

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE LOUIS PASTEUR DE STRASBOURG

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

en vue de l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LOUIS PASTEUR DE STRASBOURG

Discipline : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

par

Julien BOEUF

**Caractérisation des GASP, une nouvelle famille de
protéines impliquées dans le trafic intracellulaire
des récepteurs couplés aux protéines G**

Soutenue le 21 avril 2008, devant la Commission d'Examen :

Dr Stéphane ALLOUCHE (Rapporteur externe)

Dr Agnès HÉMAR (Rapporteur externe)

Prof. Claire GAVÉRIAUX-RUFF (Rapporteur interne)

Dr Frédéric SIMONIN (Directeur de thèse)

Merci Maman et Papa pour votre confiance et votre soutien

Merci Agnès d'être à mes côtés dans les bons moments comme dans les moments difficiles. Ton soutien, ta patience et ton optimisme m'ont été précieux,

Merci à Frédéric de m'avoir guidé durant ces années. Merci à Marie-Pierre, Christophe et toutes les personnes qui ont fait partie de l'équipe à un moment ou un autre pour leur aide et leur bonne humeur (Isabelle, Guillaume...). Merci à toute l'équipe « Galzi » et aux autres équipes du département Récepteurs et Protéines Membranaires pour nos discussions et leurs coups de pouce. Je remercie également toutes les personnes avec qui nous avons collaboré.

Je tiens à remercier Mesdames Claire Gavériaux-Ruff et Agnès Hémar ainsi que Monsieur Stéphane Allouche d'avoir accepté de juger mon travail.

Table des Matières

Liste des Tableaux et Figures	I
Abréviations	III
Version abrégée du projet de thèse	VII
 I. INTRODUCTION	 1
 I.1. Les Récepteurs Couplés aux Protéines G	 3
I.1.1. Organisation structurale et classification	4
I.1.2. Les protéines G hétérotrimériques	7
I.1.3. Les effecteurs intracellulaires	11
 I.2. Régulation de l'activité des récepteurs couplés aux protéines G et trafic intracellulaire	 13
I.2.1. La désensibilisation des récepteurs couplés aux protéines G	13
I.2.1.1. Phosphorylation des domaines intracellulaires des récepteurs	13
I.2.1.2. Le recrutement de l'arrestine	15
I.2.2. L'internalisation des récepteurs couplés aux protéines G	16
I.2.2.1. L'arrestine et la voie des vésicules tapissées de clathrine	17
I.2.2.2. L'ubiquitinylation	19
I.2.2.3. Les motifs d'internalisation	21
I.2.2.4. L'internalisation tonique	24
I.2.2.5. Nouveaux mécanismes d'internalisation	24
I.2.3. Quel est le devenir des récepteurs couplés aux protéines G qui ont été internalisés ?	26
I.2.3.1. L'arrestine dans le trafic intracellulaire des récepteurs couplés aux protéines G	28
I.2.3.2. La resensibilisation des récepteurs couplés aux protéines G	30
I.2.3.2.1. Séquences de recyclage et facteurs cytoplasmiques à domaine PDZ	30
I.2.3.2.2. Le facteur cytoplasmique NSF régule la resensibilisation du récepteur beta2 à l'adrénaline	33
I.2.3.2.3. Nouvelles séquences impliqués dans la resensibilisation des récepteurs couplés aux protéines G	34
I.2.3.3. La régulation négative des récepteurs couplés aux protéines G	37
I.2.3.3.1. Ubiquitinylation et régulation négative des récepteurs couplés aux protéines G	37
I.2.3.3.2. Les protéines SNX1 et Alix	38
I.2.3.3.3. La protéine GASP-1	39
I.2.3.3.4. Autres voies de dégradation protéolytique	39
I.2.4. Conséquences physiologiques de la régulation du trafic intracellulaire des récepteurs couplés aux protéines G	40
I.2.4.1. Système opioïde et tolérance	40
I.2.4.2. Système cannabinoïde et tolérance	41

I.2.4.3. L'infarctus du myocarde et les récepteurs beta adrénergiques	41
I.3. Les protéines de la famille GASP et leur fonction.....	43
I.3.1. Description de la famille.....	43
I.3.2. La protéine GASP-1	44
I.3.2.1. Interaction avec les récepteurs couplés aux protéines G	44
I.3.2.2. La régulation négative des récepteurs par GASP-1	44
I.3.2.2. Tolérance aux cannabinoïdes	47
I.3.2.3. Régulation du rythme circadien	48
I.3.3. GASP-2, maladie de Huntington et cancérogenèse	48
I.4. Objectifs des travaux de thèse.....	51
II. RÉSULTATS ET DISCUSSION	53
II.1. Étude de la relation entre structure et activité des protéines GASP	55
II.1.1. Introduction	57
II.1.1.1. Les GASP interagissent <i>in vitro</i> avec le domaine carboxyl-terminal des récepteurs couplés aux protéines G	58
II.1.1.1.1. Choix des récepteurs testés	58
II.1.1.1.2. Choix des protéines GASP étudiées	63
II.1.1.2. Justification de l'étude de l'hélice 8 des RCPG et de son rôle potentiel dans l'interaction avec les GASP	65
II.1.1.3. Caractérisation d'un nouveau motif GASP d'interaction protéine-protéine	67
II.1.1.3.1. Choix des mutants tronqués de GASP-1	67
II.1.1.3.2. Mutagenèse dirigée des deux motifs conservés de GASP-2	69
II.1.1.3.3. Un peptide dérivé du motif GASP peut-il inhiber l'interaction entre les RCPG et les GASP ?	69
II.1.2. Résumé des résultats	70
II.1.3. Publications n°1 et 2	73
II.1.4. Éléments de discussion	75
II.1.4.1. La méthode de GST pull-down.....	75
II.1.4.2. Un profil d'interaction large entre les GASP et les RCPG	77
II.1.4.3. Les GASP : famille et sous-familles	77
II.1.4.4. L'hélice 8 des RCPG	79
II.1.4.5. Le motif GASP, un nouveau motif d'interaction protéine-protéine	81
II.1.5. Travaux en cours : inhibition de la régulation négative du récepteur DOR à l'aide du peptide GASP	84
II.1.5.1. Choix du modèle cellulaire NG108-15	84
II.1.4.2. Translocation du peptide GASP dans les cellules NG108-15	84
II.2. Étude du rôle de GASP-1 et GASP-2 sur le trafic intracellulaire du récepteur muscarinique M₁	87
II.2.1. Introduction	89
II.2.1.1. Le système cholinergique.....	89

II.2.1.1.1. Les récepteurs muscariniques.....	89
II.2.1.1.2. Les effets muscariniques.....	90
II.2.1.1.3. Les agonistes et antagonistes des récepteurs muscariniques	91
II.2.1.1.4. Régulation de l'activité des récepteurs muscariniques	94
II.2.1.2. Choix du modèle expérimental et des essais	94
II.2.1.3. Imagerie confocale sur cellules vivantes : « <i>linear unmixing</i> »	97
II.2.3. Résumé des résultats	98
II.2.4. Publication n°3	99
II.2.5. Éléments de discussion	101
II.3. Étude du rôle physiologique de GASP-1 chez l'animal	105
II.3.1. GASP-1 est impliqué dans les réponses comportementales liées à l'administration de cocaïne	107
II.3.1.1. Introduction.....	107
II.3.1.1.1. L'action de la cocaïne sur le circuit de la récompense	107
II.3.1.1.2. Aspect neurobiologique de l'action de la cocaïne.....	107
II.3.1.1.2.1. Le système dopaminergique	107
II.3.1.1.2.2. Le système cholinergique	110
II.3.1.1.3. Problématique : GASP-1 et la stimulation prolongée des RCPG in vivo	110
II.3.1.1.4. Les objectifs	112
II.3.1.1.5. L'étude des effets comportementaux de la cocaïne	112
II.3.1.1.5.1. L'autoadministration de cocaïne	113
II.3.1.1.5.2. La sensibilisation à l'effet hyperlocomoteur.....	114
II.3.1.2. Résumé des résultats.....	115
II.3.1.3. Publication n°4	116
II.3.1.4. Éléments de discussion.....	117
II.3.1.4.1. Les effets comportementaux de la cocaïne	117
II.3.1.4.2. Les effets biochimiques de la cocaïne au niveau du striatum.....	118
II.3.1.4.3. Existe-t-il un lien entre les réponses comportementales et les modifications biochimiques observées	120
II.3.2. GASP-1 et les rythmes circadiens	124
II.3.2.1. Introduction : les rythmes circadiens	124
II.3.2.1.1. Les deux composantes des rythmes circadiens	124
II.3.2.1.2. L'horloge biologique interne ou système circadien	125
II.3.2.1.3. Le noyau suprachiasmatique.....	125
II.3.2.1.4. Les mécanismes intracellulaires des rythmes	126
II.3.2.2. Problématique et objectifs	129
II.3.2.3. La mesure des rythmes par actimétrie	130
II.3.2.4. Résultats	133
II.3.2.4.1. Interaction <i>in vitro</i> de GASP-1 et GASP-2 avec les protéines Period	133
II.3.2.4.2. Colocalisation en contexte cellulaire de GASP-1 et GASP-2 avec les protéines Period	135
II.3.2.4.3. Variation de l'expression de GASP-1 entre jour et nuit.....	143

II.3.2.4.4. Influence de GASP-1 sur la régulation des rythmes circadiens	145
II.3.2.5. Éléments de discussion.....	151
II.3.2.5.1. Les GASP interagissent avec les protéines Period	151
II.3.2.5.2. La localisation subcellulaire des protéines Period dépend de la présence des GASP	151
II.3.2.5.3. GASP-1 et les rythmes circadiens chez la souris	153
III. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	157
IV. MATÉRIEL ET MÉTHODES	163
IV.1. Biologie moléculaire	165
IV.1.1. Les plasmides	165
IV.1.1.1. Les plasmides pcDNA3.1/Néo et Hygro	165
IV.1.1.2. Le plasmide pGEX	167
IV.1.2. Les clones par réaction de polymérisation en chaîne.....	167
IV.1.3. Les souches bactériennes	168
IV.1.3.1. <i>E. coli</i> TOP10 [®] et XL1-Blue : clonage et amplification plasmidique	168
IV.1.3.2. <i>E. coli</i> BL21 Rosetta2 : expression de protéines recombinantes.....	168
IV.1.4. Préparation de bactéries compétentes et transformation bactérienne	169
IV.1.5. Amplification plasmidique	169
IV.1.6. Stratégies de clonage et de mutagenèse.....	170
IV.1.6.1. Clonage et mutagenèse des protéines de la famille GASP.....	170
IV.1.6.1.1. Les ADNc codant pour les protéines GASP	170
IV.1.6.1.2. Construction des vecteurs codants pour les mutants tronqués de GASP-1 et GASP-2	171
IV.1.6.1.3. Construction des vecteurs codants pour les mutants ponctuels de GASP-2.....	171
IV.1.6.1.4. Construction des vecteurs codants pour GASP-2 et pour son domaine carboxyl-terminal fusionné à la GST.....	173
IV.1.6.1.5. Les protéines GASP-1 et GASP-2 fusionnées à l'EYFP	173
IV.1.6.2. Clonage et mutagenèse dirigée des domaines carboxyl-terminaux de RCPG	173
IV.1.6.2.1. Les vecteurs codant pour les domaines carboxyl-terminaux de RCPG fusionnés à la GST.....	173
IV.1.6.2.2. Mutants ponctuels des domaines carboxyl-terminaux des récepteurs δ aux opioïdes et β_1 à l'adrénaline.....	175
IV.1.6.2.3. Construction du vecteur codant pour le récepteur muscarinique M ₁ fusionné à l'étiquette FLAG [®]	175
IV.1.6.2.4. Le vecteur codant pour le récepteur à l'acétylcholine muscarinique M1 fusionné à l'EGFP.....	176
IV.1.6.3. Construction des vecteurs codant pour les protéines Period fusionnées à la mCherry.	176

IV.2. Biologie cellulaire	177
IV.2.1. Les cellules de mammifère	177
IV.2.1.1. Les cellules CHO	177
IV.2.1.2. Les cellules NG108-15	178
IV.2.2. Transfection de cellules eucaryotes	178
IV.2.3. Stabilisation des cellules transfectées : sélection par résistance aux antibiotiques, tri au FACS	179
IV.3. Essai de GST pull down	179
IV.3.1. Transcription et traduction <i>in vitro</i> des protéines radiomarquées	179
IV.3.1.1. Kit de transcription et traduction <i>in vitro</i>	179
IV.3.1.2. Marquage des protéines à la méthionine [³⁵ S]	179
IV.3.2. Production en bactérie des protéines de fusion avec la GST	180
IV.3.3. Synthèse des peptides GASP	181
IV.3.4. Essais de GST pull down : interaction et compétition	181
IV.3.4.1. Interaction <i>in vitro</i> des différents partenaires	181
IV.3.4.1. Essais de compétition en GST pull down	183
IV.3.4.3. Analyse du surnageant	183
IV.4. Mesure de liaison spécifique de ligand radioactif	183
IV.4.1. Les radioligands et ligands	184
IV.4.1.1. Les radioligands muscariniques	184
IV.4.1.2. Les radioligands dopaminergiques	184
IV.4.1.3. Radioligand opioïde	184
IV.4.1.4. Les ligands	184
IV.4.2. Mesure du nombre de site à l'aide d'une concentration saturante de ligand radioactif	185
IV.4.2.1. Mesure du nombre de sites muscariniques et dopaminergiques dans différentes structures du cerveau de souris	187
IV.4.2.2. Mesure du nombre de sites muscariniques dans les lignées CHO	188
IV.5. Imagerie en microscopie confocale	188
IV.6. Mesure de la libération de calcium intracellulaire	189
IV.7. Anticorps primaire dirigé contre GASP-1	190
IV.7.1. Production d'anticorps dirigés contre GASP-1	190
IV.7.2. Purification des anticorps par chromatographie d'affinité	191
IV.8. Modèle murin déficient en protéine GASP-1	191
Références bibliographiques	193

Liste des Tableaux et Figures

Figure I.1. Représentation schématique des RCPG sous leur forme monomérique et illustration des principales caractéristiques structurales des trois familles de RCPG.	6
Figure I.2. Représentation schématique d'une protéine G et de son cycle d'activité.	8
Figure I.3. Régulation de l'activité de l'adénylate cyclase (AC) et de la phospholipase C (PLC) par les protéines G_s , G_i et G_q .	10
Figure I.4. Représentation schématique des étapes majeures de l'adaptation à la stimulation des RCPG.	12
Figure I.5. L'ubiquitinylation des protéines.	18
Tableau I.1. Alignement des séquences des RCPG possédant un motif Tyrosine	20
Tableau I.2. Alignement des séquences des RCPG possédant un motif di-Leucine	22
Figure I.6. Illustration de certains concepts sur le rôle de l'ubiquitinylation des RCPG et son implication dans la régulation de leur trafic intracellulaire.	36
Figure I.7. Réseau d'interaction protéine-protéine autour de la huntingtine.	50
Tableau II.1.1. Collection des domaines carboxyl-terminaux de récepteurs testés pour leur capacité à interagir avec les GASP.	60
Figure II.1.1. Analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide coloré au bleu de Coomassie des domaines carboxyl-terminaux de récepteur fusionnés à la GST.	61
Figure II.1.2. La famille des protéines GASP.	62
Figure II.1.3. Représentation de la séquence du récepteur β_2 AR.	64
Figure II.1.4. Représentation schématique des mutants tronqués de GASP-1 qui sont décrits dans ce chapitre.	68
Figure II.1.5. Interaction entre les mutants tronqués de GASP-1 et les domaines carboxyl-terminaux des récepteurs DOR, β_1 AR et M_1 .	72
Figure II.1.6. Compétition entre le peptide GASP et la protéine GASP-2 pour la liaison du domaine carboxyl-terminal de β_1 AR.	72
Figure II.1.7. Interaction entre GASP-1, -2 et -7 et les récepteurs β_1 AR, M_1 , CALCR, TXA_2 et DOR en présence et en absence de 150 μ M de peptide GASP.	73
Tableau II.2.1. Les récepteurs muscariniques de l'acétylcholine	90
Figure II.2.1. Principaux agonistes muscariniques.	92
Figure II.2.2. Principaux antagonistes muscariniques non sélectifs.	93
Figure II.2.3. Les étapes du « <i>linear unmixing</i> » pour un échantillon exprimant deux protéines marquées respectivement avec l'EGFP et l'EYFP.	96
Figure II.3.1.1. Localisation anatomique simplifiée des systèmes importants pour l'action pharmacologique de la cocaïne.	109
Figure II.3.2.1. Représentation schématique de l'horloge biologique moléculaire des mammifères.	128
Figure II.3.2.2. Interaction entre les protéines Period1, 2 et 3 et les protéines GASP-1, GASP-2 et de leurs domaines carboxyl-terminaux respectifs.	132
Figure II.3.2.3. Images par microscopie confocale des lignées cellulaires CHO exprimant la protéine Period1 fusionnée à la mCherry et GASP-1 ou GASP-2 fusionnés à l'EYFP.	136
Figure II.3.2.4. Images par microscopie confocale des lignées cellulaires CHO exprimant la protéine Period2 fusionnée à la mCherry et GASP-1 ou GASP-2 fusionnés à l'EYFP.	139
Figure II.3.2.5. Images par microscopie confocale des lignées cellulaires CHO exprimant la protéine Period3 fusionnée à la mCherry et GASP-1 ou GASP-2 fusionnés à l'EYFP.	140

Figure II.3.2.6. Localisation subcellulaire des protéines mCherry-Per1, 2 ou 3 exprimées seules ou coexprimées avec EYFP-GASP-1 ou EYFP-GASP-2.....	141
Figure II.3.2.7. Comparaison de l'expression de GASP-1 entre le jour et la nuit dans le noyau suprachiasmatique (NSC), la glande pinéale et la rétine de rat.....	142
Figure II.3.2.8. Actogrammes représentatifs montrant l'activité des souris sauvages (WT) et déficientes en GASP-1 (KO) en cycle lumière/obscurité (12h/12h) puis en obscurité constante.	144
Figure II.3.2.9. Comparaison des paramètres du rythme de veille/activité entre les souris sauvages (WT) et déficientes en GASP-1 (KO).	146
Figure II.3.2.10. Actogrammes représentatifs montrant l'activité des souris sauvages (WT) et déficientes en GASP-1 (KO) soumises au test de <i>jet lag</i>	147
Figure II.3.2.11. Représentation graphique du temps de resynchronisation du rythme de veille/activité chez les souris sauvages (WT) et déficientes en GASP-1 (KO)	148
Figure II.3.2.12. Représentation schématique des trois protéines Period de souris et de leurs principaux domaines.....	150
Figure III.1. Schéma résumant les résultats obtenus et les hypothèses qui feront l'objet de travaux ultérieurs.....	158
Figure IV.1. Vecteurs d'expression eucaryote pcDNA3.1/Néo.....	164
Figure IV.2. Vecteurs d'expression bactérien pGEX.....	166
Figure IV.3. Représentation schématique des différents mutants tronqués de GASP-1	172
Figure IV.4. Représentation schématique des deux mutants tronqués et des trois mutants ponctuels de GASP-2.....	172
Tableau IV.1. Les fusions des domaines carboxyl-terminaux de RCPG avec la GST	174
Figure IV.5. Représentation schématique du déroulement d'un essai de <i>GST-pull down</i>	182
Figure IV.6. Représentation schématique des 3 étapes de l'essai de liaison de ligand radioactif.....	186

Abréviations

5HT _{2C} :	récepteurs à la sérotonine (5-hydroxytryptamine) de type 2C
α _{1B} AR :	récepteur à l'adrénaline α _{1B}
A _{2A} :	récepteur à l'adénosine de type 2A
AA :	acide aminé
AC :	adénylate cyclase
ACTH :	hormone adrénocorticotrope (<i>adrenocorticotrophin hormone</i>)
ADN :	acide désoxyribonucléique
AMPc :	adénosine monophosphate cyclique
AP-2 :	protéine adaptatrice 2
ARF :	facteur d'ADP ribosylation (<i>ADP-ribosylation factor</i>)
ARNO :	<i>ARF nucleotide binding site opener</i>
ARIP-1 :	<i>activin receptor interacting protein-1</i>
ARN :	acide ribonucléique
AT _{1A} :	récepteur à l'angiotensine II de type 1A
ATP :	adénosine triphosphate
ATV :	aire tegmentale ventrale
β ₂ AR :	récepteur à l'adrénaline β ₂
BAIP3 :	<i>BARD1 Interacting Protein 3</i>
BARD1 :	<i>Breast cancer susceptibility gene 1 (BRCA1) Associated Ring Domain protein 1</i>
bHLH :	domaine basique hélice-boucle-hélice
CB ₁ :	récepteur aux cannabinoïdes de type 1
CB ₂ :	récepteur aux cannabinoïdes de type 2
CCR ₅ :	récepteur aux chemokines à motif CC de type 5
CHO :	cellule issue d'ovaire de hamster chinois (<i>chinese hamster ovary</i>)
CK1 :	caséine kinase 1
Cry :	cryptochrome
CXCR ₂ :	récepteur aux chemokines à motif CXC de type 2
CXCR ₄ :	récepteur aux chemokines à motif CXC de type 4
D _{1A} :	récepteur à la dopamine de type 1A
D ₂ :	récepteur à la dopamine de type 2
DAG :	diacylglycérol
DC :	dichroïsme circulaire
DOR :	récepteur aux opioïdes δ
EBP50 :	<i>Ezrin/radixin/moesin Binding Phosphoprotein of 50kDa</i>
EEA1 :	antigène 1 associé à l'endosome primaire (<i>early-endosomal autoantigen 1</i>)
ERK1/2 :	<i>extracellular signal-regulated kinase 1/2</i>
ERM :	<i>Ezrin/radixin/moesin</i>
ESCRT :	<i>endosomal sorting complex required for transport</i>
ET _A :	récepteur à l'endothéline de type A
ET _B :	récepteur à l'endothéline de type B
FSH :	hormone folliculostimulante (<i>follicle stimulating hormone</i>)
GABA _B :	récepteur à l'acide γ amino-butérique
GAP :	protéine activatrice de GTPase (<i>GTPase-activating protein</i>)
GASP :	protéine de tri associée aux RCPG (<i>G protein-coupled receptor associated sorting protein</i>)

GDP :	guanosine diphosphate
GEF :	facteur d'échange de guanosine (<i>guanine nucleotide exchange factor</i>)
GIPC :	<i>GAIP interacting protein C-terminal</i>
GIT :	<i>GRK interactor</i>
GMPc :	guanosine monophosphate cyclique
GRK :	kinase spécifique des RCPG (<i>G protein-coupled receptor kinase</i>)
GST :	<i>glutathione S-transferase</i>
GTP :	guanosine triphosphate
HECT :	<i>homologous to E6-AP carboxyl terminus</i>
HEK :	Cellule issue de reins d'embryon humain (<i>human embryonic kidney</i>)
HIP5 :	<i>huntingtin interacting protein 5</i>
Hrs :	<i>hepatocyte-growth factor regulated tyrosine kinase substrate</i>
IP3 :	inositol triphosphate
KO :	<i>knock-out</i>
KOR :	récepteur aux opioïdes κ
LH :	hormone lutéinisante (<i>luteinizing hormone</i>)
LHR :	récepteur à l'hormone lutéinisante et à la gonadotrophine chorionique
M ₁ à M ₅ :	récepteurs à l'acétylcholine muscarinique de type 1, 2, 3, 4 et 5
MAGI-2 :	<i>membrane-associated guanylate kinase inverted-2</i>
MAPK :	protéine kinase activée en cascade (<i>mitogen-activated protein kinase</i>)
MEF :	fibroblaste embryonnaire de souris (<i>mouse embryonic fibroblast</i>)
mGluR :	récepteur métabotrope au glutamate
Mdm2 :	<i>mouse double minute-2</i> (ubiquitine ligase)
MOR :	récepteur aux opioïdes μ
MSH :	hormone melanostimulante (<i>melanocyte-stimulating hormone</i>)
MVB :	corps multi-vésiculaire
NAc :	nucleus accumbens
NHERF :	facteur régulateur de l'échangeur Na^+/H^+ (<i>Na^+/H^+ exchange regulatory factor</i>)
NK ₁ :	récepteur à la substance P
NK ₂ :	récepteur à la neurokinine A
NK ₃ :	récepteur à la neurokinine B
NSC :	noyau suprachiasmatique
NSF :	<i>N-ethylmaleimide sensitive factor</i>
NTS ₁ :	récepteur à la neurotensine de type 1
OTR :	récepteur à l'ocytocine
P2Y ₁ :	récepteur à l'ADP de type 1
PAF :	facteur d'activation plaquettaire
PAFR :	récepteur du PAF
PAR ₁ :	récepteur activé par la thrombine de type 1 (<i>protease activated receptor 1</i>)
PAR ₂ :	récepteur activé par la thrombine de type 2 (<i>protease activated receptor 2</i>)
PDE :	phosphodiesterase
PDZ :	<i>post-synaptic density protein of 95-kDa/drosophila disc large tumour suppressor (DlgA)/zonula occludens 1 homology</i>
Per :	Period
PH :	<i>pleckstrin homology domain</i>
PI3K :	phosphoinositide 3-kinase
PIP ₂ :	phosphatidylinositol 4,5-diphosphate
PIP ₃ :	phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate
PKA :	protéine kinase dépendante du cAMP
PKC :	protéine kinase dépendante du DAG

PLC β : phospholipase C β
 PSD-95 : protéine de la densité post-synaptique (*post-synaptic density protein of 95kDa*)
 PTH : hormone parathyroïdienne hypercalcémiant (*parathyroid hormone*)
 PTH₁R : récepteur à l'hormone parathyroïdienne
 PTN : pléiotrophine
 RING : *really interesting new gene*
 RMN : résonance magnétique nucléaire
 RCPG : récepteur couplé aux protéines G
 SNX₁ : *sorting nexin 1*
 S-SCAM : *synaptic scaffolding molecule*
 SST_{2A} : récepteur à la somatostatine de type 2A
 SST₅ : récepteur à la somatostatine de type 5
 TRH : récepteur à la thyroolibérine (*thyrotropin releasing hormone*)
 TSH : thyroestimuline (*thyroxin stimulating hormone*)
 TXA₂ α : récepteur au thromboxane A₂ de type α
 TXA₂ β : récepteur au thromboxane A₂ de type β
 Ub : ubiquitine
 V₂ : récepteur à la vasopressine de type 2
 VIP : peptide intestinal vasoactif (*vasoactiv intestinal peptide*)
 WT : *wild-type*

Version abrégée du projet de thèse

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) sont parmi les principaux médiateurs de la communication cellulaire. Ils sont impliqués dans la régulation de nombreux processus physiologiques et représentent des cibles thérapeutiques privilégiées. L'activité des RCPG est finement contrôlée et leur stimulation prolongée par des agonistes endogènes ou exogènes, tel que des médicaments, conduit à un certain nombre d'adaptations. En particulier, on observe une diminution de la sensibilité des RCPG aux agonistes, appelée désensibilisation, puis la diminution du nombre de RCPG présents à la surface de la cellule, appelée régulation négative. Au niveau de l'organisme, ces adaptations moléculaires se traduisent par le développement de la tolérance. La tolérance, qui peut se définir comme une diminution de l'efficacité d'un composé au cours du temps, est bien connue des cliniciens dans le cas de traitements au long cours de nombreuses pathologies avec des médicaments ayant pour cibles les RCPG. C'est le cas par exemple du traitement de la douleur par l'administration d'opiacés dont les doses doivent être régulièrement augmentées afin de maintenir un effet analgésique constant, ce qui s'accompagne d'une augmentation des effets secondaires indésirables. Il a été proposé que la désensibilisation et la régulation négative des récepteurs aux opiacés sont à l'origine du phénomène de tolérance (Taylor, DA et al. 2001). La désensibilisation et la régulation négative des RCPG sont le résultat de la succession de mécanismes complexes. Lors de la désensibilisation, les RCPG sont découplés de leurs protéines G puis sont rapidement internalisés vers le compartiment endosomal mettant ainsi un terme à la transduction du signal. Les RCPG internalisés sont alors soit fonctionnellement recyclés vers la membrane cytoplasmique, ce qui conduit à la resensibilisation de la cellule, soit dirigés vers le compartiment lysosomal pour y être dégradés, ce qui conduit à la régulation négative.

Récemment, nous avons identifié au sein de notre laboratoire une nouvelle famille de protéines interagissant avec les RCPG (Simonin, F et al. 2004). Cette famille appelée GASP, pour *G-protein coupled receptor associating sorting protein*, est composée de 10 membres qui partagent une grande identité de séquence. Les gènes codants pour les GASP sont presque tous rassemblés au sein de deux clusters adjacents de 200 kb localisés sur le chromosome X. Les GASP, dont l'expression est fortement enrichie au niveau du système nerveux central, joueraient un rôle important dans la modulation de la signalisation des RCPG. Il a notamment été proposé que le premier membre de cette famille, GASP-1, participerait à la régulation

négative de RCPG à dégradation rapide comprenant le récepteur delta aux opioïdes (Whistler, JL et al. 2002), le récepteur à la dopamine D₂ (Bartlett, SE et al. 2005) et le récepteur aux cannabinoïdes CB₁ (Martini, L et al. 2007). Très récemment, il a été montré chez l'animal que GASP-1 jouerait un rôle dans le développement de la tolérance à l'effet analgésique des cannabinoïdes (Tappe-Theodor, A et al. 2007). Enfin, une équipe a identifiée GASP-1 comme partenaire d'interaction du modulateur de la transcription Period1 impliqué dans la régulation de l'horloge endogène (Matsuki, T et al. 2001). L'ensemble de ces éléments suggère que les GASP pourraient jouer un rôle central dans la régulation de l'activité d'un grand nombre de RCPG qui pourrait s'étendre à la régulation de l'activité transcriptionnelle. L'objectif de ma thèse a été de caractériser structuralement et fonctionnellement cette nouvelle famille de protéine.

GASP-1 interagit avec le domaine carboxyl-terminal d'un grand nombre de RCPG (Heydorn, A et al. 2004; Simonin, F et al. 2004). Cependant, nous disposons de peu d'informations sur l'interaction des autres membres de la famille GASP avec les RCPG ainsi que sur les régions de ces protéines qui sont importantes pour cette interaction. Nous avons donc étudié l'interaction de 7 des 10 membres que compte la famille GASP avec une collection de 14 extrémités carboxyl-terminales de récepteurs. Nous avons ainsi pu montrer que plusieurs autres membres de la famille GASP interagissent avec les RCPG. Nous avons également étudié la relation entre la structure protéique des GASP et leur activité. La combinaison d'analyses par délétion, d'essais de mutagenèse dirigée et d'essais de compétition m'a permis d'identifier un motif répété de 15 acides aminés, présent chez GASP-1 à -5, crucial pour l'interaction entre les GASP et les RCPG. Ce motif que l'on ne trouve présent que chez les protéines de la famille GASP représente un nouveau motif d'interaction protéine-protéine. Enfin, nous avons montré qu'un petit peptide synthétique contenant ce motif est capable d'inhiber l'interaction avec les RCPG ce qui pourrait constituer une stratégie efficace pour inhiber *in vivo* l'interaction entre les GASP et les RCPG et ainsi diminuer le phénomène de tolérance.

Par ailleurs, les travaux du groupe de J. Whistler s'étant focalisés sur GASP-1 et son implication dans la régulation négative des RCPG à dégradation rapide, il nous est apparu important d'examiner l'implication de GASP-1 et -2 dans le trafic intracellulaire d'un RCPG à dégradation lente, le récepteur à l'acétylcholine muscarinique M₁. Nous avons tout d'abord montré grâce à des essais de coimmunoprécipitation et de colocalisation en microscopie confocale que GASP-1 et GASP-2 interagissent en contexte cellulaire avec le récepteur M₁. À

l'aide de techniques fluorimétrique et de liaison de ligand radioactif, il a été montré que GASP-1 augmente la dégradation lysosomale de M₁ suite à sa stimulation. De plus, il a été montré que GASP-2 accélère l'internalisation de ce récepteur ainsi que son ciblage vers l'endosome de recyclage. L'ensemble de ces résultats confirme l'implication de GASP-1 dans la dégradation des RCPG et démontre, pour la première fois, l'implication de GASP-2 dans la régulation du trafic intracellulaire des RCPG.

Enfin, nous avons exploré le rôle *in vivo* de la protéine GASP-1 d'une part dans les phénomènes comportementaux liés à l'administration de cocaïne et d'autre part dans la régulation des rythmes circadiens. Pour cela, des souris génétiquement déficientes en GASP-1 ont été réalisées grâce à la technique de recombinaison homologue. Ces animaux ont été soumis à des tests comportementaux réalisées en collaboration avec l'équipe du Professeur Raphaël Maldonado afin d'évaluer le rôle de GASP-1 dans les phénomènes adaptatifs liés à l'administration aiguë ou chronique de cocaïne. Les résultats obtenus ont montré que les souris déficientes en GASP-1 sont globalement moins sensibles aux effets locomoteurs liés à l'administration aiguë de cocaïne et qu'elles s'administrent moins de cocaïne que leurs homologues sauvages. De plus, les densités de récepteurs dopaminergiques et cholinergiques ont été évaluées dans différentes structures cérébrales chez ces animaux afin d'examiner l'impact de GASP-1 sur la régulation du nombre de ces récepteurs lors d'un traitement chronique à la cocaïne. Les résultats obtenus montrent que les densités de récepteurs dopaminergiques et cholinergiques dans le striatum sont significativement plus faibles chez les souris déficientes en GASP-1 par rapport aux souris sauvages. Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que GASP-1 limite la régulation négative des récepteurs dopaminergiques et cholinergiques dans le striatum lors de l'administration chronique de cocaïne ce qui semble se traduire au niveau comportemental par une diminution de l'acquisition d'un comportement d'autoadministration de la cocaïne. GASP-1 ayant été décrit comme partenaire d'interaction de la protéine horloge Period-1, il est apparu important d'évaluer l'implication de GASP-1 dans la régulation des rythmes biologiques. Dans un premier temps, nous avons montré *in vitro* et en contexte cellulaire que GASP-1 et -2 interagissent non seulement avec Period-1 mais également avec les autres protéines Period mammifères (Period-2 et -3). Dans un deuxième temps, les souris déficientes en GASP-1 ont été soumises en collaboration avec l'équipe du Professeur Paul Pevet à des tests de mesure de la période du rythme circadien endogène dans des conditions d'obscurité constante et de resynchronisation du rythme après un décalage de phase afin de déterminer si cette protéine est impliquée dans la régulation du rythme circadien. Bien qu'aucunes différences n'aient été constatées entre les animaux

sauvages et les animaux mutants, il n'est pas à exclure que les GASP puissent moduler de manière fine l'horloge endogène et que ces effets n'aient pu être décelés à l'aide des tests utilisés. Par ailleurs, l'interaction entre les GASP et les protéines Period pourrait être reliée à une autre fonction et plus particulièrement à l'établissement de la dépendance aux drogues d'abus comme la cocaïne ou l'alcool (Abarca, C et al. 2002; Spanagel, R et al. 2005).

Dans l'ensemble, ces résultats ont permis de préciser l'interaction des protéines de la famille GASP avec les récepteurs couplés aux protéines G ainsi que le rôle de cette interaction dans la régulation du trafic intracellulaire de ces récepteurs et ses conséquences chez l'animal.

I. INTRODUCTION

I.1. Les Récepteurs Couplés aux Protéines G

L'organisme humain est composé d'une multitude de cellules. Leur fonctionnement coordonné et harmonieux est rendu possible grâce à des médiateurs chimiques qui vont réguler les propriétés caractéristiques de chaque type cellulaire. Se liant à leurs récepteurs spécifiques, les médiateurs entraînent une réponse cellulaire par l'intermédiaire d'une voie de signalisation, ensemble de processus biochimiques intracellulaires. C'est en interférant avec ces récepteurs de médiateurs ou leur voies de signalisation qu'agissent la plupart des médicaments.

Le concept de récepteur en biochimie peut être attribué à plusieurs auteurs de la fin du XIX^e et du début du XX^e siècle. Paul Ehrlich, médecin allemand, est le premier à considérer qu'une molécule chimique ne peut agir sur une cible qu'en s'y fixant. En 1906, Henry Dale montre la modification des effets de la stimulation des nerfs sympathiques par un extrait d'ergot de seigle et évoque à ce propos « *the receptive mechanism for adrenalin* ». Ainsi apparaît le terme de récepteur qui devait rester abstrait jusqu'à la purification dans les années 1970 des récepteurs nicotiniques et des récepteurs de l'insuline. Auparavant, le récepteur n'était présenté ni plus ni moins que comme une serrure dont le ligand était la clé. Depuis les années 1980, le clonage et le séquençage des gènes codant pour ces récepteurs ainsi que la découverte des voies de signalisation associées ont permis de lever le voile sur une partie des mécanismes reliant les médicaments et leurs effets thérapeutiques.

Parmi les différentes catégories de récepteurs de médiateurs, les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) sont les plus représentés. Localisés à la surface des cellules de l'organisme, ils régulent de nombreux processus biologiques. Les études les plus récentes indiquent l'existence de 720 à 800 gènes codant pour des RCPG différents chez l'homme ce qui représentent près de 2% du génome humain (Jacoby, E et al. 2006). Cette grande diversité de récepteurs se reflète dans leur capacité à détecter une très grande variété de stimuli allant des photons aux molécules odorantes et aux phéromones en passant par de petites molécules et des protéines. Au vu de toutes ces considérations, il est aisé de comprendre que les RCPG représentent des cibles pharmacologiques privilégiées. Près de 30% des médicaments utilisés actuellement en thérapeutique agissent sur ces récepteurs (Hopkins, AL et al. 2002). En outre, cette tendance n'est pas prête de s'inverser car parmi les 359 RCPG non sensoriels fonctionnels recensés chez l'homme (Foord, SM et al. 2005), 143 n'ont aucun ligands connus à ce jour, on parle dans ce cas de récepteurs orphelins. Dans les années à venir, la désorphanisation de ces récepteurs, c'est à dire la découverte de leurs ligands actifs, fournira

des informations cruciales pour leur caractérisation. À terme, ceci devrait conduire au développement de nouveaux médicaments agissant sur ces nouvelles cibles potentielles.

I.1.1. Organisation structurale et classification

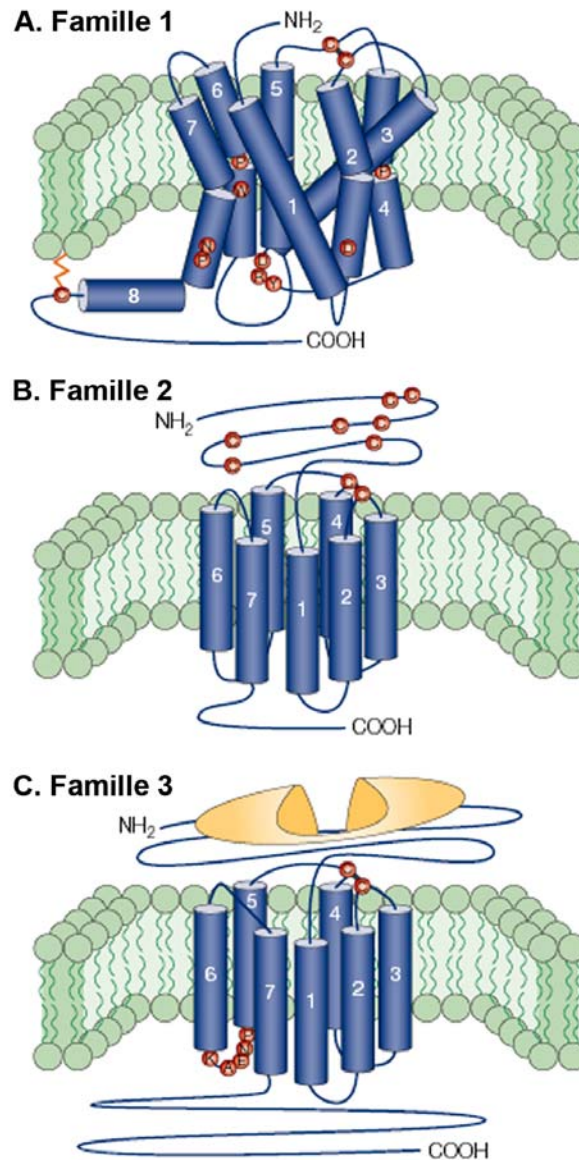
Le clonage des premiers RCPG fut réalisé en 1986 avec le récepteur β_2 AR à l'adrénaline (Dixon, RA et al. 1986) et le récepteur muscarinique M_1 à l'acétylcholine (Kubo, T et al. 1986) montrant alors qu'ils partageaient avec la rhodopsine des homologies de séquence et une organisation structurale théorique à sept domaines transmembranaires. En effet, la facilité de préparation de la rhodopsine à partir de cellules en bâtonnet de la rétine avait permis son séquençage dès 1982 et son clonage en 1983 (Ovchinnikov, YA 1987). D'autre part, la structure topologique à sept domaines transmembranaires de la bactériorhodopsine avait été déterminée par microscopie électronique en 1975 (Henderson, R et al. 1975). D'autres récepteurs furent clonés dans les années qui suivirent, confirmant l'idée d'une grande famille de récepteurs et jetant les bases d'une classification reposant sur leurs homologies de structure primaire et les sites d'interaction avec les ligands agonistes.

