-30.
246. Noma, T., Lemaire, A., Naga Prasad, S. V., Barki-Harrington, L., Tilley, D. G., Chen, J., Le Corvoisier, P., Violin, J. D., Wei, H., Lefkowitz, R. J. & Rockman, H. A. (2007) Beta-arrestin-mediated beta1-adrenergic receptor transactivation of the EGFR confers cardioprotection, *J Clin Invest.* *117*, 2445-58.
247. Kim, J., Zhang, L., Peppel, K., Wu, J. H., Zidar, D. A., Brian, L., DeWire, S. M., Exum, S. T., Lefkowitz, R. J. & Freedman, N. J. (2008) Beta-arrestins regulate atherosclerosis and neointimal hyperplasia by controlling smooth muscle cell proliferation and migration, *Circ Res.* *103*, 70-9.
248. Pike, N. B. (2005) Flushing out the role of GPR109A (HM74A) in the clinical efficacy of nicotinic acid, *J Clin Invest.* *115*, 3400-3.
249. Walters, R. W., Shukla, A. K., Kovacs, J. J., Violin, J. D., DeWire, S. M., Lam, C. M., Chen, J. R., Muehlbauer, M. J., Whalen, E. J. & Lefkowitz, R. J. (2009) beta-Arrestin1 mediates nicotinic acid-induced flushing, but not its antilipolytic effect, in mice, *J Clin Invest.* *119*, 1312-21.
250. Defea, K. A. (2010) Beta-arrestins as regulators of signal termination and transduction: How do they determine what to scaffold?, *Cell Signal.*
251. Moussa, O., Ashton, A. W., Fraig, M., Garrett-Mayer, E., Ghoneim, M. A., Halushka, P. V. & Watson, D. K. (2008) Novel role of thromboxane receptors beta isoform in bladder cancer pathogenesis, *Cancer Res.* *68*, 4097-104.
252. Li, T. T., Alemayehu, M., Aziziyeh, A. I., Pape, C., Pampillo, M., Postovit, L. M., Mills, G. B., Babwah, A. V. & Bhattacharya, M. (2009) Beta-arrestin/Ral signaling regulates lysophosphatidic acid-mediated migration and invasion of human breast tumor cells, *Mol Cancer Res.* *7*, 1064-77.
253. Rosano, L., Cianfrocca, R., Masi, S., Spinella, F., Di Castro, V., Biroccio, A., Salvati, E., Nicotra, M. R., Natali, P. G. & Bagnato, A. (2009) Beta-arrestin links endothelin A receptor to beta-catenin signaling to induce ovarian cancer cell invasion and metastasis, *Proc Natl Acad Sci U S A.* *106*, 2806-11.
254. Chun, K. S., Lao, H. C., Trempus, C. S., Okada, M. & Langenbach, R. (2009) The prostaglandin receptor EP2 activates multiple signaling pathways and beta-arrestin1 complex formation during mouse skin papilloma development, *Carcinogenesis.* *30*, 1620-7.
255. Luan, B., Zhao, J., Wu, H., Duan, B., Shu, G., Wang, X., Li, D., Jia, W., Kang, J. & Pei, G. (2009) Deficiency of a beta-arrestin-2 signal complex contributes to insulin resistance, *Nature.* *457*, 1146-9.
256. Sonoda, N., Imamura, T., Yoshizaki, T., Babendure, J. L., Lu, J. C. & Olefsky, J. M. (2008) Beta-Arrestin-1 mediates glucagon-like peptide-1 signaling to insulin secretion in cultured pancreatic beta cells, *Proc Natl Acad Sci U S A.* *105*, 6614-9.

## Bibliographie

257. Bockaert, J., Perroy, J., Becamel, C., Marin, P. & Fagni, L. (2010) GPCR interacting proteins (GIPs) in the nervous system: Roles in physiology and pathologies, *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 50, 89-109.
258. Kreienkamp, H. J. (2008) Scaffolding proteins at the postsynaptic density: shank as the architectural framework, *Handb Exp Pharmacol*, 365-80.
259. Vatinel, S., Ferrand, A., Lopez, F., Kowalski-Chauvel, A., Esteve, J. P., Fourmy, D., Dufresne, M. & Seva, C. (2006) An ITIM-like motif within the CCK2 receptor sequence required for interaction with SHP-2 and the activation of the AKT pathway, *Biochim Biophys Acta.* 1763, 1098-107.
260. Sun, Y., Huang, J., Xiang, Y., Bastepe, M., Juppner, H., Kobilka, B. K., Zhang, J. J. & Huang, X. Y. (2007) Dosage-dependent switch from G protein-coupled to G protein-independent signaling by a GPCR, *EMBO J.* 26, 53-64.