En effet, l'ensemble des RCPG partage une structure tridimensionnelle commune caractérisée par un domaine amino-terminal extracellulaire, sept hélices α transmembranaires reliées par des boucles intra et extracellulaires et un domaine carboxyl-terminal intracellulaire. Le nombre d'acides aminés des RCPG varie de 340 à 1200, voir plus. Chaque hélice transmembranaire comporte 20 à 22 acides aminés. La variabilité du nombre total d'acides aminés est liée à la taille du domaine amino-terminal, du domaine carboxyl-terminal et des boucles intracellulaires, les boucles extracellulaires étant quant à elles de taille modeste.

Trois principales familles de RCPG ont été définies sur la base de ces homologies de structure primaire (Figure I.1). Nommées familles 1, 2 et 3 elles ont pour récepteurs prototypiques respectivement la rhodopsine, le récepteur de la sécrétine et le récepteur métabotrope du glutamate. Les RCPG de la famille 1 sont les plus représentés. Selon l'Union Internationale de Pharmacologie (IUPHAR), si l'on exclue les récepteurs du goût, des odeurs et de la lumière, 276 récepteurs composent la famille 1, 53 la famille 2 et 19 la famille 3. Il faut ajouter à cela les 11 récepteurs de la famille frizzled/smoothened qui sont impliqués dans le développement et la prolifération cellulaire. Structuralement proches des récepteurs de classe 2, ils ne présentent pas tous de couplage avec les protéines G (Winklbauer, R et al. 2001) ce qui prête à controverse leur incorporation dans la classification des RCPG.

La famille 1 est caractérisée par la présence de nombreux résidus conservés et d'un pont disulfure qui relie la première et la deuxième boucle extracellulaire. Les rares exceptions sont les récepteurs aux hormones peptidiques mélanostimulante (MSH) et adrénocorticotrope (ACTH) et les récepteurs aux cannabinoïdes. La plupart des récepteurs de la famille 1 possèdent au sein de leur domaine carboxyl-terminal une cystéine palmitoylée qui vient s'ancrer dans la membrane cytoplasmique. En amont de celle-ci, la portion proximale du domaine carboxyl-terminal se replie en une hélice α nommée hélice 8. La résolution de la structure cristallographique de la rhodopsine (Palczewski, K et al. 2000) a montré que les domaines transmembranaires présentaient des coudes du à la présence de résidus proline qui contraignent leur repliement en hélice α . La famille 1 est subdivisée en trois sous-familles définies par la localisation de leur site d'interaction avec le ligand agoniste. On distingue tout d'abord la sous-famille 1a des récepteurs de petits neuromédiateurs aminés (adrénaline, noradrénaline, dopamine, sérotonine), de l'acétylcholine, des neuropeptides opioïdes, de l'adénosine et de l'adénosine triphosphate (ATP). Ces récepteurs présentent un site de liaison à leur agoniste situé à l'intérieur du domaine à 7 hélices transmembranaires. On distingue ensuite la sous-famille 1b des récepteurs de neuropeptides et d'hormones peptidiques tel que les cytokines, la thrombine, le PAF. Ces récepteurs interagissent avec leur ligand à l'aide de leur extrémité amino-terminale, des boucles extracellulaires 1 et 2 et la portion supérieure des hélices transmembranaires. Enfin, la sous-famille 1c des récepteurs des hormones glycoprotéiques : l'hormone lutéinisante (LH), l'hormone folliculostimulante (FSH) et la thyrostimuline (TSH). Ces grosses hormones interagissent avec la longue extrémité amino-terminale très structurée et de manière moindre avec les boucles extracellulaires.

La famille 2 comprend des récepteurs à hormones peptidiques tel que la sécrétine, l'hormone parathyroïdienne (PTH), le glucagon ou la calcitonine. Leur morphologie globale rappelle celle des récepteurs de la sous-famille 1c, mais sans analogie de structure primaire. Leur longue portion amino-terminale est structurée en un domaine globulaire par la présence conservée de trois ponts disulfures.



Adapté de Nature Reviews Drug Discovery. 2004. 3:581

Figure I.1. Représentation schématisique des RCPG sous leur forme monomérique et illustration des principales caractéristiques structurales des trois familles de RCPG.

La famille 1 est caractérisée par la présence de résidus conservés indiqués en rouge, d'un pont disulfure entre la 1^{ère} et la 2^{ème} boucle extracellulaire et d'un groupement cystéine palmitoylé ancré dans la membrane (zig-zag rouge) (A). La famille 2 est caractérisée par un long domaine amino-terminal structuré par plusieurs ponts disulfures (en rouge). Leur morphologie est proche de celle des RCPG de la famille 1 mais la cystéine palmitoylée est absente (B). La famille 3 est caractérisée par des domaines amino- et carboxyl-terminaux volumineux. Le site de liaison des ligands (en jaune) est localisé sur le domaine amino-terminal et prend la structure d'une pince pouvant s'ouvrir ou se fermer pour emprisonner le ligand (C).

La famille 3 comprend le récepteur du calcium extracellulaire, les récepteurs à l'acide γ amino-butérique (GABA_B) et les récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluR). Ces récepteurs possèdent une portion amino-terminale et une portion carboxyl-terminale de très grandes tailles. Le ligand est reconnu par la portion amino-terminale du récepteur qui contient son site de liaison constitué de deux domaines reliés par un pont disulfure. Excepté le récepteur GABA_B, la portion amino-terminale est marquée par la présence d'une séquence conservée riche en cystéines qui la relie à la portion transmembranaire à sept hélices α . La troisième boucle intracellulaire est fortement conservée et la présence de deux cystéines au sein des deuxième et troisième boucles extracellulaires suggère la présence potentielle d'un pont disulfure.

I.1.2. Les protéines G hétérotrimériques

Les protéines G hétérotrimériques, comme leur nom l'indique, sont composées de trois sous-unités distinctes (Figure I.2.A). La sous-unité α , d'une masse de 39 à 52 kDa, lie la guanosine diphosphate (GDP) et triphosphate (GTP) et hydrolyse le GTP. Les sous-unités β (36 kDa) et γ (7 à 8 kDa) forment un dimère considéré comme fonctionnellement indissociable. Les protéines G trimériques sont principalement situées sur la face interne de la membrane cytoplasmique dans laquelle peuvent s'ancrer les sous-unités α et γ par isoprénylation ou myristylation (adjonction de chaînes carbonées).

Au repos, le site catalytique de la sous-unité α du trimère $\alpha\beta\gamma$ est occupé par une molécule de GDP. Lors de l'activation d'un récepteur par la fixation de son ligand extracellulaire celui-ci va subir une modification conformationnelle impliquant les hélices α transmembranaires 3 et 6 (Ballesteros, JA et al. 2001). Ceci conduit au recrutement intracellulaire de la protéine G qui va venir interagir avec la partie proximale du domaine carboxyl-terminal et les deuxième et troisième boucles intracellulaires du récepteur. L'affinité de la sous-unité α pour le GDP diminue et son affinité pour le GTP augmente. Il se produit un échange entre le GDP et le GTP (Figure I.2.B). L'occupation de la sous-unité α par le GTP conduit à la dissociation de $G\alpha$ et $\beta\gamma$, qui vont aller réguler l'activité d'effecteurs intracellulaires, prolongeant la cascade réactionnelle de la transduction du signal. Cependant, l'activité GTPasique de la sous-unité α hydrolyse le GTP en GDP. À nouveau occupée par le GDP, la sous-unité α perd son affinité pour son effecteur mais voit son affinité pour $\beta\gamma$ restaurée. Le trimère $\alpha\beta\gamma$ se reforme et prend part à un nouveau cycle.

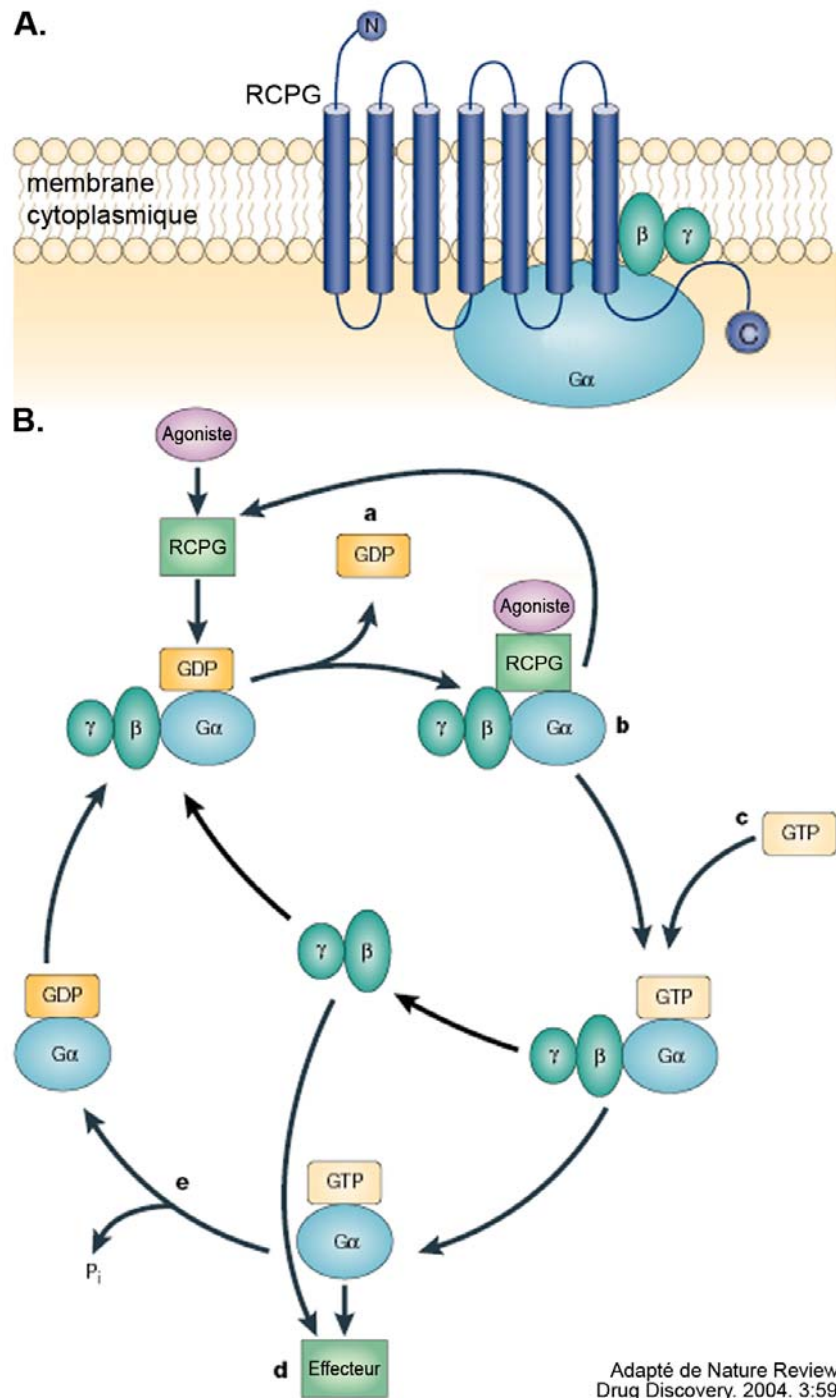


Figure I.2. Représentation schématique d'une protéine G et de son cycle d'activité.

La protéine G est composée de trois sous-unités (α , β et γ) et interagit avec les domaines intracellulaires des RCPG (A). L'activation de la protéine G par son récepteur provoque la libération d'une molécule de GDP (a) et le recrutement d'une molécule de GTP (b, c). La protéine G se dissocie alors en $G\alpha$ et $G\beta\gamma$ qui vont activer leurs effecteurs secondaires respectifs (d). Finalement, la sous-unité $G\alpha$ hydrolyse la molécule de GTP en GDP et se réassocie avec une sous-unité $G\beta\gamma$ initiant ainsi un nouveau cycle (B).

On notera que certains récepteurs sont couplés aux protéines G en absence de toute activation par la fixation de ligand. Ces récepteurs sont dits constitutivement actifs et participent au tonus basal des voies de signalisation auxquelles ils sont couplés.

Actuellement il existe une vingtaine de sous-unité α , cinq sous-unité β et treize sous-unité γ . La classification des protéines G repose sur les analogies de structure des sous-unités α qui les composent, le dimère $\beta\gamma$ étant considéré comme interchangeable. On distingue les quatre familles G_s , G_i , G_q et $G_{12/13}$. La famille G_s comprend les protéines G dont les sous-unités α sont α_s ou α_{olf} . La sous-unité α_s est ubiquitaire dans tout l'organisme alors que la sous-unité α_{olf} est uniquement présente dans le neuroépithélium olfactif. La famille G_i comprend les protéines G dont les sous-unités α sont α_{i1} , α_{i2} , α_{i3} , α_{o1} , α_{o2} ou α_z ainsi que les transducines α_{t1} et α_{t2} de la rétine et la gustducine α_{gust} des cellules gustatives. La famille G_q comprend les protéines G dont les sous-unités α sont α_q et α_{11} majoritairement représentées ainsi que α_{14} et α_{15} des cellules hématopoïétiques et α_{16} . Enfin la famille $G_{12/13}$ comprend les protéines G dont les sous-unités α sont α_{12} , largement répartie, et α_{13} , principalement exprimée dans les cellules gustatives.

Comparativement à la profusion de récepteurs couplés aux protéines G, il existe peu de protéines G hétérotrimériques. Néanmoins, les RCPG génèrent une grande diversité de réponses cellulaires sous différentes conditions environnementales dans différents tissus de l'organisme. Cette diversité peut s'expliquer par la capacité d'une protéine G hétérotrimérique à réguler l'activité de plusieurs effecteurs intracellulaires. En effet, la sous-unité α et les sous-unités $\beta\gamma$ vont moduler, de manière synergétique ou antagoniste, l'activité d'un ou plusieurs effecteurs produisant ainsi une réponse intracellulaire multiple. C'est le cas par exemple de la protéine $G_{i/o}$ dont la sous-unité α inhibe l'adénylyl-cyclase et les sous-unités $\beta\gamma$ activent simultanément la phospholipase C β (PLC β) (Exton, JH 1996). Mais cette diversité de réponse peut également s'expliquer par la capacité d'un RCPG à activer de manière concomitante plusieurs protéines G hétérotrimériques. Des doubles couplages G_s/G_q (Jin, LQ et al. 2001) ou G_i/G_q (Offermanns, S et al. 1994) ont été observés pour de nombreux RCPG. Dans certains cas, il a été montré qu'un seul récepteur pouvait activer simultanément trois et même quatre protéines G hétérotrimériques issues de famille différentes (Laugwitz, KL et al. 1996).

Comme nous le verrons plus tard, l'activité des RCPG est finement régulée. Néanmoins, il est important de savoir que d'autres mécanismes, parallèlement à ceux agissant sur les RCPG, participent au contrôle de la transduction du signal. L'activité des protéines G

est ainsi régulée par les protéines de la famille RGS (De Vries, L et al. 2000; Ross, EM et al. 2000). Ces protéines nommées GAP (*GTPase Activating Protein*) stimulent l'activité d'hydrolyse du GTP de la sous-unité α des protéines G. Ceci a pour conséquence d'accélérer la désactivation de la sous-unité α et prévient l'activation des effecteurs intracellulaires.

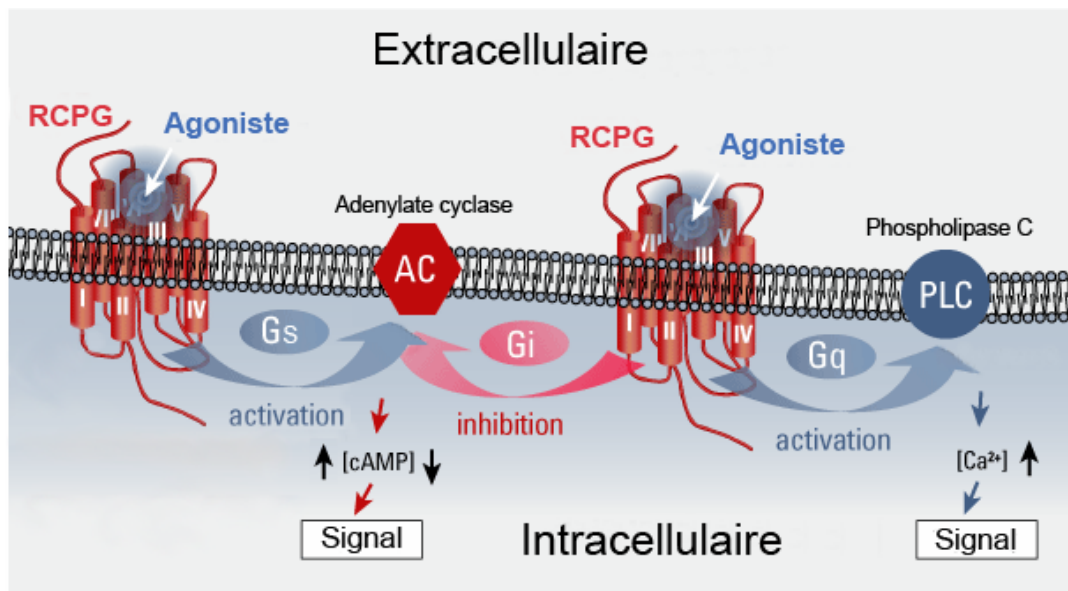


Figure I.3. Régulation de l'activité de l'adénylate cyclase (AC) et de la phospholipase C (PLC) par les protéines G_s, G_i et G_q.

L'AC est activée par G_s et inhibée par G_i ce qui provoque respectivement l'augmentation ou la diminution du taux intracellulaire d'AMPc. La PLC est activée par G_q ce conduit notamment à l'augmentation du taux intracellulaire de calcium.

I.1.3. Les effecteurs intracellulaires

Les récepteurs couplés aux protéines G modulent l'activité d'effecteurs intracellulaires par l'entremise des protéines G hétérotrimériques qu'ils activent. Ces effecteurs sont essentiellement des enzymes qui génèrent des médiateurs intracellulaires et des canaux ioniques qui participent à l'établissement du potentiel de membrane. Leur activité est modulée à la fois par la sous-unité α et par les sous-unités $\beta\gamma$ des protéines G.

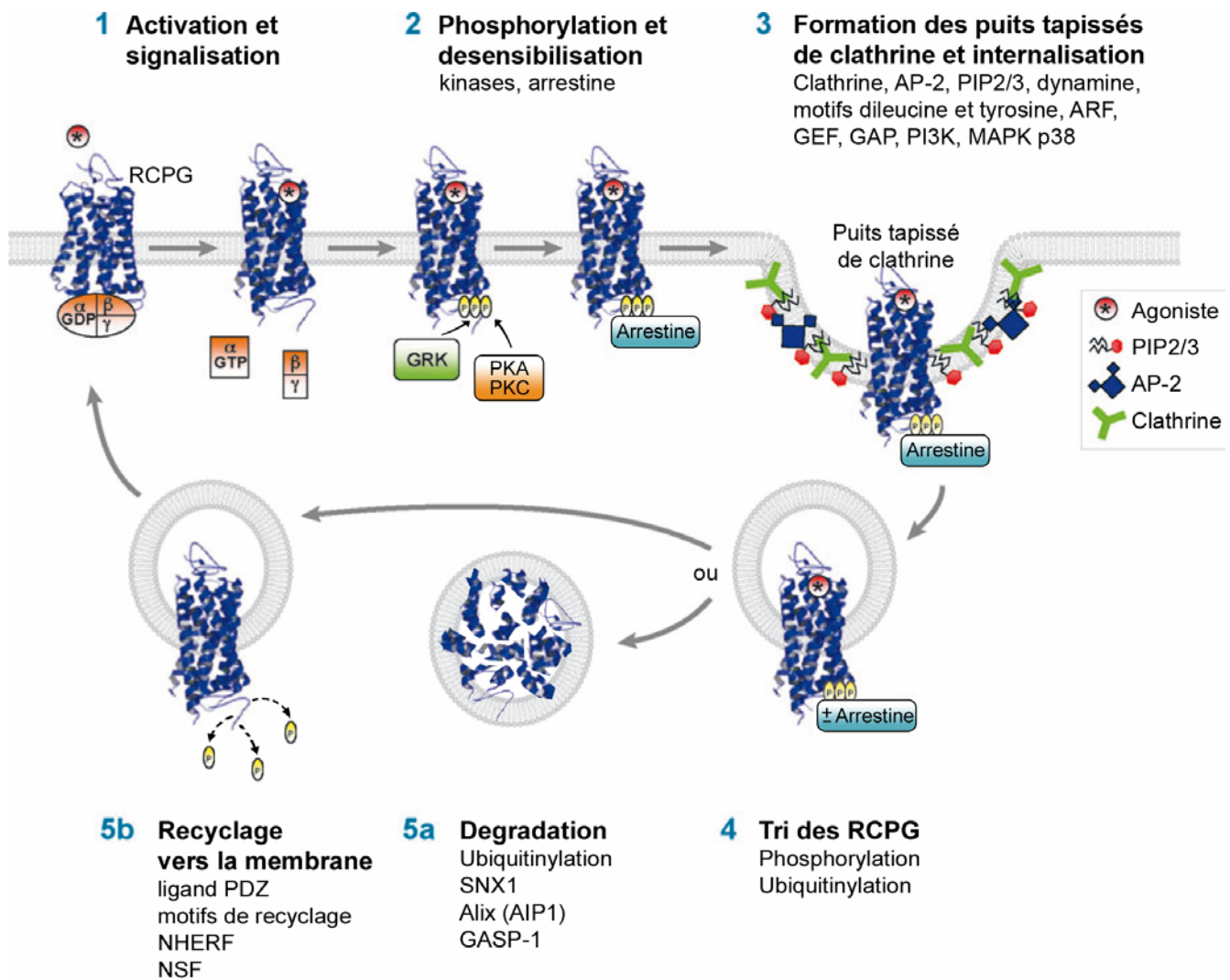
Les adénylyl-cyclases (AC) provoquent l'augmentation du taux d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) intracellulaire qui active notamment les protéines kinases A (PKA). Elles sont activées par les sous-unités α_s ou α_{olf} et inhibées par la sous-unité α_i . Les sous-unités $\beta\gamma$ peuvent également activer ou inhiber certaines adénylyl-cyclases (Figure I.3).

Les phosphodiésthérases (PDE) présentes dans les cellules de la rétine et dans les cellules gustatives sont activées par les sous-unités α_{11} , α_{12} et α_{gust} conduisant à une diminution du taux de AMPc ou de guanosine monophosphate cyclique (GMPc) intracellulaire.

Les phospholipases C β (PLC β) sont activées par les sous-unités α de la famille G $_q$ et produisent de l'inositol triphosphate (IP3) et du diacylglycérol (DAG) qui conduisent à la mobilisation des stocks intracellulaires de calcium et à l'activation des protéines kinases activées par le DAG (PKC) (Figure I.3). Les PLC β peuvent également être activées par les sous-unités $\beta\gamma$ provenant des protéines G $_{i/o}$ (Exton, JH 1996)

Certains canaux ioniques sélectifs au sodium, au calcium ou au chlore sont activés par la sous-unité α_s et inhibés par les sous-unités α_i et α_o alors que les canaux potassiques K $_M$ et K $_{Ach}$ sont activés par les sous-unités α_i et α_o . Les sous-unités $\beta\gamma$ activent certains canaux potassiques à rectification entrante (K $_{Ach}$ et K $_{ir3.0}$) et inactivent certains canaux calciques dépendants du voltage (Ca $v2.1$ et Ca $v2.2$) que l'on trouve dans le cœur et le cerveau.

Enfin, les petites protéines G monomériques (Ras, Rho, ARF, Rab et Ran) sont activées par les sous-unités α_{12} et α_{13} et probablement aussi par les sous-unités $\beta\gamma$ (Takai, Y et al. 2001). De plus l'activation de tyrosyl-kinases de la famille Src par la sous-unité α_s a également été montrée (Ma, YC et al. 2002) ainsi que l'activation de la PI3-kinase (PI3K) 1B par les sous-unités $\beta\gamma$.



Adapté de Ann. Rev. Physiol. 2007. 69:453

Figure I.4. Représentation schématique des étapes majeures de l'adaptation à la stimulation des RCPG.

La fixation de l'agoniste sur le récepteur active la transduction du signal via la protéine G (1). La signalisation du récepteur est arrêtée par la phosphorylation de ses domaines intracellulaires par les GRK (désensibilisation homologue) ou les PKA/PKC (désensibilisation hétérologue) et le recrutement de la β -arrestine (2). Les récepteurs désensibilisés sont internalisés via la voie des vésicules tapissées de clathrine (3). Les vésicules d'endocytose rejoignent l'endosome précoce puis l'endosome de tri. À ce stade là, la β -arrestine peut encore être associée au récepteur dans certains cas (4). Le récepteur est alors dégradé au niveau du compartiment lysosomal ou du protéasome (5a) ou recyclé vers la membrane cytoplasmique (5b), son domaine carboxyl-terminal étant alors déphosphorylé et l'agoniste dissocié.

I.2. Régulation de l'activité des récepteurs couplés aux protéines G et trafic intracellulaire

Comme nous venons de le voir, les récepteurs couplés aux protéines G modulent de nombreuses voies de signalisation elles-mêmes impliquées dans de nombreux aspects de la physiologie humaine. Il est donc capital pour l'organisme de pouvoir ajuster de manière très fine l'activité des RCPG afin de maintenir l'état d'équilibre homéostatique. Ainsi, l'activation du récepteur par son ligand conduit généralement à l'atténuation progressive de sa capacité à produire une réponse intracellulaire qui résulte d'une succession de phénomènes comprenant la désensibilisation des récepteurs, l'internalisation des récepteurs vers les compartiments membranaires intracellulaires et la régulation négative par dégradation des récepteurs membranaires et diminution de la synthèse *de novo* de récepteurs. L'échelle de temps sur laquelle se déroulent ces phénomènes va des secondes pour la désensibilisation aux minutes et aux heures pour l'internalisation et la régulation négative. La succession de ces processus est hautement intégrée permettant ainsi de totalement bloquer la réponse au ligand sur des périodes plus ou moins longues comme c'est le cas dans la rétine (Sakmar, TP 1998) ou de simplement atténuer cette réponse comme cela est observé pour le récepteur β_2 à l'adrénaline (Pippig, S et al. 1995; Zhang, J et al. 1997). Ces différents phénomènes, traités dans ce chapitre, sont représentés de manière synthétique dans la Figure I.4.

I.2.1. La désensibilisation des récepteurs couplés aux protéines G

La désensibilisation des récepteurs couplés aux protéines G conduit au découplage entre le récepteur et sa protéine G hétérotrimérique, ce qui met rapidement fin au signal déclenché par la fixation du ligand sur le récepteur. Deux processus distincts de désensibilisation, nommés désensibilisation homologue et désensibilisation hétérologue, ont été identifiés. Ces processus participent tous les deux à la limitation de l'intensité, de la durée mais également de la qualité du signal produit par le récepteur.

I.2.1.1. Phosphorylation des domaines intracellulaires des récepteurs

La désensibilisation homologue et la désensibilisation hétérologue sont initiées par la phosphorylation des sérines et/ou des thréonines qui sont présentes au sein des boucles intracellulaires et de l'extrémité carboxyl-terminale du récepteur.

Au cours de la désensibilisation hétérologue, ce sont les protéines PKA et PKC qui sont à l'origine de la phosphorylation du récepteur. Cette phosphorylation est suffisante pour inhiber le couplage entre le récepteur et la protéine G et est indépendante de la fixation de l'agoniste. En effet, la PKA et la PKC sont respectivement activées par les seconds messagers de la voie de l'AC et de la PLC β . Ainsi, l'activation d'une de ces voies par un type de récepteur peut conduire à la phosphorylation et la désensibilisation hétérologue d'un autre type de récepteur.

La désensibilisation homologue est quant à elle dépendante de la fixation de l'agoniste sur le récepteur. Des kinases spécifiques des RCPG, les GRK (*G protein-coupled Receptor Kinase*), vont être recrutées par le récepteur activé et vont le phosphoryler en retour. Il existe sept GRK qui présentent de grandes homologies de séquence (Premont, RT et al. 1995). Elles partagent la même structure composée d'un domaine central catalytique et d'un domaine amino-terminal de liaison au récepteur. Elles se différencient néanmoins par leur domaine carboxyl-terminal qui leur permet de se transloquer à la membrane cytoplasmique lorsque les RCPG sont activés. Trois classes de GRK ont été définies sur la base de ces homologies. Les GRK1 et GRK7, essentiellement présentes dans la rétine, possèdent un domaine carboxyl-terminal farnésylé (additionné d'un acide gras) qui les ancre dans les membranes (Inglese, J et al. 1992). Les GRK2 et GRK3 présentent un domaine PH (*Pleckstrin Homology domain*) qui leur permet d'interagir avec les sous-unités G $\beta\gamma$ elles-mêmes associées à la membrane cytoplasmique (Pitcher, JA et al. 1992; Touhara, K et al. 1994). Enfin, les GRK4 et GRK6 ont un domaine carboxyl-terminal palmitoylé (additionné d'un acide gras) (Stoffel, RH et al. 1994) et GRK5 présente une extension de 46 acides aminés basiques qui interagissent de manière électrostatique avec les phospholipides de la membrane cytoplasmique (Kunapuli, P et al. 1994). Leur translocation à la membrane semble également être régulée par leur phosphorylation par des MAP-kinases (MAPK, *Mitogen-Activated Protein Kinase*), des PKC et des tyrosyl-kinases de type Src (Chuang, TT et al. 1995; Winstel, R et al. 1996; Pitcher, JA et al. 1999; Sarnago, S et al. 1999; Elorza, A et al. 2000).

La désensibilisation hétérologue de certains récepteurs par les PKA ou les PKC peut également provoquer une modification de leur sélectivité de couplage aux protéines G. Une étude en contexte cellulaire portant sur des récepteurs β_2 AR dont les sites de phosphorylation ont été modifiés, ainsi qu'une étude *in vitro* employant des récepteurs β_2 AR et des protéines G recombinantes se sont intéressés à la désensibilisation hétérologue de β_2 AR par la PKA. Elles ont montrées que la phosphorylation du récepteur β_2 AR par la PKA inhibe son couplage

avec la protéine G_s mais favorise son couplage avec la protéine G_i (Daaka, Y et al. 1997; Zamah, AM et al. 2002). Ainsi, le récepteur est désensibilisé par rapport à la voie de l'AC mais il acquiert la capacité de signaler via la voie de ERK1/2 qui dépend de G_i . D'autres RCPG présentent ce type de désensibilisation hétérologue sélective. Par exemple, le récepteur $mGluR_{1a}$ au glutamate active la libération du glutamate via son couplage à la protéine G_q qui est progressivement désensibilisé par la PKC alors que le couplage avec la protéine G_i responsable de l'inhibition de la libération du glutamate n'est pas affecté. Ainsi, lors d'une stimulation prolongée le récepteur $mGluR_{1a}$ passe d'activateur à inhibiteur de la libération du glutamate (Herrero, I et al. 1998). Ces données suggèrent donc que la phosphorylation des RCPG contribue à la modulation de leur activité dans le temps au cours de stimulations prolongées.

1.2.1.2. Le recrutement de l'arrestine

Contrairement à ce qui se passe lors de la désensibilisation hétérologue, durant laquelle la phosphorylation du récepteur par les PKA et PKC provoque le découplage de la protéine G, lors de la désensibilisation homologue la phosphorylation du récepteur par les GRK ne provoque qu'un découplage partiel. Le découplage total de la protéine G est obtenu par le recrutement de l'arrestine qui possède une forte affinité pour les récepteurs phosphorylés par les GRK (Stoffel, RH, 3rd et al. 1997).

L'arrestine a été identifiée pour la première fois dans les cellules en bâtonnet de la rétine (Pfister, C et al. 1985). Par la suite, une protéine proche de l'arrestine visuelle est découverte comme étant impliquée dans la désensibilisation dépendante de GRK2 du récepteur β_2AR (Benovic, JL et al. 1987). En 1990, Lohse et ses collaborateurs clonent la β -arrestine1 et trouve une homologie de séquence de 59% avec l'arrestine visuelle (Lohse, MJ et al. 1990) confirmant l'existence d'une famille de protéines. On compte chez l'homme quatre arrestines, deux arrestines visuelles exprimées uniquement dans la rétine ainsi que dans la glande pinéale et deux arrestines non visuelles, appelées β -arrestine1 et β -arrestine2, qui sont exprimées de façon ubiquitaire dans tout l'organisme et plus particulièrement dans le système nerveux central (Attramadal, H et al. 1992). Résolue aux rayons X pour l'arrestine visuelle de boeuf (Granzin, J et al. 1998; Hirsch, JA et al. 1999) et plus récemment pour la β -arrestine (Han, M et al. 2001; Milano, SK et al. 2002), la structure tridimensionnelle est presque exclusivement composée de feuillet β qui s'organisent en deux domaines

fonctionnels principaux s'articulant autour d'une charnière polaire et complétés par deux petits domaines régulateurs. Les deux domaines fonctionnels nommés domaine N et domaine C sont responsables de l'interaction avec le récepteur (Gurevich, VV et al. 1993; Gurevich, VV et al. 1995). Le domaine N reconnaît les modifications conformationnelles qui se sont opérées chez le récepteur consécutivement à la fixation de son agoniste et interagit notamment avec la troisième boucle intracellulaire (Wu, G et al. 1997). Les acides aminés du domaine carboxyl-terminal du récepteur qui ont été phosphorylés par les GRK sont reconnus par des acides aminés chargés positivement et localisés au sein des domaines N et C de l'arrestine (Kieselbach, T et al. 1994). Cette reconnaissance modifie la conformation de l'arrestine et renforce l'interaction avec le récepteur (Gurevich, VV et al. 1997) découplant ainsi la protéine G par encombrement stérique.

De nombreux animaux génétiquement déficients en GRK ou en arrestines ont été créés et ont montré des déficiences dans diverses voies de signalisation régulées par les RCPG confirmant ainsi l'importance des mécanismes de désensibilisation dans la régulation de l'activité des RCPG.

I.2.2. L'internalisation des récepteurs couplés aux protéines G

L'internalisation, aussi nommée endocytose, est un processus qui se traduit par la translocation des récepteurs couplés aux protéines G depuis la membrane cytoplasmique vers un compartiment membranaire intracellulaire localisé sous celle-ci : l'endosome précoce. Du point de vue fonctionnel, ce processus conduit à une diminution du nombre de récepteurs se trouvant à la surface de la cellule limitant ainsi leur capacité à répondre à leur ligand. L'internalisation des récepteurs est la continuité logique de leur désensibilisation. Cependant, elle peut également se dérouler sans qu'il y ait eu de désensibilisation préalable. Les récepteurs couplés aux protéines G peuvent suivre plusieurs voies d'internalisation incluant l'internalisation dépendante de la clathrine, l'internalisation dépendante de la cavéoline ainsi que des voies d'internalisation ne dépendant ni de la clathrine ni de la cavéoline. Bien que ces voies d'internalisation soient spatialement bien séparées, elles possèdent certains éléments en commun et dans certains cas peuvent se confondre au sein de la cellule ce qui suggère que ces processus sont hautement intégrés. À l'heure actuelle, la voie d'internalisation la plus décrite est l'internalisation dépendante de la clathrine. Elle se caractérise par la relocalisation des RCPG au niveau de zones spécifiques de la membrane cytoplasmique qui forment des puits tapissés de clathrine évoluant en vésicules d'endocytose qui vont ensuite fusionner avec

l'endosome précoce. Ces mécanismes sont régulés par des facteurs cytoplasmiques ainsi que par des éléments présents au niveau du domaine carboxyl-terminal des récepteurs.

I.2.2.1. L'arrestine et la voie des vésicules tapissées de clathrine

La β -arrestine joue un rôle central dans l'internalisation des récepteurs en tant que protéine adaptatrice. En effet, les récepteurs désensibilisés vont être concentrés au niveau de puits tapissés de clathrine grâce à la capacité de la β -arrestine à interagir avec la sous-unité $\beta 2$ -adaptine de la protéine adaptatrice AP-2 (Laporte, SA et al. 2000), la chaîne lourde de la clathrine (Goodmann, OB et al. 1996) et les phosphoinositides PIP₂ et PIP₃ qui composent la couche interne de la membrane cytoplasmique (Gaidarov, I et al. 1999). Ces puits tapissés de clathrine évoluent rapidement en vésicules d'endocytose sous l'action d'une GTPase cytoplasmique, la dynamine qui réalise la scission entre la vésicule d'endocytose et la membrane cytoplasmique (Kaksonen, M et al. 2005; Perrais, D et al. 2005). Ces vésicules sont ensuite transportées jusqu'à l'endosome précoce avec lequel elles fusionnent.

Les RCPG qui suivent la voie d'internalisation dépendant de la clathrine peuvent être classés en deux catégories selon leur *profil* d'interaction avec l'arrestine (Oakley, RH et al. 2000). La catégorie A comprend les RCPG qui présentent une plus grande affinité d'interaction avec la β -arrestine2 qu'avec la β -arrestine1. On distingue notamment le récepteur β_2 AR, le récepteur aux opioïdes μ (MOR), le récepteur ET_A à l'endothéline, le récepteur D₁ à la dopamine et le récepteur à l'adrénaline α_{1B} (α_{1B} AR). La catégorie B comprend les RCPG qui interagissent avec la β -arrestine1 et la β -arrestine2 avec la même affinité. On distingue notamment le récepteur AT_{1A} à l'angiotensine II, le récepteur V₂ à la vasopressine, le récepteur NTS₁ à la neurotensine, le récepteur TRH à la thyroïdolibérine (*thyrotropin releasing hormone*) et le récepteur NK₁ à la substance P. La β -arrestine participe à la désensibilisation des récepteurs des deux catégories. Cependant, elle n'internalise pas avec les RCPG de la catégorie A dont elle se dissocie rapidement dès le début de leur endocytose alors qu'elle forme un complexe stable avec les RCPG de la catégorie B et colocalise avec eux au niveau de l'endosome (Zhang, J et al. 1999). Nous verrons par la suite que la théorie majoritairement acceptée actuellement propose que ce profil différentiel d'interaction entre la β -arrestine et les RCPG des classes A et B est à l'origine de l'orientation des récepteurs internalisés vers la voie de recyclage ou la voie de dégradation.

Il a également été observé que l'état de phosphorylation du récepteur β_2 AR

conditionne son profil d'interaction avec la β -arrestine (Shenoy, SK et al. 2006). En effet, l'expression de la GRK2, qui est la GRK prototypique du récepteur β_2 AR, conduit à une dissociation rapide de la β -arrestine au cours de l'internalisation ce qui est caractéristique d'un récepteur de la catégorie A. Par contre, l'expression de la GRK5 ou de la GRK6 conduit à la formation d'un complexe stable entre la β -arrestine et le récepteur β_2 AR ce qui est observé habituellement avec les récepteurs de la catégorie B.

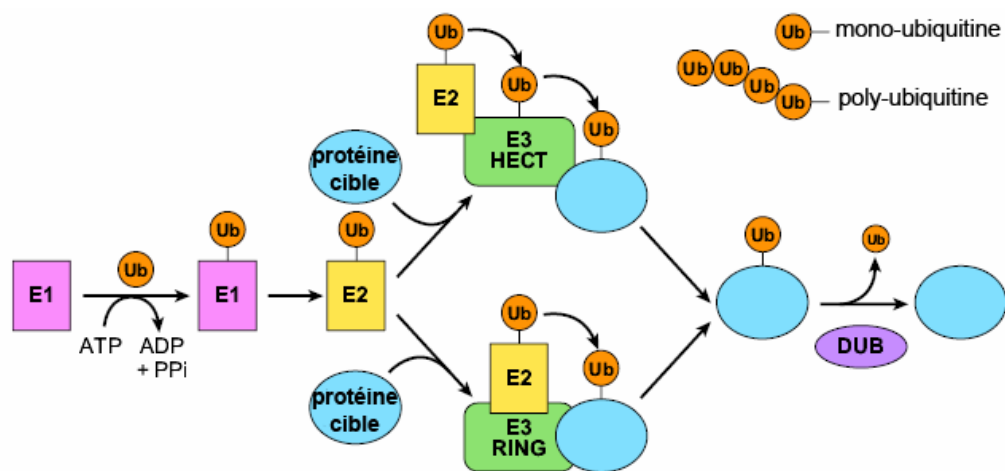


Figure I.5. L'ubiquitinylation des protéines.

L'ubiquitinylation est un processus dynamique qui est réalisé par un complexe multienzymatique composé d'une enzyme d'activation (E1), d'une enzyme de conjugaison (E2) et d'une enzyme de ligation (E3). L'activation de l'ubiquitine nécessite de l'ATP et conduit à sa fixation sur la cystéine du site actif de E1 via son extrémité carboxyl-terminale. L'ubiquitine est ensuite transférée sur la cystéine du site actif de E2. Finalement l'ubiquitine est transférée sur un groupement lysine de la protéine cible grâce à E3. Il existe deux classes d'enzyme de ligation qui contiennent soit un domaine HECT (*homologous to E6-AP carboxyl terminus*) soit un domaine RING (*really interesting new gene !!!*) en « doigt » et qui diffèrent par le mode de transfert de l'ubiquitine sur la protéine cible (les E3 de type RING ne possèdent pas de site catalytique). L'ubiquitinylation est un processus réversible et la protéine peut être déubiquitinylée sous l'action d'une déubiquitinyrase (DUB).

Au-delà de son rôle d'échafaudage du complexe d'endocytose, la β -arrestine interagit également avec des protéines participant à la régulation du processus d'internalisation. La β -arrestine promeut l'internalisation des récepteurs en recrutant la tyrosyl-kinase cytosolique c-Src (Luttrell, LM et al. 1999) qui active la dynamine en phosphorylant ses résidus tyrosines. Ainsi, il a été montré que la surexpression d'une c-Src mutante inapte à interagir avec la β -arrestine de même qu'une dynamine ne pouvant être phosphorylée conduit à l'inhibition de l'internalisation dépendant de la clathrine (Ahn, S et al. 1999; Ahn, S et al. 2002).

I.2.2.2. L'ubiquitinylation

L'ubiquitinylation dont la fonction première est de diriger les protéines cibles vers le protéasome 26S joue également un rôle dans la stabilisation du complexe formé par la β -arrestine et le récepteur. L'ubiquitinylation est une réaction qui conduit à l'adjonction d'une ou plusieurs molécules d'ubiquitines (Ub) sur les résidus lysines de la protéine cible. Elle est catalysée par un complexe enzymatique composé de trois enzymes dont l'une possède l'activité ubiquitine ligase (Figure I.5). L'une de ces ubiquitine ligases, la Mdm2 (*mouse doubleminute-2*) de type RING, interagit avec la β -arrestine conduisant à la fois à l'ubiquitinylation de la β -arrestine et du récepteur β_2 AR auquel elle est associée. L'ubiquitinylation de la β -arrestine est spécifiquement catalysée par Mdm2 et est indispensable à l'internalisation du récepteur. En effet, les cellules ayant un déficit en protéine Mdm2 présentent un défaut d'ubiquitinylation de la β -arrestine et une réduction de l'internalisation du récepteur β_2 AR (Shenoy, SK et al. 2001). Ceci montre qu'en modulant l'activité de la β -arrestine, l'ubiquitinylation module également l'internalisation des RCPG.

Par ailleurs, un travail récent a montré pour la première fois un lien direct entre l'ubiquitinylation d'un RCPG et son internalisation (Wolfe, BL et al. 2007). Il apparaît que le récepteur PAR_1 est ubiquitinylé dans des conditions basales et déubiquitinylé lorsque le récepteur est activé. L'internalisation constitutive d'un mutant de PAR_1 déficient en lysine, qui ne peut donc pas être ubiquitinylé, est augmentée alors que la fusion d'une ubiquitine à son extrémité carboxyl-terminale inhibe l'internalisation. Ceci suggère que l'ubiquitinylation régule négativement l'internalisation du récepteur PAR_1 . De plus, il apparaît que l'ubiquitinylation a lieu au niveau des Lys⁴²¹ et Lys⁴²² localisée au sein du site de fixation de la protéine AP-2 qui est impliquée dans la formation des puits à clathrine ce qui suggère que l'ubiquitinylation préviendrait en réalité le recrutement de l'AP-2.

Tableau I.1. Alignement des séquences des RCPG possédant un motif Tyrosine

Famille	Nomen. IUPHAR	n° accès Swiss-Prot	motif Tyrosine Y-X-X-Ø
5-HT	5-HT ₇	P34969	NPFIYAFNRLRTTYRSLLQCQYRNINRKL SAA-(42)-SPDHHNWLADKMLTTVEKKVMIHD.
Acetylcholine	M ₂	P08172	NPACYALCNATFKKTFKHLLMCHYKNIGATR.
Acetylcholine	M ₄	P08173	NPACYALCNATFKKTFRHLLLCQYRNIGTAR.
Adenosine	A ₃	P33765	NPVYAYKIKFKETIYLLILKACVWCHPSPDSLDTSEIKNSE.
Adrenoreceptors	α _{1B}	P35368	NPIYPCSSKEKRAFVRILGQCQCRGRRRRRRRLGGCAYTYRPWTRGGSLETSQ-(119).
Adrenoreceptors	α _{1D}	P25100	NPIYPCSSREFKRAFLRLRCQCRGRRRRRRPLWR-(118)-AEGATCQAYELADYSNLRRETDI.
Bradykinin	B ₂	P30411	NPLVYVIVGKFRKKSWEVYQGVQCQGGCRSEPIQMENSMTGLRTSISVERQIHKLQDWAGSRQ.
Chemokine	CXCR3	P49682	NPLLAFVGVKFRERMWMLLRGCPNQRGLQRPSSRRDSSWSETSEASYSGL.
Chemokine	CXCR6	O00574	NPVLYAFVSLKFRKNFWKLVDIGCLPYLGVS HQWKSSDNSTFSASHNVEATSMFQL.
Chemokine	CCR3	P51677	NPVYAVGERFERYLRHFFRHLLMHLGRYIPFLPSEKLETSVSPSTAEPELSIVF.
Chemokine	CCR4	P51679	NPIYFELGEKFRKYLQLFKTCRGLFVLCQYCGLLQIYSADTPSSSYTQSTMDHDLHDAL.
Chemokine	CCR5	P51681	NPIYAFVGEKFRNLLVFFQKHIARFKCCSIFQQAEPERASSVYTRSTGEQEISVGL.
Chemokine	CCR11	Q9NPB9	NPILYVFMGASFKNYVMKVAKYGSWRRQRQSVVEFFDSEGTEPTSTFSI.
Cholecystokinin	CCK2	P32239	NPIYCFMKNKFRFLGFMATFPCCPNPGPGARGEVEEGEGTTGASLSRFSYSHMSASVPPQ.
Dopamine	D ₅	P21918	NPVYAFNADFQKVFAQLLGC SHFCSTRP-(12)-YNQDIVFHKEIAAA YIHMPNAVTP(57).
Endothelin	ET _B	P24530	NPIALYLVSKRFKNCFKSCLCWCQSFEEKQSLEEKQSCCLKFKANDHGYDNFRSSNKYSSS.
Galanin	GAL ₁	P47211	NPIYAFLSNFRKAYKQVFKCHIRKDSHLSDTKENKSRIDTPPSTNCTHV.
GnRH	GnRH	P30968	DPLIYG YFSL.
GLYC-H	FSHR	P23945	NPFLYAIFTKNFRDRDFILLSKGCGYEMQAQIYRTETSTT-(16)-VTSGSTYILVPLSHLAQN.
Histamine	H ₂	P25021	NPILYAALNRDFTGYQLFCORLANRNSHKTSL-(18)-EEKPLKLQVWVGTEVTAPQGATDR.
Lysophospholipid	LPA ₃	Q9UBY5	NPIYSYKDEDMYGTMKMICCFSQENPERRPSRIPSTVLSRSDTGSQ-(8)-GAVCNKSTS.
Melatonin	MT ₁	P48039	NAIYGLLNQNFREYRRIVSLCTARVFFVDSSNDVADRVKWKPSPLMTNNVVKVDSV.
Melatonin	MT ₂	P49286	NAIYGLLNQNFREYKRILLALWNPRIHQDADASKGSHAEGLQSPAPIIGVQHQAADAL.
Neuropeptide Y	Y ₁	P25929	NPIYGFNLKNFQRLQFFNFCDFRSRDDDDYETIAMSTMHTDVS KTS-(11)-INNDDNEKI.
Neuromedin U	NMU2	Q7LC54	NPIYNLLSRFFQAQFNVISSFHKQVHSHQHPQL-(35)-LPTALSSQMSRTNYQSFHNKT.
PAR	PAR1	P25116	DPLIYASSETCQRYVYSILCKKESDPSSYNSGGQLMASKMDTCCSNLNNYSYKKLLT.
SPC/LPC	GPR65	Q8IYL9	DPILYCFVETGRYDMWNILKFC TGRCNTSQQRKRLSVSTKDTMELEVL.
Tachykinin	NK ₁	P25103	NPIYCCNLDRFRLGFKHAFRCPCFISAGDYEGLEMK-(49)-SRSDSKTMTESFSFSSNVL.
Tachykinin	NK ₂	P21452	NPIYCCNLH-(60)-CHTKETLFMAGDTAPSEATSGEAGRPQDGSLWFGYGLLAPTKTHVEI.
Tachykinin	NK ₃	P29371	NPIYCCNLKRFRAFGKRAFRWCPIFKVSS YDELELKT-(56)-SASATSSFISSPYTSVDEYS.
TRH	TRH	P34981	NPVIYNLMSQKFRAAFRKLCNCKQKPTKPNYSVALNYSVIKESDHFSTE-(17)-EVFSFSQS.
Trace amine	TA ₁	Q96RI9	NPMVYAFFYPWFRKALKMMLFGKIFQKDSRRCKLFLELSS.

I.2.2.3. Les motifs d'internalisation

Nous venons de voir que l'arrestine joue le rôle de protéine adaptatrice en interagissant d'une part avec les récepteurs et d'autre part avec l'AP-2 et dirige ainsi ces récepteurs vers les puits tapissés de clathrine où ils seront internalisés. Néanmoins, dans certains cas, les RCPG peuvent interagir directement avec l'AP-2 sans nécessiter le concours de l'arrestine. Ce sont des motifs localisés au niveau du domaine carboxyl-terminal des RCPG qui assurent l'interaction avec la protéine AP-2 (Ohno, H et al. 1995). Parmi ces motifs, on distingue plus particulièrement les motifs à tyrosine et les motifs di-leucines que l'on retrouve présents chez certains RCPG.

Le motif à tyrosine est caractérisé par la séquence consensus YXX ϕ , avec ϕ un acide aminé à chaîne latérale hydrophobe et X un acides aminé quelconque. Ce motif est notamment reconnu par la sous-unité $\mu 2$ de la protéine AP-2. Deux motifs à tyrosine, l'un proximal et l'autre distal, ont été identifiés au sein du domaine carboxyl-terminal du récepteur PAR₁ (*protease activated receptor 1*) activé par la thrombine. PAR₁ est activé de manière irréversible par la thrombine qui coupe spécifiquement son extrémité extracellulaire, dévoilant une nouvelle extrémité amino-terminale qui joue le rôle de ligand. La mutation du motif proximal bloque l'internalisation de PAR₁ suite à son activation par la thrombine mais ne bloque pas l'internalisation constitutive (Paing, MM et al. 2004). L'internalisation constitutive a lieu en l'absence d'activation par la thrombine et ne nécessite ni phosphorylation, ni recrutement de la β -arrestine. Elle a pour fonction d'alimenter un stock intracellulaire de récepteurs qui permet une resensibilisation rapide. En effet, protégés de l'action de la thrombine, ces récepteurs de réserve sont fonctionnels et peuvent retourner à la membrane pour y être actifs assurant ainsi une resensibilisation indépendante de la synthèse de nouveaux récepteurs. Par contre, la mutation du motif distal conduit au blocage de l'internalisation constitutive. Il a été montré que le motif distal interagit directement avec l'AP-2 et que sa mutation inhibe cette interaction, empêchant ainsi l'internalisation constitutive de PAR₁ (Paing, MM et al. 2006). Par ailleurs, un motif similaire (YXXX ϕ) a été identifié dans la partie proximale du domaine carboxyl-terminal du récepteur TXA₂ β au thromboxane A₂ qui internalise lui aussi de manière constitutive. L'isoforme α (TXA₂ α) ne présente pas ce motif et n'internalise pas de manière constitutive mais la greffe du motif provenant de TXA₂ β le fait internaliser constitutivement (Parent, JL et al. 2001).

Tableau I.2. Alignement des séquences des RCPG possédant un motif di-Leucine

Nomen.		n° accés	motif di-Leucine	
Famille	IUPHAR	Swiss-Prot	[D/E]-X-X-X-L-[L/I]	[D/E]-X-X-L-[L/I]
Acetylcholine	M ₁	P11229	NPMCYALCNKAFR D TFR L L	LCRWDKRRWRKIPKRPGSVHRTPSRQC.
Adenosine	A ₃	P33765	NPVYAYKIKKFK E TY L L	KACVCHPDSLDTSIEKNSE.
Adrenoreceptors	α _{1A}	P35348	NPIIYPCSSQEFKKAQFNVLRI-(122)-VPPGRRRHAQQLIFVETGFHHVG Q D L D L LTS.	
Angiotensin	AT ₁	Q13725	NPLFYGLGKKFK D IL L L	KYIPPKAKSHNSLTKMSTLSYRPSDNVSSSTKKPAPCFEVE.
Chemokine	CCR10	P46092	NPVLYAFGLRFRQ D LR L L	RGSSPSGPQPRRGCPRRRLSSCSAPTETHLSWDN.
Chemokine	CXCR5	P32302	NPMLYTFAGVKFRS D LSR L L	TKLGCTGPASLCQLFPSWRRSSLSSEENATSLTTF.
Chemokine	CX ₃ CR1	P49238	NPLIYAFAGEKFRRLYLHLYG-(10)-VHVDFFSSSESQSRHGSVLSNFTYHTS D G D A L L L L.	
Chemokine	CX ₃ CR1	P49238	NPLIYAFAGEKFRRLYLHLYG-(10)-VHVDFFSSSESQSRHGSVLSNFTYHTS D G D A L L L L.	
FFA	FFAR3	O14843	DPEVYFSSSGFOA D FHE L L	RRLCGLWGQWQQESSMELKEQKGG-(18)-GCGTGGQVACAES.
FFA	GPR42	O15529	DPEVYFSSSGFOA D FHE L L	RRLCGLWGQWQQESSMELKEQKGG-(18)-GCGTGGQVACAES.
Galanin	GAL ₂	O43603	NPVYALVSKHFRKGFRITCAGLL-(30)-GSVLER S S D L	HMSEAAGAL-(30)-TVDVA.
GLYC-H	FSHR	P23945	NPFLYAITKNFR D FF L L	SKCGCYEMQAQYRTETSS-(16)-VTSGSTYILVPLSHLAQN.
PRP	PRP	P49683	NPFIYAWLHDSFRE L R L L	VAPRKIAHPGQNMVSVI.
SPC/LPC	GPR68	Q15743	DPVLYCFVSETTHRDAR-(26)-EASGKSGAQ Q EE P E L L	TKLHPAFQTPNSPGSGGFPTGRLA.
Vasopressin	V ₂	P30518	NPWIYASFSSSVSS E LS R L	CCARGTPPSLGPQDESCTTASSSLAKDTSS.
5-HT	5-HT _{2B}	P41595	NPLVYTLFNKTFRDAFGRYITCNRA-(48)-SSTIQSSSI L L	D T L L L TENEGDKTEEQVSYV.
Adenosine	A _{2A}	P29274	NPFIYAIRIREFRQITRKI-(71)-SQNGTGLP D VE L L	SHELKGVCPPEPPGLDDPLAQDGAGVS.
Adenosine	A ₃	P33765	NPVYAYKIKKFK E TY L L	ILKACVVCHPDSLDTSIEKNSEILKACVVCHPDSLDTSIEKNSE.
Adrenoreceptors	α _{1A}	P35348	NPIIYPCSSQEFKKAQFNVLRI-(122)-VPPGRRRHAQQLIFVETGFHHVG Q D D L L LTS.	
Adrenoreceptors	α _{1D}	P25100	NPLIYPCSSREFKRAFRL-(73)-PPSAF R W R L	GPFRRP-(50)-QAYELADYSNLRETDI.
Adrenoreceptors	β ₂	P07550	NPLIYGRS-(34)-SGYHVEQEK E N K L L	CEDLPGTEDFVGHQGTVPSDNIDSQGRNCSTNDSLL.
Chemokine	CX ₃ CR1	P49238	NPLIYAFAGEKFRRLYLHLYGKCLAVLCGRSVHVDFFSSSE-(8)-VLSSNFTYHTSDG D A L L L L.	
Prostanoid	EP ₄	P35408	DPWYI-(103)-ETSDSSQGDSE S V L L	VEAGSGRAGPAPKGSQVTFPSETNLSEKCI.
Prostanoid	TPβ	O75228	DPWYILFRRAVLRLRLQRLSTRPRR-(26)-PCMLFDP E F D L	L L AGVQLLPFEPPTGKALSRKD.
RFP	RXFP1	Q9HBX9	NPLIYTLTRPFKEMIHFWYNYRQ-(23)-LQEMPELMKPDLTYP C EMS L I	SQSTRLSNYS.
RFP	RXFP3	Q9NSD7	NPVLYCLVRREFRKALKSL-(27)-LQAPAPHA A EP D L	L L YPPGWVYSGGRYDILLPSSAY.
Somatostatin	sst ₃	P32745	NPVLYGLSYRFKQGFRRRLRPSRRV-(52)-PPSRVASK E Q L L	PQEASTGEKSTMRISYL.
SPC/LPC	GPR68	Q15743	DPVLYCFVSETTHRDAR-(26)-EASGKSGAQ Q EE P E L L	TKLHPAFQTPNSPGSGGFPTGRLA.

On notera que parmi les RCPG internalisés par la voie impliquant l'arrestine bons nombres possèdent un motif tyrosine (YXX ϕ) au sein de leur domaine intracellulaire (Tableau I.1). Bien que ces motifs n'aient pas encore été étudiés, ils pourraient jouer un rôle important dans l'internalisation de ces récepteurs et plus particulièrement dans leur internalisation constitutive.

Le motif di-leucine est présent chez plusieurs récepteurs (Tableau I.2) tel que les récepteurs CXCR₂ et CXCR₄ aux chemokines et le récepteur β_2 AR. La mutation du motif di-leucine (LLKIL muté en AAKIL ou LLKAA) du récepteur CXCR₂ conduit à une diminution de son interaction avec l'AP-2, une inhibition de son internalisation ainsi qu'une diminution de la réponse chimotactique à l'interleukine IL-8 (Fan, GH et al. 2001). Pour les récepteurs CXCR₄ et β_2 AR, la mutation du motif di-leucine entraîne une diminution importante de leur internalisation suite à la fixation de leurs ligands respectifs (Gabilondo, AM et al. 1997; Orsini, MJ et al. 1999). Le motif di-leucine joue un rôle important dans l'internalisation de ces récepteurs mais l'arrestine reste cependant nécessaire pour que cette internalisation soit efficace comme cela a été montré avec des fibroblastes embryonnaires (Kohout, TA et al. 2001) ainsi que des cellules neutrophiles (Su, Y et al. 2005) dérivés de souris transgéniques déficientes en β -arrestine2. En système hétérologue, l'inhibition de l'expression de la β -arrestine2 par ARN interférentiel conduit à une diminution de l'internalisation de CXCR₄ (Ahn, S et al. 2003) alors que la surexpression de la β -arrestine2 et de la GRK2 provoque l'augmentation de son internalisation (Orsini, MJ et al. 1999; Cheng, ZJ et al. 2000). La mutation des motifs di-leucine de CXCR₂ et β_2 AR inhibe leur internalisation mais n'affecte pas leur signalisation via la voie calcique ou la voie du cAMP alors qu'une déficience en arrestine inhibe l'internalisation de ces récepteurs mais augmente également leur signalisation (Kohout, TA et al. 2001; Su, Y et al. 2005). Ceci suggère que bien que le motif di-leucine soit impliqué dans l'internalisation de ces récepteurs, il ne participe pas à leur désensibilisation à l'inverse de l'arrestine qui participe à l'internalisation et la désensibilisation. À l'heure actuelle, la manière dont ces deux modes d'internalisation sont intégrés et inter-régulés reste inconnue. On peut néanmoins supposer que l'état de phosphorylation du domaine carboxyl-terminal du récepteur ou son repliement conformationnel puisse participer à la discrimination de ces deux mécanismes.

I.2.2.4. L'internalisation tonique

L'internalisation tonique est le mécanisme par lequel un récepteur va être internalisée indépendamment de son activation par la fixation de son ligand. Ainsi de nombreux RCPG subissent à la fois une internalisation déclenchée par la fixation de leur ligand et une internalisation tonique. Ces deux modes d'internalisation impliquent des mécanismes bien distincts. Ainsi le récepteur $TXA_2\beta$ activé par son ligand est internalisé grâce au concours des GRK et de l'arrestine (Parent, JL et al. 1999). En revanche, son internalisation tonique, bien qu'elle empreinte également la voie des vésicules tapissées de clathrine, est déclenchée par la présence d'un motif d'internalisation de type tyrosine (YXX ϕ) (Parent, JL et al. 2001) dont nous avons parlé dans le chapitre précédent. L'internalisation déclenchée par la fixation du ligand joue un rôle déterminant dans la régulation de l'activité de la plupart des RCPG. Le rôle physiologique de l'internalisation tonique reste quant à lui assez mal compris. Néanmoins certaines études offrent des éléments de réponse. Ainsi, l'internalisation du récepteur PAR_1 activé par la thrombine conduit à sa dégradation au niveau du lysosome alors que son internalisation tonique conduit à son recyclage vers la membrane (Shapiro, MJ et al. 1998) permettant, comme nous l'avons mentionné précédemment, une resensibilisation rapide du récepteur indépendamment de toute nouvelle synthèse (Paing, MM et al. 2006). Par ailleurs, certains récepteurs neuronaux comme le récepteur CB_1 aux cannabinoïdes présentent une internalisation tonique. Des cultures de neurones d'hippocampe ont permis de montrer que les récepteurs CB_1 étaient internalisés de façon tonique au niveau du soma et des dendrites mais pas au niveau de l'axone, ce qui contribuerait à la distribution majoritairement axonale de ces récepteurs (Leterrier, C et al. 2006).

I.2.2.5. Nouveaux mécanismes d'internalisation

L'arrestine joue un rôle central dans l'internalisation des RCPG qu'elle module en recrutant de nombreuses protéines impliquées dans la formation des vésicules d'endocytose et leur transport intracellulaire. Ainsi, l'arrestine interagit avec les protéines ARF (*ADP-ribosylation factor*) et leurs protéines régulatrices GEF (*guanine nucleotide exchange factor*) et GAP (*GTPase-activating protein*) ainsi qu'avec la MAP-kinase p38 et la phosphoinositide 3-kinase (PI3K). Les protéines ARF sont au nombre de six (ARF1 à 6) et font parties de la famille des petites protéines G monomériques, elles lient le GTP et le GDP et possèdent une activité GTPasique intrinsèque. ARF1, 2 et 3 sont plus particulièrement engagées dans la

formation des vésicules en recrutant les différents partenaires protéiques impliqués. ARF6 quant à elle est impliquée dans de nombreux processus tels que le mouvement, l'adhésion et la migration cellulaire, la dynamique du cytosquelette, la régulation de phospholipases et de kinases et plus particulièrement le trafic des vésicules d'endocytose (Donaldson, JG 2003; D'Souza-Schorey, C et al. 2006). L'activité des ARF est modulée par les GEF et par les GAP. Les GEF activent les ARF en favorisant l'échange du GDP par du GTP alors que les GAP inhibent les ARF en stabilisant leur état inactif lié au GDP.

Des études récentes ont montré que ARF6, les GAP et une des GEF de ARF6, ARNO (*ARF nucleotide binding site opener*), modulaient la désensibilisation, l'internalisation et le trafic intracellulaire des RCPG. ARF6 et ARNO ont notamment été impliquées dans la désensibilisation du récepteur à l'hormone lutéinisante et à la gonadotrophine chorionique (LHR). L'activation de ARF6 et ARNO conduit au recrutement de la β -arrestin1 qui interagit alors avec le récepteur LHR (Mukherjee, S et al. 1999; Mukherjee, S et al. 2000; Mukherjee, S et al. 2002) et provoque sa désensibilisation. Par ailleurs, il a été montré en système hétérologue que l'internalisation du récepteur β_2 AR est d'une part inhibée par deux GAP, GIT1 et GIT2 (*GRK interactor 1 & 2*) qui interagissent avec le récepteur par l'intermédiaire de la GRK2 (Premont, RT et al. 1998; Claing, A et al. 2000; Premont, RT et al. 2000; Claing, A et al. 2001), et d'autre part activée par ARNO (Claing, A et al. 2001). Ces travaux suggèrent que ces mécanismes s'appliquent aux récepteurs qui suivent la voie d'internalisation dépendante de la clathrine tels que β_1 AR, MOR, M_1 et le récepteur A_{2A} à l'adénosine mais pas aux récepteurs suivant une autre voie d'internalisation tels que M_2 et ET_B (Claing, A et al. 2000). À contrario, des études ont montré que ARF6, dont l'expression a été inhibée par ARN interférentiel, est impliqué dans l'internalisation dépendante de la clathrine (β_2 AR et V_2) ainsi que dans l'internalisation indépendante de la clathrine (M_2 et ET_B) (Houndolo, T et al. 2005) ce qui est en accord avec ce qui avait été observé avec un mutant constitutivement actif de ARF6 (Claing, A et al. 2000; Delaney, KA et al. 2002).

D'autres modes de régulation de l'endocytose ont également été identifiés impliquant notamment la MAPK p38 et la PI3K. La protéine p38 a été impliquée dans l'internalisation du récepteur MOR. Cette internalisation est inhibée dans les fibroblastes dérivés de cellules embryonnaires de souris transgéniques déficientes en p38 (MEF p38^{-/-}) et est restaurée lorsque l'on exprime de manière exogène p38 dans ces cellules (Mace, G et al. 2005). De plus, *in vitro*, p38 phosphoryle l'antigène 1 associé à l'endosome primaire (EEA1, *early-endosomal autoantigen 1*), un facteur cytosolique régulé par la protéine G monomérique Rab5 qui est

responsable de la fusion des vésicules avec l'endosome. L'expression d'un mutant de EEA1 mimant cet état de phosphorylation permet de restaurer l'internalisation de MOR dans les cellules MEF p38^{-/-}. La PI3K est recrutée à la membrane par la GRK2 où elle est impliquée dans la régulation de l'internalisation des RCPG (Naga Prasad, SV et al. 2001). Il a été proposé que le complexe GRK2/PI3K favorise le recrutement de l'AP-2 favorisant ainsi l'internalisation du récepteur β_2 AR (Naga Prasad, SV et al. 2005). De plus, il a été observé qu'une mutation de la PI3K provoquant la perte de son activité kinase conduisait à la diminution de la phosphorylation de la tropomyosine et au blocage de l'internalisation du récepteur β_2 AR (Naga Prasad, SV et al. 2005).

Rab5 est un autre acteur majeur de l'internalisation des RCPG. Au même titre que EEA1, cette protéine G monomérique est un marqueur de l'endosome précoce et est impliqué dans le transport et la fusion des vésicules. L'expression d'un mutant dominant négatif de Rab5 bloque l'internalisation de nombreux RCPG incluant les récepteurs β_2 AR, D₂, NK₁, et CXCR₂ (Iwata, K et al. 1999; Seachrist, JL et al. 2000; Schmidlin, F et al. 2001; Fan, GH et al. 2003). De plus, Rab5 interagit directement avec le récepteur AT_{1A} (Seachrist, JL et al. 2002) qui internalise à la fois de manière dépendante et indépendante de la β -arrestine. Cependant, selon une autre étude Rab5 ne serait pas impliqué dans l'internalisation du récepteur AT_{1A} (Zhang, J et al. 1996).

I.2.3. Quel est le devenir des récepteurs couplés aux protéines G qui ont été internalisés ?

Après leur internalisation, les récepteurs couplés aux protéines G vont être soit recyclés vers la membrane cytoplasmique, soit dirigés vers le compartiment lysosomal pour y être dégradés. La ségrégation des récepteurs internalisés et leur orientation vers l'une de ces deux voies se fait au sein de l'endosome de tri (Sachse, M et al. 2002).

La resensibilisation : elle permet aux RCPG qui ont été internalisés de réintégrer la membrane cytoplasmique, restaurant ainsi le nombre de sites de liaison et la sensibilité de la cellule aux agonistes. Au cours de ce processus, l'action des pompes à proton localisées dans la membrane de l'endosome va contribuer à l'acidification de son pH, provoquant d'une part

le découplage du ligand de son site de liaison et d'autre part un changement conformationnel du récepteur autorisant la déphosphorylation de son domaine carboxyl-terminal par les phosphatases cytoplasmiques (Krueger, KM et al. 1997). Ainsi, les RCPG qui réintègrent la membrane cytoplasmique sont à nouveau fonctionnels. On distingue deux processus de resensibilisation, une resensibilisation dite rapide et une resensibilisation dite lente. La resensibilisation rapide mène directement certains récepteurs, tel que β_2 AR, depuis l'endosome de tri, où ils sont déphosphorylés, vers la membrane cytoplasmique (Seachrist, JL et al. 2000). Les récepteurs qui suivent la resensibilisation lente vont par contre transiter par l'endosome de recyclage avant de réintégrer la membrane cytoplasmique (Trischler, M et al. 1999). Ces deux processus font intervenir les protéines G monomériques Rab et plus particulièrement Rab4 qui participe à la resensibilisation rapide et Rab11 qui participe à la resensibilisation lente (Sonnichsen, B et al. 2000).

La dégradation protéolytique : elle prend place lorsque les RCPG sont stimulés de façon prolongée ou chronique par leurs agonistes. Ce phénomène, qui est appelé régulation négative, a pour conséquence directe la diminution prolongée du nombre de récepteurs à la surface de la cellule ce qui se traduit par une réduction sur le long terme de la sensibilité de la cellule aux agonistes. La protéolyse des RCPG se déroule dans le lysosome. Le trafic des vésicules membranaires contenant les RCPG depuis l'endosome de tri vers l'endosome tardif puis vers le lysosome dépend de la protéine G monomérique Rab7. En effet, la surexpression d'un mutant dominant négatif de Rab7 prévient l'adressage vers le lysosome et la dégradation protéolytique des récepteurs κ au opioïdes (KOR) et CXCR₂ (Li, JG et al. 2000; Fan, GH et al. 2003).

Les premières études portant sur le trafic intracellulaire des protéines transmembranaires et plus particulier du récepteur à la transferrine ont suggéré que le recyclage se faisait par défaut et que les récepteurs qui retournaient à la membrane le faisaient en suivant le flux du recyclage des membranes (Mayor, S et al. 1993; Gruenberg, J 2001). Plus récemment cependant, des études utilisant des récepteurs chimériques ont montré que le domaine carboxyl-terminal des RCPG joue un rôle particulièrement important dans la régulation de ces mécanismes. Ainsi, les récepteurs chimériques β_2 AR/V₂ (Oakley, RH et al. 1999) et NK₁/PAR₁ (Trejo, J et al. 1999) ont été réalisés en échangeant les domaines carboxyl-terminaux d'un récepteur qui suit la voie de recyclage et d'un autre qui suit la voie de dégradation. En suivant leur trafic intracellulaire il a été montré que c'est le domaine carboxyl-terminal qui détermine le sort du récepteur chimérique. Il est ainsi possible de faire

recycler un récepteur qui est naturellement dégradé en intervertissant son domaine carboxyl-terminal avec celui d'un récepteur qui est naturellement recyclé et inversement. À partir de ce type d'études, il a été proposé que des motifs spécifiques présents au sein du domaine carboxyl-terminal des RCPG seraient reconnus par des protéines cytoplasmiques régulant l'orientation des récepteurs vers la voie de recyclage à la membrane ou la voie de dégradation lysosomale.

1.2.3.1. L'arrestine dans le trafic intracellulaire des récepteurs couplés aux protéines G

L'orientation des RCPG vers la voie de recyclage ou vers celle de la dégradation lysosomale est déterminée par leur profil d'interaction avec la β -arrestine. Nous avons vu que la β -arrestine régule l'internalisation des récepteurs de la classe A et de la classe B mais qu'elle se dissocie rapidement de ceux de la classe A alors qu'elle reste associée à ceux de la classe B et se colocalise avec eux au niveau de l'endosome. La dissociation rapide de la β -arrestine permet aux récepteurs de la classe A tel que β_2 AR de recycler vers la membrane cytoplasmique (Anborgh, PH et al. 2000). En effet, le recyclage des récepteurs nécessite la déphosphorylation de leur domaine carboxyl-terminal par des phosphatases cytoplasmiques. Mais lorsque la β -arrestine est associée au domaine carboxyl-terminal du récepteur, les phosphatases n'ont pas accès aux résidus phosphorylés. Ainsi, en se dissociant la β -arrestine dévoile ses résidus qui peuvent être déphosphorylés et le récepteur peut être recyclé. Les récepteurs de la classe B tel que AT_{1A} ou V_2 ne sont pas recyclés vers la membrane en raison de leur association stable avec la β -arrestine qui provoque leur séquestration dans l'endosome (Oakley, RH et al. 1999; Anborgh, PH et al. 2000; Innamorati, G et al. 2001). En remplaçant les domaines carboxyl-terminaux de AT_{1A} et V_2 par celui de β_2 AR, la β -arrestine va se dissocier rapidement de ces deux récepteurs au début de leur endocytose entraînant leur recyclage vers la membrane (Oakley, RH et al. 1999; Anborgh, PH et al. 2000). Cependant, la dissociation de la β -arrestine ne suffit pas à promouvoir la déphosphorylation du récepteur AT_{1A} ce qui suggère que d'autres déterminants régulent ce processus (Anborgh, PH et al. 2000).

L'association stable de la β -arrestine avec les récepteurs AT_{1A} , V_2 , NTS_1 , NK_1 et les récepteurs OTR à l'ocytocine semble s'expliquer par la présence au sein de leur domaine carboxyl-terminal de motifs formés par la répétition de sérines et/ou de thréonines qui sont

phosphorylées par les GRK (Oakley, RH et al. 2001). Pour le récepteur V_2 , ces motifs fonctionnent tels des séquences de rétention du récepteur au sein de l'endosome de recyclage, l'association stable avec la β -arrestine protégeant ces motifs des phosphatases (Oakley, RH et al. 1999). D'autres éléments suggèrent cependant que ce phénomène de séquestration du récepteur V_2 dans l'endosome de recyclage est indépendant de l'interaction avec la β -arrestine et que seuls les motifs sérine/thréonine sont impliqués dans ce phénomène (Innamorati, G et al. 2001). Les récepteurs NTS_1 et NK_1 possèdent également ces motifs sérine/thréonine et ont été décrits comme ne recyclant pas pour NTS_1 (Botto JM, 1998, p585) ou très faiblement pour NK_1 (Grady, EF et al. 1995; McConalogue, K et al. 1999). De plus, le récepteur NTS_2 à la neurotensine est un récepteur qui recycle vers la membrane cytoplasmique (Botto, JM et al. 1998). NTS_2 ne possède pas les motifs sérine/thréonine présents chez NTS_1 ce qui confirme leur rôle dans la séquestration des récepteurs dans l'endosome. Cependant, des cas particuliers existent. Une étude a identifié au sein du domaine carboxyl-terminal du récepteur SST_{2A} à la somatostatine la présence de résidus phosphorylés comparables aux motifs sérine/thréonine décrits précédemment. Ces résidus sont responsables de la formation d'un complexe stable entre la β -arrestine et le récepteur SST_{2A} qui colocalisent au niveau de l'endosome après 30 minutes de stimulation mais de manière surprenante, le récepteur SST_{2A} recycle rapidement lorsque la stimulation cesse (Tulipano, G et al. 2004).

Nous avons vu précédemment au chapitre I.2.2.1 page 17 que l'ubiquitinylation jouait un rôle important dans l'internalisation des RCPG en stabilisant le complexe formé par la β -arrestine et le récepteur. Il a notamment été montré que l'ubiquitinylation de la β -arrestine était nécessaire à l'internalisation du récepteur β_2AR . L'ubiquitinylation de la β -arrestine, en contrôlant la stabilité du complexe formé avec le récepteur, participe également à la régulation du trafic intracellulaire des RCPG. Récemment, il a été montré que lorsque la β -arrestine s'associe aux récepteurs de classe B AT_{1A} et V_2 elle subit une ubiquitinylation prolongée alors que lorsqu'elle s'associe au récepteur de classe A β_2AR elle subit une ubiquitinylation transitoire (Shenoy, SK et al. 2003; Shenoy, SK et al. 2006). L'ubiquitinylation prolongée de la β -arrestine est donc corrélée avec la formation d'un complexe stable avec les récepteurs de classe B qui ne recyclent alors que l'ubiquitinylation transitoire est corrélée avec la dissociation précoce de ce complexe et le recyclage des récepteurs de classe A. L'expression concomitante d'une chimère β -arrestine2-Ub avec le récepteur de classe A β_2AR conduit à l'internalisation d'un complexe stable β_2AR/β -

arrestine2-Ub caractéristique des récepteurs de classe B et à une augmentation de la dégradation du récepteur β_2 AR (Shenoy, SK et al. 2003). Un complexe stable β_2 AR/ β -arrestine est également obtenu en coexprimant la β -arrestine et le récepteur β_2 AR en présence de N-éthylmaléimide, un inhibiteur des enzymes responsables de la désubiquitinylation, ce qui suggère que c'est la désubiquitinylation de la β -arrestine qui déclenche la dissociation du complexe. La séquence primaire de la β -arrestine2 comprend 31 lysines qui sont autant de sites potentiels d'ubiquitinylation. La mutation des Lys¹¹ et Lys¹² conduit à une dissociation précoce du complexe AT_{1A}/ β -arrestine2^(K11R,K12R) internalisé suite à l'activation du récepteur AT_{1A} par l'angiotensine II. La fusion d'un groupement ubiquitine au mutant β -arrestine2^(K11R,K12R) permet de restaurer la formation du complexe stable (Shenoy, SK et al. 2006). Cependant, et de façon surprenante, la mutation des Lys¹¹ et Lys¹² n'affecte pas l'association de la β -arrestine avec le récepteur V₂ ce qui suggère que ce ne sont pas les mêmes résidus qui sont ubiquitinylés au cours de l'internalisation de AT_{1A} et de celle de V₂. En effet, le quintuple mutant β -arrestine2^(K18R,K107R,K108R,K207R,K296R) n'internalise pas avec le récepteur V₂ mais internalise avec le récepteur AT_{1A} et colocalise avec lui au niveau de l'endosome (Shenoy, SK et al. 2006). Ces éléments suggèrent que l'ubiquitinylation de la β -arrestine joue un rôle critique dans la séquestration des récepteurs et que cette ubiquitinylation se fait sur des résidus différents selon le récepteur auquel est associé la β -arrestine.

I.2.3.2. La resensibilisation des récepteurs couplés aux protéines G

I.2.3.2.1. Séquences de recyclage et facteurs cytoplasmiques à domaine PDZ

De nombreux récepteurs expriment à l'extrémité de leur domaine carboxyl-terminal un motif de reconnaissance PDZ (*Post-synaptic density protein of 95-kDa/Drosophila disc large tumour suppressor (DlgA)/Zonula occludens 1 homology*). Long de 3 à 4 acides aminés au minimum, les motifs PDZ sont regroupés selon trois classes (I, II et III) en fonction de leur séquence (Sheng, M et al. 2001). Ces motifs interagissent avec les domaines PDZ de protéines cytoplasmiques impliquées dans l'échafaudage de complexes supramoléculaires, l'adressage subcellulaire des récepteurs ou la régulation de leur activité. Parmi ces protéines, on distingue la protéine NHERF (*Na⁺/H⁺ exchange regulatory factor*) également nommée EBP50 (*Ezrin/radixin/moesin Binding Phosphoprotein of 50kDa*). Cette protéine possède deux domaines PDZ en tandem du côté amino-terminal ainsi qu'un domaine ERM

(*Ezrin/Radixin/Moesin*) d'interaction avec les filaments d'actine du côté carboxyl-terminal. La protéine NHERF interagit avec plusieurs RCPG dont elle module l'activité (Weinman, EJ et al. 2006). Ceci suggère que les domaines de reconnaissance PDZ jouent un rôle important dans la resensibilisation des RCPG en recrutant des protéines telles que NHERF qui vont favoriser cette resensibilisation. C'est le cas notamment du récepteur β_2 AR qui présente un motif PDZ nécessaire et suffisant pour promouvoir son recyclage. La transposition de ce motif sur des récepteurs à dégradation rapide tel que le récepteur DOR, permet ainsi de provoquer leur retour à la membrane cytoplasmique (Gage, RM et al. 2001; Gage, RM et al. 2005). De plus, la délétion ou la mutation du motif PDZ (DSLL) du récepteur β_2 AR bloque son recyclage et inhibe son interaction avec la protéine NHERF (Cao, TT et al. 1999). Le complexe formé par le récepteur β_2 AR et NHERF semble exister en absence de toute stimulation du récepteur (Wheeler, D et al. 2007). Cependant, Cao T.T. et collaborateurs ont montré que la phosphorylation par la GRK5 de la Ser⁴¹¹ du motif PDZ de β_2 AR inhibe l'interaction du récepteur avec NHERF et empêche le recyclage vers la membrane (Cao, TT et al. 1999). Ceci suggère que la fixation de l'agoniste pourrait moduler négativement l'association de β_2 AR avec NHERF. Par ailleurs, le cytosquelette joue un rôle important dans la régulation du trafic intracellulaire des RCPG (Gaidarov, I et al. 1999) et sa déstructuration bloque le recyclage du récepteur β_2 AR qui est alors dégradé (Cao, TT et al. 1999). Ceci s'explique par le fait que la protéine NHERF interagit avec le réseau cortical de filaments d'actine grâce à son domaine ERM, rattachant ainsi le récepteur β_2 AR au cytosquelette. De plus, il semblerait que l'association de la protéine NHERF avec le cytosquelette soit dépendante de la présence de l'agoniste (Wheeler, D et al. 2007). D'autres études ont rapporté l'interaction de la protéine NHERF avec le récepteur P2Y₁ à l'ADP (Hall, RA et al. 1998) et le récepteur KOR dont la resensibilisation est accrue lorsque NHERF est surexprimé (Li, JG et al. 2002; Liu-Chen, LY 2004). L'interaction de NHERF avec le récepteur KOR implique cependant une séquence de reconnaissance PDZ qui ne correspond pas à une séquence consensus ce qui pourrait indiquer que d'autres séquences de reconnaissance PDZ plus ou moins dévoyées existeraient encore et que d'autres RCPG puissent également interagir avec NHERF.