261. Mitchell, R., McCulloch, D., Lutz, E., Johnson, M., MacKenzie, C., Fennell, M., Fink, G., Zhou, W. & Sealfon, S. C. (1998) Rhodopsin-family receptors associate with small G proteins to activate phospholipase D, *Nature.* 392, 411-4.
262. Bousquet, C., Guillermet-Guibert, J., Saint-Laurent, N., Archer-Lahlou, E., Lopez, F., Fanjul, M., Ferrand, A., Fourmy, D., Pichereaux, C., Monsarrat, B., Pradayrol, L., Esteve, J. P. & Susini, C. (2006) Direct binding of p85 to sst2 somatostatin receptor reveals a novel mechanism for inhibiting PI3K pathway, *EMBO J.* 25, 3943-54.
263. Marrero, M. B., Schieffer, B., Paxton, W. G., Heerdt, L., Berk, B. C., Delafontaine, P. & Bernstein, K. E. (1995) Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT1 receptor, *Nature.* 375, 247-50.
264. Calebiro, D., Nikolaev, V. O., Gagliani, M. C., de Filippis, T., Dees, C., Tacchetti, C., Persani, L. & Lohse, M. J. (2009) Persistent cAMP-signals triggered by internalized G-protein-coupled receptors, *PLoS Biol.* 7, e1000172.
265. Ferrandon, S., Feinstein, T. N., Castro, M., Wang, B., Bouley, R., Potts, J. T., Gardella, T. J. & Vilardaga, J. P. (2009) Sustained cyclic AMP production by parathyroid hormone receptor endocytosis, *Nat Chem Biol.* 5, 734-42.
266. Mullershausen, F., Zecri, F., Cetin, C., Billich, A., Guerini, D. & Seuwen, K. (2009) Persistent signaling induced by FTY720-phosphate is mediated by internalized S1P1 receptors, *Nat Chem Biol.* 5, 428-34.
267. Neumann, S., Geras-Raaka, E., Marcus-Samuels, B. & Gershengorn, M. C. (2010) Persistent cAMP signaling by thyrotropin (TSH) receptors is not dependent on internalization, *FASEB J.* 24, 3992-9.
268. De Lean, A., Stadel, J. M. & Lefkowitz, R. J. (1980) A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptor, *J Biol Chem.* 255, 7108-17.
269. Samama, P., Cotecchia, S., Costa, T. & Lefkowitz, R. J. (1993) A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model, *J Biol Chem.* 268, 4625-36.
270. Bond, R. A., Leff, P., Johnson, T. D., Milano, C. A., Rockman, H. A., McMinn, T. R., Apparsundaram, S., Hyek, M. F., Kenakin, T. P., Allen, L. F. & et al. (1995) Physiological effects of inverse agonists in transgenic mice with myocardial overexpression of the beta 2-adrenoceptor, *Nature.* 374, 272-6.
271. Leff, P. (1995) The two-state model of receptor activation, *Trends Pharmacol Sci.* 16, 89-97.
272. Monod, J., Wyman, J. & Changeux, J. P. (1965) ON THE NATURE OF ALLOSTERIC TRANSITIONS: A PLAUSIBLE MODEL, *J Mol Biol.* 12, 88-118.
273. Weiss, J. M., Morgan, P. H., Lutz, M. W. & Kenakin, T. P. (1996) The cubic ternary complex receptor-occupancy model. III. resurrecting efficacy, *J Theor Biol.* 181, 381-97.
274. Fisher, A., Heldman, E., Gurwitz, D., Haring, R., Barak, D., Meshulam, H., Marciano, D., Brandeis, R., Pittel, Z., Segal, M. & et al. (1993) Selective signaling via unique M1 muscarinic agonists, *Ann N Y Acad Sci.* 695, 300-3.
275. Rajagopal, S., Rajagopal, K. & Lefkowitz, R. J. (2010) Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors, *Nat Rev Drug Discov.* 9, 373-86.

## Bibliographie

276. Kobilka, B., Gether, U., Seifert, R., Lin, S. & Ghanouni, P. (1999) Characterization of ligand-induced conformational states in the beta 2 adrenergic receptor, *J Recept Signal Transduct Res.* **19**, 293-300.
277. Swaminath, G., Xiang, Y., Lee, T. W., Steenhuis, J., Parnot, C. & Kobilka, B. K. (2004) Sequential binding of agonists to the beta2 adrenoceptor. Kinetic evidence for intermediate conformational states, *J Biol Chem.* **279**, 686-91.
278. Neubig, R. R., Spedding, M., Kenakin, T. & Christopoulos, A. (2003) International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology, *Pharmacol Rev.* **55**, 597-606.
279. Alves, I. D., Ciano, K. A., Boguslavski, V., Varga, E., Salamon, Z., Yamamura, H. I., Hruby, V. J. & Tollin, G. (2004) Selectivity, cooperativity, and reciprocity in the interactions between the delta-opioid receptor, its ligands, and G-proteins, *J Biol Chem.* **279**, 44673-82.