A l'opposé, des études ont montré qu'en interagissant avec le récepteur PTH₁R à l'hormone parathyroïdienne, NHERF inhibe son internalisation et retarde son recyclage vers la membrane cytoplasmique (Sneddon, WB et al. 1998; Wang, B et al. 2007). Ces observations font écho à d'autres travaux récents portant sur l'interaction de NHERF avec le

récepteur PTH₁R et les filaments d'actine du cytosquelette. Ainsi, en reliant les récepteurs PTH₁R aux filaments d'actine, NHERF diminue leur mobilité latérale au sein de la membrane ce qui a pour conséquence de les empêcher d'être transloqués au niveau des puits tapissés de clathrine et donc d'être internalisés. De plus, NHERF interfère dans l'interaction du récepteur PTH₁R avec l'arrestine par encombrement stérique, ce qui ralentit le recrutement des différents acteurs de la formation des puits tapissés de clathrine et donc ralentit également l'internalisation (Wheeler, D et al. 2007). Ceci montre qu'au-delà de son rôle dans la régulation du recyclage, la protéine NHERF joue un rôle plus large dans la régulation de l'activité de certains RCPG à motif PDZ.

Récemment de nouveaux motifs PDZ impliqués dans le recyclage de RCPG ont été décrits. Un motif PDZ interne a notamment été identifié au sein du domaine carboxyl-terminal du récepteur ET_A par similarité de séquence (Paasche, JD et al. 2005). Le récepteur ET_A est un récepteur qui est rapidement recyclé vers la membrane cytoplasmique lors de sa stimulation par l'endothéline alors que le récepteur ET_B est dégradé (Bremnes, T et al. 2000). Par ailleurs, le récepteur ET_B ne possède pas de motif PDZ interne. Ceci suggère que ce motif joue un rôle important dans la régulation du recyclage du récepteur ET_A ce qui a par ailleurs été montré dans une étude de mutagenèse dirigée. En effet, des mutations ponctuelles de la séquence de ce motif inhibent le recyclage du récepteur ET_A (Paasche, JD et al. 2005). Un nouveau motif PDZ a également été identifié à l'extrémité carboxyl-terminale du récepteur CCR₅ aux chemokines. La mutation ponctuelle de ce motif conduit à l'inhibition du recyclage du récepteur CCR₅ et promeut sa dégradation lysosomale (Delhay, M et al. 2007). Enfin, les récepteurs 5HT_{2C} à la sérotonine et SST₅ à la somatostatine possèdent également un motif PDZ dont la délétion retarde la resensibilisation du récepteur 5HT_{2C} (Backstrom, JR et al. 2000) et bloque celle du récepteur SST₅ (Wente, W et al. 2005). La protéine PIST, identifiée par criblage en double hybride chez la levure, interagit avec le motif PDZ du récepteur SST₅ internalisé et pourrait être impliqué dans son retour vers la membrane cytoplasmique (Wente, W et al. 2005). On distingue également d'autres protéines à domaine PDZ impliquées dans la régulation du trafic intracellulaire des RCPG. La protéine PSD-95 (*post-synaptic density protein of 95kDa*) interagit avec les récepteurs 5HT_{2A} et β_1 AR et limite leur internalisation (Hall, RA et al. 1998; Xia, Z et al. 2003). À l'opposé, l'internalisation de β_1 AR est accrue par son interaction avec la protéine synaptique d'échafaudage MAGI-2 (*membrane-associated guanylate kinase inverted-2*) également appelée ARIP-1 (*activin receptor interacting protein-1*) ou S-SCAM (*synaptic scaffolding molecule*) (Xu, J et al. 2001). L'identification de

nouveaux motifs PDZ montre qu'ils jouent un rôle déterminant dans la régulation du trafic intracellulaire des RCPG mais globalement les mécanismes moléculaires mis en jeu dans le recyclage de tous ces récepteurs ainsi que les partenaires d'interaction de ces motifs PDZ sont encore à identifier.

I.2.3.2.2. Le facteur cytoplasmique NSF régule la resensibilisation du récepteur beta2 à l'adrénaline

La protéine NSF (*N-ethylmaleimide sensitive factor*) est une protéine à activité ATPasique qui est essentielle à de nombreuses voies de trafic intracellulaire ainsi qu'à la fusion des vésicules membranaires notamment impliquées dans le processus d'exocytose. Par ailleurs, NSF interagit avec l'extrémité carboxyl-terminale à motif PDZ du récepteur β_2 AR. La mutation ponctuelle du motif PDZ inhibe l'interaction du récepteur β_2 AR avec NSF, ce qui a pour conséquence de diminuer le taux d'internalisation et d'inhiber le recyclage du récepteur. À l'opposé, la surexpression de NSF augmente le taux d'internalisation et de recyclage du récepteur β_2 AR (Cong, M et al. 2001). Cependant, NSF ne possède pas de domaine PDZ et son interaction avec le récepteur doit faire intervenir d'autres mécanismes encore inconnus. Néanmoins, il a été montré que ce ne sont pas les mêmes acides aminés qui sont impliqués dans l'interaction de l'extrémité carboxyl-terminale de β_2 AR avec NSF et NHERF. De plus, lorsque ces deux protéines sont coexprimées avec β_2 AR, une compétition pour la liaison avec le récepteur est observée entre NHERF et NSF.

Un criblage *in vitro* d'un grand nombre de domaines carboxyl-terminaux de RCPG a montré que le profil d'interaction de NSF ne se limitait pas au récepteur β_2 AR (Heydorn, A et al. 2004). Les récepteurs muscariniques M_1 , M_3 , M_4 et M_5 à l'acétylcholine, les récepteurs NK_1 et NK_2 aux tachykinines, le récepteur SST_1 à la somatostatine, le récepteur DOR et les récepteurs viraux US27 et US28 aux chemokines interagissent tous de manière significative avec NSF. Enfin, une interaction entre NSF et la β -arrestine1 a été montrée en double hybride et *in vitro* (McDonald, PH et al. 1999). NSF interagit également avec la β -arrestine1 et la β -arrestine2 dans des essais de coimmunoprécipitation. Cette interaction pourrait représenter un mécanisme de modulation du recyclage des récepteurs avec lesquels NSF n'interagit pas directement. Dans l'ensemble, ces éléments suggèrent que le rôle joué par NSF dans la régulation de la resensibilisation des RCPG pourrait s'avérer être plus important que ce qui avait été anticipé.

I.2.3.2.3. Nouvelles séquences impliqués dans la resensibilisation des récepteurs couplés aux protéines G

D'autres séquences ont récemment été impliquées dans le recyclage des récepteurs MOR, D₁ et le récepteur à l'hormone lutéinisante et à la gonadotrophine chorionique (LHR). Le récepteur MOR présente à son extrémité carboxyl-terminale une séquence de 17 acides aminés qui est impliquée dans son recyclage. La délétion ou la mutation ponctuelle de cette séquence bloque le recyclage de MOR et augmente sa protéolyse (Tanowitz, M et al. 2003). De plus, l'adjonction de cette séquence au récepteur DOR, normalement dégradé après sa stimulation par son agoniste, entraîne son retour vers la membrane cytoplasmique. Enfin, cette séquence est fonctionnellement interchangeable avec le motif de reconnaissance PDZ du récepteur β_2 AR. Cependant, le recyclage de MOR et le recyclage de β_2 AR ne présentent pas la même sensibilité à la dépolymérisation des filaments d'actine, ce qui suggère que la resensibilisation de ces deux récepteurs implique deux mécanismes distincts. Alors que NHERF et NSF interagissent avec l'extrémité carboxyl-terminale de β_2 AR et régulent sa resensibilisation, on peut supposer qu'un autre facteur protéique encore inconnu puisse interagir avec la séquence de recyclage de 17 acides aminés du récepteur MOR et promouvoir sa resensibilisation.

Le récepteur humain à l'hormone lutéinisante et à la gonadotrophine chorionique (hLHR) possède au sein de son domaine intracellulaire deux résidus, la cystéine-699 carboxyl-terminale et la leucine-683, qui sont impliqués dans sa resensibilisation (Galet, C et al. 2004). À l'inverse du récepteur hLHR, le récepteur de rat (rLHR) n'est pas recyclé et ne présente pas le motif Leu⁶⁸³Cys⁶⁹⁹. Cependant, l'adjonction de ce motif au récepteur rLHR entraîne son recyclage. De la même manière, le récepteur chimère résultant de la fusion entre le récepteur DOR et la portion carboxyl-terminale du récepteur hLHR contenant le motif Leu⁶⁸³Cys⁶⁹⁹ est recyclée vers la membrane cytoplasmique alors que le récepteur DOR sauvage est dégradé au niveau du lysosome. Le motif Leu⁶⁸³Cys⁶⁹⁹ du récepteur hLHR présente certaines similitudes avec le motif PDZ (DSLL) du récepteur β_2 AR. La Cys⁶⁹⁹ forme l'extrémité carboxyl-terminale de hLHR au même titre que DSLL pour β_2 AR et ces deux motifs impliquent la présence de leucine. Néanmoins, NHERF et NSF n'interagissent pas avec le récepteur hLHR. Il a par contre été montré qu'une protéine à domaine PDZ, GIPC (*GAIP interacting protein C-terminal*), interagit avec hLHR et que cette interaction nécessite la présence de la Cys⁶⁹⁹ mais pas de la Leu⁶⁸³. De plus, GIPC est partiellement responsable du

recyclage de l'hormone gonadotrophine internalisée par hLHR ainsi que du maintien de la stabilité du nombre de récepteurs hLHR présents à la surface de la cellule durant l'internalisation de l'hormone (Hirakawa, T et al. 2003). Par ailleurs, GIPC interagit de façon indépendante du domaine PDZ avec une séquence spécifique située immédiatement en amont de l'extrémité carboxyl-terminale des récepteurs D₂ et D₃ mais pas D₄ et inhibe la dégradation lysosomale des récepteurs D₂ et D₃ (Jeanneteau, F et al. 2004).

Le récepteur D₁ à la dopamine possède également une séquence de recyclage. À l'opposé des récepteurs β_2 AR, MOR et hLHR, cette séquence longue de 23 acides aminés se trouve localisée dans la partie proximale du domaine intracellulaire du récepteur D₁ entre les résidus 360 et 382 (Vargas, GA et al. 2004). Cette séquence n'est pas nécessaire à l'internalisation de D₁ mais est spécifiquement impliquée dans son recyclage. Lorsqu'elle est fusionnée à la portion distale du domaine intracellulaire du récepteur DOR, elle inhibe sa dégradation protéolytique et favorise son retour vers la membrane cytoplasmique. Cette séquence fait écho à une autre séquence de reconnaissance localisée dans cette même portion proximale du domaine intracellulaire de D₁ et qui s'étend entre les résidus 333 et 341. Reconnue par la protéine cytoplasmique DRIP78, cette séquence est responsable de l'exportation vers la membrane cytoplasmique des récepteurs nouvellement synthétisés (Bermak, JC et al. 2001).

Récemment, une nouvelle séquence de reconnaissance composée de résidus acides et d'un doublet leucine a été identifiée au sein du domaine carboxyl-terminal du récepteur β_2 AR (Hanyaloglu, AC et al. 2007). Cette séquence dirige le récepteur vers la voie de recyclage impliquant le motif PDZ carboxyl-terminal. La mutation des résidus acides et du doublet leucine de cette séquence réoriente le récepteur vers la voie de recyclage « par défaut ». Cette voie ne nécessite ni la présence du motif PDZ ni celle de la protéine Hrs (*hepatocyte-growth factor regulated tyrosine kinase substrate*) associée à l'endosome, qui a précédemment été impliquée dans le recyclage du récepteur β_2 AR (Figure I.6) au cours d'essais de déplétion en protéine Hrs par ARN interférentiel (Hanyaloglu, AC et al. 2005). En effet, le recyclage « par défaut » n'implique ni séquences de recyclage ni facteurs cytoplasmiques et a été notamment décrit pour le récepteur de la transferrine. Cette étude montre pour la première fois l'existence d'une séquence impliquée dans la discrimination de deux modes de recyclage et suggère une flexibilité ainsi qu'une complexité nouvelle dans la régulation du trafic intracellulaire des RCPG. L'identification d'une protéine reconnaissant ce nouveau motif permettra de mieux appréhender les mécanismes biochimiques impliqués.

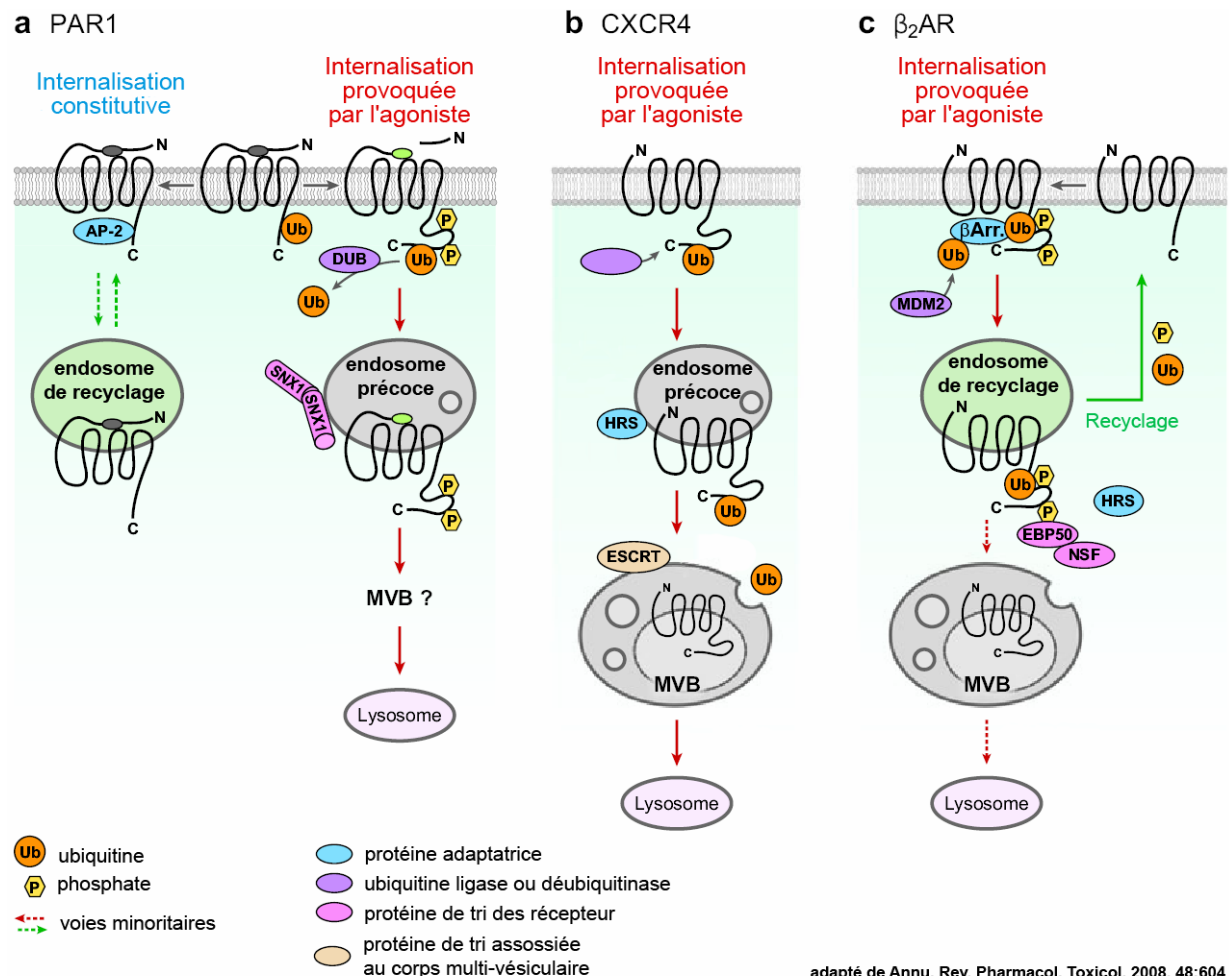


Figure I.6. Illustration de certains concepts sur le rôle de l'ubiquitinylation des RCPG et son implication dans la régulation de leur trafic intracellulaire.

La déubiquitinylation (DUB) de PAR₁ est nécessaire à son internalisation (a). Le récepteur CXCR₄ est le seul récepteur dont on ait clairement démontré une orientation vers le lysosome impliquant la protéine Hrs et le complexe protéique (ESCRT) associé au tri des cargos membranaires ubiquitinylés vers le corps multi-vésiculaire (MVB) (b). L'ubiquitinylation de la β -arrestine est impliquée dans l'internalisation du récepteur β_2 AR et l'ubiquitinylation du récepteur lui-même serait nécessaire à sa dégradation au niveau du lysosome. Par ailleurs, il semblerait que la protéine Hrs soit impliquée dans le recyclage de β_2 AR (c).

I.2.3.3. La régulation négative des récepteurs couplés aux protéines G

I.2.3.3.1. Ubiquitinylation et régulation négative des récepteurs couplés aux protéines G

Bien que l'ubiquitinylation prolongée de la β -arrestine ne soit pas directement impliquée dans la dégradation lysosomale du récepteur β_2 AR, nous avons vu qu'elle entraîne sa rétention au niveau de l'endosome ce qui a pour conséquence de potentialiser son orientation vers la voie lysosomale (Figure I.6). Par contre, il a été montré que l'ubiquitinylation du récepteur lui-même est impliquée dans son orientation vers la voie lysosomale. L'ubiquitine ligase Mdm2, qui s'associe à la β -arrestine, catalyse non seulement l'ubiquitinylation de la β -arrestine mais également celle du récepteur β_2 AR ce qui promeut sa dégradation lysosomale (Shenoy, SK et al. 2001). En effet, un récepteur β_2 AR dont les résidus lysine de son domaine carboxyl-terminal ont été mutés afin d'empêcher toute ubiquitinylation est toujours internalisé mais n'est plus dégradé. Ceci indique que l'ubiquitinylation de β_2 AR est nécessaire à sa dégradation mais pas à son internalisation et à sa séquestration au niveau de l'endosome. Le même type d'approche a été utilisé avec les récepteurs CXCR₄ (Marchese, A et al. 2001), PAR₂ (Jacob, C et al. 2005) et NK₁ (Cottrell, GS et al. 2006). Pour le récepteur CXCR₄ une séquence de dégradation contenant les lysines ubiquitinylées a été caractérisée dans le domaine carboxyl-terminal (³²⁴SSLKILSKGK³³³). Ces récepteurs, dont les résidus lysine ont été mutés, sont internalisés mais ne sont plus dégradés suite à leur stimulation prolongée. Il a également été montré que le récepteur V₂ est ubiquitinylé puis dégradé dans le lysosome consécutivement à sa stimulation par la vasopressine. Cette ubiquitinylation nécessite la présence de la β -arrestine2 qui joue le rôle de protéine adaptatrice entre le récepteur V₂ et le complexe d'ubiquitinylation (Martin, NP et al. 2003).

Les mécanismes impliqués dans la reconnaissance des RCPG ubiquitinylés et leur orientation vers le compartiment lysosomal sont encore mal compris. Il a cependant été proposé que le récepteur CXCR₄ ubiquitinylé soit pris en charge par l'ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*), un complexe protéique associé à la membrane de l'endosome qui est impliqué dans le transport de vésicules cargo ubiquitinylées vers le lysosome via un compartiment membranaire intermédiaire appelé corps multi-vésiculaire (MVB, *multivesicular body*) (Figure I.6) (Katzmann, DJ et al. 2001). L'ESCRT est notamment composé de la protéine Hrs qui contient un domaine d'interaction avec l'ubiquitine. Des essais de déplétion de protéine Hrs ont montré un blocage du trafic vers le

lysosome des récepteurs CXCR₄ (Marchese, A et al. 2003). Comme nous l'avons vu précédemment, la protéine Hrs est également impliquée dans le recyclage vers la membrane cytoplasmique des récepteurs β_2 AR (Figure I.6) et MOR (Hanyaloglu, AC et al. 2005) ce qui suggèrerait qu'elle puisse jouer un rôle centrale dans le tri des récepteurs entre la voie de recyclage et la voie de dégradation lysosomale.

I.2.3.3.2. Les protéines SNX1 et Alix

La protéine SNX1 (*sorting nexin 1*) a été identifiée lors d'un criblage en double hybride chez la levure pour sa capacité à interagir avec le récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR) (Kurten, RC et al. 1996). De plus, l'augmentation de la dégradation de EGFR suite à la stimulation de cellules surexprimant SNX1 laissait supposer que cette protéine jouait un rôle dans la régulation de la dégradation des récepteurs internalisés. SNX1 a par la suite été impliquée dans le trafic du récepteur PAR₁ vers le compartiment lysosomal (Figure I.6). En effet, SNX1 interagit *in vitro* avec PAR₁ et coimmunoprécipite avec lui lorsqu'ils sont coexprimés en système hétérologue. De plus, il a été montré en système hétérologue que la surexpression du domaine *coiled-coil* carboxyl-terminal de SNX1 comme dominant négatif (Wang, Y et al. 2002) ou l'utilisation d'ARN interférentiel afin d'inhiber l'expression endogène de SNX1 (Gullapalli, A et al. 2006), conduit à l'accumulation de PAR₁ au niveau de l'endosome suite à son activation par la thrombine. Cette accumulation est corrélée avec la diminution du trafic vers le compartiment lysosomal et de la dégradation protéolytique de PAR₁. Un criblage *in vitro* d'une collection de domaines intracellulaires de RCPG a révélé que SNX1 pouvait potentiellement interagir avec un grand nombre de récepteurs et plus particulièrement avec le récepteur OTR à l'ocytocine, le récepteur DOR et le récepteur viral US28 qui suivent la voie de la dégradation lysosomale et de façon plus surprenante avec les récepteurs muscariniques M₁, M₄ et M₅ à l'acétylcholine, les récepteurs NK₁, NK₂ et NK₃ aux tachykinines et le récepteur GLP₁ au glucagon qui sont recyclés vers la membrane (Heydorn, A et al. 2004). Curieusement, ce criblage n'a pas mis en évidence l'interaction de SNX1 avec le récepteur PAR₁. À l'heure actuelle, les mécanismes impliquant SNX1 dans la régulation du transport des RCPG vers le lysosome restent encore inconnus.

Alix (*ALG-2-interacting protein X*), également nommé AIP1, a été récemment identifié au cours d'un criblage en double hybride chez la levure à l'aide de l'extrémité carboxyl-terminale du récepteur V₂ (Yi, X et al. 2007). Il a été montré dans cette étude que

Alix interagit avec les 29 derniers acides aminés de l'extrémité carboxyl-terminale du récepteur V₂ et promeut sa dégradation lysosomale lorsqu'ils sont coexprimés en système hétérologue. Le récepteur V₂ est un récepteur qui recycle très lentement et sa stimulation prolongée provoque son accumulation au niveau de l'endosome. Lorsque Alix est coexprimé avec le récepteur V₂, celui-ci n'est plus accumulé dans l'endosome mais il est redirigé vers le lysosome pour y être dégradé.

I.2.3.3.3. La protéine GASP-1

La protéine GASP-1, sur laquelle nous allons revenir plus en détail par la suite, a été identifiée pour sa capacité à interagir avec le domaine carboxyl-terminal de plusieurs RCPG. Il a été montré que la protéine GASP-1 (*GPCR associated sorting protein 1*) dirige les récepteurs DOR (Whistler, JL et al. 2002), D₂ (Bartlett, SE et al. 2005) et CB₁ (Martini, L et al. 2007; Tappe-Theodor, A et al. 2007) vers le compartiment lysosomal où ils sont dégradés. Ainsi, la surexpression d'un mutant dominant négatif de GASP-1 permet d'inhiber la dégradation de ces récepteurs et de favoriser leur retour à la membrane plasmique. L'inhibition de l'interaction entre GASP-1 et le récepteur D₂ à l'aide d'anticorps dirigés contre GASP-1 produit une resensibilisation partielle des neurones de la zone tegmentale ventrale du cerveau de rat (Bartlett, SE et al. 2005).

I.2.3.3.4. Autres voies de dégradation protéolytique

Bien que la dégradation lysosomale soit la voie de dégradation majoritaire des RCPG, d'autres voies peuvent coexister avec elle. Ainsi, les récepteurs β_2 AR (Jockers, R et al. 1999) et V₂ (Kojro, E et al. 1995) peuvent être dégradés sans subir d'endocytose. Les récepteurs β_2 AR (Shenoy, SK et al. 2001), DOR (Petaja-Repo, UE et al. 2001) et le récepteur au facteur d'activation plaquettaire (PAFR) (Dupre, DJ et al. 2003) sont dégradés au niveau du protéasome consécutivement à leur polyubiquitinylation. L'ubiquitinylation de β_2 AR favorise par ailleurs sa dégradation lysosomale, alors que le récepteur DOR est quant à lui dirigé vers le lysosome sans être ubiquitinylé (Chaturvedi, K et al. 2001). La dégradation des RCPG est donc un phénomène complexe faisant intervenir diverses voies impliquant des protéines cytoplasmiques spécifiques.

I.2.4. Conséquences physiologiques de la régulation du trafic intracellulaire des récepteurs couplés aux protéines G

I.2.4.1. Système opioïde et tolérance

La désensibilisation, l'internalisation et la resensibilisation ou la régulation négative sont des mécanismes qui permettent de réguler l'activité des récepteurs couplés aux protéines G. Si la désensibilisation des récepteurs activés par un agoniste permet de mettre rapidement un terme à la transduction du signal, la régulation négative entraîne une diminution du nombre de récepteurs présents à la surface de la cellule, ce qui se traduit par une baisse prolongée de la sensibilité de la cellule à l'agoniste. Cette baisse de la sensibilité est observée lors de traitements chroniques ou prolongés avec un agoniste et conduit à l'apparition d'un phénomène de tolérance. En clinique, la tolérance se traduit par la nécessité d'augmenter les doses de médicament au cours d'un traitement afin de maintenir l'effet thérapeutique désiré. L'augmentation des doses s'accompagne généralement de l'augmentation des effets secondaires indésirables ce qui pose certains problèmes lors de traitements au long cours. Ce phénomène est particulièrement bien connu dans le cadre du traitement des douleurs sévères à l'aide de composés opiacés tels que la morphine. Le système opioïde est composé de trois récepteurs μ , δ et κ (MOR, DOR et KOR) (Kieffer, BL 1995) qui modulent la perception de la douleur au niveau central (Dickenson, AH 1991). La plupart des médicaments qui traitent la douleur agissent sur le récepteur MOR. Il existe sept sous-types pharmacologiques du récepteur MOR (Pasternak, GW 2001) et les divers composés opiacés utilisés en clinique présentent des affinités différentes pour chacun de ces sous-types. La tolérance à l'effet analgésique se développe spécifiquement pour chacun des sous-types en réponse à un composé particulier, on parle de tolérance croisée incomplète. Ainsi, lorsque le patient développe une tolérance à un composé il est possible de basculer sur un autre composé pour lequel il n'est pas encore tolérant. La tolérance aux effets analgésiques des composés opiacés semble pouvoir s'expliquer par la désensibilisation du récepteur MOR. Ainsi, l'étude de souris génétiquement déficientes en β -arrestine2 a permis de mettre en évidence une potentialisation et une prolongation remarquables des effets analgésiques de la morphine chez ces animaux (Bohn, LM et al. 1999). Par la suite, il a été montré que la désensibilisation du récepteur MOR, dont la β -arrestine2 est un des éléments clé, joue un rôle physiologique important dans l'apparition de la tolérance à l'effet analgésique de la morphine (Bohn, LM et al. 2000). À terme, une meilleure compréhension de ces mécanismes devrait permettre de limiter les phénomènes de tolérance et de développer de nouveaux traitements thérapeutiques

des douleurs chroniques.

I.2.4.2. Système cannabinoïde et tolérance

D'autres phénomènes de tolérance impliquant la régulation du trafic intracellulaire des RCPG ont été décrits tel que la tolérance à l'effet analgésique des cannabinoïdes. Le système cannabinoïde est composé de deux récepteurs CB₁ et CB₂ qui sont activés par les cannabinoïdes endogènes. Ce système régule de nombreux processus physiologiques et plus particulièrement la perception de la douleur (Caligaris-Cappio, F et al. 1985; Rice, AS 2001). L'utilisation des cannabinoïdes dans le traitement des douleurs chroniques a montré des résultats prometteurs lors d'études précliniques et cliniques (Rice, AS 2001; Walker, JM et al. 2005; Mackie, K 2006). Cependant, l'utilisation des cannabinoïdes en clinique est limitée d'une part par l'apparition d'effets secondaires indésirables (Marsicano, G et al. 2006) et d'autre part par l'apparition d'une tolérance à l'effet analgésique (De Vry, J et al. 2004; Martin, BR et al. 2004; Gonzalez, S et al. 2005; Rubino, T et al. 2005). Chez l'animal traité en chronique aux cannabinoïdes, cette tolérance s'accompagne de la régulation négative des récepteurs CB₁ qui a été mesurée dans des essais de liaison de ligand radioactif réalisés sur coupes ou homogénats de cerveau (Romero, J et al. 1997; Breivogel, CS et al. 1999; Rubino, T et al. 2000; Sim-Selley, LJ et al. 2002). Très récemment, il a été montré dans des neurones de moelle épinière en culture et chez la souris que la régulation négative du récepteur CB₁ était déterminée par son interaction avec GASP-1 (Martini, L et al. 2007; Tappe-Theodor, A et al. 2007). De plus, l'inhibition de cette interaction *in vivo* à l'aide d'un virus recombinant codant pour un dominant négatif de GASP-1 permet de prévenir le développement de la tolérance à l'effet analgésique des cannabinoïdes. Cette étude fait pour la première fois le lien entre un mécanisme impliqué dans le trafic intracellulaire du récepteur CB₁ et la tolérance à l'effet analgésique des cannabinoïdes.

I.2.4.3. L'infarctus du myocarde et les récepteurs beta adrénergiques

Au niveau périphérique, la désensibilisation et la régulation négative des récepteurs β adrénergiques sont impliquées dans l'infarctus du myocarde. Le muscle cardiaque exprime majoritairement les récepteurs β_1 et β_2 adrénergiques qui sont impliqués dans l'augmentation de la fréquence (effet chronotrope positif) et de l'intensité (effet inotrope positif) des contractions cardiaques. On trouve également des récepteurs β_3 adrénergiques qui sont

responsables de l'effet inotropique négatif mais leur expression est marginale. Un infarctus est provoqué par l'emballlement du système sympathique cardio-accélérateur qui libère une grande quantité de noradrénaline à destination des récepteurs β adrénergiques du coeur. Cette activation prolongée des récepteurs provoque leur régulation négative et plus particulièrement celle du récepteur β_1 AR (Bristow, MR et al. 1982; Brodde, OE 1993). Les autres récepteurs vont également être désensibilisés en raison de l'accroissement de l'activité de la GRK2 et/ou de la GRK5 (Ungerer, M et al. 1993; Ungerer, M et al. 1994; Ping, P et al. 1997). La désensibilisation et la régulation négative des récepteurs β adrénergiques sont des mécanismes adaptatifs qui répondent à la stimulation excessive du système sympathique. Néanmoins, on ne sait pas si ces mécanismes sont protecteurs ou dommageables pour le muscle cardiaque. Bien que la diminution prolongée du nombre de récepteurs β adrénergiques semble prévenir l'apparition de troubles tels que l'arythmie, l'hypertrophie ou l'apoptose et la nécrose qui seraient les conséquences d'une stimulation chronique, elle a également pour conséquence négative de priver le cœur de toute réponse chronotrope ou inotropique à court terme ce qui peut conduire à une aggravation de la crise cardiaque. Actuellement, les traitements mis à disposition des cliniciens reposent essentiellement sur l'utilisation d'antagonistes des récepteurs β adrénergiques appelés β -bloquants (Bristow, MR 2000) dont le mode d'action pourrait être de resensibiliser les récepteurs ou simplement de bloquer l'action de la noradrénaline. La compréhension des mécanismes moléculaires mis en jeu dans la régulation de l'activité des récepteurs adrénergiques lors d'un infarctus du myocarde est donc d'un intérêt capital et devrait permettre à terme de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

I.3. Les protéines de la famille GASP et leur fonction

I.3.1. Description de la famille

La protéine GASP-1 a été identifiée de manière concomitante au sein de notre laboratoire et par l'équipe de J. Whistler dans des essais de criblage par double hybride chez la levure visant à identifier de nouveaux partenaires d'interaction du récepteur DOR (Whistler, JL et al. 2002; Simonin, F et al. 2004).

Par la suite, des recherches d'homologie de séquence ont montré chez GASP-1 la présence d'un domaine carboxyl-terminal de 250 acides aminés possédant une forte identité de séquence avec neuf autres protéines qui ont été proposées pour former la famille GASP (Simonin, F et al. 2004). Les gènes codant pour les GASP, excepté GASP-8, sont regroupés dans deux clusters adjacents d'environ 160 et 200 kb localisés sur le locus Xq22 du chromosome X et sont constitués d'un seul exon codant. GASP-8 est codé par deux gènes, le premier est situé sur le chromosome 7 et est constitué de 7 exons qui codent pour deux isoformes de *splice*, le deuxième est localisé sur le chromosome 3 et est constitué d'un seul exon codant. Ces gènes sont présents uniquement chez les mammifères. Il a par ailleurs été récemment proposé que les gènes codant pour les GASP seraient issus d'un ancêtre commun, proche de GASP-10, que l'on retrouve chez les poissons téléostéens (Winter, EE et al. 2005).

La famille GASP se caractérise aussi par la présence d'un motif conservé de 15 acides aminés présent de manière répétée chez les cinq premiers membres de la famille GASP. Localisé dans la portion centrale des GASP, il est répété 22 fois chez GASP-1 et 2 fois chez GASP-2 à GASP-5. La séquence consensus de ce motif est riche en acides aminés chargés et présente 4 résidus centraux quasiment invariants, SWFW, qui forment le cœur du motif. Bien qu'on les retrouve dans d'autres tissus, c'est dans le système nerveux central que les protéines GASP sont le plus fortement exprimées (Simonin, F et al. 2004) ce qui est en accord avec une fonction liée à la régulation de l'activité des RCPG présents abondamment dans le système nerveux central. Ces points seront présentés et discutés plus en détail dans la partie dédiée aux résultats.

I.3.2. La protéine GASP-1

I.3.2.1. Interaction avec les récepteurs couplés aux protéines G

L'interaction directe entre le domaine carboxyl-terminal du récepteur DOR et la protéine GASP-1 a été confirmée d'une part *in vitro* dans des essais de chromatographie d'affinité mettant en jeu le domaine carboxyl-terminal de DOR, exprimé sous la forme d'une protéine de fusion avec la *glutathione S-transferase* (GST), immobilisé sur une résine couplée au glutathion et la protéine GASP-1 marquée à la [³⁵S]-méthionine. D'autre part, cette interaction a été confirmée en contexte cellulaire dans des essais de coimmunoprécipitation de GASP-1 avec le récepteur DOR (Whistler, JL et al. 2002; Heydorn, A et al. 2004; Simonin, F et al. 2004; Bartlett, SE et al. 2005; Martini, L et al. 2007; Tappe-Theodor, A et al. 2007). Cette interaction a été élargie à d'autres récepteurs de la famille 1 mais également à des récepteurs des familles 2 et 3 dont les domaines carboxyl-terminaux interagissent de manière significative avec GASP-1 *in vitro* (Heydorn, A et al. 2004; Simonin, F et al. 2004; Bartlett, SE et al. 2005; Martini, L et al. 2007; Tappe-Theodor, A et al. 2007). Ceci sera l'objet de la première partie des résultats présentés ici. Par ailleurs, il a également été montré en contexte cellulaire que GASP-1 interagit avec les récepteurs β_2 AR (Whistler, JL et al. 2002), D₂ (Bartlett, SE et al. 2005) et CB₁ (Martini, L et al. 2007; Tappe-Theodor, A et al. 2007). L'ensemble de ces résultats montre que GASP-1 présente une capacité à interagir avec un grand nombre de récepteurs différents et laissent supposer qu'il puisse jouer un rôle dans la régulation d'un processus commun à l'ensemble de ces récepteurs.

I.3.2.2. La régulation négative des récepteurs par GASP-1

L'équipe de J. Whistler a proposé que GASP-1 participe à la régulation négative du récepteur DOR en le dirigeant vers le compartiment lysosomal. Des essais réalisés en contexte cellulaire ont notamment montré que la portion carboxyl-terminale de GASP-1, allant des acides aminés 899 à 1395 et nommée cGASP, peut entrer en compétition avec la protéine GASP-1 endogène pour la liaison au récepteur DOR et que sa surexpression favorise le recyclage du récepteur DOR vers la membrane cytoplasmique en jouant le rôle de dominant négatif. À l'inverse, la surexpression de GASP-1 amplifie la dégradation du récepteur DOR suite à sa stimulation prolongée (Whistler, JL et al. 2002).

Une autre étude menée par S. Bartlett et ses collaborateurs a également impliquée GASP-1 dans la dégradation lysosomale du récepteur D₂ à la dopamine. En effet, GASP-1

coimmunoprécipite avec le récepteur D₂ en contexte cellulaire et dans des extraits de cerveau de rat mais pas avec le récepteur D₁ qui recycle vers la membrane cytoplasmique. De plus, la surexpression de cGASP prévient la dégradation lysosomale du récepteur D₂ dans des cellules exprimant de manière endogène GASP-1. Des anticorps dirigés contre GASP-1 ont été utilisés afin d'inhiber son interaction avec le récepteur D₂ dans des neurones dopaminergiques de l'air tegmentale ventrale. Ces neurones ont été étudiés en *patch-clamp* sur des coupes de cerveau de rat. Cette technique permet de mesurer la variation du potentiel électrique de membrane sur un neurone isolé. Sa stimulation prolongée avec un agoniste dopaminergique conduit à une diminution progressive de sa réponse électrophysiologique (hyperpolarisation provoquée par l'activation via G_i des canaux K⁺ de rectification entrante) qui est liée à la désensibilisation des récepteurs D₂. Cette réponse n'est pas recouvrée après une phase de repos sans agoniste ce qui indique que ces récepteurs ne sont pas resensibilisés. L'application d'un anticorps spécifique qui va saturer GASP-1 et l'empêcher d'agir, permet d'obtenir après la phase de repos une nouvelle réponse électrophysiologique suite au renouvellement de la stimulation avec l'agoniste. Ces résultats indiquent que l'inhibition de l'interaction entre GASP-1 et le récepteur D₂ favorise son retour à la membrane cytoplasmique et la resensibilisation des neurones à l'agoniste (Bartlett, SE et al. 2005).

Récemment, deux études ont montré que GASP-1 est impliqué dans la dégradation lysosomale du récepteur CB₁ lors de sa stimulation prolongée avec un agoniste cannabinoïde (Martini, L et al. 2007; Tappe-Theodor, A et al. 2007). En effet, GASP-1 et le récepteur CB₁ coimmunoprécipitent en contexte cellulaire et dans des extraits de cerveau de rat. Ils colocalisent également dans des neurones de striatum et de moelle épinière en culture primaire ainsi que dans le cerveau de rat et plus particulièrement au niveau de l'hippocampe et du gyrus denté. Dans les neurones de striatum comme dans les neurones de moelle épinière en culture primaire, la stimulation prolongée avec un agoniste cannabinoïde provoque une diminution significative du nombre de récepteurs CB₁ qui sont dégradés au niveau du lysosome. Cette diminution peut être prévenue par la surexpression du dominant négatif cGASP qui va se lier au domaine carboxyl-terminal du récepteur CB₁ à la place de GASP-1 endogène et l'empêcher ainsi de diriger le récepteur vers le compartiment lysosomal. Les récepteurs CB₁ internalisés suivent alors la voie de recyclage et retournent à la membrane cytoplasmique. Ces études montrent ainsi que l'interaction de GASP-1 avec le récepteur CB₁ est nécessaire à sa dégradation lysosomale.

Comme nous venons de le voir, GASP-1 favorise la dégradation lysosomale des récepteurs DOR, D₂ et CB₁ avec lesquels il interagit. Cependant, il est intrigant de constater que GASP-1 interagit également avec des récepteurs qui sont recyclés vers la membrane cytoplasmique comme nous le verrons par la suite (Heydorn, A et al. 2004; Simonin, F et al. 2004). Parmi eux, on distingue les récepteurs β_2 AR et MOR dont il existe deux mutants qui sont dirigés vers le compartiment lysosomal au lieu d'être recyclés vers la membrane cytoplasmique. Récemment, une étude s'est intéressée à l'interaction en contexte cellulaire de ces deux récepteurs et de leurs mutants avec GASP-1 et GASP-2 son plus proche homologue (Thompson, D et al. 2007). Le récepteur β_2 AR interagit fortement avec GASP-1 et GASP-2 *in vitro* mais pas en contexte cellulaire. En effet, une fois internalisé le récepteur β_2 AR va interagir préférentiellement avec la protéine cytoplasmique NHERF qui va promouvoir son recyclage rapide vers la membrane cytoplasmique. Cette interaction est possible grâce à la présence d'un motif PDZ au niveau de l'extrémité carboxyl-terminale du récepteur β_2 AR (Cao, TT et al. 1999). Lorsque ce motif est muté, le récepteur n'interagit plus avec NHERF par contre une interaction avec GASP-1 et GASP-2 est alors révélée par coimmunoprécipitation. De plus, le récepteur β_2 AR n'est plus recyclé mais dégradé et cette dégradation peut être prévenue par la surexpression du dominant négatif cGASP. Il apparaît donc que l'inhibition de l'interaction avec NHERF rend le récepteur β_2 AR accessible à GASP-1 qui va le diriger vers le compartiment lysosomal. Ceci suggère que certains partenaires d'interaction cytoplasmiques des RCPG sont en compétition et que l'orientation de ces RCPG vers la voie du recyclage ou vers la voie de la dégradation soit déterminée par l'affinité de ces partenaires pour les récepteurs. Ainsi l'affinité de la protéine NHERF pour le récepteur β_2 AR est plus importante que celle de GASP-1 c'est pourquoi ce récepteur est recyclé. Cette notion d'affinité de liaison est illustrée par le fait que la surexpression de cGASP ne permet de déplacer qu'une fraction des protéines NHERF qui interagissent avec le récepteur β_2 AR sauvage (Thompson, D et al. 2007). Le récepteur MOR est également recyclé vers la membrane cytoplasmique mais à la différence du récepteur β_2 AR, il n'interagit que faiblement avec GASP-1 et GASP-2 *in vitro* ainsi qu'en contexte cellulaire. Le récepteur MOR possède à son extrémité carboxyl-terminale une séquence de recyclage de 17 acides aminés (Tanowitz, M et al. 2003). La délétion de cette séquence favorise la dégradation protéolytique du récepteur. De plus, le récepteur MOR tronqué présente une affinité plus grande pour GASP-1 et GASP-2 ce qui est en contradiction avec ce qui a été observé pour le récepteur β_2 AR. Il apparaît donc que la délétion de la séquence de recyclage du récepteur

MOR modifie son affinité pour GASP-1 et GASP-2 et l'hypothèse privilégiée par les auteurs de cette étude est que la délétion de cette séquence démasque ou rend accessible un site de liaison pour GASP-1 et -2.

I.3.2.2. Tolérance aux cannabinoïdes

GASP-1 interagit *in vitro* et *in vivo* avec un grand nombre de récepteurs couplés aux protéines G et participe à leur régulation négative. La dégradation lysosomale des RCPG est considérée comme l'un des principaux mécanismes du développement de la tolérance. Ainsi, il a récemment été montré que la régulation du trafic intracellulaire du récepteur CB₁ par GASP-1 était impliquée dans le développement de la tolérance à l'effet analgésique d'un agoniste cannabinoïde, WIN 55,212-2, chez la souris (Tappe-Theodor, A et al. 2007). La tolérance à l'effet analgésique de WIN a tout d'abord été mise en évidence chez la souris à l'aide d'un test de retrait de la queue. Dans ce test, la queue de l'animal est mis en contact avec une source de chaleur et le temps de latence entre l'application de la source de chaleur et le retrait de la queue est mesuré. Le retrait de la queue est un réflexe nociceptif qui ne fait pas appel aux centres cérébraux de traitement de la douleur, seul les circuits neuronaux de la moelle épinière sont mobilisés. Ce temps de latence est fortement accru pour un animal ayant reçu une injection de WIN par rapport à un animal n'ayant pas reçu d'injection ce qui rend compte de l'effet analgésique du composé. Lorsque le test est répété durant plusieurs jours, le temps de latence décroît et revient progressivement à son niveau basal car une tolérance à l'effet analgésique de WIN s'est développée au cours du temps. Par la suite, ce test a été répété avec des souris infectées au niveau de leur moelle épinière par un virus recombinant exprimant le dominant négatif cGASP. Durant les premiers jours du test le même temps de latence a été mesuré pour les souris infectées et les souris sauvages traitées avec WIN. Par contre, le temps de latence ne décroît presque pas chez les souris infectées ce qui indique que l'effet analgésique de WIN est plus stable chez ces animaux alors qu'une tolérance se développe chez les souris sauvages. Le dominant négatif cGASP permet donc de limiter le développement de la tolérance aux effets analgésiques de WIN. L'ensemble de ces éléments fait pour la première fois le lien entre la régulation du trafic intracellulaire d'un RCPG et le développement d'une tolérance lors de son traitement prolongé avec un agoniste.

I.3.2.3. Régulation du rythme circadien

GASP-1 a été identifié pour la première fois au cours d'un criblage double hybride chez la levure à l'aide de la protéine period1 de rat (Matsuki, T et al. 2001). Les protéines de la famille Period sont impliquées dans la régulation des rythmes biologiques. Nommés également rythmes circadiens, les rythmes biologiques englobent l'ensemble des processus physiologiques et comportementaux qui se répètent de façon cyclique sous l'action de l'horloge interne de notre organisme dont la périodicité est de 24 heures environ. Le siège de cette horloge interne est le noyau suprachiasmatique, une petite zone située à la base du cerveau juste au-dessus du chiasma optique, qui donne la mesure à l'ensemble de l'organisme à la manière d'un métronome. En effet, les neurones qui composent le noyau suprachiasmatique possèdent une rythmicité intrinsèque qui est due à la présence de « gènes horloges » codant pour des facteurs de transcriptions. Grâce à des boucles de contrôle rétroactives, ces facteurs de transcription régulent dans le temps leur propre expression ainsi que l'expression de gènes impliqués dans la synchronisation du reste de l'organisme (Reppert, SM et al. 2002). Les protéines Period font partie de ces facteurs de transcription et sont fortement exprimées dans le noyau suprachiasmatique. T. Matsuki et ses collaborateurs ont montré que GASP-1 coimmunoprécipite et colocalise avec Period1 en contexte cellulaire et qu'il est fortement exprimé dans le noyau suprachiasmatique. De plus, une relocalisation de GASP-1 dans le noyau de cellules coexprimant Period1 a été observée et une séquence de localisation nucléaire a été identifiée au sein de GASP-1 (Matsuki, T et al. 2001). Selon les auteurs de cette étude, ces résultats suggèrent que GASP-1 pourrait participer à la régulation des rythmes circadiens. Le rôle des GASP dans la régulation des rythmes circadiens sera étudié plus en détail dans les résultats (chapitre II.3.2).

I.3.3. GASP-2, maladie de Huntington et cancérogenèse

GASP-2, le plus proche homologue de GASP-1, interagit *in vitro* avec le domaine carboxyl-terminal de plusieurs RCPG (Simonin, F et al. 2004; Thompson, D et al. 2007). Il coimmunoprécipite également avec les récepteurs β_2 AR et MOR mutants qui subissent la dégradation protéolytique (Thompson, D et al. 2007). En effet, les récepteurs β_2 AR et MOR sont décrits pour être resensibilisés après leur internalisation mais la mutation du ligand PDZ carboxyl-terminal de β_2 AR et la délétion de la séquence carboxyl-terminale de recyclage (³⁸⁹LENLEAE³⁹⁵) de MOR favorise leur interaction avec GASP-2 et conduit à leur

dégradation lysosomale. Ces éléments laissent supposer que GASP-2, à l'instar de son homologue GASP-1, puisse lui aussi être impliqué dans la régulation du trafic intracellulaire des RCPG.

Par ailleurs, un criblage à grande échelle réalisé en double hybride chez la levure et visant à définir un réseau d'interaction protéine-protéine centré sur la huntingtine, la protéine qui cause la maladie d'Huntington, a permis d'identifier GASP-2 parmi 15 nouveaux partenaires d'interaction (Goehler, H et al. 2004) (Figure I.7). La maladie d'Huntington est une maladie génétique neurodégénérative qui se caractérise par une mort cellulaire sélective des neurones du cortex et du striatum conduisant à l'apparition de troubles de la motricité, de la cognition et de la personnalité (Harjes, P et al. 2003). Elle est déclenchée par l'expansion d'une séquence de polyglutamine au niveau de l'extrémité amino-terminale de la huntingtine qui forme alors des agrégats et devient toxique pour les neurones du cortex et du striatum. Parmi les nombreuses fonctions de la huntingtine on retiendra plus particulièrement son implication dans l'endocytose et le trafic intracellulaire de vésicules, des fonctions proches de celle proposée pour les GASP. Par la suite, l'interaction entre la huntingtine et GASP-2 a été confirmée dans des essais de coimmunoprécipitation à partir d'extraits de cellules mammifères ainsi que dans des essais de colocalisation dans des cellules neuronales en culture (Horn, SC et al. 2006). C'est le domaine carboxyl-terminal de GASP-2, identifié lors du criblage double hybride, qui semble être responsable de l'interaction de GASP-2 avec la huntingtine. De plus, il semblerait que l'expansion de polyglutamine favorise cette interaction. Cette étude est la première à faire le lien entre une protéine de la famille GASP et une protéine impliquée dans une maladie génétique neurodégénérative ouvrant ainsi de nouvelles perspectives de compréhension de la fonction des GASP.

Au sein du réseau d'interaction protéine-protéine caractérisé par H. Goehler et collaborateurs, GASP-2 interagit également avec quatre autres protéines qui sont la pléiotrophine (PTN), BARD1 (*Breast cancer susceptibility gene 1 (BRCA1) Associated Ring Domain protein 1*) et deux protéines d'activité inconnue, BAIP3 (*BARD1 Interacting Protein 3*) et HIP5 (*Huntingtin Interacting Protein 5*) (Figure I.7). La pléiotrophine est une cytokine liant l'héparine. Elle joue un rôle dans le développement et plus particulièrement au niveau du système nerveux central où elle est impliquée dans la différenciation cellulaire des neurones et des cellules gliales, la croissance des neurites, la migration des cellules nerveuses et l'angiogénèse. Par ailleurs, la pléiotrophine est surexprimée dans plusieurs types de cancers et notamment les neuroblastomes et glioblastomes (Kadomatsu, K et al. 2004). Quant à la

protéine BARD1, on la retrouve exprimée dans le noyau où elle joue le rôle de régulateur de facteurs de transcription et possède également une activité ubiquitine ligase et de réparation de l'ADN. BARD1 est également exportée vers le cytoplasme (Henderson, BR 2005) où elle exerce une activité pro-apoptotique en stabilisant le facteur suppresseur de tumeur p53 (Irminger-Finger, I et al. 2001). Des mutations, entraînant une perte de fonction de BARD1, ont été identifiées dans certains cancers du sein ou des ovaires. Des résultats préliminaires de microscopie confocale et d'essais *in vitro* obtenus récemment au laboratoire ont confirmé l'interaction entre GASP-2 et BARD1. Dans l'ensemble, ces éléments semblent indiquer que les protéines GASP pourraient avoir des fonctions qui ne se limitent pas au trafic intracellulaire des RCPG mais également des fonctions dans la régulation de facteurs suppresseurs de tumeurs tels que BARD1.

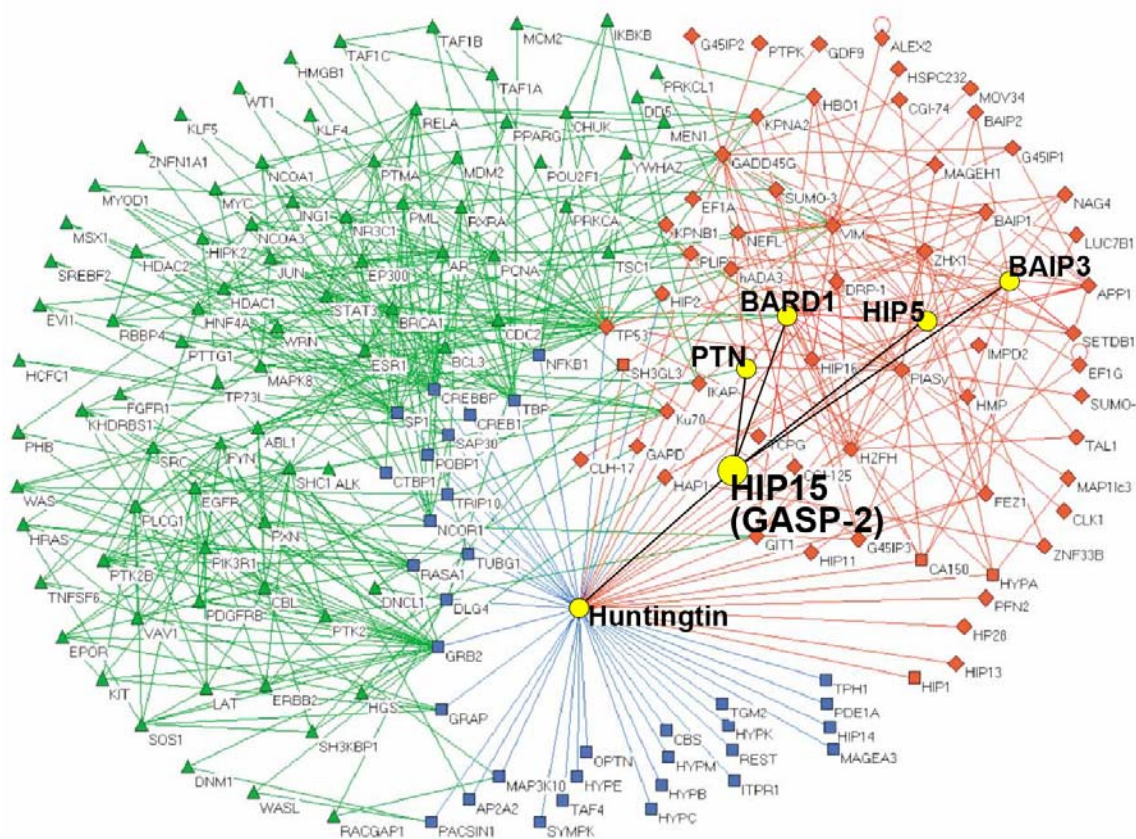


Figure I.7. Réseau d'interaction protéine-protéine autour de la huntingtine.

L'accent est mis ici sur le sous-réseau d'interaction protéine-protéine centré sur HIP15, un peptide de 175 acides aminés qui correspond à un fragment d'une protéine plus grande qui est GASP-2. Les cinq partenaires d'interaction de HIP15(GASP-2) sont représentés en jaune. (Adapté de Goehler et al., 2004).

I.4. Objectifs des travaux de thèse

Les récepteurs couplés aux protéines G sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques et leur activité est finement régulée par divers partenaires d'interaction parmi lesquels se trouvent les protéines GASP. Elles ont été identifiées au sein de notre laboratoire pour leur capacité à interagir avec différents RCPG et il a été proposé que GASP-1, le premier membre de cette famille, participe au trafic intracellulaire du récepteur δ aux opioïdes vers le compartiment lysosomal. Lorsque nous avons initié ce travail, nous disposions de peu d'informations sur l'interaction des GASP avec les RCPG ainsi que sur la fonction de cette nouvelle famille de protéines. Notre objectif a donc été de caractériser structuralement et fonctionnellement la nouvelle famille des protéines GASP.

Nous avons tout d'abord étudié l'interaction de 6 des 10 membres que compte la famille GASP avec une collection de 14 extrémités carboxyl-terminales de RCPG. Nous avons également étudié la relation entre la structure protéique des GASP et leur activité grâce à la combinaison d'analyses par délétion, et d'essais de mutagenèse dirigée. Ces essais nous ont permis d'identifier un nouveau motif d'interaction protéine-protéine qui est présent de manière répétée chez GASP-1 à GASP-5 et qui est crucial pour l'interaction entre les GASP et les RCPG. Ces premiers résultats nous ont amené à développer un peptide synthétique contenant ce motif dans le but d'inhiber l'interaction avec les RCPG.

Par ailleurs, les travaux du groupe de J. Whistler s'étant focalisés sur GASP-1 et son implication dans la régulation négative des RCPG à dégradation rapide, il nous est apparu important d'examiner l'implication de GASP-1 et GASP-2 dans le trafic intracellulaire d'un RCPG à dégradation lente, le récepteur à l'acétylcholine muscarinique M_1 . Nous avons tout d'abord étudié l'interaction de GASP-1 et GASP-2 avec le récepteur M_1 en contexte cellulaire à l'aide d'essais de coimmunoprécipitation et de colocalisation en microscopie confocale. Puis grâce à des techniques fluorimétrique et de liaison de ligand radioactif, nous avons mesuré l'internalisation et la dégradation lysosomale de M_1 suite à sa stimulation et l'impact de la présence de GASP-1 et GASP-2 sur ces phénomènes.

Enfin, nous avons exploré le rôle *in vivo* de la protéine GASP-1 d'une part dans les phénomènes comportementaux liés à l'administration de cocaïne et d'autre part dans la régulation des rythmes circadiens. Pour cela, des souris génétiquement déficientes en GASP-1 ont été réalisées. Ces animaux ont été soumis à des tests comportementaux pratiqués en collaboration avec l'équipe du Professeur Raphaël Maldonado afin d'évaluer le rôle de

GASP-1 dans les phénomènes adaptatifs liés à l'administration aiguë ou chronique de cocaïne. Nous avons également évalué les densités de récepteurs dopaminergiques et cholinergiques dans différentes structures cérébrales chez ces animaux afin d'examiner l'impact de GASP-1 sur la régulation du nombre de ces récepteurs lors d'un traitement chronique à la cocaïne. GASP-1 ayant été décrit comme partenaire d'interaction de la protéine horloge Period1, il nous est apparu important d'évaluer l'implication de GASP-1 dans la régulation des rythmes biologiques. Dans un premier temps, nous avons évalué *in vitro* et en contexte cellulaire l'interaction de GASP-1 et GASP-2 avec les protéines Period1, Period2 et Period3. Dans un deuxième temps, les souris déficientes en GASP-1 ont été soumises en collaboration avec l'équipe du Professeur Paul Pevet à des tests de mesure du rythme circadien d'activité/veille dans différentes conditions environnementales.

II. RÉSULTATS ET DISCUSSION

II.1. Étude de la relation entre structure et activité des protéines GASP

Introduction

Publication n°1

Publication n°2

Éléments de discussion

Travaux en cours

II.1.1. Introduction

Plusieurs récepteurs aux opioïdes ont été mis en évidence par des études pharmacologiques et trois gènes codant pour les récepteurs mu (MOR), delta (DOR) et kappa (KOR) ont été clonés (Kieffer, BL 1995). En conditions physiologiques, ces récepteurs lient plusieurs ligands peptidiques endogènes issus de trois précurseurs, la pro-opiomélanocortine, la préproenképhaline et la prodynorphine (Akil, H et al. 1997). Ces récepteurs et leurs ligands constituent un système neuromodulateur, le système opioïde, qui joue un rôle majeur au niveau central notamment dans la perception de la douleur (Dickenson, AH 1991), mais également dans la réponse au stress (Akil, H et al. 1984; Kreek, MJ 1996) et le contrôle des voies de récompense et de renforcement des comportements (Koob, GF 1992; Nestler, EJ et al. 1997). Son action s'étend également au niveau périphérique où il est par exemple impliqué dans la réduction du péristaltisme et de la sécrétion hydrique gastro-intestinale.

La morphine est à l'heure actuelle l'analgésique le plus efficace qui soit mis à la disposition du médecin pour traiter les douleurs sévères. Cependant, l'administration de morphine n'est pas anodine et s'accompagne de nombreux effets secondaires indésirables (dépression respiratoire, constipation, nausées et vomissements, troubles de l'humeur et de la locomotion) (Shug, SA et al. 1992). Les traitements prolongés avec des opioïdes telle que la morphine, conduisent également à l'apparition des phénomènes adaptatifs que sont la tolérance et la dépendance. La tolérance se traduit par la nécessité d'augmenter les doses pour maintenir l'effet analgésique (Mayer, DJ et al. 1999). La dépendance se caractérise quant à elle par une consommation compulsive de la drogue, une incapacité à en limiter la prise ainsi que par une détresse psychologique et des douleurs physiques lors de l'arrêt de l'administration de la substance (Nestler, EJ et al. 1993). Bien que les mécanismes moléculaires qui sous-tendent le développement de la tolérance et de la dépendance sont à l'heure actuelle encore mal compris, la désensibilisation et la régulation du trafic intracellulaire des récepteurs aux opioïdes représentent des événements clés de ces phénomènes. La découverte de nouveaux partenaires d'interactions des récepteurs aux opioïdes devrait ainsi ouvrir de nouveaux champs d'investigation.

C'est dans ce contexte que le criblage par double hybride chez la levure d'une banque d'ADNc de cellules SHSY-5Y à l'aide de l'extrémité carboxyl-terminale du récepteur DOR avait été entrepris au laboratoire afin d'identifier de nouveaux partenaires d'interaction de ce récepteur et que la nouvelle protéine GASP-1 avait été identifiée (Simonin, F et al. 2004). Des études préliminaires réalisées *in vitro* montrèrent que GASP-1 interagissait également avec

d'autres RCPG appartenant aux familles 1 et 2. De plus, des recherches d'homologie de séquence permirent de mettre en avant l'existence de neuf protéines présentant de fortes identités de séquence avec GASP-1. Dans l'ensemble, ces résultats suggéraient l'existence d'une famille de protéines GASP qui pourraient être impliquées dans la régulation de l'activité de nombreux RCPG.

Dans le but de confirmer l'existence de la famille GASP, nous avons entrepris de cloner les différentes protéines qui la constituent et d'évaluer *in vitro* dans des essais de *GST-pull down* leur capacité à interagir avec une collection de 14 domaines carboxyl-terminaux de récepteurs. Afin d'identifier au sein des domaines carboxyl-terminaux des récepteurs ainsi qu'au sein de la séquence des GASP les déterminants structuraux qui sont importants pour cette interaction, nous avons mené des expériences de mutagenèse et de mutagenèse dirigée sur les récepteurs et les GASP. Nous avons ainsi pu identifier un nouveau motif d'interaction protéine-protéine que l'on ne trouve présent que chez les protéines GASP. À partir de ce motif nous avons développé un petit peptide capable d'inhiber l'interaction entre les GASP et les récepteurs.

II.1.1.1. Les GASP interagissent *in vitro* avec le domaine carboxyl-terminal des récepteurs couplés aux protéines G

II.1.1.1.1. Choix des récepteurs testés

GASP-1 a été identifié en double hybride chez la levure pour sa capacité à interagir avec le domaine carboxyl-terminal du récepteur DOR. Cette interaction avec DOR a, dans un premier temps, été confirmée en *GST-pull down* puis étendue aux domaines carboxyl-terminaux des deux autres récepteurs aux opioïdes MOR et KOR ainsi qu'à celui du récepteur ORL₁, structuralement très proche des récepteurs aux opioïdes. Ces résultats ont motivé le choix de tester la capacité de GASP-1 à interagir avec d'autres RCPG. Pour cela, nous avons plus particulièrement sélectionné des récepteurs issus de la famille 1 qui représentent 90% de l'ensemble des RCPG (Fredriksson, R et al. 2003) et dont font parti les récepteurs DOR, MOR, KOR et ORL₁. Notre choix a été guidé par la volonté de comparer des récepteurs différents aussi bien au niveau de la séquence de leur domaine carboxyl-terminal qu'au niveau de leur mode de couplage avec les protéines G. Nous avons également ajouté à cette

collection le domaine carboxyl-terminal du récepteur à la calcitonine (CALCR). Ce récepteur est issu de la famille 2 des récepteurs à hormones peptidiques et ne présente pas d'homologie de séquence avec les domaines carboxyl-terminaux des récepteurs de la famille 1. Les domaines carboxyl-terminaux ont été définis en incluant le motif NPXXY qui termine le 7^{ème} domaine transmembranaire des récepteurs de la famille 1. Il a notamment été montré que ce motif caractéristique des récepteurs de la famille 1 a un effet structurant sur la portion proximale de l'extrémité carboxyl-terminale du récepteur PAR_I via des liaisons hydrogènes (Swift, S et al. 2006).

Cette collection a également été complétée par trois autres récepteurs, un RCPG atypique issu de la famille des récepteurs Frizzled/Smoothed (FZ₄) ainsi que deux récepteurs à un domaine transmembranaire (TβR_{III} et IGF_I). Les récepteurs Frizzled ont été identifiés chez la drosophile où ils sont activés par des glycoprotéines de la famille Wnt et jouent un rôle important dans le développement. Ces récepteurs partagent un grand nombre de caractéristiques communes avec les RCPG à savoir, une structure à 7 domaines transmembranaires, un domaine amino-terminal glycosylé et un domaine carboxyl-terminal possédant des sites de phosphorylation. Bien que le mode canonique de transduction du signal passe par le recrutement de la phosphoprotéine Dishvelled qui conduit à terme à la régulation de l'expression de gènes, des études ont montré que les récepteurs Frizzled sont également capables de se coupler aux protéines G (Wang, HY et al. 2004) ce qui suggère que ces récepteurs constitueraient une nouvelle famille de RCPG. La décision d'incorporer le récepteur FZ₄ dans la collection de domaines carboxyl-terminaux qui serait testée pour l'interaction avec les GASP a été motivée par une étude montrant que l'activation de ce récepteur par son ligand Wnt5A conduit au recrutement de la β-arrestine2 qui provoque son internalisation (Chen, W et al. 2003). En effet, étant donné le rôle proposé pour GASP-1 dans la régulation du trafic intracellulaire des RCPG, il nous est apparu important de tester le récepteur FZ₄.

Enfin, les domaines carboxyl-terminaux des récepteurs TβR_{III} et IGF_I ont également été inclus dans cette étude. Ces récepteurs ne font pas partie de la famille des RCPG mais de la famille des récepteurs d'hormones à un domaine transmembranaire. Le récepteur TβR_{III} fait partie de la famille des récepteurs aux *transforming growth factors* composée de TβR_I, TβR_{II} et TβR_{III} qui s'associent pour former des hétéromères fonctionnels qui vont phosphoryler le facteur de transcription Smad et ainsi réguler l'expression des gènes. Il a ainsi été montré que le domaine cytoplasmique de TβR_{III} était phosphorylé par TβR_{II} ce qui conduit au recrutement

de la β -arrestine2 et à l'internalisation du récepteur (Chen, W et al. 2003). De la même manière, la β -arrestine a été impliquée dans la régulation de l'internalisation du récepteur IGF_I de l'*insulin growth factor I* par la voie des vésicules à clathrine et dans la modulation de son activité mitogène (Lin, FT et al. 1998). Ces résultats suggèrent que l'activité des récepteurs à un domaine transmembranaire puisse être régulée par des partenaires d'interaction cytoplasmiques impliqués dans la régulation de l'activité des RCPG, tels que les GASP, c'est pourquoi les domaines carboxyl-terminaux de ces deux récepteurs ont été clonés et inclus dans notre collection.

Les récepteurs qui ont été sélectionnés, la taille de leur domaine carboxyl-terminal et leur mode de couplage sont répertoriés dans le Tableau II.1.1.

Récepteur	Abréviation	Taille du domaine NPXXY-Cter (AA)	Couplage
aux opioïdes delta	DOR	59	Gi
aux opioïdes mu	MOR	67	Gi
aux opioïdes kappa	KOR	55	Gi
de type opioïde 1	ORL ₁	56	Gi
à l'acétylcholine muscarinique m1	M ₁	47	Gq
à l'acétylcholine muscarinique m2	M ₂	31	Gi
à l'adrénaline beta 1	β_1 AR	97	Gs
à la calcitonine	CALCR	94	Gq/Gs
à la sérotonine type 7	5HT ₇	66	Gs
à l'histamine type 2	H ₂	66	Gs
au thromboxane A ₂ alpha	TXA ₂	40	Gq
frizzled type 4	FZ ₄	45	?
au <i>transforming growth factor beta</i> type III	T β R _{III}	45	n.a
à l' <i>insulin-like growth factor I</i>	IGF _I	100	n.a

Tableau II.1.1. Collection des domaines carboxyl-terminaux de récepteurs testés pour leur capacité à interagir avec les GASP.

La taille du domaine carboxyl-terminal étendu au motif NPXXY de la fin de la 7^{ème} hélice transmembranaire est indiquée en nombre d'acides aminés. (n.a : non applicable).

La qualité des protéines de fusion produites dans *E. Coli* a été contrôlée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide après purification par chromatographie d'affinité sur résine glutathion-sépharose. La plupart des protéines montrent une bande majoritaire à la taille attendue. Les autres bandes présentes correspondent à des formes partiellement dégradées (Figure II.1.1). Dans tous les essais, la même quantité de protéine de fusion complète a été mise en jeu.

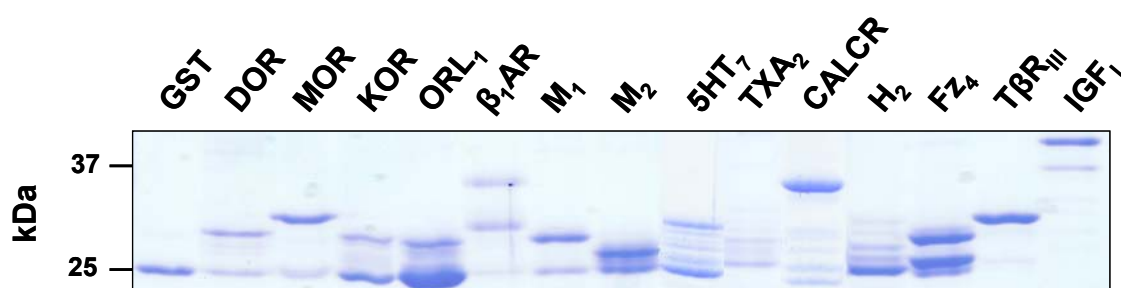


Figure II.1.1. Analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide coloré au bleu de Coomassie des domaines carboxyl-terminaux de récepteur fusionnés à la GST.

La bande supérieure correspond à la protéine de fusion complète, les autres bandes sont des produits de dégradation.

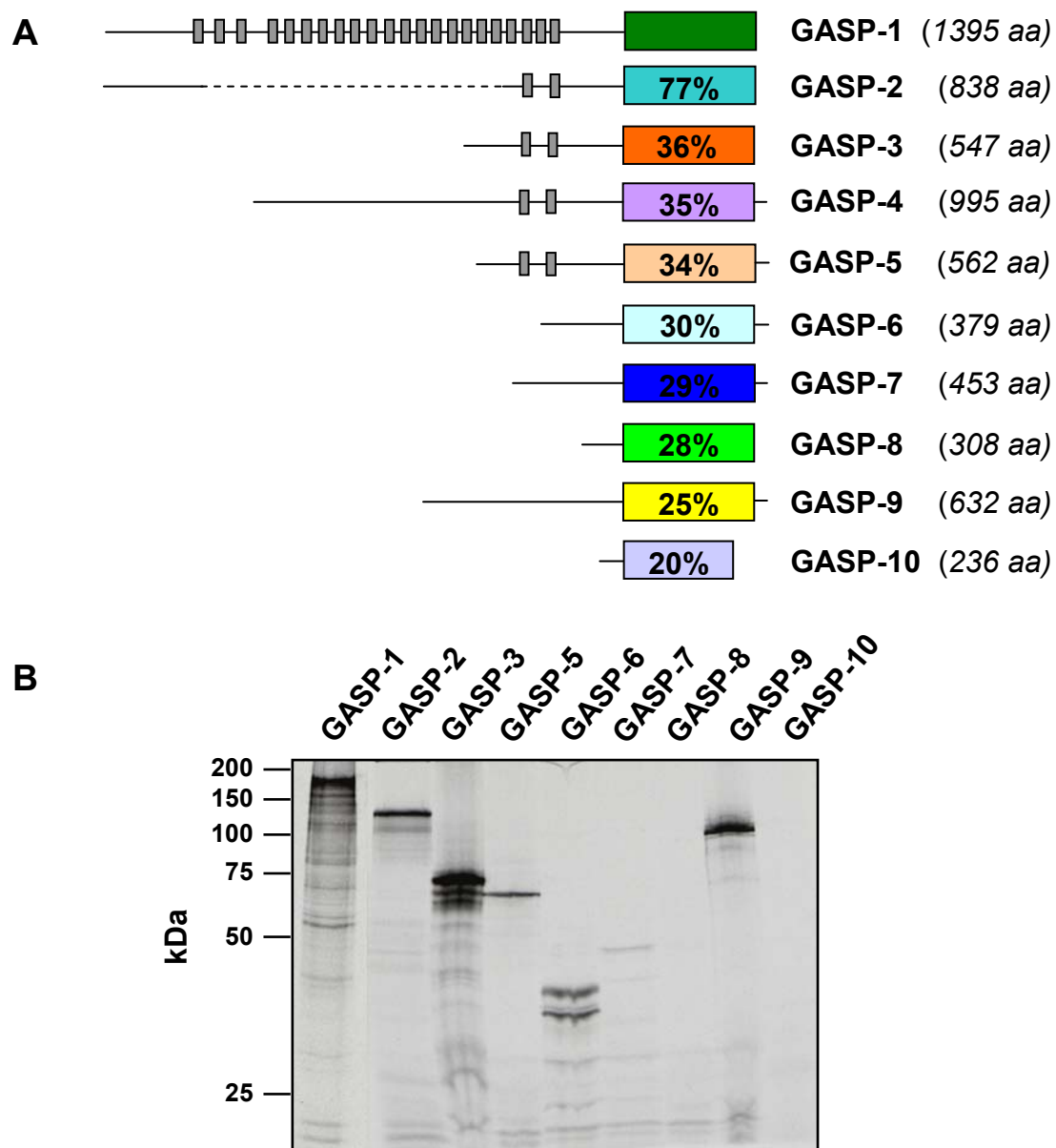


Figure II.1.2. La famille des protéines GASP.

Représentation schématique des 10 membres de la famille. Les boîtes de couleurs représentent le domaine carboxyl-terminal conservé au sein de la famille, le pourcentage d'identité par rapport à GASP-1 indiqué dans les boîtes. Les petites boîtes grises représentent un motif conservé de 15 acides aminés répété chez les 5 premiers membres de la famille (**A**). Analyse sur gel de l'expression *in vitro* des protéines GASP marquées à la méthionine- ^{35}S . La bande supérieure majoritaire correspond à la protéine GASP complète et les bandes minoritaires inférieures correspondent à des protéines incomplètes ou résultant de « starts » alternatifs (**B**).

II.1.1.1.2. Choix des protéines GASP étudiées

Les protéines GASP, excepté GASP-4 dont la séquence codante complète n'est à l'heure actuelle pas clairement définie, ont été sous-clonées dans le vecteur d'expression pcDNA3.1 afin de permettre leur expression *in vitro* en présence de méthionine [³⁵S] à l'aide du système de transcription/traduction TNT décrit plus en détail dans le chapitre IV.3 page 179. L'analyse sur gel des protéines radiomarquées ainsi produites est représentée sur la Figure II.1.2. La protéine GASP-1 a un poids moléculaire théorique de 157 kDa alors que son poids moléculaire apparent est de 190 kDa lorsque la protéine est migrée en condition dénaturante sur gel SDS-PAGE en tampon Tris-HCl (170 kDa en tampon MOPS). Ce type de différence entre poids moléculaire théorique et apparent n'est pas inhabituel (exemple de la TBP (*TATA-binding protein*) (Peterson, MG et al. 1990)). Les poids moléculaires apparents des autres protéines GASP sont également légèrement supérieures à leur poids moléculaires théoriques ce qui est probablement dû à un potentiel hydrogène isoélectrique (pHi) bas en raison de la présence de nombreux groupements acides. Néanmoins deux protéines n'ont pas été produites de façon satisfaisante. GASP-8 et GASP-10 présentent un rendement de production très nettement inférieur aux autres GASP. Le promoteur Sp6, employé pour initier la transcription des séquences codant pour ces deux protéines, a été remplacé au profit d'un promoteur T7 plus fort en sous-clonant les ADNc dans un nouveau vecteur d'expression eucaryote. Cependant, les rendements de production de GASP-8 et GASP-10 n'ont pas pu être améliorés de façon significative, rendant techniquement difficile la réalisation d'expériences de *GST-pull down* avec ces deux protéines. Nous nous sommes donc limités à l'étude des GASP-1, -2, -3, -5, -6, -7 et -9.

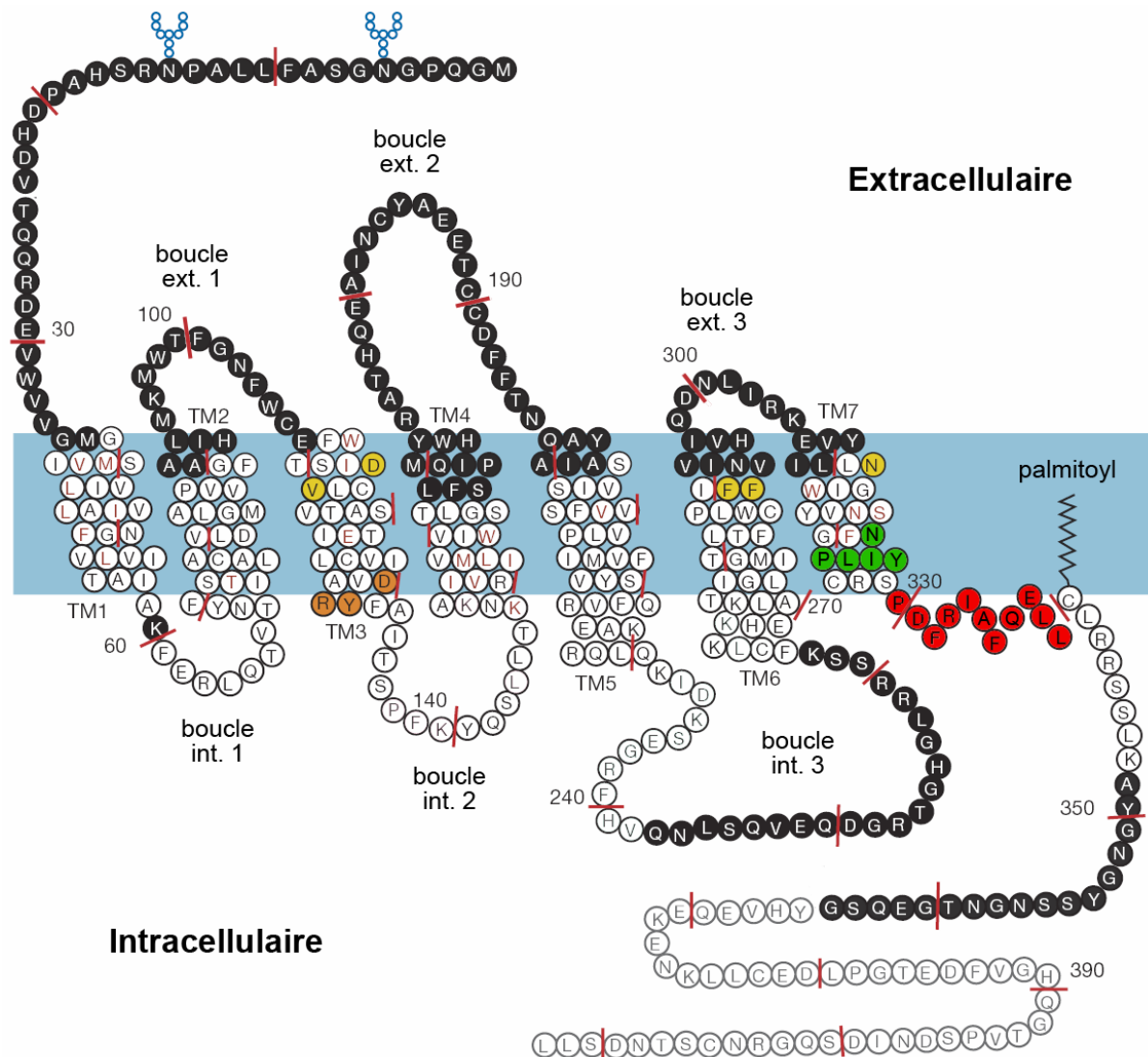


Figure II.1.3. Représentation de la séquence du récepteur β_2 AR.

Le motif NPXXY est représenté en vert. L'hélice 8 est indiquée en rouge. En noir sont représentés les séquences de fort désordre conformationnel, en jaune les acides aminés constituant le site de liaison du ligand et en orange le motif conservé DRY. Abréviation : TM, domaine transmembranaire.