280. Spengler, D., Waeber, C., Pantaloni, C., Holsboer, F., Bockaert, J., Seeburg, P. H. & Journot, L. (1993) Differential signal transduction by five splice variants of the PACAP receptor, *Nature.* **365**, 170-5.
281. Bonhaus, D. W., Chang, L. K., Kwan, J. & Martin, G. R. (1998) Dual activation and inhibition of adenylyl cyclase by cannabinoid receptor agonists: evidence for agonist-specific trafficking of intracellular responses, *J Pharmacol Exp Ther.* **287**, 884-8.
282. Bond, R. A. & Ijzerman, A. P. (2006) Recent developments in constitutive receptor activity and inverse agonism, and their potential for GPCR drug discovery, *Trends Pharmacol Sci.* **27**, 92-6.
283. Robinson, P. R., Cohen, G. B., Zhukovsky, E. A. & Oprian, D. D. (1992) Constitutively active mutants of rhodopsin, *Neuron.* **9**, 719-25.
284. Nijenhuis, W. A., Oosterom, J. & Adan, R. A. (2001) AgRP(83-132) acts as an inverse agonist on the human-melanocortin-4 receptor, *Mol Endocrinol.* **15**, 164-71.
285. Vilardaga, J. P., Steinmeyer, R., Harms, G. S. & Lohse, M. J. (2005) Molecular basis of inverse agonism in a G protein-coupled receptor, *Nat Chem Biol.* **1**, 25-8.
286. Smit, M. J., Vischer, H. F., Bakker, R. A., Jongejan, A., Timmerman, H., Pardo, L. & Leurs, R. (2007) Pharmacogenomic and Structural Analysis of Constitutive G Protein-Coupled Receptor Activity, *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **47**, 53-87.
287. Azzi, M., Charest, P. G., Angers, S., Rousseau, G., Kohout, T., Bouvier, M. & 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**, 11406-11.
288. Neubig, R. R. (2007) Missing links: mechanisms of protean agonism, *Mol Pharmacol.* **71**, 1200-2.
289. Gbahou, F., Rouleau, A., Morisset, S., Parmentier, R., Crochet, S., Lin, J. S., Ligneau, X., Tardivel-Lacombe, J., Stark, H., Schunack, W., Ganellin, C. R., Schwartz, J. C. & Arrang, J. M. (2003) Protean agonism at histamine H3 receptors in vitro and in vivo, *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**, 11086-91.
290. Jansson, C. C., Kukkonen, J. P., Nasman, J., Huifang, G., Wurster, S., Virtanen, R., Savola, J. M., Cockcroft, V. & Akerman, K. E. (1998) Protean agonism at alpha2A-adrenoceptors, *Mol Pharmacol.* **53**, 963-8.
291. Dougall, I. G., Young, A., Ince, F. & Jackson, D. M. (2003) Dual dopamine D2 receptor and beta2-adrenoceptor agonists for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease: the pre-clinical rationale, *Respir Med.* **97 Suppl A**, S3-7.
292. Hruby, V. J., Agnes, R. S., Davis, P., Ma, S. W., Lee, Y. S., Vanderah, T. W., Lai, J. & Porreca, F. (2003) Design of novel peptide ligands which have opioid agonist activity and CCK antagonist activity for the treatment of pain, *Life Sci.* **73**, 699-704.
293. Jensen, A. A. & Spalding, T. A. (2004) Allosteric modulation of G-protein coupled receptors, *Eur J Pharm Sci.* **21**, 407-20.
294. Soudijn, W., Van Wijngaarden, I. & AP, I. J. (2004) Allosteric modulation of G protein-coupled receptors: perspectives and recent developments, *Drug Discov Today.* **9**, 752-8.
295. Chan, W. Y., McKinzie, D. L., Bose, S., Mitchell, S. N., Witkin, J. M., Thompson, R. C., Christopoulos, A., Lazareno, S., Birdsall, N. J., Bymaster, F. P. & Felder, C. C. (2008) Allosteric

## Bibliographie

- modulation of the muscarinic M4 receptor as an approach to treating schizophrenia, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105, 10978-83.
296. Nawaratne, V., Leach, K., Suratman, N., Loiacono, R. E., Felder, C. C., Armbruster, B. N., Roth, B. L., Sexton, P. M. & Christopoulos, A. (2008) New insights into the function of M4 muscarinic acetylcholine receptors gained using a novel allosteric modulator and a DREADD (designer receptor exclusively activated by a designer drug), *Mol Pharmacol.* 74, 1119-31.
297. Valant, C., Sexton, P. M. & Christopoulos, A. (2009) Orthosteric/allosteric bitopic ligands: going hybrid at GPCRs, *Mol Interv.* 9, 125-35.
298. Kamal, M. & Jockers, R. (2009) Bitopic ligands: all-in-one orthosteric and allosteric, *F1000 Biol Rep.* 1.
299. Disingrini, T., Muth, M., Dallanoce, C., Barocelli, E., Bertoni, S., Kellershohn, K., Mohr, K., De Amici, M. & Holzgrabe, U. (2006) Design, synthesis, and action of oxotremorine-related hybrid-type allosteric modulators of muscarinic acetylcholine receptors, *J Med Chem.* 49, 366-72.
300. Antony, J., Kellershohn, K., Mohr-Andra, M., Kebig, A., Prilla, S., Muth, M., Heller, E., Disingrini, T., Dallanoce, C., Bertoni, S., Schrobang, J., Trankle, C., Kostenis, E., Christopoulos, A., Holtje, H. D., Barocelli, E., De Amici, M., Holzgrabe, U. & Mohr, K. (2009) Dualsteric GPCR targeting: a novel route to binding and signaling pathway selectivity, *FASEB J.* 23, 442-50.
301. Kaupmann, K., Malitschek, B., Schuler, V., Heid, J., Froestl, W., Beck, P., Mosbacher, J., Bischoff, S., Kulik, A., Shigemoto, R., Karschin, A. & Bettler, B. (1998) GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes, *Nature.* 396, 683-7.
302. Maurel, D., Comps-Agrar, L., Brock, C., Rives, M. L., Bourrier, E., Ayoub, M. A., Bazin, H., Tinel, N., Durroux, T., Prezeau, L., Trinquet, E. & Pin, J. P. (2008) Cell-surface protein-protein interaction analysis with time-resolved FRET and snap-tag technologies: application to GPCR oligomerization, *Nat Methods.* 5, 561-7.
303. Fanelli, F. & Felling, A. (2010) Dimerization and ligand binding affect the structure network of A(2A) adenosine receptor, *Biochim Biophys Acta.*
304. Urizar, E., Montanelli, L., Loy, T., Bonomi, M., Swillens, S., Gales, C., Bouvier, M., Smits, G., Vassart, G. & Costagliola, S. (2005) Glycoprotein hormone receptors: link between receptor homodimerization and negative cooperativity, *EMBO J.* 24, 1954-64.
305. Han, Y., Moreira, I. S., Urizar, E., Weinstein, H. & Javitch, J. A. (2009) Allosteric communication between protomers of dopamine class A GPCR dimers modulates activation, *Nat Chem Biol.* 5, 688-95.
306. Song, G. J. & Hinkle, P. M. (2005) Regulated dimerization of the thyrotropin-releasing hormone receptor affects receptor trafficking but not signaling, *Mol Endocrinol.* 19, 2859-70.
307. Kenakin, T. (2010) Functional Selectivity and Biased Receptor Signaling, *J Pharmacol Exp Ther.*
308. Violin, J. D. & Lefkowitz, R. J. (2007) Beta-arrestin-biased ligands at seven-transmembrane receptors, *Trends Pharmacol Sci.* 28, 416-22.
309. Rajagopal, S., Kim, J., Ahn, S., Craig, S., Lam, C. M., Gerard, N. P., Gerard, C. & Lefkowitz, R. J. (2010) Beta-arrestin- but not G protein-mediated signaling by the "decoy" receptor CXCR7, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107, 628-32.
310. Masri, B., Salahpour, A., Didriksen, M., Ghisi, V., Beaulieu, J. M., Gainetdinov, R. R. & Caron, M. G. (2008) Antagonism of dopamine D2 receptor/beta-arrestin 2 interaction is a common property of clinically effective antipsychotics, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105, 13656-61.
311. Violin, J. D., Dewire, S. M., Yamashita, D., Rominger, D. H., Nguyen, L., Schiller, K., Whalen, E. J., Gowen, M. & Lark, M. W. (2010) Selectively engaging {beta}-arrestins at the AT1R reduces blood pressure and increases cardiac performance, *J Pharmacol Exp Ther.*
312. Gregory, R. A. & Tracy, H. J. (1964) THE CONSTITUTION AND PROPERTIES OF TWO GASTRINS EXTRACTED FROM HOG ANTRAL MUCOSA, *Gut.* 5, 103-14.
313. Ivy, A. & Oldberg, E. (1928) A hormone mechanism for gallbladder contraction and evacuation, *American Journal of Physiology.* 86, 559-613.
314. Harper, A. A. & Raper, H. S. (1943) Pancreozymin, a stimulant of the secretion of pancreatic enzymes in extracts of the small intestine, *J Physiol.* 102, 115-25.



## Bibliographie

315. Mutt, V. & Jorpes, E. (1971) Hormonal polypeptides of the upper intestine, *Biochem J.* **125**, 57P-58P.
316. Dockray, G., Dimaline, R. & Varro, A. (2005) Gastrin: old hormone, new functions, *Pflugers Arch.* **449**, 344-55.
317. Rehfeld, J. F. (2004) Clinical endocrinology and metabolism. Cholecystokinin, *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* **18**, 569-86.