II.1.1.2. Justification de l'étude de l'hélice 8 des RCPG et de son rôle potentiel dans l'interaction avec les GASP

GASP-1 interagit avec une large palette de domaines carboxyl-terminaux de RCPG issus des familles 1 et 2. Ceci laisse supposer que tous ces récepteurs doivent probablement posséder un déterminant commun qui serait reconnu par GASP-1 et qui favoriserait ces interactions. Parmi les différents domaines carboxyl-terminaux de récepteur interagissant avec les GASP, on distingue deux domaines courts qui sont ceux des récepteurs M_2 et TXA_2 composés de 31 et 40 acides aminés respectivement. Ceci suggère que la portion proximale du domaine carboxyl-terminal des récepteurs joue un rôle important dans la liaison des GASP. Par ailleurs, chez les RCPG de la famille 1, cette portion se caractérise notamment par la présence d'une séquence d'une dizaine d'acides aminés environ qui se replie en une structure secondaire de type hélice α que l'on appelle hélice 8. Cette hélice 8 pourrait ainsi constituer un déterminant important pour l'interaction des RCPG avec les GASP.

Bien que l'hélice 8 ait été décrite uniquement chez le récepteur de la rhodopsine, qui est le seul RCPG dont la structure cristallographique complète ait été résolue à l'heure actuelle, les prédictions de structure tridimensionnelle semblent indiquer que ce repliement en hélice α soit commun à l'ensemble des RCPG de la famille 1 (Palczewski, K et al. 2000). De plus, de nombreux travaux ont tenté de déterminer si d'autres RCPG possèdent la même topologie au niveau de leur domaine carboxyl-terminal. Plusieurs peptides synthétiques correspondant à la séquence putative de l'hélice 8 de différents récepteurs ont été étudiés par dichroïsme circulaire (DC) et résonance magnétique nucléaire (RMN), et ont effectivement démontrés une capacité à se structurer en hélice α . Le fragment synthétique correspondant aux acides aminés 300 à 320 du récepteur AT_{1A} à l'angiotensine II se structure en hélice α qui forme des agrégats solubles en solution aqueuse ou des monomères en présence de solvant organique (Franzoni, L et al. 1997). Plusieurs exemples montrent une propriété des extrémités carboxyl-terminales des récepteurs à former des hélices α en présence de détergents ou de phospholipides. C'est le cas du fragment correspondant aux acides aminés 324 à 357 du récepteur β_2AR en présence de dodécyl-phosphocholine ou de diméthyl-sulfoxyde (Katragadda, M et al. 2004) et du fragment correspondant aux acides aminés 401 à 417 du récepteur CB_1 aux cannabinoïdes en présence de dodécyl-sulfate de sodium ou de dipalmitoyl-phosphatidyl-glycérol (Mukhopadhyay, S et al. 1999).

L'hélice 8 est une séquence d'une dizaine d'acides aminés environ qui est rattachée à

la 7^{ème} hélice transmembranaire par son extrémité amino-terminale et à une (ou deux) cystéine(s) palmitoylée(s) insérée(s) dans la membrane cytoplasmique par son extrémité carboxyl-terminale (O'Dowd, BF et al. 1989). Ancrée par ses deux extrémités, elle se dispose parallèlement à la face interne de la membrane cytoplasmique et présente un côté hydrophobe dirigé vers la membrane et un côté hydrophile constitué de résidus chargés dirigé vers le cytoplasme (Figure II.1.3). Chez le récepteur de la rhodopsine, l'hélice 8 est impliquée dans le couplage et l'activation de la transducine (Konig, B et al. 1989; Franke, RR et al. 1990). Mais l'analyse du rôle de l'hélice 8 dans d'autres RCPG a révélé d'autres fonctions pour ce domaine. L'hélice 8 est impliquée dans l'expression à la membrane cytoplasmique des récepteurs *melanin concentrating hormone-1* (Tetsuka, M et al. 2004) et β_1 AR (Delos Santos, NM et al. 2006). Les résidus hydrophiles de l'hélice 8 putative des récepteurs à la bradykinine de type 2, à l'ocytocine, à l'angiotensine II de type 1A et β_1 AR sont impliqués dans le couplage à leur protéine G (Sano, T et al. 1997; Zhong, M et al. 2004; Faussner, A et al. 2005; Delos Santos, NM et al. 2006). Enfin, l'hélice 8 putative du récepteur à la bradykinine de type 2 est impliqué dans son internalisation (Faussner, A et al. 2005).

Ces observations nous ont amené à entreprendre des études de mutagenèse afin de déterminer si l'hélice 8 est impliquée dans la liaison entre le domaine carboxyl-terminal des RCPG et les GASP. Dans un premier temps nous avons réalisé des expériences de *GST-pull down* avec GASP-1 marqué à la méthionine [³⁵S] et l'extrémité carboxyl-terminale de DOR en fusion avec la GST ainsi que les fusions GST du mutant DOR 314-333, qui ne comprend que la portion du domaine carboxyl-terminal de DOR correspondant à l'hélice 8 dans la structure de la rhodopsine, et du mutant DOR 331-372, qui ne possède pas l'hélice 8. Dans un deuxième temps, nous avons réalisé un alignement de séquence de la partie proximale du domaine carboxyl-terminal de la rhodopsine et des RCPG pour lesquels nous avons préalablement montré une interaction avec GASP-1 en *GST-pull down*. Au sein de la séquence correspondant à l'hélice 8 de la rhodopsine, deux acides aminés, l'un hydrophobe (le plus souvent la phénylalanine) et l'autre basique (la lysine ou l'arginine), sont fortement conservés dans toutes les extrémités carboxyl-terminales des RCPG. Ceci suggère un rôle important pour ces deux résidus dans l'interaction avec GASP-1. Nous avons donc décidé de réaliser des mutants ponctuels de ces deux acides aminés dans l'extrémité carboxyl-terminale de DOR ainsi que dans celle de β_1 AR pour lequel nous avons montré précédemment une forte interaction avec GASP-1. Les constructions suivantes ont été testées en *GST-pull down* avec GASP-1 [³⁵S] : la partie carboxyl-terminale de DOR, soit doublement mutée (DOR

FK/AA), soit mutée ponctuellement (DOR F/A et DOR K/A) et la partie carboxyl-terminale du récepteur β_1 AR doublement mutée (β_1 AR FR/AA).

II.1.1.3. Caractérisation d'un nouveau motif GASP d'interaction protéine-protéine

Dans la continuité de l'étude visant à identifier les déterminants structuraux importants pour l'interaction de l'extrémité carboxyl-terminale des RCPG avec les GASP et après avoir évalué le rôle de l'hélice 8 des RCPG, nous avons cherché à identifier chez les GASP les déterminants impliqués dans cette interaction. Pour cela, nous avons réalisé divers mutants tronqués de GASP-1 et de GASP-2 ainsi que des mutants ponctuels de GASP-2 qui ont été marqués à la méthionine [35 S] et dont l'interaction avec plusieurs domaines carboxyl-terminaux de RCPG a été évaluée en *GST-pull down*.

II.1.1.3.1. Choix des mutants tronqués de GASP-1

Ces mutants tronqués de GASP-1 ont été définis sur la base d'alignements de séquence réalisés entre les GASP. En effet, ces alignements de séquence ont mis en évidence la présence d'un domaine carboxyl-terminal de 250 acides aminés fortement conservé au sein de la famille des protéines GASP avec des identités de séquence allant de 20 à 77% par rapport au domaine de GASP-1. Pour les protéines GASP-1 à -5, l'homologie de séquence recouvre une région plus importante et on retrouve notamment dans la partie centrale de ces protéines la présence d'un motif conservé de 15 acides aminés qui est répété 22 fois chez GASP-1 et deux fois chez les GASP-2 à -5. La protéine GASP-1 possède donc deux domaines distincts avec d'une part un domaine carboxyl-terminal conservé de 250 acides aminés et d'autre part un domaine central de 650 acides aminés contenant un motif répété 22 fois, ces deux domaines étant séparés d'environ 200 acides aminés. Dans un premier temps, afin d'évaluer le rôle de ces deux domaines, nous avons réalisé trois mutants tronqués de GASP-1 représentés dans la Figure II.1.3 : un mutant où nous avons éliminé toute l'extrémité aminoterminal de GASP-1 jusqu'au domaine central (GASP1 380-1395), un mutant correspondant au domaine carboxyl-terminal (GASP1 1025-1395) et un mutant correspondant au domaine central avec ses motifs répétés (GASP1 380-1070).

Dans un deuxième temps, afin de préciser plus avant les rôles respectifs de chacun de ces deux domaines, d'autres mutants de GASP-1 ont été réalisés. Ainsi, le clone qui avait été

identifié en double hybride chez la levure à l'aide de l'extrémité carboxyl-terminale de DOR code pour une protéine correspondant aux acides aminés 924 à 1395 de la séquence de GASP-1 et il avait été montré précédemment que cette forme tronquée de GASP-1 présente des niveaux d'interaction avec les récepteurs aux opioïdes qui sont équivalents à ceux détectés pour la protéine GASP-1 complète (Simonin, F et al. 2004). Cette forme tronquée de GASP-1 comprend le domaine carboxyl-terminal et deux des 22 motifs conservés de GASP-1 qui pourraient ainsi jouer un rôle dans l'interaction avec les RCPG. Afin d'évaluer ce rôle nous avons utilisé le mutant 924-1395 et nous avons réalisé le mutant 975-1395 qui correspond au domaine carboxyl-terminal plus le dernier motif répété de GASP-1. Par ailleurs, afin de déterminer la taille minimum du domaine carboxyl-terminal de GASP-1 nécessaire à l'interaction avec les RCPG, deux autres mutants ont été réalisés : le mutant 924-1350 dont les 45 derniers acides aminés du domaine carboxyl-terminal ont été rognés et le mutant 925-1300 dont les 95 derniers acides aminés ont été rognés.

Ces différents mutants sont représentés dans la Figure II.1.3. Leur interaction avec le domaine carboxyl-terminal des récepteurs DOR, β_1 AR et M_1 fusionné à la GST a été évaluée en *GST-pull down*.

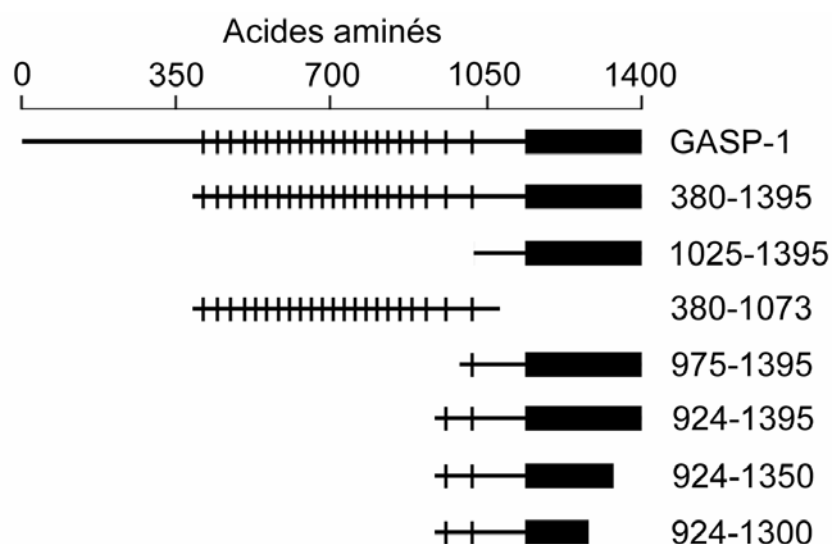


Figure II.1.4. Représentation schématique des mutants tronqués de GASP-1 qui sont décrits dans ce chapitre.

Le rectangle noir représente le domaine carboxyl-terminal conservé de 250 acides aminés et les traits verticaux représentent le motif conservé présent 22 fois chez GASP-1.

II.1.1.3.2. Mutagenèse dirigée des deux motifs conservés de GASP-2

La famille GASP est caractérisée par la présence d'un motif conservé de 15 acides aminés qui est répété 22 fois chez GASP-1 et deux fois chez GASP-2, -3, -4 et -5. Par ailleurs, GASP-1, -2 et -3 interagissent plus fortement avec la collection de domaines carboxyl-terminaux de RCPG que GASP-6, -7 et -9 qui sont dépourvus de ce motif. Ces informations suggèrent fortement que ce motif joue un rôle déterminant dans la liaison entre les GASP et les RCPG. Afin d'étudier cette hypothèse, nous avons choisi de réaliser des expériences de mutagenèse dirigée sur GASP-2 qui ne comporte que 2 motifs répétés contre 22 chez GASP-1 et qui interagit fortement avec la plupart des récepteurs interagissant avec GASP-1. Nous avons pour cela réalisé trois mutants ponctuels, deux mutants simples dans lesquels un seul motif a été muté et un mutant double dans lequel les deux motifs ont été mutés. La mutation a été réalisée en substituant par 4 alanines les 4 acides aminés SWFW fortement conservés qui constituent le cœur de ces motifs. L'interaction de ces trois mutants avec le domaine carboxyl-terminal des récepteurs β_1 AR, M_1 et CALCR a été évaluée en *GST-pull down*.

II.1.1.3.3. Un peptide dérivé du motif GASP peut-il inhiber l'interaction entre les RCPG et les GASP ?

Nous avons défini à partir du motif GASP un petit peptide synthétique afin de prévenir l'interaction entre les RCPG et les GASP. Ce peptide, que nous nommerons peptide GASP, correspond au premier motif conservé de GASP-2 additionné des 8 résidus se trouvant en amont de cette séquence et d'un résidu se trouvant en aval. En raison de la présence de plusieurs résidus acides, le motif GASP de 15 acides aminés présente un pH isoélectrique (pHi) bas qui peut rendre sa synthèse délicate, c'est pourquoi nous avons choisi d'étendre cette séquence afin d'incorporer des résidus basiques qui équilibrent le pHi. Un peptide témoin négatif a également été défini en mélangeant au hasard la séquence du peptide GASP. Ce témoin permet de s'assurer que l'effet de compétition est spécifique au peptide GASP et à sa séquence en acides aminés.

Dans un premier temps, ces deux peptides ont été testés dans des essais de compétition en *GST-pull down* avec GASP-2 marqué à la méthionine [35 S] et le domaine carboxyl-terminal de β_1 AR fusionné à la GST. Des concentrations croissantes de peptide ont été employées afin de montrer un effet dose sur l'inhibition de l'interaction entre GASP-2 et

β_1 AR. Puis des essais de compétition avec une concentration fixe de 150 μ M de peptide ont été réalisés avec GASP-1, -2 et -7 marqués à la méthionine [35 S] et le domaine carboxyl-terminal des récepteurs β_1 AR, M_1 , CALCR, TXA_2 et DOR fusionné à la GST.

II.1.2. Résumé des résultats

L'ensemble des résultats obtenus lors de l'étude *in vitro* de l'interaction des protéines de la famille GASP avec le domaine carboxyl-terminal des RCPG sont exposés en détails dans les publications n°1 et 2. Un résumé des principaux résultats est présenté ci-dessous :

Les GASP interagissent *in vitro* avec le domaine carboxyl-terminal des récepteurs couplés aux protéines G.

- Tous les GASP étudiés présentent une interaction significative avec de nombreux récepteurs, excepté les récepteurs à activité tyrosyl-kinase $T\beta R_{III}$ et IGF_1 qui n'interagissent pas avec les GASP.
- Tous GASP confondus, les meilleurs partenaires d'interaction sont les récepteurs β_1 AR, TXA_2 et CALCR mais également M_1 et de façon plus surprenante FZ_4 .
- Les GASP étudiés peuvent être subdivisés en deux catégories selon leur profil d'interaction avec les RCPG. Ainsi GASP-1, -2 et -3 interagissent fortement avec les domaines carboxyl-terminaux des RCPG alors que GASP-6, -7 et -9 interagissent modérément à faiblement.

L'hélice 8 des RCPG joue un rôle important dans l'interaction avec les GASP.

- La portion proximale du domaine carboxyl-terminal de DOR contenant la séquence correspondant à l'hélice 8 de la rhodopsine (DOR 314-333) est suffisante pour promouvoir l'interaction avec GASP-1 alors que le domaine carboxyl-terminal de DOR privé de cette portion (DOR 331-372) n'interagit pas avec GASP-1.
- L'interaction du domaine carboxyl-terminal des récepteurs DOR et β_1 AR avec GASP-1 est affectée par la mutation des deux résidus conservés au sein de l'hélice 8 putative. Les doubles mutants montrent un effondrement de $77 \pm 3\%$ et $90 \pm 2\%$ (respectivement DOR FK/AA et β_1 AR FR/AA) de la liaison avec GASP-1 [35 S] par rapport aux séquences sauvages. Par ailleurs, les deux mutants ponctuels de DOR

présentent également une diminution de $69 \pm 9\%$ et $53 \pm 15\%$ (respectivement DOR F/A et DOR K/A) par rapport au type sauvage.

Le motif répété et conservé des GASP joue un rôle critique dans l'interaction avec les RCPG et un peptide dérivé de ce motif est capable d'inhiber cette interaction.

- Le domaine central de GASP-1 joue un rôle important dans l'interaction avec l'extrémité carboxyl-terminale des récepteurs DOR, β_1 AR et M_1 . À l'opposé, le domaine carboxyl-terminal conservé de GASP-1 semble uniquement impliqué dans l'interaction avec le récepteur DOR. L'interaction de GASP-1 avec DOR nécessite à la fois la présence d'un domaine carboxyl-terminal entier, exception faite des 45 derniers acides aminés qui représentent la portion la moins conservée du domaine, et au moins 2 des 22 motifs répétés du domaine central (Figure II.1.5).
- Les deux motifs conservés de GASP-2 jouent un rôle déterminant dans l'interaction avec les récepteurs β_1 AR, M_1 et CALCR. La mutation d'un des deux motifs conduit à une baisse significative de l'interaction avec le domaine carboxyl-terminal des récepteurs β_1 AR et M_1 mais pas CALCR. La mutation des deux motifs provoque la perte quasi totale de l'interaction avec β_1 AR et M_1 et la diminution significative de l'interaction avec CALCR.
- Le peptide GASP inhibe l'interaction entre GASP-2 et le domaine carboxyl-terminal de β_1 AR de façon dose dépendante avec un effet maximum à 500 μ M de peptide. Le peptide témoin quant à lui ne présente aucun effet inhibiteur sur cette interaction quelque soit la concentration utilisée (Figure II.1.6). Le peptide GASP est capable de prévenir efficacement l'interaction de GASP-1, -2 et -7 avec leurs partenaires d'interaction les plus forts à savoir β_1 AR, M_1 , CALCR, TXA_2 . Le peptide GASP prévient également l'interaction de GASP-1 avec DOR (Figure II.1.7).

La figure II.1.5 fait la synthèse des essais portant sur les mutants tronqués de GASP-1. La figure II.1.6 complète les résultats de compétition réalisés en présence d'une dose croissante de peptide GASP qui sont présentés dans la publication n°2. La figure II.1.7 reprend de manière plus détaillée les essais de compétition avec GASP-1, -2 et -7 et les récepteurs β_1 AR, M_1 , CALCR, TXA_2 et DOR exposés dans la publication n°2.

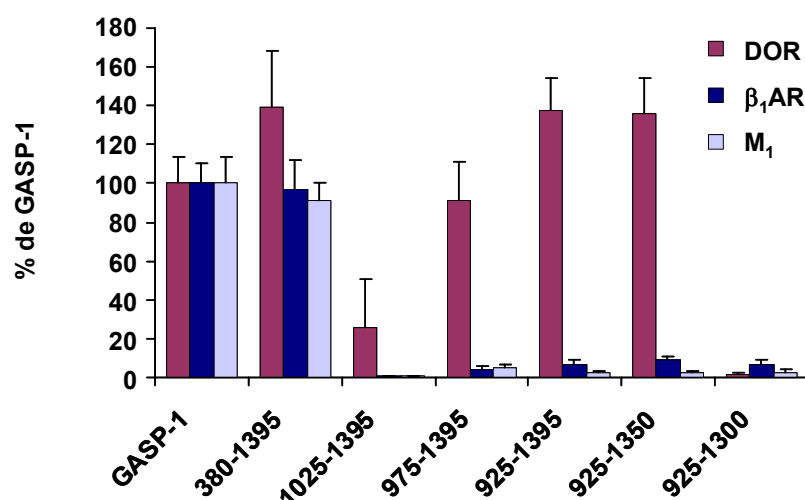


Figure II.1.5. Interaction entre les mutants tronqués de GASP-1 et les domaines carboxyl-terminaux des récepteurs DOR, β₁AR et M₁.

Les formes tronquées de GASP-1 sont marquées à la méthionine-[³⁵S] et les domaines carboxyl-terminaux des RCPG sont fusionnés à la GST. Pour chaque récepteur l'interaction avec les différentes formes tronquées est exprimée en pourcentage de l'interaction mesurée pour la forme complète de GASP-1.

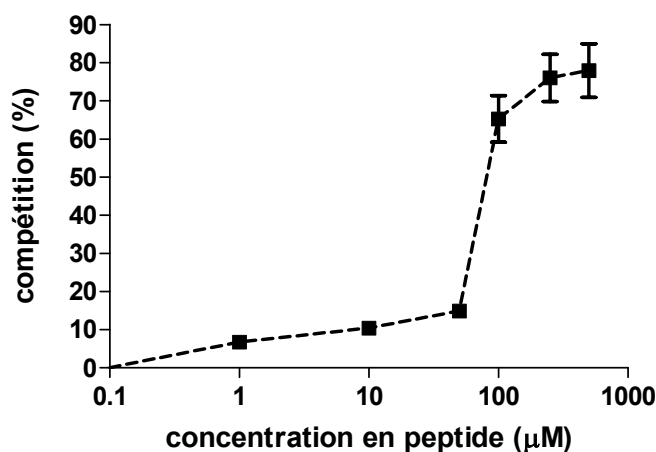


Figure II.1.6. Compétition entre le peptide GASP et la protéine GASP-2 pour la liaison du domaine carboxyl-terminal de β₁AR.

La concentration de peptide employée est représentée en abscisse. Les résultats de compétition sont représentés en pourcentage de protéine GASP-2 déplacée par le peptide GASP.

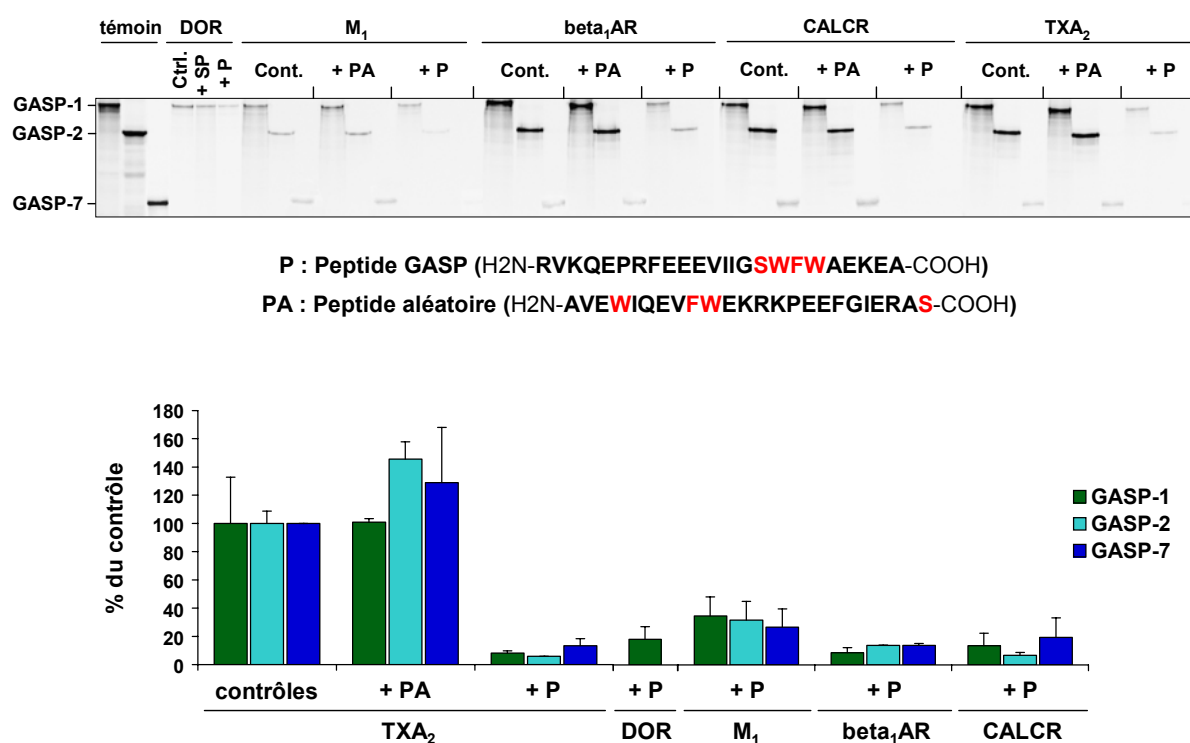


Figure II.1.7. Interaction entre GASP-1, -2 et -7 et les récepteurs β_1 AR, M_1 , CALCR, TXA_2 et DOR en présence et en absence de 150 μ M de peptide GASP.

L'autoradiographie représente les GASP-1, -2 et -7 radiomarqués à la méthionine-[35 S] qui sont retenus par les différents domaines carboxyl-terminaux de récepteurs fusionnés à la GST. En dessous se trouve la quantification, au PhosphorImager, de l'intensité des bandes exprimée en pourcentage du contrôle sans peptide. Les contrôles sans peptide (contrôles) et en présence de peptide témoin négatif (+PA) sont montrés uniquement pour le récepteur TXA_2 et sont représentatifs des profils de contrôle obtenus avec les autres récepteurs.

II.1.3. Publications n°1 et 2

Identification of a novel family of G protein-coupled receptor associated sorting proteins

Frederic Simonin, Pascale Karcher, Julien J.-M. Boeuf, Audrey Matifas and Brigitte L. Kieffer

Journal of Neurochemistry, 2004, 89, 766–775

Publication n° 1 : pages [1-10]

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs de l'ULP peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02411.x>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

Identification of a novel protein-protein interaction domain mediating interaction of GASPs with G protein-coupled receptors

Julien Boeuf, Marie-Pierre Candusso and Frédéric Simonin

École Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg, Département Récepteurs et Protéines Membranaires, UMR-7175 / Institut Gilbert Laustriat LC1, CNRS - Université Louis Pasteur, Illkirch, France.

Correspondence and reprint requests should be addressed to Frédéric Simonin, UMR-7175 / LC1, Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg, bld Sébastien Brandt, 67412 Illkirch, France. E-mail: simonin@esbs.u-strasbg.fr

ABSTRACT

Receptor desensitization and down regulation are considered key molecular events underlying the development of tolerance *in vivo*. Recently, we have identified a novel family of proteins, namely GASPs for G protein-coupled receptor (GPCR) associated sorting proteins, which interact with numerous GPCRs. The first member of this family, GASP-1, has been proposed to be involved in the degradation of fast-degrading receptors and this phenomenon has been proposed to represent a molecular basis of analgesic tolerance to cannabinoids. However, little is known about the motifs within GASP-1 which are involved in the interaction with GPCRs. Moreover, except for GASP-1 and GASP-2, which have been shown to interact with several GPCRs, interaction of the other members of the family with GPCRs has not been investigated so far. We hereby present a detailed structure activity relationship analysis of the interaction between GASPs and GPCRs. In addition to GASP-1 and GASP-2, several other members of the GASP family display a significant interaction with GPCRs, demonstrating that GASPs indeed represent a novel family of GPCR-interacting proteins. A small highly conserved motif that we call the “GASP motif” is critical for this interaction, and small peptides derived from it could represent a mean to disrupt the interaction between GASPs and GPCRs.

Keywords: G protein-coupled receptors; G protein-coupled receptor associated sorting protein; protein-protein interaction motif; small protein interaction inhibitor peptide.

INTRODUCTION

G protein-coupled receptors (GPCRs) represent one of the most diversified protein families in humans. The large panel of physiological processes modulated by GPCRs making them unrivalled therapeutic targets for new medicines to be developed. GPCRs translate extracellular stimuli into intracellular signals whose appropriate intensity and duration are guaranteed by complex regulation mechanisms. Internalization, whereby agonist-activated GPCRs are rapidly silenced by their removal from the cell surface to the endocytic compartment, represents a central event in the modulation of receptor activity (Ferguson 2001). Upon internalization, GPCRs can be recycled back to the plasma membrane or degraded. Although the mechanisms that govern their postendocytic fate are not fully understood, several proteins were shown to modulate this phenomenon via a direct interaction with their carboxy-terminal intracellular tail (Cao *et al.* 1999, Li *et al.* 2002, Cong *et al.* 2001, Gullapalli *et al.* 2006). One of these regulatory proteins is GPCR-associated sorting protein 1 (GASP-1), which has been identified in a yeast two-hybrid screen using the δ -opioid receptor C-tail as a bait (Simonin *et al.* 2004, Whistler *et al.* 2002), and has been proposed to be involved in the sorting of receptors that are quickly degraded following their agonist-promoted internalization (Whistler *et al.* 2002). Very recently, this phenomenon has been proposed to represent a molecular basis of analgesic tolerance to cannabinoids (Tappe-Theodor *et al.* 2007). GASP-1 has also been found to interact with numerous other GPCRs both *in vitro* (Simonin *et al.* 2004, Heydorn *et al.* 2004) and *in vivo* (Martini *et al.* 2007, Bartlett *et al.* 2005). Although our previous study has shown that helix 8 within the carboxy-terminal tail of GPCRs is critical for this interaction, little is known about the motifs within GASP-1 which are involved.

GASP-1 is part of a novel protein family of ten members, which were identified by sequence homology searches. The carboxy-terminal 250-amino acids region of GASP-1 displays remarkable sequence identity with the nine other members of the family. Furthermore, *Gasp* genes, except *Gasp-8*, contain a single coding-exon and are located within two 200-kb clusters on two adjacent contigs of the chromosome X, indicating that they arose from a common ancestral gene. Altogether, these data indicate that GASPs do indeed form a protein family and might display similar functions. However, except for GASP-1 and GASP-2, which were shown to interact with the carboxy-terminal tail of several GPCRs, the interaction of the other members of the family with GPCRs has not been investigated so far.

In this study, we present a detailed structure activity relationship analysis of the interaction

between GASPs and GPCRs. We show that in addition to GASP-1 and GASP-2, several other members of the GASP family display significant interaction with GPCRs. Furthermore, using a combination of deletion analysis, site directed mutagenesis and competition experiments, we show that a small highly conserved motif present in GASP-1 to GASP-5, is critical for their interaction with GPCRs, and is responsible for their strong GPCR binding activity. Altogether, our results demonstrate that GASPs represent indeed a novel family of GPCR-interacting proteins that can be divided into two sub-families, depending on the presence of a small conserved motif that we called “GASP motif”. Our data clearly highlight the fact that this motif represents a novel protein-protein interaction motif that is critical for the interaction between GASPs and GPCRs, and that small peptides containing this GASP motif could represent a mean to disrupt this interaction.

MATERIAL AND METHODS

Production of GST-fused receptor carboxy-terminal tails

cDNAs encoding the carboxy-terminal tail (C-tail) of 12 GPCRs and of 2 one-transmembrane receptors, were cloned into the pGEX-2T prokaryotic expression vector (Amersham Biosciences). The following pGEX constructs were engineered: pGEX-DOR encoding residues 314-372 of the δ -opioid receptor (referring to number U10504), pGEX-MOR encoding residues 334-400 of the μ -opioid receptor (referring to number L29301), pGEX-KOR encoding residues 326-380 of the κ -opioid receptor (referring to number U17298), pGEX-ORL₁ encoding residues 315-370 of the opioid receptor-like 1 (referring to number X77130), pGEX-M₁ encoding residues 414-460 of the muscarinic M₁ acetylcholine receptor (referring to number X52068), pGEX-M₂ encoding residues 436-466 of the muscarinic M₂ acetylcholine receptor (referring to number M16404), pGEX- β_1 AR encoding residues 373-477 of the β_1 adrenergic receptor (referring to number J03019), pGEX-CALCR encoding residues 407-490 of the calcitonin receptor (referring to number L00587), pGEX-5HT₇ encoding residues 380-445 of the 5-hydroxytryptamine 7 receptor (referring to number L21195), pGEX-H₂ encoding residues 284-349 of the histamine 2 receptor (referring to number S57565), pGEX-TXA₂ encoding residues 304-343 of the thromboxane A₂ alpha receptor (referring to number D38081), pGEX-FZ₄ encoding residues 493-537 of the frizzled 4 receptor (referring to number AB032417), pGEX-TGF β encoding residues 805-849 of the transforming growth factor β III receptor (referring to number L07594), and pGEX-IGF

encoding residues 1268-1367 of the insulin growth factor I receptor (referring to number X04434). These plasmids were transformed into the E. Coli BL21 strain, and their expression was induced with 1 mM isopropylthiogalactoside (IPTG) for 2 hours. Bacteria were then pelleted, resuspended in PBS, lysed using a cell disintegrator, and lysates were cleared by centrifugation.

[³⁵S]-labelled GASPs *in vitro* production

cDNAs encoding GASP-1 and GASP-2 were cloned into the pcDNA3 eukaryotic expression vector (Invitrogen; (Simonin et al. 2004)). The cDNA encoding GASP-3 was purchased from the Kazusa DNA Research Institute (<http://www.kazusa.or.jp/huge/>) and subcloned into pcDNA3.1. The cDNA encoding GASP-5, -6, -7, and -9, subcloned into pBluescript II SK (+), were purchased from Invitrogen and subcloned into pcDNA3.1. All the clones were controlled by DNA sequencing. The *in vitro* production of [³⁵S]-labelled GASPs was performed by using the TNT Quick-coupled Transcription/Translation T7 kit (Promega) in presence of [³⁵S]-Methionine according to the manufacturer's instructions.

GST-pull down assay

GST-fusion proteins were immobilized on glutathione-sepharose beads (Amersham Biosciences) for 1 h at 4°C and incubated for 1hr at 4°C with gentle rocking with [³⁵S]-labelled *in vitro*-translated GASPs proteins, or their truncated or mutated forms, in ice-cold binding buffer [20 mM TrisHCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10% glycerol and 1% triton X-100]. Beads were washed five times with ice-cold binding buffer, resuspended in 30 µl of sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) sample buffer, incubated for 10 min at 65°C, pelleted for 60 s at 3000 × g and the supernatants were subjected to 10% SDS-PAGE. Gels were stained with Coomassie blue to visualize GST-fusion proteins, dried, and analyzed using a Phosphor-Imager (Personal Molecular Imager FX, Biorad) to visualize [³⁵S]-labelled GASPs. Quantification was performed with the Quantity One software (Biorad).

GASP peptides synthesis

The 24-amino acid peptide derived from the conserved GASP motif and its corresponding scrambled version, were purchased from Genecust. The peptides were synthesized with a purity grade ≥ 80% and quality controlled by RP-HPLC followed by MS analysis.

Competition experiments

Procedure is based on the GST-pull down assay with some additions. GST-fusion proteins and [³⁵S]-labelled GASPs were incubated in presence of the GASP peptide or its corresponding scrambled version. In a first step, the dose-effect of the GASP peptide was assessed in competition experiments for the interaction with GST-β₁AR between [³⁵S]-labelled GASP-2 and a GASP peptide concentration range (1, 10, 50, 100 and 250 μM). Competition experiments were later performed with a unique 150 μM concentration of GASP peptide or its scrambled version.

Data analysis

GST-pull down quantification data were analyzed using GraphPad Prism 4.03 (GraphPad Software). Quantifications presented are means of at least three independent experiments. ANOVA-tests with Dunnett's post tests were performed assuming the equality of the variances and normality of the data distribution. Resulting probability values < 0.05 were considered significant and values < 0.01 were considered very significant.

RESULTS

GASPs form a family of G protein-coupled receptor interacting proteins

In our previous study, we have shown that GASP-1 and GASP-2 interact with the carboxy-terminal domain of several GPCRs. Based on sequences homologies searches, we have identified eight additional members (see (Simonin et al. 2004) and figure 1) of the GASP family. All members display sequence similarities in their carboxy-terminal domain (last 250 amino acids), and the first five members contain a repeated stretch of 15 amino acids outside of this domain (figure 1). Although GASP-1 and GASP-2 have been shown to interact with GPCRs (Whistler et al. 2002, Simonin et al. 2004, Heydorn et al. 2004), there is no experimental evidence showing that the other members of the GASP family also interact with GPCRs. In order to examine this possibility we decided to perform GST-pull down experiments with radiolabelled GASP-1, -2, -3, -6, -7 and -9 and the carboxy-terminal tail (C-tail) of a subset of 12 GPCRs and of 2 one-transmembrane receptors fused to GST. Equal amounts of radiolabelled GASPs were incubated with saturating concentrations of GST-fused receptor C-tails immobilized on glutathione-sepharose beads. Radiolabelled proteins that were retained by receptor C-tails were then analyzed by SDS-PAGE, and quantified by Phosphor-

Imager analysis. Results presented in figure 2 show that all GASPs tested displayed significant interactions with several GPCRs C-tails, while the 2 one-transmembrane receptor C-tails (TGF β and IGF) did not significantly interact with any GASPs (figure 2A and 2B). Each GASP showed a different interaction profile. We distinguished two GASP subfamilies depending on their level of interaction. The first subfamily, including GASP-1 to GASP-3, displayed strong interaction with most GPCRs C-tails tested (figure 2A). The best GPCR interacting partners were the β_1 adrenergic receptor (β_1 -AR), the calcitonin receptor (CALCR) and the thromboxane A₂ receptor (TXA₂), which retained 30% up to 50% of the GASPs input. Interestingly, the atypical Frizzled 4 receptor (FZ₄) was a good interacting partner too, especially for GASP-1 and GASP-3, for which about 20% of the radiolabelled GASP input was retained. The other GPCRs displayed medium to low interaction propensities. Amongst them, opioid receptors showed particularly low levels of interaction with GASP-1 to -3, except DOR with GASP-1. The second subfamily, including GASP-6, -7 and -9, showed weak (GASP-7) to very weak (GASP-6 and 9) interactions with GPCRs C-tails (figure 2B). The best interacting partners for GASP-7 were M₁, β_1 -AR, CALCR, TXA₂ and FZ₄, which retained 6% up to 10% of the GASP-7 input. Some receptor C-tails, including DOR, M₁, β_1 -AR, CALCR, histamine H₂ receptor and TXA₂, retained around 1% of GASP-6 or GASP-9 inputs. Altogether, these results show that almost all the members of the GASP family can interact with a wide range of GPCRs carboxy-terminal tails, but not with that of one-transmembrane receptors. Moreover, the members of the GASP family that contain the 15-AA repeated motif within their sequence, appeared to display a higher level of interaction with GPCR C-tails.

Two portions of GASP-1 are implicated in the interaction with the carboxy-terminal tails of GPCRs

In our previous study, we had shown that the C-terminal region of GASP-1, corresponding to amino acids 924 to 1395, displayed a strong interaction with the DOR C-tail. Within this region, a 250-AA carboxy-terminal domain displays high sequence similarities with the other GASPs (figure 1). We therefore hypothesized that this conserved carboxy-terminal domain could be critical for the interaction of GASPs with GPCRs. In order to test this hypothesis, we assessed the interaction of DOR, β_1 -AR and M₁ C-tails with truncated mutants of GASP-1 in GST-pull down experiments.

In a first set of experiments, we tested three truncated mutants of GASP-1: mutant 380-1395

that lacked the N-terminal portion, mutant 1025-1395 corresponding to the conserved C-terminal domain, and mutant 380-1073 corresponding to the central portion of GASP-1, which contains the 15-AA repeated motifs (figure 3A). As shown in figure 3A, DOR, β_1 -AR and M₁ C-tails interacted similarly with full-length GASP-1 and mutant 380-1395, indicating that the N-terminal portion of GASP-1 is not implicated in the interaction with GPCRs. Unexpectedly, mutant 1025-1395 did not display a significant interaction with β_1 -AR and M₁ C-tails and only interacted weakly with DOR. Conversely, mutant 380-1073 retained around 70% of the interaction of full-length GASP-1 with β_1 -AR and M₁ C-tails and 30% of the interaction of full-length GASP-1 with DOR. These data suggested that the central domain GASP-1 is mandatory for its interaction with β_1 -AR and M₁ receptors while both central and C-terminal domains of GASP-1 are important for its interaction with DOR.

In order to delineate more precisely which regions of GASP-1 are important for the interaction with DOR, we measured the interaction of the DOR C-tail with four additional truncated mutants of GASP-1 (figure 2C). They were derived from mutant 1025-1395 that was extended with 50 AA and 100 AA at the N-terminus to include one and two 15-AA repeated motif from the central domain (mutants 975-1395 and 924-1395, respectively) and then deleted of 45 AA and 95 AA at the C-terminus (mutants 924-1350 and 924-1300, respectively). When incubated with the DOR C-tail, mutants 975-1395 and 924-1395 displayed increasing interaction compared to mutant 1025-1395. These interactions were similar to those obtained with full-length GASP-1 and mutant 380-1395. Mutant 924-1350 displayed strong interaction as well, while it was completely lost with mutant 924-1300. Altogether, these results indicate that the 15-AA repeated motifs from the central domain are important to warrant full interaction with DOR and that the integrity of the carboxy-terminal portion is mandatory for this interaction. From these results we distinguished two types of GPCRs depending on their mode of interaction with GASP-1: GPCRs that interact exclusively with the central portion of GASP-1 such as β_1 -AR and M₁, and GPCRs that interact with both the central and the carboxy-terminal portions of GASP-1 such as DOR.