318. Dubeykovskiy, A., Nguyen, T., Dubeykovskaya, Z., Lei, S. & Wang, T. C. (2008) Flow cytometric detection of progastrin interaction with gastrointestinal cells, *Regul Pept.* **151**, 106-14.
319. Jin, G., Ramanathan, V., Quante, M., Baik, G. H., Yang, X., Wang, S. S., Tu, S., Gordon, S. A., Pritchard, D. M., Varro, A., Shulkes, A. & Wang, T. C. (2009) Inactivating cholecystokinin-2 receptor inhibits progastrin-dependent colonic crypt fission, proliferation, and colorectal cancer in mice, *J Clin Invest.* **119**, 2691-701.
320. Dockray, G. J., Varro, A., Dimaline, R. & Wang, T. (2001) The gastrins: their production and biological activities, *Annu Rev Physiol.* **63**, 119-39.
321. Rehfeld, J. F. (1998) Accurate measurement of cholecystokinin in plasma, *Clin Chem.* **44**, 991-1001.
322. Fried, M., Erlacher, U., Schwizer, W., Lochner, C., Koerfer, J., Beglinger, C., Jansen, J. B., Lamers, C. B., Harder, F., Bischof-Delaloye, A. & et al. (1991) Role of cholecystokinin in the regulation of gastric emptying and pancreatic enzyme secretion in humans. Studies with the cholecystokinin-receptor antagonist loxiglumide, *Gastroenterology.* **101**, 503-11.
323. Zerbib, F., Bruley Des Varannes, S., Scarpignato, C., Leray, V., D'Amato, M., Roze, C. & Galmiche, J. P. (1998) Endogenous cholecystokinin in postprandial lower esophageal sphincter function and fundic tone in humans, *Am J Physiol.* **275**, G1266-73.
324. Schmidt, W. E., Schenk, S., Nustede, R., Holst, J. J., Folsch, U. R. & Creutzfeldt, W. (1994) Cholecystokinin is a negative regulator of gastric acid secretion and postprandial release of gastrin in humans, *Gastroenterology.* **107**, 1610-20.
325. Dufresne, M., Seva, C. & Fourmy, D. (2006) Cholecystokinin and gastrin receptors, *Physiol Rev.* **86**, 805-47.
326. Morton, M. F., Harper, E. A., Tavares, I. A. & Shankley, N. P. (2002) Pharmacological evidence for putative CCK(1) receptor heterogeneity in human colon smooth muscle, *Br J Pharmacol.* **136**, 873-82.
327. Peters, J. H., Simasko, S. M. & Ritter, R. C. (2006) Modulation of vagal afferent excitation and reduction of food intake by leptin and cholecystokinin, *Physiol Behav.* **89**, 477-85.
328. Noble, F., Wank, S. A., Crawley, J. N., Bradwejn, J., Seroogy, K. B., Hamon, M. & Roques, B. P. (1999) International Union of Pharmacology. XXI. Structure, distribution, and functions of cholecystokinin receptors, *Pharmacol Rev.* **51**, 745-81.
329. Massoubre, C., Rattner, A., Pellet, J., Frey, J. & Chamson, A. (2002) La cholécystokinine: mise au point, *Nutrition Clinique et Métabolisme.* **16**, 4-13.
330. Rozengurt, E. & Walsh, J. H. (2001) Gastrin, CCK, signaling, and cancer, *Annu Rev Physiol.* **63**, 49-76.
331. Ojeaburu, J. V., Ito, T., Crafa, P., Bordi, C. & Jensen, R. T. (2010) Mechanism of Acid Hypersecretion Post Curative Gastrinoma Resection, *Dig Dis Sci.*
332. Friis-Hansen, L., Sundler, F., Li, Y., Gillespie, P. J., Saunders, T. L., Greenson, J. K., Owyang, C., Rehfeld, J. F. & Samuelson, L. C. (1998) Impaired gastric acid secretion in gastrin-deficient mice, *Am J Physiol.* **274**, G561-8.
333. Kirton, C. M., Wang, T. & Dockray, G. J. (2002) Regulation of parietal cell migration by gastrin in the mouse, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **283**, G787-93.
334. Saillan-Barreau, C., Dufresne, M., Clerc, P., Sanchez, D., Corominola, H., Moriscot, C., Guy-Crotte, O., Escrieut, C., Vaysse, N., Gomis, R., Tarasova, N. & Fourmy, D. (1999) Evidence for a functional role of the cholecystokinin-B/gastrin receptor in the human fetal and adult pancreas, *Diabetes.* **48**, 2015-21.

## Bibliographie

335. Herranz, R. (2003) Cholecystokinin antagonists: pharmacological and therapeutic potential, *Med Res Rev.* 23, 559-605.
336. Makovec, F. & D'Amato, M. (1997) CCKB/gastrin receptor antagonists as potential drugs for peptic ulcer therapy, *Drug Discovery Today.* 2, 283-293.
337. Foucaud, M., Tikhonova, I. G., Langer, I., Escricut, C., Dufresne, M., Seva, C., Maigret, B. & Fourmy, D. (2006) Partial agonism, neutral antagonism, and inverse agonism at the human wild-type and constitutively active cholecystokinin-2 receptors, *Mol Pharmacol.* 69, 680-90.
338. Ding, X. Q., Chen, D. & Hakanson, R. (1995) Cholecystokinin-B receptor ligands of the dipeptoid series act as agonists on rat stomach histidine decarboxylase, *Gastroenterology.* 109, 1181-7.
339. Hughes, J., Boden, P., Costall, B., Domeney, A., Kelly, E., Horwell, D. C., Hunter, J. C., Pinnock, R. D. & Woodruff, G. N. (1990) Development of a class of selective cholecystokinin type B receptor antagonists having potent anxiolytic activity, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87, 6728-32.
340. Christophe, J., De Neef, P., Deschodt-Lanckman, M. & Robberecht, P. (1978) The interaction of caerulein with the rat pancreas. 2. Specific binding of [3H]caerulein on dispersed acinar cells, *Eur J Biochem.* 91, 31-8.
341. Innis, R. B. & Snyder, S. H. (1980) Distinct cholecystokinin receptors in brain and pancreas, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77, 6917-21.
342. Silvente-Poirot, S., Dufresne, M., Vaysse, N. & Fourmy, D. (1993) The peripheral cholecystokinin receptors, *Eur J Biochem.* 215, 513-29.
343. Soll, A. H., Amirian, D. A., Thomas, L. P., Reedy, T. J. & Elashoff, J. D. (1984) Gastrin receptors on isolated canine parietal cells, *J Clin Invest.* 73, 1434-47.
344. Kopin, A. S., Lee, Y. M., McBride, E. W., Miller, L. J., Lu, M., Lin, H. Y., Kolakowski, L. F., Jr. & Beinborn, M. (1992) Expression cloning and characterization of the canine parietal cell gastrin receptor, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89, 3605-9.
345. Wank, S. A., Pisegna, J. R. & de Weerth, A. (1992) Brain and gastrointestinal cholecystokinin receptor family: structure and functional expression, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89, 8691-5.
346. Lee, Y. M., Beinborn, M., McBride, E. W., Lu, M., Kolakowski, L. F., Jr. & Kopin, A. S. (1993) The human brain cholecystokinin-B/gastrin receptor. Cloning and characterization, *J Biol Chem.* 268, 8164-9.
347. Jagerschmidt, A., Guillaume, N., Roques, B. P. & Noble, F. (1998) Binding sites and transduction process of the cholecystokininB receptor: involvement of highly conserved aromatic residues of the transmembrane domains evidenced by site-directed mutagenesis, *Mol Pharmacol.* 53, 878-85.
348. Silvente-Poirot, S., Escricut, C. & Wank, S. A. (1998) Role of the extracellular domains of the cholecystokinin receptor in agonist binding, *Mol Pharmacol.* 54, 364-71.
349. Jagerschmidt, A., Guillaume, N., Goudreau, N., Maigret, B. & Roques, B. P. (1995) Mutation of Asp100 in the second transmembrane domain of the cholecystokinin B receptor increases antagonist binding and reduces signal transduction, *Mol Pharmacol.* 48, 783-9.
350. Miyake, A. (1995) A truncated isoform of human CCK-B/gastrin receptor generated by alternative usage of a novel exon, *Biochem Biophys Res Commun.* 208, 230-7.
351. Song, I., Brown, D. R., Wiltshire, R. N., Gantz, I., Trent, J. M. & Yamada, T. (1993) The human gastrin/cholecystokinin type B receptor gene: alternative splice donor site in exon 4 generates two variant mRNAs, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90, 9085-9.
352. Ding, W. Q., Kuntz, S. M. & Miller, L. J. (2002) A misspliced form of the cholecystokinin-B/gastrin receptor in pancreatic carcinoma: role of reduced sellular U2AF35 and a suboptimal 3'-splicing site leading to retention of the fourth intron, *Cancer Res.* 62, 947-52.
353. Hellmich, M. R., Rui, X. L., Hellmich, H. L., Fleming, R. Y., Evers, B. M. & Townsend, C. M., Jr. (2000) Human colorectal cancers express a constitutively active cholecystokinin-B/gastrin receptor that stimulates cell growth, *J Biol Chem.* 275, 32122-8.
354. Korner, M., Waser, B., Reubi, J. C. & Miller, L. J. (2010) CCK(2) receptor splice variant with intron 4 retention in human gastrointestinal and lung tumours, *J Cell Mol Med.* 14, 933-43.