The GASP motif is critical for the interaction of GASP subfamily 1 with GPCRs.

Results obtained with GASP-1 truncated mutants point to the 15-AA repeated motif of its central domain as a critical element for the interaction with GPCRs. This conserved motif is also present at least twice in the corresponding central portions of GASP-2 to -5, suggesting that it could play an important role in the interaction between GPCRs and these GASP sub-

family members. In order to test this hypothesis, we first evaluated the interaction of GASP-2 truncated mutants with the GST-fused β_1 -AR, M_1 and CALCR C-tails for which a strong interaction with full length GASP-2 was observed before (see figure 1). As shown in figure 4A, mutant 377-838 resulting from the deletion of the N-terminal portion of GASP-2 (upstream from the first repeated motif) displayed an interaction with the three receptor C-tails, ranging from 30% to 60% compared to full-length GASP-2. Conversely, mutant 470-838, corresponding to the C-terminal portion of GASP-2, downstream from the second motif, displayed almost no interaction with the three GPCR C-tails tested (figure 4A). As previously observed with GASP-1, these results suggest that the central portion of GASP-2 is important for its interaction with GPCRs. In a second step, we focused on the two repeated motifs from this central portion. As shown in figure 4B, we replaced the four most conserved residues from these motifs (SWFW) by alanines, either individually (GASP2-m1 and GASP2-m2), or in combination (GASP2-dm). Resulting mutants were probed for their interaction with β_1 -AR, M_1 and CALCR C-tails. Compared to wild-type GASP-2, both GASP2-m1 and -m2 displayed a strong decrease of their interaction with β_1 -AR and M_1 C-tails while they still retained around 70% of the interaction with CALCR C-tail. For the double mutant, GASP2-dm, almost no interaction was detected with β_1 -AR and M_1 C-tails, and only a weak interaction was measured with the CALCR C-tail. Altogether, these results indicated that this repeated motif, that we name the “GASP motif”, plays a crucial role in the interaction between GASP-2 and GPCRs. Interestingly, the mutagenesis analysis showed that mutation of only one of the two motifs was sufficient to strongly impair the interaction of GASP-2 with the C-tail of β_1 -AR and M_1 receptor, while mutation of both motifs in GASP-2 was required to disrupt its interaction with the C- tail of CALCR.

A small synthetic peptide derived from the GASP motif is capable of disrupting interaction between GASPs and GPCRs.

In order to demonstrate that the GASP motif is mandatory for the interaction between GASP and GPCRs, we decided to investigate whether small synthetic peptides containing the GASP motif could compete with full length GASPs for their interaction with GPCRs. In a first step, we performed competition experiments between GASP-2 and a synthetic peptide of 22 AA containing the second GASP motif of GASP-2. Different concentrations of this peptide, ranging from 1 to 250 μ M, were tested for their capacity to disrupt the interaction between the β_1 -AR C-tail and GASP-2. As shown in figure 5A, increasing amounts of synthetic peptide

led to a decrease in the amount of GASP-2 retained by the β_1 -AR C-tail, while the addition of the highest dose of corresponding scrambled-peptide did not affect this interaction. Inhibition rates of $65 \pm 6\%$ and $76 \pm 6\%$ were obtained with 100 μM and 250 μM of peptide, respectively. In a second step, we chose a single peptide concentration (150 μM) to compete the interaction between four different receptor C-tails, β_1 -AR, M_1 , CALCR and TXA_2 , and three different GASPs, GASP-1 and -2, which contain the GASP motif, and GASP-7, which does not. Figure 5B shows the data obtained in a representative experiment for β_1 -AR C-tail and the three GASPs. The addition of 150 μM of the synthetic peptide into the GST-pull down incubation mix almost completely prevented the interaction between all GASPs and the β_1 -AR C-tail, while the control peptide did not. Quantifications revealed that in the presence of 150 μM of peptide, the four receptor C-tails retained between 6% and 35% of GASP-1, -2 and -7 compared to control values (figure 5C). Altogether, these results confirmed that the GASP motif is mandatory for the interaction between GASPs and GPCRs. Moreover, the interaction between GPCRs and GASP-7, which does not contain any GASP motif is also inhibited by the GASP peptide, suggesting that the two GASP subfamilies (with or without GASP motif) most likely interact with the same region of the GPCRs carboxy-terminal domain.

DISCUSSION

In our previous study, we identified a novel family of proteins from which the two first members, GASP-1 and GASP-2, interact with GPCRs (Simonin et al. 2004). In this study, we provide the first evidence that other members of the GASP family can also interact with the carboxy-terminal tail of GPCRs. Although some members, including GASP-6 and GASP-9, displayed low levels of interaction (around 1% of the inputted radiolabelled GASP), it was significantly higher than the non specific interaction observed with either GST alone or some receptor C-tails fused to GST such as MOR or $\text{TGF}\beta$. These data indicate that GASPs are indeed a family of proteins that interact with GPCRs. Since GASP-1 has been shown to modulate the postendocytic sorting of some GPCRs, our results raise the possibility that other GASPs could also be implicated in similar functions, thus adding another level of complexity in the regulation of agonist induced post-endocytic sorting of GPCRs. In the future, a key issue will be to define how the selectivity of the interaction between GASPs and GPCRs is achieved in a cellular context.

Amongst receptor C-tails, which we have tested, the β_1 -AR is the one which displays the highest level of interaction with GASP-1 and GASP-2. This last result contrasts with previous observations showing a weak interaction of GASP-1 with the β_1 -AR C-tail (Heydorn et al. 2004). This discrepancy is most likely due to the fact that we used full length GASPs to perform our experiments, while Heydorn A. et al. used a truncated form of GASP-1, cGASP, corresponding to amino acids 898 to 1395 of GASP-1. Indeed, we demonstrated in this study that a small repeated motif, present 22 times in the central domain of GASP-1, is mandatory for the interaction of GASPs with several GPCRs. This GASP motif is present only twice within cGASP. When we performed GST-pull down experiments with a similar fragment of GASP-1 (corresponding to amino acids 924 to 1395) only 5% of the inputted GASP-1 fragment was retained by the β_1 -AR C-tail (data not shown), which is in accordance with the results from Heydorn A. et al. (Heydorn et al. 2004). Therefore, our results suggest that the repertoire of GPCRs that interact with GASP-1 could prove to be much larger than previously suggested (Heydorn et al. 2004).

Previous experiments suggested that GASP-1 is involved in lysosomal sorting of GPCRs, and preferentially interacts with receptors that are rapidly degraded after agonist mediated internalization. The strong interaction we observed between the β_1 -AR C-tail and GASP-1 is therefore somewhat surprising, since this receptor has been shown to be resistant to agonist mediated down-regulation (Liang *et al.* 2003). A recent study showed that mutation or truncation of the recycling signal in β_2 -AR and MOR, two different receptors, which are oriented towards recycling, increases their binding to GASP-1 and their degradation through the lysosomal pathway (Thompson *et al.* 2007). This raises the possibility that in particular cell types, or under specific conditions, the balance between recycling and degradation could be modified in such a way that these receptors would be preferentially degraded. A similar situation could occur for β_1 -AR, which was described to be particularly resistant to degradation in several physiological conditions, while down-regulated in human heart tissue failure (Bristow *et al.* 1986, Bristow *et al.* 1982). Further investigations are needed to evaluate the potential involvement of GASP-1 in β_1 -AR degradation *in vivo*.

In this study we have shown that GPCRs can be divided into two sub-families depending on their mode of interaction with GASPs. However, the GASP motif seems critical for this interaction in both cases. In addition, we have shown that a small peptide containing this motif can efficiently compete with three different GASPs for their interaction of with four different receptors. Altogether, our data clearly show that the GASP motif represents a novel

protein-protein interaction motif. Detailed sequence homology searches performed with the available full genomes revealed that this motif is present only in GASP-1 to -5. In our previous study, we showed that point mutations in the predicted helix 8 of DOR and β_1 -AR almost completely prevented the interaction between GASP-1 and both of these receptor C-tails. These data suggest that the interaction between GASPs and GPCRs could occur via an interaction between the GASP motif and helix 8. Very recently, Tappe-Theodor A. et al. showed that viral overexpression of a GASP-1 dominant negative mutant in the dorsal horn of the spinal cord reduced the development of cannabinoid antinociceptive tolerance, leading to the hypothesis that preventing GASP-1 interaction with GPCRs might provide a means to limit the decrease in receptor signalling upon sustained agonist treatments. We propose here that using a peptide or peptidomimetic compounds containing the GASP motif could represent an efficient way to selectively blunt the interaction between GASP-1 and helix 8 of a given GPCR. Further experiments are now needed to delineate the elements that will allow the achievement of a satisfying level of selectivity in this interaction blunting.

In summary, we have shown here that the GASP family is divided into two sub-families based on their interaction with the carboxy-terminal tail of GPCRs: sub-family 1, which comprises GASP-1 to -5, that strongly interact with receptor C-tails and contain a small repeated motif, the GASP motif, involved in the interaction with GPCRs; sub-family 2, which includes GASP-6 to -10, that weakly interact with the receptor C-tails and does not contain the GASP motif. Our data demonstrate that this sequence that we call the GASP motif represents a novel protein-protein interaction motif. The GASP motif is only present in the GASP family. Furthermore, we showed that a small peptide containing this motif is capable of preventing the interaction of GASPs with the receptors carboxy-terminal tails. This peptide or derivatives might be useful to investigate the role played by GASPs in the modulation of the activity of GPCRs *in vivo*. Ultimately, this approach could represent an innovative strategy to limit the development of tolerance upon chronic treatment with GPCR agonists.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by The Ministère de l'Éducation Nationale de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MENSER) fellowship, The Association pour la Recherche sur le Cancer (N°3423), The Fondation pour la Recherche Médicale, The Centre National de la Recherche Scientifique, and The Université Louis Pasteur. We thank The Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire core facilities for excellent technical assistance.

REFERENCES

- Bartlett, S. E., Enquist, J., Hopf, F. W. et al. (2005) Dopamine responsiveness is regulated by targeted sorting of D2 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 11521-11526.
- Bristow, M. R., Ginsburg, R., Minobe, W., Cubicciotti, R. S., Sageman, W. S., Lurie, K., Billingham, M. E., Harrison, D. C. and Stinson, E. B. (1982) Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med*, **307**, 205-211.
- Bristow, M. R., Ginsburg, R., Umans, V. et al. (1986) Beta 1- and beta 2-adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective beta 1-receptor down-regulation in heart failure. *Circ Res*, **59**, 297-309.
- Cao, T. T., Deacon, H. W., Reczek, D., Bretscher, A. and von Zastrow, M. (1999) A kinase-regulated PDZ-domain interaction controls endocytic sorting of the beta2-adrenergic receptor. *Nature*, **401**, 286-290.
- Cong, M., Perry, S. J., Hu, L. A., Hanson, P. I., Claing, A. and Lefkowitz, R. J. (2001) Binding of the beta2 adrenergic receptor to N-ethylmaleimide-sensitive factor regulates receptor recycling. *J Biol Chem*, **276**, 45145-45152.
- Ferguson, S. S. (2001) Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev*, **53**, 1-24.
- Gullapalli, A., Wolfe, B. L., Griffin, C. T., Magnuson, T. and 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**, 1228-1238.
- Heydorn, A., Sondergaard, B. P., Ersboll, B., Holst, B., Nielsen, F. C., Haft, C. R., Whistler, J. and Schwartz, T. W. (2004) A library of 7TM receptor C-terminal tails. Interactions with the proposed post-endocytic sorting proteins ERM-binding phosphoprotein 50 (EBP50), N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF), sorting nexin 1 (SNX1), and G protein-coupled receptor-associated sorting protein (GASP). *J Biol Chem*, **279**, 54291-54303.
- Li, J. G., Chen, C. and Liu-Chen, L. Y. (2002) Ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein-50/Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor (EBP50/NHERF) blocks U50,488H-induced down-regulation of the human kappa opioid receptor by enhancing its recycling rate. *J Biol Chem*, **277**, 27545-27552.

- Liang, W., Austin, S., Hoang, Q. and Fishman, P. H. (2003) Resistance of the human beta 1-adrenergic receptor to agonist-mediated down-regulation. Role of the C terminus in determining beta-subtype degradation. *J Biol Chem*, **278**, 39773-39781.
- Martini, L., Waldhoer, M., Pusch, M., Kharazia, V., Fong, J., Lee, J. H., Freissmuth, C. and Whistler, J. L. (2007) Ligand-induced down-regulation of the cannabinoid 1 receptor is mediated by the G-protein-coupled receptor-associated sorting protein GASP1. *Faseb J*, **21**, 802-811.
- Simonin, F., Karcher, P., Boeuf, J. J., Matifas, A. and Kieffer, B. L. (2004) Identification of a novel family of G protein-coupled receptor associated sorting proteins. *J Neurochem*, **89**, 766-775.
- Tappe-Theodor, A., Agarwal, N., Katona, I. et al. (2007) A molecular basis of analgesic tolerance to cannabinoids. *J Neurosci*, **27**, 4165-4177.
- Thompson, D., Pusch, M. and Whistler, J. L. (2007) Changes in G protein-coupled receptor sorting protein affinity regulate postendocytic targeting of G protein-coupled receptors. *J Biol Chem*, **282**, 29178-29185.
- Whistler, J. L., Enquist, J., Marley, A., Fong, J., Gladher, F., Tsuruda, P., Murray, S. R. and Von Zastrow, M. (2002) Modulation of postendocytic sorting of G protein-coupled receptors. *Science*, **297**, 615-620.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Schematic comparison of the ten members composing the GASP family. Boxes represent the shared carboxy-terminal domain. The percentage of identical amino acids shared with GASP-1 is indicated within each box. Small grey boxes represent a highly conserved motif of 15 amino acids which is repeated 22 times in GASP-1 and two times in GASP-2 to -5. The consensus sequence of this motif is as follow: (E/D/G) (E/D) E X (I/L/V/S/T) (I/V/A/F) (G/N) (S/T) W F W (A/V/T/S/D/E) (G/E/R) (E/D/K) (E/D/K/A/Q). For GASP-2, two regions showing significant sequence homology with GASP-1 are separated by a gap represented by a dotted line.

Figure 2. GASPs form a family of G protein-coupled receptor interacting proteins. GASP-1, -2, -3, -6, -7 and -9 were probed for their interaction with 14 receptor C-tails (12 GPCRs and 2 one-transmembrane receptors) by using GST-pull down assays. The two lower panels are representative gel images analysed by Phosphor-Imager. The corresponding graphs represent the quantification of the band signal intensities. Results are shown as percent of the [³⁵S]-GASPs input retained by the GST-fused receptor C-tails and correspond to the mean $\pm$ S.E.M of three independent assays. **(A)** GASP-1, -2 and -3 showed medium to strong interactions, up to 50%, with most GPCR C-tails but no interaction was detected with the two one-transmembrane receptors C-tails (TGF β _{III} and IGF_I). **(B)** GASP-7 showed weak to medium interactions, up to 10%, with some GPCR C-tails. GASP-6 and -9 showed very weak interactions with all tested GPCRs. No interaction was detected with TGF β _{III} and IGF_I C-tails.

Figure 3. Two portions of GASP-1 are implicated in the interaction with GPCRs. **(A)** Diagram showing three truncated mutants of GASP-1 that were probed for their interaction *in vitro* with the DOR, β ₁-AR and M₁ C- tails. Deletion analysis revealed the critical role played by the central part of GASP-1 (1025-1395) in the interaction with the DOR, β ₁-AR and M₁ C-tails and especially with β ₁-AR and M₁ C-tails. Surprisingly, the conserved carboxy-terminal part of GASP-1 (1073-1395) displayed no significant interaction with these receptor C-tails, excepted for DOR for which a 25% interaction was observed. **(B)** Diagram representing additional truncated mutants of GASP-1 that were probed for their interaction *in vitro* with the DOR C-tail. Detailed deletion analysis showed that in addition to the central part of GASP-1, the integrity of the carboxy-terminal part was mandatory for the interaction with the DOR C-tail. Results are represented as percent of the full-length GASP-1 interaction and correspond

to the mean $\pm$ S.E.M of three independent assays. AA, amino acid.

Figure 4. The repeated motif of GASP-2 is implicated in the interaction with GPCRs. **(A)** Diagram showing two truncated mutants of GASP-2 that were probed for their interaction *in vitro* with the β_1 -AR, M₁ and CALCR C-tails. The repeated motif of 15 amino acids is represented by open boxes. Deletion analysis revealed that the central domain of GASP-2, which contains the two repeated motifs, is critical for the interaction between GASP-2 and β_1 -AR, M₁ and CALCR C-tails. **(B)** Diagram representing three GASP-2 mutants: two with only one of the two motifs mutated (GASP2-m1 and GASP2-m2) and one with both motifs mutated (GASP2-dm). The wild-type motif is represented by an open box and the mutant motif by a hatched box. Consensus sequences are given for wild-type and mutant motifs. Mutated amino acids are underlined. Site directed mutagenesis analysis of these two repeated motifs showed that they played a crucial role in the interaction of GASP-2 with the three-receptor C-tails tested here. Interestingly, the loss of one of the two motifs is sufficient to strongly impair the interaction between GASP-2 and β_1 -AR and M₁ C-tails, while the mutation of both motifs is required to disrupt the interaction with CALCR C-tail. Results are represented as percent of the wild-type GASP-2 interaction, and correspond to the mean $\pm$ S.E.M of three independent assays. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ denoted significant difference (assessed by one-way ANOVA). AA, amino acid.

Figure 5. A small synthetic peptide derived from the repeated motif of GASPs is capable of disrupting the interaction between GASPs and GPCRs. **(A)** Dose-effect analysis of the peptide assessed *in vitro* by competition assays in GST-pull down between GASP-2 and GST- β_1 -AR, revealed that the peptide competes with GASP-2 for the interaction with β_1 -AR in a concentration dependent manner. The control scrambled peptide display no significant effect on the interaction between GASP-2 and β_1 -AR. **(B)** Competition assays between the peptide and GASP-1, -2 or -7 for the interaction with β_1 -AR, M₁, CALCR and TXA₂ C-tails were performed *in vitro*. A representative gel image of a competition assay shows that significantly lower amounts of GASPs were retained by the β_1 -AR C-tail in presence of the peptide (150 μ M) but not the control scrambled peptide (150 μ M). **(C)** Quantification of the competition assay results revealed that 150- μ M peptide inhibited 65% up to 95% of the interaction between GASP-1, -2 and -7 and all of the GPCR C-tails tested. Results are shown as percent of the interaction between the corresponding GASPs and GPCRs in absence of the peptide

(mean $\pm$ S.E.M of two independent assays).

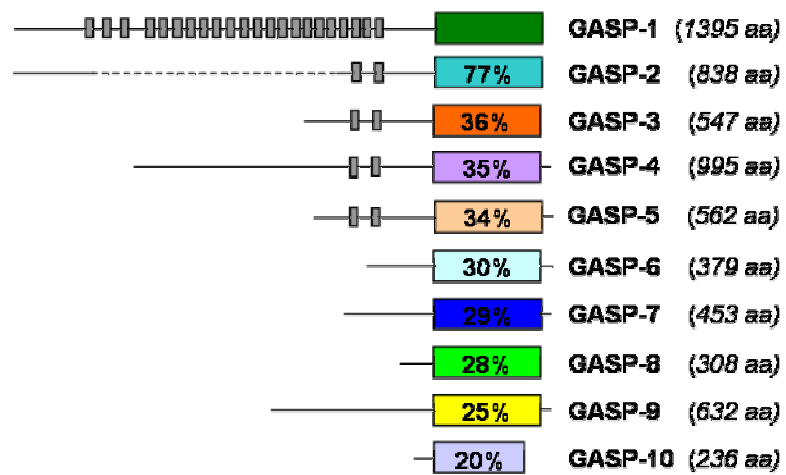


Figure 1.

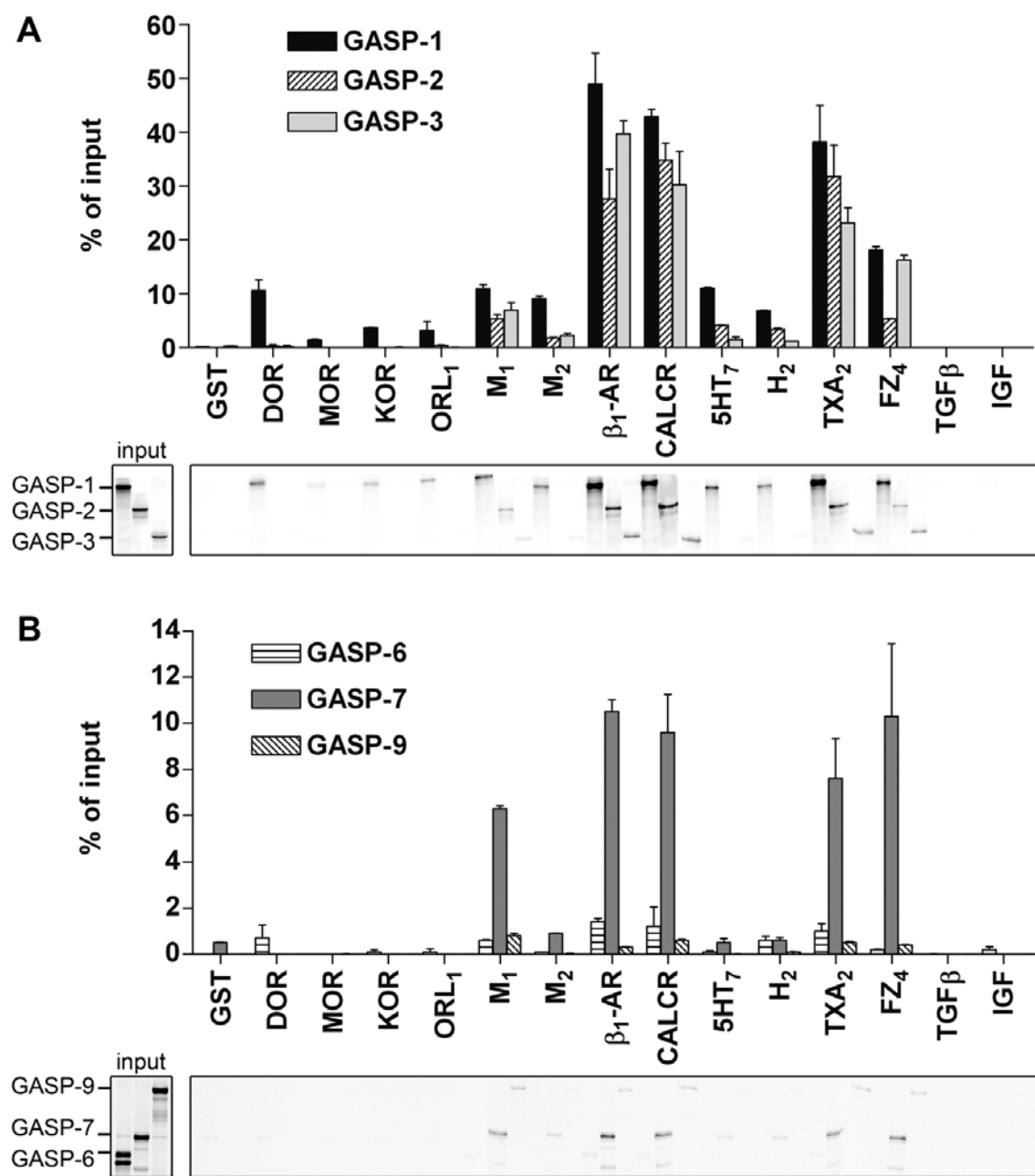


Figure 2.

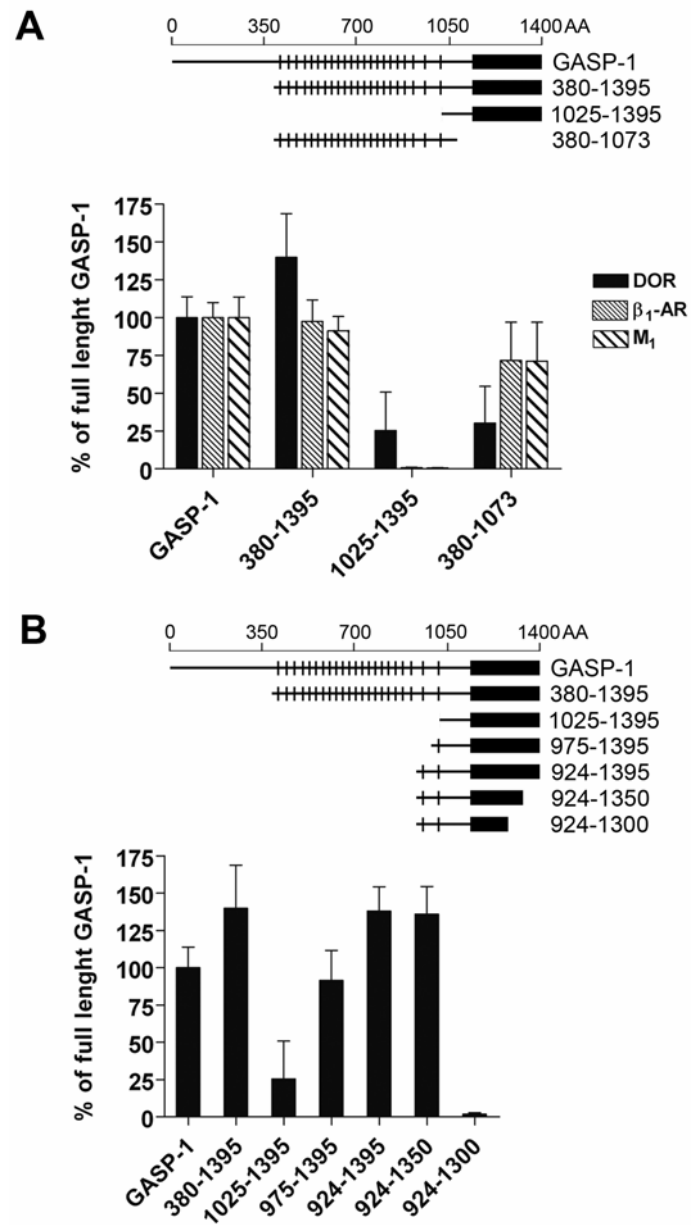


Figure 3.

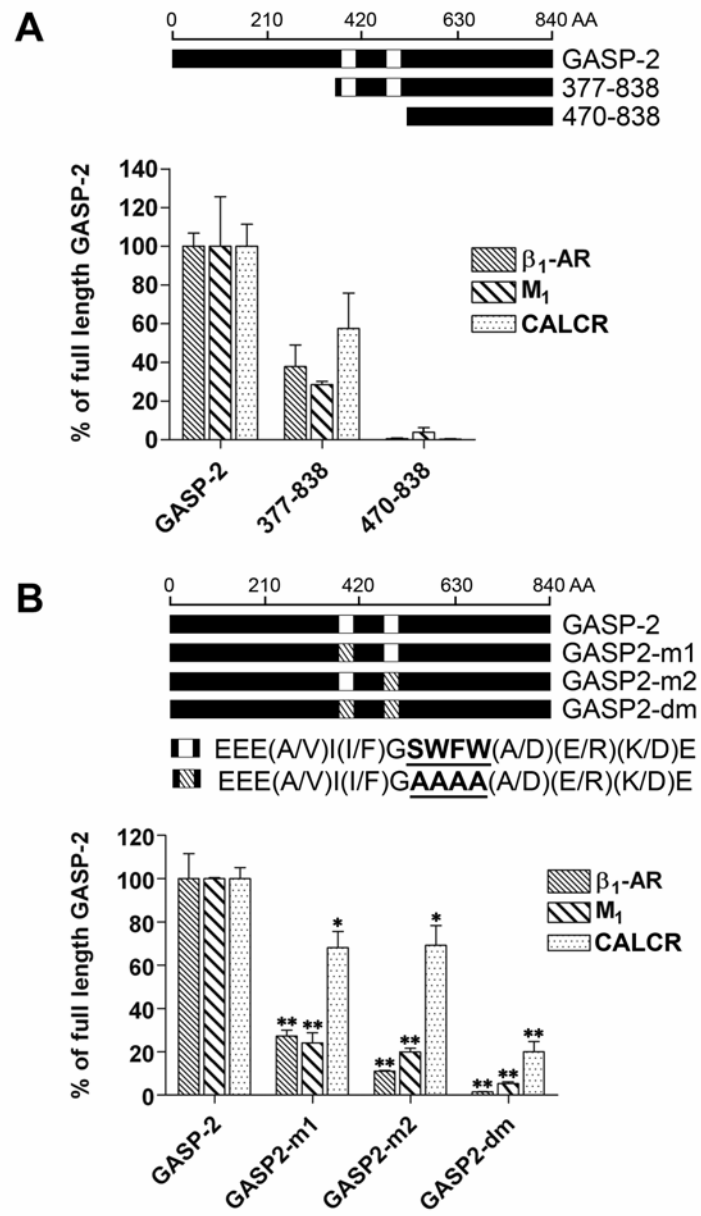


Figure 4.

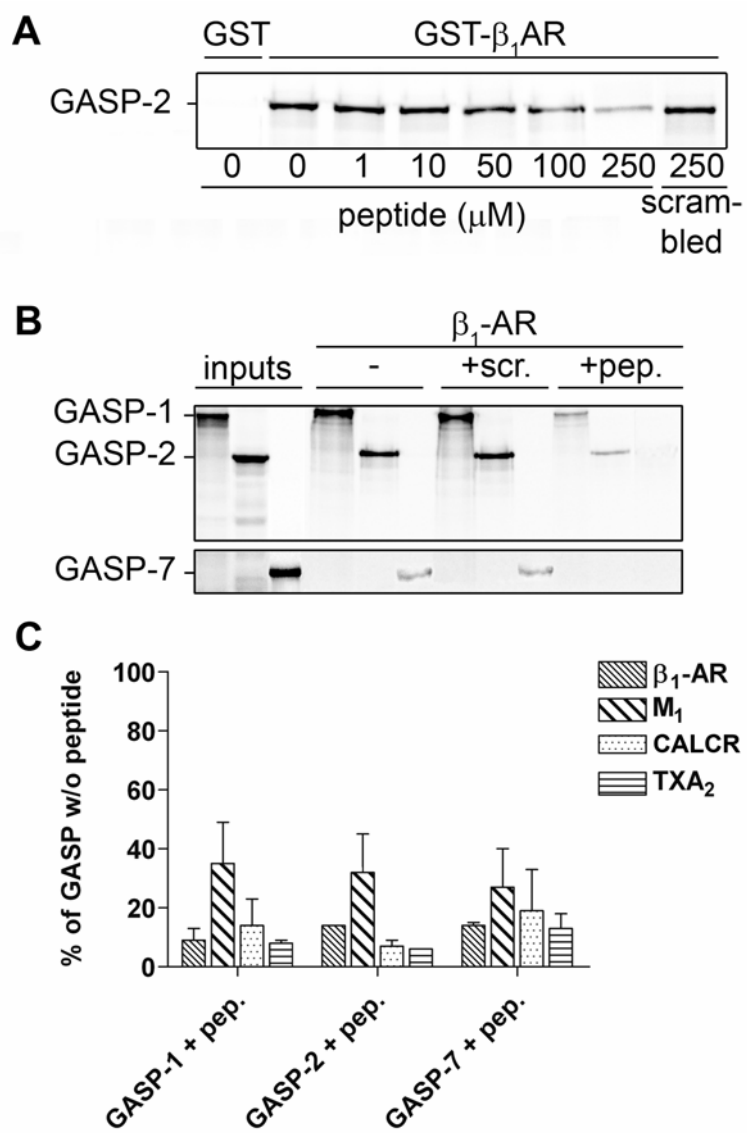


Figure 5.

II.1.4. Éléments de discussion

II.1.4.1. La méthode de *GST-pull down*

Le *GST-pull down* est une méthode couramment utilisée pour évaluer l'interaction *in vitro* entre deux protéines. Cependant, elle est généralement couplée à une série d'essais complémentaires, biochimiques ou en contexte cellulaire, visant à confirmer les interactions dans des systèmes plus physiologiques. Il est important de souligner que dans ce type d'étude, la discrimination entre une interaction positive et une interaction aspécifique se fait sur la base de l'interaction observée entre les protéines radiomarquées et le témoin négatif de la GST seule. Cette interaction avec la GST est systématiquement très faible, ce qui peut conduire à considérer que la plupart des protéines de fusion avec la GST sont des partenaires d'interaction car la quantité de protéine radiomarquée retenue, bien que faible, est sensiblement plus élevée que ce qui est obtenu avec la GST seule. Il convient donc de rester prudent avec les faibles niveaux d'interaction. Cependant, les résultats obtenus ici montrent des profils d'interaction bien marqués avec des domaines carboxyl-terminaux de récepteurs qui interagissent très fortement avec les GASP (β_1 AR, TXA₂ et CALCR) et d'autres domaines qui n'interagissent pas du tout avec eux (T β R_{III} et IGF_I). Ces interactions clairement négatives indiquent que les GASP ne présentent pas de propension à se « coller » de façon aspécifique aux protéines, ce qui tend à donner plus de crédit aux interactions moyennes voir faibles qui ont été observées, suggérant que ces récepteurs pourraient être de bons partenaires d'interaction des GASP dans un contexte plus physiologique.

La méthode de *GST-pull down* présente des limites. Les protéines en fusion avec la GST produites chez la bactérie ainsi que les partenaires d'interaction radiomarqués produits *in vitro* pour ces essais ne subissent aucune modification post-traductionnelle. Les modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation ou l'ubiquitination sont l'apanage des cellules eucaryotes et jouent un rôle important dans la régulation de l'activité des RCPG. La phosphorylation des domaines carboxyl-terminaux est tout particulièrement impliquée dans le recrutement de certains partenaires d'interaction. C'est le cas par exemple pour les β -arrestines dont le recrutement nécessite la phosphorylation par les GRK du domaine carboxyl-terminal des RCPG (Kieselbach, T et al. 1994; Gurevich, VV et al. 1995; Gurevich, VV et al. 1997). Ainsi, il ne peut pas être exclu que de telles modifications puissent jouer un rôle déterminant dans l'interaction des GASP avec le domaine carboxyl-terminal de certains RCPG. Cela signifie que certains récepteurs présentant une interaction faible avec les GASP en *GST-pull down* puissent se révéler être de bien meilleurs partenaires d'interaction *in vivo*.

Il convient cependant de noter que de telles modifications post-traductionnelles ne conduisent pas à un effet « tout ou rien ». Il est ainsi peu probable que des récepteurs n'interagissant pas avec les GASP *in vitro* puissent interagir avec eux *in vivo*. Pour revenir à l'exemple des β -arrestines, leur affinité pour les RCPG ne varie que d'un facteur de 5 à 10 entre l'état phosphorylé et déphosphorylé du domaine carboxyl-terminal du récepteur (Lohse, MJ et al. 1992; Gurevich, VV et al. 1995). De la même manière, il convient de prendre en considération le fait que ce ne sont pas les récepteurs complets qui ont été testés ici mais uniquement leurs domaines carboxyl-terminaux. Bien que les partenaires d'interaction des RCPG se lient principalement au domaine carboxyl-terminal, certains se lient également aux boucles intracellulaires. La 3^{ème} boucle intracellulaire, qui joue un rôle déterminant dans la liaison avec les protéines G, interagit également avec plusieurs protéines associées au cytosquelette et qui sont impliquées dans le trafic intracellulaire des RCPG (Bockaert, J et al. 2004). Par ailleurs, la 2^{ème} boucle intracellulaire des RCPG de la famille 1 a récemment été impliquée dans le recrutement de la β -arrestine (Marion, S et al. 2006). Ainsi il se pourrait que d'autres motifs en dehors du domaine carboxyl-terminal puissent participer à l'interaction des récepteurs avec les protéines GASP. Enfin, dans les essais de *GST-pull down* seul les deux partenaires d'interactions sont mis en présence l'un de l'autre. Ce modèle « minimum » ne rend pas compte de la multitude de protéines présentes en contexte cellulaire. Les RCPG interagissent avec de nombreuses autres protéines parmi lesquelles certaines peuvent entrer en compétition avec les GASP pour la liaison du domaine carboxyl-terminal. D. Thompson et ses collaborateurs ont ainsi montré que le récepteur β_2 AR interagit préférentiellement avec NHERF/EBP50 plutôt qu'avec GASP-1 en contexte cellulaire alors que ces deux protéines interagissent de façon équivalente avec le récepteur en *GST-pull down* (Thompson, D et al. 2007). D'autre part, certaines protéines pourraient également limiter l'accès des GASP au domaine carboxyl-terminal du récepteur par simple gêne stérique, d'autant plus que GASP est protéine volumineuse.

De façon générale, une étude *in vitro* ne pourra pas refléter ce qui se passe en contexte cellulaire, de la même manière qu'une étude se basant sur l'expression de récepteurs recombinants en système hétérologue (qui constitue la majorité des modèles actuels d'étude des RCPG) ne pourra pas refléter ce qui se passe réellement *in vivo*. Les essais de *GST-pull down* réalisés ici sont donc avant tout un moyen aisé et efficace de comparer les GASP entre eux sur la base de leur capacité à interagir *in vitro* avec le domaine carboxyl-terminal des RCPG. Ces essais permettent également d'identifier des partenaires d'interactions potentiels

qui constitueront des pistes pour de futures études plus approfondies qui seront dans des contextes plus physiologiques.

II.1.4.2. Un profil d'interaction large entre les GASP et les RCPG

Les GASP interagissent avec une large palette de récepteurs issus de la famille 1 mais également avec le récepteur CALCR issu de la famille 2 et le récepteur FZ₄ de la famille Frizzled/Smoothed. Récemment, une autre étude s'est également intéressée à l'interaction entre les GASP et les RCPG. Quatre protéines impliquées dans le trafic intracellulaire des récepteurs, à savoir NHERF, NSF, SNX1 et une forme tronquée de GASP-1 allant des acides aminés 899 à 1395 et nommé cGASP, ont été testées en *GST-pull down* avec une large collection de domaine carboxyl-terminaux de RCPG fusionnés à la GST (Heydorn, A et al. 2004). Cette étude a notamment montré que cGASP interagissait avec plus d'un tiers des protéines de fusions testées contre quelques unes d'entre elles pour NHERF, NSF et SNX1, ce qui est en accord avec le large profil d'interaction que nous avons observé. Certaines différences apparaissent cependant entre les résultats de cette étude et les résultats que nous avons obtenus. Ainsi, A. Heydorn et collaborateurs ont rapporté une interaction faible entre le récepteur β_1 AR et cGASP alors que parmi les récepteurs testés dans notre étude, β_1 AR représente le meilleur partenaire d'interaction des GASP. Cette différence s'explique probablement par le fait que les auteurs de cette étude ont utilisé dans leurs essais une forme tronquée de GASP-1. En effet, les résultats que nous avons obtenus montrent que la portion centrale de GASP-1 contenant les 22 motifs répétés joue un rôle déterminant dans la liaison entre GASP-1 et les RCPG. La forme tronquée de GASP-1 employée par A. Heydorn et ses collaborateurs, ne comprend que les deux derniers motifs répétés de cette portion ce qui est insuffisant pour produire une interaction complète avec le récepteur β_1 AR. Ceci indique que le profil d'interaction de GASP-1 avec la collection de domaines carboxyl-terminaux de RCPG testée par A. Heydorn et ses collaborateurs pourrait s'avérer être plus large que ce qui a été proposé à l'origine (Heydorn, A et al. 2004).

II.1.4.3. Les GASP : famille et sous-familles

De nombreux éléments nous permettent aujourd'hui de confirmer l'existence de la nouvelle famille des protéines GASP. Tout d'abord nos résultats obtenus en *GST-pull down* montrent clairement la capacité commune des GASP à interagir avec le domaine carboxyl-

terminal des RCPG. En comparant les profils de chacun des GASP nous pouvons constater que se sont systématiquement les mêmes domaines carboxyl-terminaux de RCPG qui interagissent le plus fortement. Cette similarité de profil d'interaction indique que les GASP possèdent la même sélectivité envers les RCPG avec lesquels ils interagissent et confirme cette notion de famille de protéines. Malgré une grande similarité au niveau des profils d'interaction, certaines protéines GASP interagissent plus fortement que d'autres avec les RCPG. Cette observation est corrélée avec la présence d'un motif conservé et répété de 15 acides aminés chez les protéines GASP interagissant fortement avec les RCPG. Nous avons ainsi subdivisé la famille GASP en deux sous-familles. La première sous-famille regroupe les GASP-1 à -5 qui possèdent le motif conservé et présentent des niveaux d'interaction forts à modérés avec le domaine carboxyl-terminal des RCPG. La deuxième sous-famille regroupe quant à elle les GASP-6 à -10 qui ne possèdent pas le motif conservé et présentent des niveaux d'interaction modérés à faibles avec le domaine carboxyl-terminal des RCPG.