## Bibliographie

355. Arnould, M., Tassa, A., Ferrand, A., Archer, E., Esteve, J. P., Penalba, V., Portolan, G., Escherich, A., Moroder, L., Fourmy, D., Seva, C. & Dufresne, M. (2004) The G-protein-coupled CCK2 receptor associates with phospholipase Cgamma1, *FEBS Lett.* **568**, 89-93.
356. Pommier, B., Marie-Claire, C., Da Nascimento, S., Wang, H. L., Roques, B. P. & Noble, F. (2003) Further evidence that the CCK2 receptor is coupled to two transduction pathways using site-directed mutagenesis, *J Neurochem.* **85**, 454-61.
357. Daulhac, L., Kowalski-Chauvel, A., Pradayrol, L., Vaysse, N. & Seva, C. (1999) Src-family tyrosine kinases in activation of ERK-1 and p85/p110-phosphatidylinositol 3-kinase by G/CCKB receptors, *J Biol Chem.* **274**, 20657-63.
358. Khan, Z. E., Wang, T. C., Cui, G., Chi, A. L. & Dimaline, R. (2003) Transcriptional regulation of the human trefoil factor, TFF1, by gastrin, *Gastroenterology.* **125**, 510-21.
359. Guo, Y. S., Cheng, J. Z., Jin, G. F., Gutkind, J. S., Hellmich, M. R. & Townsend, C. M., Jr. (2002) Gastrin stimulates cyclooxygenase-2 expression in intestinal epithelial cells through multiple signaling pathways. Evidence for involvement of ERK5 kinase and transactivation of the epidermal growth factor receptor, *J Biol Chem.* **277**, 48755-63.
360. Sinclair, N. F., Ai, W., Raychowdhury, R., Bi, M., Wang, T. C., Koh, T. J. & McLaughlin, J. T. (2004) Gastrin regulates the heparin-binding epidermal-like growth factor promoter via a PKC/EGFR-dependent mechanism, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **286**, G992-9.
361. Dehez, S., Daulhac, L., Kowalski-Chauvel, A., Fourmy, D., Pradayrol, L. & Seva, C. (2001) Gastrin-induced DNA synthesis requires p38-MAPK activation via PKC/Ca(2+) and Src-dependent mechanisms, *FEBS Lett.* **496**, 25-30.
362. Ferrand, A., Kowalski-Chauvel, A., Bertrand, C., Escricut, C., Mathieu, A., Portolan, G., Pradayrol, L., Fourmy, D., Dufresne, M. & Seva, C. (2005) A novel mechanism for JAK2 activation by a G protein-coupled receptor, the CCK2R: implication of this signaling pathway in pancreatic tumor models, *J Biol Chem.* **280**, 10710-5.
363. Gales, C., Kowalski-Chauvel, A., Dufour, M. N., Seva, C., Moroder, L., Pradayrol, L., Vaysse, N., Fourmy, D. & Silvente-Poirot, S. (2000) Mutation of Asn-391 within the conserved NPXXY motif of the cholecystokinin B receptor abolishes Gq protein activation without affecting its association with the receptor, *J Biol Chem.* **275**, 17321-7.
364. Clerc, P., Coll Constans, M. G., Lulka, H., Broussaud, S., Guigne, C., Leung-Theung-Long, S., Perrin, C., Knauf, C., Carpenne, C., Penicaud, L., Seva, C., Burcelin, R., Valet, P., Fourmy, D. & Dufresne, M. (2006) Involvement of CCK2 receptor in food intake regulation: Hyperphagia and increased fat deposition in CCK2 receptor-deficient mice, *Endocrinology.*
365. Clerc, P., Leung-Theung-Long, S., Wang, T. C., Dockray, G. J., Bouisson, M., Delisle, M. B., Vaysse, N., Pradayrol, L., Fourmy, D. & Dufresne, M. (2002) Expression of CCK2 receptors in the murine pancreas: proliferation, transdifferentiation of acinar cells, and neoplasia, *Gastroenterology.* **122**, 428-37.
366. Caplin, M., Savage, K., Khan, K., Brett, B., Rode, J., Varro, A. & Dhillon, A. (2000) Expression and processing of gastrin in pancreatic adenocarcinoma, *Br J Surg.* **87**, 1035-40.
367. Yu, H. G., Schafer, H., Mergler, S., Muerkoster, S., Cramer, T., Hocker, M., Herzig, K. H., Schmidt, W. E. & Schmitz, F. (2005) Valine-286 residue in the third intracellular loop of the cholecystokinin 2 receptor exerts a pivotal role in cholecystokinin 2 receptor mediated intracellular signal transduction in human colon cancer cells, *Cell Signal.* **17**, 1505-15.
368. Kennedy, J. L., Bradwejn, J., Koszycki, D., King, N., Crowe, R., Vincent, J. & Fourie, O. (1999) Investigation of cholecystokinin system genes in panic disorder, *Mol Psychiatry.* **4**, 284-5.
369. Xiong, W. & Yu, L. C. (2006) Involvement of endogenous cholecystokinin in tolerance to morphine antinociception in the nucleus accumbens of rats, *Behav Brain Res.* **173**, 116-21.
370. Langer, I., Tikhonova, I. G., Travers, M. A., Archer-Lahlou, E., Escricut, C., Maigret, B. & Fourmy, D. (2005) Evidence that interspecies polymorphism in the human and rat cholecystokinin receptor-2 affects structure of the binding site for the endogenous agonist cholecystokinin, *J Biol Chem.* **280**, 22198-204.

## Bibliographie

371. Silvente-Poirot, S. & Wank, S. A. (1996) A segment of five amino acids in the second extracellular loop of the cholecystokinin-B receptor is essential for selectivity of the peptide agonist gastrin, *J Biol Chem.* **271**, 14698-706.
372. Silvente-Poirot, S., Escrieut, C., Gales, C., Fehrentz, J. A., Escherich, A., Wank, S. A., Martinez, J., Moroder, L., Maigret, B., Bouisson, M., Vaysse, N. & Fourmy, D. (1999) Evidence for a direct interaction between the penultimate aspartic acid of cholecystokinin and histidine 207, located in the second extracellular loop of the cholecystokinin B receptor, *J Biol Chem.* **274**, 23191-7.
373. Gales, C., Poirot, M., Taillefer, J., Maigret, B., Martinez, J., Moroder, L., Escrieut, C., Pradayrol, L., Fourmy, D. & Silvente-Poirot, S. (2003) Identification of tyrosine 189 and asparagine 358 of the cholecystokinin 2 receptor in direct interaction with the crucial C-terminal amide of cholecystokinin by molecular modeling, site-directed mutagenesis, and structure/affinity studies, *Mol Pharmacol.* **63**, 973-82.
374. Jagerschmidt, A., Guillaume-Rousselet, N., Vikland, M. L., Goudreau, N., Maigret, B. & Roques, B. P. (1996) His381 of the rat CCKB receptor is essential for CCKB versus CCKA receptor antagonist selectivity, *Eur J Pharmacol.* **296**, 97-106.
375. Kopin, A. S., McBride, E. W., Quinn, S. M., Kolakowski, L. F., Jr. & Beinborn, M. (1995) The role of the cholecystokinin-B/gastrin receptor transmembrane domains in determining affinity for subtype-selective ligands, *J Biol Chem.* **270**, 5019-23.
376. Foucaud, M., Marco, E., Escrieut, C., Low, C., Kalindjian, B. & Fourmy, D. (2008) Linking non-peptide ligand binding mode to activity at the human cholecystokinin-2 receptor, *J Biol Chem.* **283**, 35860-8.
377. Foucaud, M., Archer-Lahlou, E., Marco, E., Tikhonova, I. G., Maigret, B., Escrieut, C., Langer, I. & Fourmy, D. (2008) Insights into the binding and activation sites of the receptors for cholecystokinin and gastrin, *Regul Pept.* **145**, 17-23.
378. Pohl, M., Silvente-Poirot, S., Pisegna, J. R., Tarasova, N. I. & Wank, S. A. (1997) Ligand-induced internalization of cholecystokinin receptors. Demonstration of the importance of the carboxyl terminus for ligand-induced internalization of the rat cholecystokinin type B receptor but not the type A receptor, *J Biol Chem.* **272**, 18179-84.
379. Cheng, Z. J., Harikumar, K. G., Holicky, E. L. & Miller, L. J. (2003) Heterodimerization of type A and B cholecystokinin receptors enhance signaling and promote cell growth, *J Biol Chem.* **278**, 52972-9.
380. Langer, I., Tikhonova, I. G., Boulegue, C., Esteve, J. P., Vatinel, S., Ferrand, A., Moroder, L., Robberecht, P. & Fourmy, D. (2009) Evidence for a direct and functional interaction between the regulators of G protein signaling-2 and phosphorylated C terminus of cholecystokinin-2 receptor, *Mol Pharmacol.* **75**, 502-13.
381. Yaqub, T., Tikhonova, I. G., Lattig, J., Magnan, R., Laval, M., Escrieut, C., Boulegue, C., Hewage, C. & Fourmy, D. (2010) Identification of determinants of glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor that interact with N-terminal biologically active region of the natural ligand, *Mol Pharmacol.* **77**, 547-58.
382. Wheeler, M. B., Gelling, R. W., Hinke, S. A., Tu, B., Pederson, R. A., Lynn, F., Ehses, J. & McIntosh, C. H. (1999) Characterization of the carboxyl-terminal domain of the rat glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) receptor. A role for serines 426 and 427 in regulating the rate of internalization, *J Biol Chem.* **274**, 24593-601.