D'autres éléments viennent supporter l'existence de la famille GASP. Cette famille a été proposée à l'origine sur la base de recherches d'homologie de séquence qui ont révélé l'existence de 9 protéines de fonctions inconnues présentant de grandes similarités de séquence avec GASP-1. Les gènes codants pour ces protéines sont tous localisés sur le chromosome X, excepté le gène codant pour GASP-8 qui se trouve sur le chromosome 7. Ils sont rassemblés au sein de deux clusters adjacents de 200 kb et présentent une organisation génique similaire caractérisée notamment par la présence de plusieurs exons dont un seul est codant. Leur profil de distribution tissulaire est également très similaire avec une localisation prédominante au niveau du système nerveux central, ce qui est par ailleurs en accord avec l'hypothèse d'un rôle de ces protéines dans la régulation de l'activité des RCPG qui sont très largement représentés à ce niveau. En outre, les gènes codant pour les protéines GASP ne sont présents que chez les mammifères. Toutefois, une étude reposant sur la comparaison de séquences de régions 5' non transcrites a récemment proposé l'existence d'un gène ancêtre proche de GASP-10, que l'on retrouve notamment chez les poissons téléostéens et qui aurait donné naissance à la famille des GASP ainsi qu'à deux autres familles de gènes suite à des duplications successives et des divergences de séquence (Winter, EE et al. 2005). Bien que les deux clusters de 200 kb renfermant les gènes GASP ne soient pas présents chez les poissons téléostéens, des gènes orthologues aux gènes qui bordent ces deux régions chez les mammifères ont pu être identifiés chez ces poissons ce qui confirme que ces clusters soient apparus après une expansion rapide de gènes. Par ailleurs, l'évolution rapide et la

conservation de ces gènes suggèrent qu'ils aient apporté un avantage physiologique aux mammifères. Nous pouvons supposer que si les GASP dérivent d'un ancêtre commun proche de GASP-10, la fonction associée à cette protéine ancestrale a évolué avec la duplication des gènes et la diversification des séquences. Cette évolution fonctionnelle a peut-être été marquée par l'apparition du motif GASP de 15 acides aminés que l'on trouve présent chez les GASP de la sous-famille 1. Nous savons que la répétition de motifs ou de domaines au sein d'une protéine est généralement associée à un avantage évolutif (Andrade, MA et al. 2001). Nous pouvons ainsi supposer qu'en conférant un avantage fonctionnel aux GASP le possédant, ce motif aurait été conservé puis répété lors d'évènements de recombinaison et de duplication intragénique de séquences. De plus, près de 5% des protéines eucaryotes possèdent des répétitions de motifs ou de domaines au sein de leur séquence et la fonction majoritairement associée à ces répétitions est l'interaction protéine-protéine (Andrade, MA et al. 2001). Un même motif ou domaine peut être répété un nombre variable de fois d'une protéine à l'autre. Nous pouvons évoquer par exemple le domaine PDZ répété deux fois dans la protéine NHERF/EBP50, 7 fois dans la protéine GRIP ou encore 13 fois dans la protéine MUPP1 (Bockaert, J et al. 2003). Ces éléments sont en accord avec une spécialisation des protéines GASP au cours de l'évolution de manière à développer leur capacité à interagir avec les RCPG grâce à l'apparition du motif GASP. Dans l'ensemble, ceci confirme l'existence d'une famille de protéines GASP.

II.1.4.4. L'hélice 8 des RCPG

Les résultats que nous avons obtenus montrent que la portion proximale fortement conservée du domaine carboxyl-terminal des récepteurs opioïdes (comprenant le motif NPXXY du domaine transmembranaire 7 et les 12 premiers acides aminés du domaine carboxyl-terminal) joue un rôle critique dans l'interaction avec GASP-1. Cette portion contient la séquence correspondant à l'hélice 8 décrite chez la rhodopsine et dont l'existence a été prédite chez l'ensemble des RCPG de la famille 1 (Palczewski, K et al. 2000). La plupart des récepteurs que nous avons testés en *GST-pull down* sont issus de cette famille et interagissent avec les GASP ce qui suggère que l'hélice 8 putative de ces récepteurs pourrait être à l'origine de cette interaction. De plus, deux résidus présents au sein de la séquence correspondant à l'hélice 8 de la rhodopsine sont fortement conservés dans l'ensemble de ces récepteurs et leur importance dans l'interaction avec GASP-1 a été démontré par mutagenèse dirigée dans les récepteurs DOR et β_1 AR. L'ensemble de ces données suggère que l'hélice 8

putative joue un rôle critique dans l'interaction de ces récepteurs avec GASP-1. Cependant, il est probable que d'autres déterminants présents au sein des domaines carboxyl-terminaux des RCPG soient également impliqués. En effet, la portion proximale du domaine carboxyl-terminal de DOR (acides aminés 314 à 333) interagit plus faiblement avec GASP-1 que le domaine carboxyl-terminal complet (acides aminés 314 à 372). Ceci suggère que d'autres déterminants présents dans la portion distale du domaine carboxyl-terminal (acides aminés 333 à 372) participent à cette interaction d'autant plus que les domaines carboxyl-terminaux des récepteurs DOR, MOR, KOR et ORL₁ testés en *GST-pull down* partagent la même portion proximale mais présentent des niveaux d'interaction très différents avec GASP-1. Cette hypothèse est également supportée par les résultats d'une étude portant sur le récepteur NK1 montrant qu'un domaine plus distal de l'extrémité carboxyl-terminale est également impliqué dans la liaison de GASP-1 (Heydorn, A et al. 2004).

Une interaction forte de GASP-1 a aussi été observée avec les récepteurs CALCR et FZ₄ qui font partie de deux familles de RCPG distinctes de la famille 1. L'extrémité carboxyl-terminale de ces deux récepteurs présente deux résidus qui pourraient correspondre aux résidus de la séquence de l'hélice 8 putative, dont nous avons montré l'importance pour l'interaction de DOR et β_1 AR avec GASP-1. Bien qu'à ce jour l'existence de l'hélice 8 n'est été proposée que pour les RCPG de la famille 1, l'ensemble de nos données suggère qu'il pourrait aussi exister un repliement secondaire en hélice α dans la partie proximale du domaine carboxyl-terminal des RCPG des familles 2 et Frizzled/Smoothed et que cette région serait impliquée dans l'interaction avec GASP-1.

Par ailleurs, l'hélice 8 a également été impliquée dans le couplage des RCPG aux protéines G et une étude a plus particulièrement montrée que le couplage du récepteur β_1 AR avec la protéine G_s dépendait fortement de l'arginine dont nous avons montré l'importance pour l'interaction avec GASP-1 (Delos Santos, NM et al. 2006). Ceci suggère que la protéine GASP-1 pourrait entrer en compétition avec la protéine G au niveau de ce site et participer à la désensibilisation de β_1 AR.

Il convient cependant de rester prudent face à ces résultats. En effet, il apparaît clairement dans diverses études de RMN portant sur des peptides en solution qui correspondent à l'hélice 8 putative de RCPG, que la composition du milieu aqueux dans lequel se trouvent ses peptides influence fortement leur repliement conformationnel. Il a ainsi

été montré que la présence de détergents ou de phospholipides était nécessaire au repliement en hélice α (Mukhopadhyay, S et al. 1999; Krishna, AG et al. 2002; Katragadda, M et al. 2004). Nous ne pouvons donc pas exclure que dans nos essais *in vitro* le repliement de cette portion puisse ne pas être conforme au repliement qui serait observé chez le récepteur complet exprimé dans un environnement membranaire. Cependant la présence dans nos essais de détergeant non ionique et la production de l'extrémité carboxyl-terminale des récepteurs en bactérie suggèrent malgré tout que la portion proximale de ces extrémités puissent acquérir et conserver une conformation en hélice α .

Afin de confirmer dans un modèle plus physiologique le rôle de l'hélice 8 dans l'interaction entre les RCPG et les GASP, des études de mutagenèse dirigée sur des récepteurs exprimés en système hétérologue pourraient être initiées. Par ailleurs, la technique de RMN en solution de type homonucléaire (^1H) ou hétéronucléaire pourraient permettre de définir précisément d'une part le site d'interaction du peptide GASP au niveau du récepteur et d'autre part sa structure tridimensionnelle. Pour ce faire, une extrémité carboxyl-terminale de RCPG (le récepteur $\beta_1\text{AR}$ par exemple, qui est l'un des meilleurs partenaire d'interaction *in vitro* des GASP) pourrait être produite en bactérie et purifiée à l'aide d'un système de fusion de type pGEX ou pMAL puis solubilisée dans des conditions garantissant son bon repliement tridimensionnel. Le complexe formé en solution par l'extrémité carboxyl-terminale du RCPG et le peptide GASP pourrait être ainsi analysé par RMN.

II.1.4.5. Le motif GASP, un nouveau motif d'interaction protéine-protéine

Nous avons montré dans cette étude qu'un motif conservé présent de manière répétée chez les GASP de la sous-famille 1 (GASP-1 à GASP-5) et que nous appelons le motif GASP joue un rôle crucial dans l'interaction de ces protéines avec le domaine carboxyl-terminal des RCPG. En effet, les GASP qui possèdent ce motif interagissent nettement plus fortement avec les RCPG que les GASP qui ne le possèdent pas. De plus, sa mutation ou l'utilisation d'un peptide dominant négatif dérivé de sa séquence permet de prévenir l'interaction entre les GASP et les RCPG.

La séquence consensus de ce motif de 15 acides aminés comprend en son centre les quatre résidus sérine, tryptophane, phénylalanine et tryptophane (Ser-Trp-Phe-Trp, SWFW) qui sont invariables excepté le résidu Ser qui est remplacé dans certains cas par un résidu

thréonine (Thr). Le résidu Trp est par ailleurs codé par un seul codon à l'opposé de la plupart des autres résidus, ce qui en fait un résidu hautement conservé. Les résidus Phe et Trp sont caractérisés par une chaîne latérale hétérocyclique volumineuse et hydrophobe. Par ailleurs, le résidu Trp est donneur de liaison hydrogène grâce à sa fonction indolamine. Ces deux résidus sont favorables à un repliement en brin β et des prédictions de structure secondaire *in silico* indiquent notamment que le motif GASP serait replié à plus de 50% en brin β . La substitution des quatre résidus SWFW constituant le cœur des deux motifs répétés de GASP-2 par des alanines inhibe totalement la capacité de cette protéine à interagir avec les RCPG et les prédictions de structure secondaire *in silico* indiquent que le motif muté serait quant à lui replié en hélice α à près de 100%. Ceci suggère que le cœur SWFW contribue fortement au maintien de la structure tridimensionnelle du motif GASP et donc de sa fonction. Cependant, nous ne pouvons pas exclure que d'autres résidus de ce motif soient également impliqués dans l'interaction avec les RCPG. Ainsi, le motif GASP est riche en résidus chargés, majoritairement des résidus acides, qui pourraient être impliqués dans des interactions de type ioniques avec le domaine carboxyl-terminal des récepteurs. Des essais de mutagenèse dirigée sur ces résidus pourraient être envisagés dans le futur afin de répondre à ces interrogations.

Le motif GASP joue un rôle important dans l'interaction des cinq premiers membres de la famille GASP avec le domaine carboxyl-terminal des RCPG. Cependant, bien qu'il ne possède pas ce motif, GASP-7 interagit de façon significative avec plusieurs récepteurs. Cette interaction est par ailleurs surprenante étant donné que les autres GASP dépourvus de ce motif, GASP-6 et GASP-9, n'interagissent que très faiblement avec les RCPG. Ceci suggère qu'il pourrait exister d'autres déterminants spécifiques à GASP-7 qui seraient impliqués dans l'interaction avec les RCPG. La protéine GASP-7, également connue sous le nom de ARM CX1 pour *armadillo repeat containing X-linked 1*, présente deux domaines Armadillo répétés en tandem. Ces domaines d'interaction protéine-protéine, longs d'environ 42 acides aminés, ont été caractérisés dans plusieurs protéines impliquées dans l'architecture du cytosquelette et dans la signalisation intracellulaire. Nous pouvons citer parmi ces protéines la β -caténine qui participe à la formation des jonctions adhérentes et l'importine- α qui est impliquée dans le transport nucléaire (Coates, JC 2003). Ils pourraient donc être à l'origine de l'interaction de GASP-7 avec les RCPG mais GASP-6 (ARM CX3), qui possède également ces deux domaines Armadillo répétés en tandem, n'interagit que très faiblement avec les RCPG.

Le motif GASP est répété 22 fois chez GASP-1 et deux fois chez les GASP-2 à -5, il

n'est donc jamais présent de manière isolée. Par ailleurs, les essais de mutagenèse dirigée réalisés sur GASP-2 montrent que la mutation d'un des deux motifs provoque un effondrement significatif de l'interaction entre GASP-2 et les récepteurs M_1 et β_1AR , ce qui suggère une complémentarité entre ces deux motifs. De ce fait, en tenant compte des prédictions de structure indiquant que le motif GASP adopte un repliement secondaire de type brin β , il se pourrait que deux motifs puissent former une structure de type feuillet β en s'associant. Cependant, l'interaction entre GASP-2 et le récepteur CALCR semble contredire cette hypothèse. En effet, la mutation d'un des deux motifs de GASP-2 ne suffit pas à perturber pas de manière significative l'interaction avec le récepteur CALCR qui est inhibée uniquement lorsque les deux motifs sont conjointement mutés. Ceci laisse supposer que le fonctionnement et l'organisation de ces motifs est plus complexe que ce qui avait été anticipé.

Le peptide GASP est dérivé de la séquence du premier motif répété de GASP-2. Il a permis de confirmer dans des essais de compétition les résultats qui avaient été obtenus par mutagenèse dirigée de GASP-2. Nous avons ainsi montré que le peptide GASP inhibe de façon compétitive et dose dépendante l'interaction de GASP-1 et -2 avec le domaine carboxyl-terminal des RCPG. Bien que GASP-7 ne possède pas de motif répété comme GASP-1 ou GASP-2, il interagit néanmoins de façon significative avec le domaine carboxyl-terminal de plusieurs RCPG, c'est pourquoi des essais de compétition ont également été réalisés entre GASP-7 et le peptide GASP. De façon surprenant, ces essais ont montré que le peptide GASP est aussi capable d'inhiber l'interaction de GASP-7 avec le domaine carboxyl-terminal des RCPG. Ceci semble indiquer que le peptide GASP se lie au domaine carboxyl-terminal des RCPG masquant ainsi les déterminants qui sont impliqués dans la liaison avec les GASP. Ceci montre également que GASP-7, bien qu'il ne possède pas de motif GASP, interagit potentiellement avec les mêmes déterminants du domaine carboxyl-terminal des RCPG que les GASP de la sous-famille 1. Le peptide GASP inhibe l'interaction de tous les couples GASP/RCPG que nous avons testés sans qu'une sélectivité particulière est pue être mise en évidence. Néanmoins, il pourrait être intéressant d'obtenir des peptides GASP sélectifs de tel ou tel type de récepteur. Il pourrait ainsi être envisagé d'optimiser le peptide GASP par des modifications fines de sa séquence en mutant notamment les acides aminés qui composent le cœur du motif GASP (SWFW) ou les acides aminés chargés.

II.1.5. Travaux en cours : inhibition de la régulation négative du récepteur DOR à l'aide du peptide GASP

II.1.5.1. Choix du modèle cellulaire NG108-15

Le peptide GASP qui a été développé ici pourrait constituer un bon outil d'exploration de la fonction des protéines GASP et des conséquences de leur interaction avec les RCPG dans des modèles plus physiologiques. Nous avons donc décidé d'initier des essais en contexte cellulaire avec le peptide GASP. GASP-1 ayant été impliqué dans le trafic intracellulaire du récepteur DOR vers le compartiment lysosomal (Whistler, JL et al. 2002), nous avons choisi de réaliser ces essais dans la lignée cellulaire NG108-15. Cette lignée qui a été établie en 1974 par Klee et Nirenberg est un hybride de neuroblastome de souris (N18TG2) et de gliome de rat (C6-BU1). Ces cellules expriment de manière endogène plusieurs récepteurs du système nerveux et plus particulièrement le récepteur DOR, elles expriment également GASP-1 et plus faiblement GASP-2. Cette lignée offre donc l'avantage de travailler avec un récepteur et une protéine GASP qui ne sont pas transfectés, se rapprochant ainsi de conditions plus physiologiques. Nous nous sommes assuré dans un premier temps, par liaison de diprénorphine tritiée, que ces cellules subissent une régulation négative du nombre de sites aux opioïdes δ suite à la stimulation par l'agoniste SNC80 (et DPDPE).

II.1.4.2. Translocation du peptide GASP dans les cellules NG108-15

Afin d'étudier l'effet du peptide GASP sur la régulation négative du récepteur DOR, nous avons cherché dans un deuxième temps à délivrer ce peptide à l'intérieur des cellules NG108-15. Plusieurs méthodes permettent de faire pénétrer un peptide dans une cellule. Certaines de ces méthodes sont de type chimique et d'autres reposent sur l'utilisation de peptides de pénétration cellulaire. Nous avons tout d'abord expérimenté le système PULSin™ (Polyplus transfection) qui repose sur l'utilisation d'un composé cationique amphiphile. Ce composé a été testé avec la phycoérythrine en guise de protéine témoin fluorescente mais malgré des essais de mise au point, il s'est révélé être toxique pour les cellules NG108-15. Nous avons donc récemment expérimenté une autre méthode reposant sur l'emploi du peptide de pénétration cellulaire TAT. Ce peptide polycationique de 13 acides aminés est dérivé de la protéine de transactivation de la transcription Tatp du HIV-1 (Frankel, AD et al. 1988) et sa capacité à être internalisé par les cellules dépend de la présence abondante de résidus arginine

dans sa séquence (Vives, E et al. 1997). Un peptide GASP fusionnée à la séquence TAT et à un marqueur fluorescent FITC par son extrémité amino-terminale a donc été synthétisé. Les premières observations réalisées en microscopie à épifluorescence sur des cellules NG108-15 mises en présence du peptide TAT-GASP semblent indiquer que le peptide pénètre efficacement les cellules. De plus, les premiers essais de stimulation de ces cellules avec le SNC80 en présence ou en absence de peptide TAT-GASP semblent indiquer que la présence du peptide dans les cellules limiterait la dégradation lysosomale du récepteur DOR. Cependant, cet effet n'est pas robuste et les essais nécessitent d'être mis au point et répétés notamment avec un peptide TAT-témoin négatif.

Nous envisageons par ailleurs de réaliser des essais complémentaires de contrôle. D'une part, des essais de *GST-pull down* devrait permettre de s'assurer que l'adjonction de la séquence TAT et du FITC ne modifie pas la capacité du peptide GASP à inhiber l'interaction entre GASP-1 et le domaine carboxyl-terminal du récepteur DOR *in vitro*. Par ailleurs, pour pouvoir se lier au domaine carboxyl-terminal du récepteur DOR et ainsi inhiber son interaction avec GASP-1, le peptide TAT-GASP doit être localisé dans le cytoplasme des cellules. Or, le mécanisme d'internalisation du peptide TAT et des autres peptides de pénétration cellulaire est sujet à débats. Plusieurs mécanismes ont été proposés tels que l'endocytose par vésicule tapissée de clathrine, la macropinocytose où la diffusion simple, des mécanismes qui seraient grandement dépendant des conditions d'incubation des cellules avec le peptide TAT (Futaki, S et al. 2007). Dans le cas de l'endocytose et de la macropinocytose, le peptide est internalisé dans des vésicules et doit être relargué dans le cytoplasme pour pouvoir produire son action. Il apparaît donc important de s'assurer de la localisation subcellulaire du peptide TAT-GASP grâce à l'observation en microscopie confocale des cellules NG108-15 transloquées avec le peptide TAT-GASP.

Une autre stratégie de vectorisation du peptide GASP pourrait être envisagée si l'utilisation de la séquence de pénétration cellulaire TAT s'avérait ne pas être efficace. Cette stratégie repose sur la fusion du peptide avec un acide gras. Cette technique a déjà été employée pour inhiber l'interaction entre le récepteur muscarinique à l'acétylcholine avec la protéine $G_{q/11}$ dans des neurones en culture grâce à un peptide correspondant à l'extrémité carboxyl-terminale de la sous-unité α de $G_{q/11}$ fusionnée à un acide palmitique (Robbins, J et al. 2006). L'acide palmitique s'intègre à la membrane plasmique, ancrant ainsi le peptide, qui est ensuite transloqué à l'intérieur de la cellule par flip-flop. Cette méthode présente l'avantage de concentrer le peptide au niveau de la membrane cytoplasmique alors que les

autres méthodes conduisent à une dilution du peptide dans le cytoplasme. Ceci permet de réduire les quantités de peptide nécessaire et par conséquent les risques de toxicité cellulaire. Par ailleurs, à l'inverse des autres techniques, celle-ci ne fait pas intervenir d'étape d'endocytose du peptide ce qui limite grandement les risques de protéolyse liés à l'acidification des vésicules d'endocytose ou à leur orientation vers le compartiment lysosomal.

II.2. Étude du rôle de GASP-1 et GASP-2 sur le trafic intracellulaire du récepteur muscarinique M₁

Introduction

Publication n°3

Éléments de discussion

II.2.1. Introduction

II.2.1.1. Le système cholinergique

Les transmissions cholinergiques sont assurées par l'acétylcholine, ester acétique de la choline. L'acétylcholine a été le premier neuromédiateur caractérisé dès le début du 20^{ème} siècle par son action en périphérie où il assure la transmission des voies motrices innervant les muscles squelettiques et celle des voies sympathiques préganglionnaires ainsi que parasympathiques pré et postganglionnaires innervant les muscles lisses, le muscle cardiaque et les organes sécréteurs. Mais c'est aussi un neuromédiateur important du système nerveux central où il a une action excitatrice en activant les récepteurs nicotiniques, et un rôle modulateur en activant les récepteurs muscariniques. L'acétylcholine intervient ainsi dans de nombreuses fonctions comme la régulation de la motricité, perturbée dans la maladie de Parkinson (Mesulam, MM 1996), et la mémoire, perturbée dans la maladie d'Alzheimer (Bosboom, JL et al. 2003). Les neurones cholinergiques du système nerveux central ne respectent pas les territoires bien isolés des différents noyaux. Ils sont généralement mélangés à d'autres neurones non cholinergiques. À part les interneurones cholinergiques réalisant des connexions locales dans le striatum ou le cortex, les voies cholinergiques sont souvent diffuses, se projetant dans différentes régions du cerveau. Il est donc difficile de rattacher aux fonctions observées des structures de neurones cholinergiques très précises et encore plus difficile de distinguer les effets muscariniques des effets cholinergiques de l'acétylcholine.

Les récepteurs cholinergiques de type nicotinique sont des canaux cationiques activés par la liaison de l'acétylcholine qui provoquent une réponse rapide sous forme d'augmentation de perméabilité sodique, dépolarisation et excitation. Les récepteurs cholinergiques de type muscariniques sont couplés aux protéines G, leur réponse est plus lente et ils peuvent être excitateurs ou inhibiteurs des neurones ou induire diverses réponses sur les autres types cellulaires. Nous allons à présent détailler plus particulièrement cette deuxième catégorie de récepteurs cholinergiques.

II.2.1.1.1. Les récepteurs muscariniques

Les premiers récepteurs muscariniques ont été clonés en 1986 par l'équipe de Kubo à partir de cortex puis de coeur et furent respectivement nommés M₁ et M₂ (Kubo, T et al. 1986; Kubo, T et al. 1986). Puis rapidement 5 récepteurs muscariniques (M₁ à M₅) issus de gènes distincts furent finalement clonés (Bonner, TI 1989). Les récepteurs muscariniques ont une

taille qui varie entre 460 et 590 acides aminés avec une grande homologie de séquence de l'un à l'autre (Tableau II.2.1). Ils font partie de la famille 1a des RCPG avec un site de fixation du ligand situé à l'intérieur de la portion à sept domaines transmembranaires et plus particulièrement entre les domaines II à VI.

Les récepteurs muscariniques M_1 , M_3 et M_5 sont couplés aux protéines $G_{q/11}$ et leur activation provoque, via la voie de la $PLC\beta$, la libération des stocks intracellulaires de calcium et l'activation de la PKC. Les récepteurs muscariniques M_2 et M_4 sont couplés par des protéines $G_{i/o}$ aux adénylyl-cyclases (III, V, VI et IX) qu'ils inhibent, prévenant ainsi l'activation de la PKA (Tableau II.2.1).

Récepteur	M_1	M_2	M_3	M_4	M_5
Taille (acides aminés)	460	466	590	479	532
Localisation chromosomique	chrom. 1 11q12-13	chrom. 2 7q35-36	chrom. 3 1q43-44	chrom. 4 11q12-11.2	chrom. 5 15q26
Couplage	$G_{q/11}$	$G_{i/o}$	$G_{q/11}$	$G_{i/o}$	$G_{q/11}$
Affinité des antagonistes					
pirenzépine	+++	+	+	++	+
méthoctramine	++	+++	+	++	+
4-DAMP	++	+	+++	++	++
himbacine	+	++	+	+++	+

Tableau II.2.1. Les récepteurs muscariniques de l'acétylcholine

II.2.1.1.2. Les effets muscariniques

Au niveau du système nerveux central, l'activation des récepteurs muscariniques conduit à une modulation de la stimulation neuronale assurée par les neuromédiateurs excitateurs. Cette modulation a lieu soit au niveau somatodendritique avec modification du

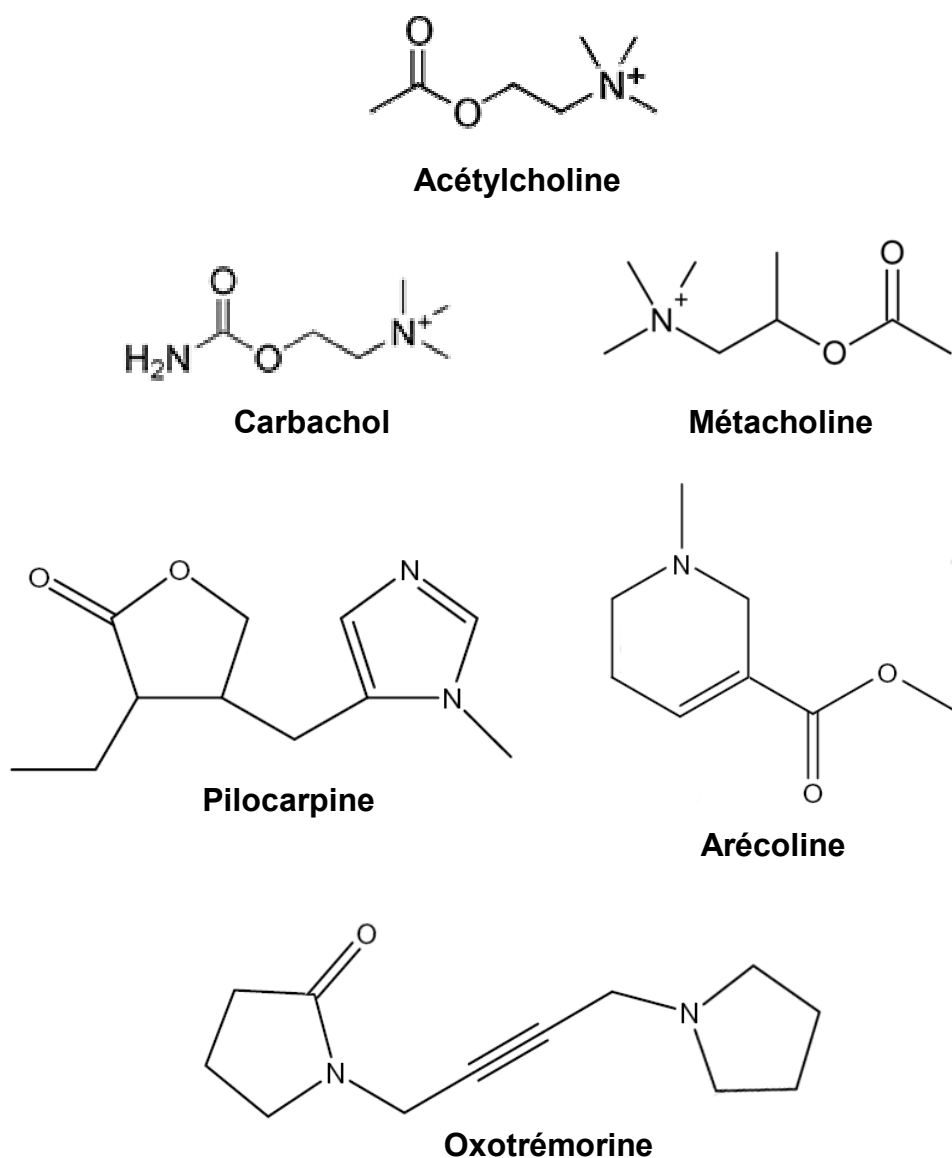
potentiel d'action engendré par les neuromédiateurs excitateurs, soit au niveau axonal en présynaptique avec une inhibition de l'exocytose du neuromédiateur. Les récepteurs M_1 , M_3 et M_5 sont localisés uniquement au niveau somatodendritique où leur activation provoque une dépolarisation qui renforce le potentiel d'action. Les récepteurs M_2 et M_4 sont localisés au niveau somatodendritique où ils déclenchent une hyperpolarisation qui limite le développement des potentiels d'action ainsi qu'au niveau présynaptique où ils inhibent l'exocytose (via la sous-unité $\alpha_{i/o}$ mais également via la sous-unité $\beta\gamma$).

Au niveau périphérique, on retrouve essentiellement les récepteurs muscariniques M_1 , M_2 et M_3 qui sont localisés sur les organes innervés par les fibres des voies parasympathiques et dans les ganglions des voies sympathiques et parasympathiques pour le récepteur M_1 . Les effets muscariniques périphériques sont donc principalement dus à la stimulation des fibres parasympathiques. Ces effets sont divers selon les organes considérés, on retiendra une contraction des muscles lisses (bronchiques, intestinaux...), une vasodilatation, une activation des sécrétions tels que la salive et l'acide gastrique, des effets chronotrope et inotrope négatifs sur la contraction cardiaque (diminution du rythme et diminution de la force contractile).

II.2.1.1.3. Les agonistes et antagonistes des récepteurs muscariniques

L'acétylcholine est l'agoniste de référence des récepteurs muscariniques, cependant son action est de courte durée en raison d'une hydrolyse rapide par les estérases. De nombreux analogues non hydrolysables de l'acétylcholine ont été synthétisés tels que la métacholine et le carbachol qui ont une affinité similaire pour les récepteurs nicotiniques et muscariniques et qui sont avant tout utilisés en laboratoire. Plusieurs alcaloïdes sont des agonistes muscariniques, par exemple la pilocarpine qui est extraite des feuilles d'un arbuste brésilien et l'arécoline qui est extraite de la noix d'Arec, fruit d'un palmier d'Extrême-Orient, était utilisée traditionnellement sous la forme d'une préparation masticatoire provoquant salivation et sudation. Actuellement ces molécules sont utilisées en thérapeutique sous la forme de collyres prescrits dans le traitement du glaucome. L'oxotréphine est quant à elle un composé synthétique utilisé comme outil pharmacologique pour sa capacité à provoquer des effets centraux comparables à ceux observés chez un malade de Parkinson (tremblement, dyskinésie...). Les agonistes cités ici sont représentés dans la Figure II.2.1.

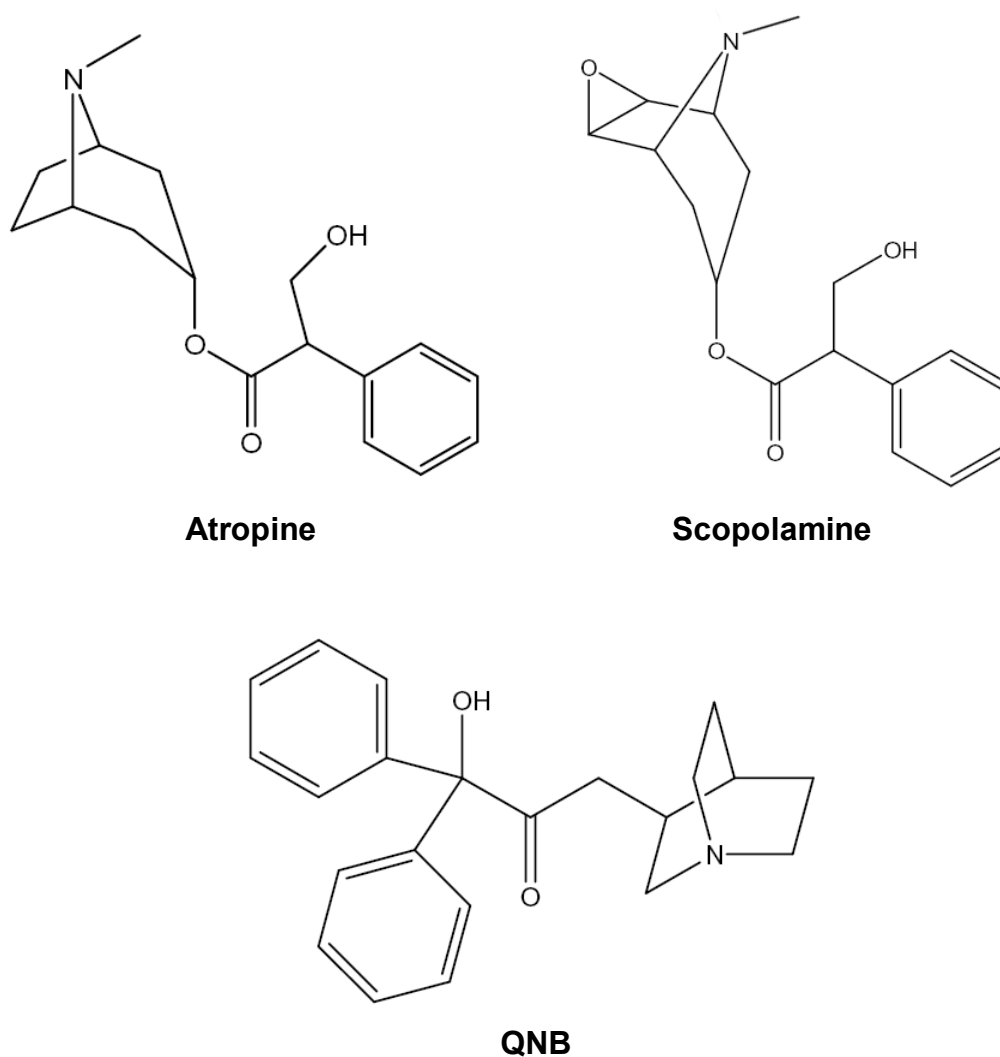
Figure II.2.1. Principaux agonistes muscariniques.



Parmi les antagonistes muscariniques on distingue des antagonistes non sélectifs et des antagonistes sélectifs d'un sous-type de récepteur. L'atropine et la scopolamine sont deux antagonistes non sélectifs extraits à partir de plantes et dont les structures chimiques sont très proches. En clinique, sous sa forme injectable l'atropine est un médicament d'urgence aux multiples usages, par exemple en cas d'infarctus, de malaise vagal ou de troubles aigus du tube digestif. L'atropine est également utilisée en collyre comme mydriatique (dilatation des pupilles) lors d'un examen de fond d'œil. La scopolamine est quant à elle prescrite dans le cas du mal des transports ou dans le traitement du syndrome Parkinsonien. Le 3-quinuclidyl

benzylate (QNB) est un antagoniste non sélectif de synthèse uniquement utilisé en laboratoire. Les antagonistes muscariniques non sélectifs sont représentés dans la Figure II.2.2. *In vitro*, chaque sous-type de récepteur muscarinique, excepté M_5 , peut être antagonisé de manière spécifique par au moins un composé. Par exemple la pirenzépine est un anti-ulcéreux qui antagonise le M_1 , la méthoctramine antagonise le M_2 et la tropicamine est un mydriatique qui antagonise le M_4 (Tableau II.2.1).

Figure II.2.2. Principaux antagonistes muscariniques non sélectifs.



II.2.1.1.4. Régulation de l'activité des récepteurs muscariniques

Dès que l'acétylcholine est libérée dans la fente synaptique, elle subit une hydrolyse par l'acétylcholinestérase associée à la face externe des membranes neuronales. Cette hydrolyse produit de l'acétate et de la choline, immédiatement recapté par la terminaison présynaptique via un transporteur spécifique à 12 domaines transmembranaires. Ceci met rapidement fin à la stimulation des récepteurs muscariniques et provoque l'arrêt de la réponse postsynaptique.

Comme tout les RCPG, les récepteurs muscariniques subissent une désensibilisation homologue impliquant les GRK et les β -arrestines mais un mécanisme de désensibilisation hétérologue, impliquant la PKC, a également été décrit pour ces récepteurs (Haga, K et al. 1998; Waugh, MG et al. 1999). L'internalisation des récepteurs muscariniques fait suite à leur désensibilisation et s'effectue via la voie des vésicules tapissées de clathrine. Il a par ailleurs été démontré que l'internalisation des récepteur M_1 , M_3 et M_4 est régulée via un mécanisme impliquant la dynamine mais dont les adaptateurs éventuels et les vésicules recrutées pour le transport intracellulaire sont encore inconnus (Lee, KB et al. 1998; Vogler, O et al. 1998). Après leur internalisation les récepteurs muscariniques sont resensibilisés et retournent vers la membrane cytoplasmique, cependant si leur stimulation persiste dans le temps, ces récepteurs sont alors réorientés vers le compartiment lysosomal pour y être dégradés. Il a par ailleurs été montré que dans des conditions d'exposition prolongée à l'agoniste, cette régulation négative peut s'accompagner d'une réduction importante de la quantité d'ARNm du récepteur muscarinique M_1 (Lee, NH et al. 1994; Shockley, MS et al. 1997).

II.2.1.2. Choix du modèle expérimental et des essais

Le premier rôle fonctionnel de GASP-1 a été proposé par l'équipe de J. Whistler qui a montré en contexte cellulaire que GASP-1 participe au trafic intracellulaire du récepteur DOR en l'orientant vers le compartiment lysosomal (Whistler, JL et al. 2002). Le récepteur DOR est considéré comme un récepteur qui est dégradé rapidement après sa stimulation et le fait que GASP-1 n'interagisse que très faiblement avec le récepteur MOR, un récepteur qui est recyclé rapidement, suggérerait l'implication de GASP-1 dans le trafic intracellulaire des récepteurs à dégradation rapide. Par la suite, GASP-1 a également été impliqué dans la dégradation lysosomale d'un autre récepteur à dégradation rapide, le récepteur D_2 à la

dopamine (Bartlett, SE et al. 2005). Cependant, nos résultats ainsi que ceux de l'équipe d'A. Tappe-Theodor (Tappe-Theodor, A et al. 2007) indiquent que GASP-1 et plus généralement les protéines de la famille GASP interagissent non seulement avec des récepteurs à dégradation rapide mais également avec des récepteurs à dégradation lente comme le récepteur muscarinique M_1 à l'acétylcholine. Il est ainsi apparu fondamental de préciser le rôle de cette interaction dans la régulation du trafic intracellulaire des récepteurs à dégradation lente. Nous avons choisi comme modèle le récepteur M_1 car il présente une interaction significative avec GASP-1 et GASP-2 *in vitro*, c'est par ailleurs un récepteur qui est bien caractérisé en tant que RCPG à dégradation lente et qui est très représenté au niveau du système nerveux central notamment dans le cortex, l'hippocampe et le striatum où il joue un rôle important dans les processus de mémorisation, d'apprentissage et de l'attention (Volpicelli, LA et al. 2004).

Le récepteur M_1 a été fusionné par son extrémité amino-terminale à la protéine fluorescente EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) dérivée de la GFP qui est issue de la méduse *Aequoria victoria* (Heim, R et al. 1995). Le récepteur fluorescent a été exprimé de façon stable dans des cellules CHO. Afin de s'assurer que la fusion de l'EGFP sur le récepteur ne modifie pas ses caractéristiques pharmacologiques et biologiques, cette lignée cellulaire a été comparée avec une lignée témoin exprimant le récepteur M_1 sauvage. L'affinité de ces deux lignées pour le QNB a été déterminée, la transduction du signal a été évaluée par spectrophotométrie dans des essais de mobilisation des stocks de calcium intracellulaire et l'internalisation a été évaluée par des essais de liaison de ligand radioactif.

Des lignées stables coexprimant le récepteur EGFP- M_1 ainsi que la protéine GASP-1 ou GASP-2 fusionnée par son extrémité amino-terminale à un variant de la GFP, l'EYFP (*enhanced yellow fluorescent protein*), ont alors été réalisées. Afin d'évaluer l'impact de GASP-1 et GASP-2 sur les phénomènes d'internalisation et de recyclage du récepteur M_1 , nous avons réalisé à partir de ces lignées des études de microscopie confocale sur des cellules vivantes stimulées à l'aide d'un agoniste muscarinique. De plus, étant donné que GASP-1 a été impliqué dans l'orientation vers le compartiment lysosomal des récepteurs à dégradation rapide, nous avons évalué dans des essais de liaison de ligand radioactif le rôle de GASP-1 et GASP-2 dans la dégradation du récepteur M_1 suite à sa stimulation prolongée avec un agoniste muscarinique.

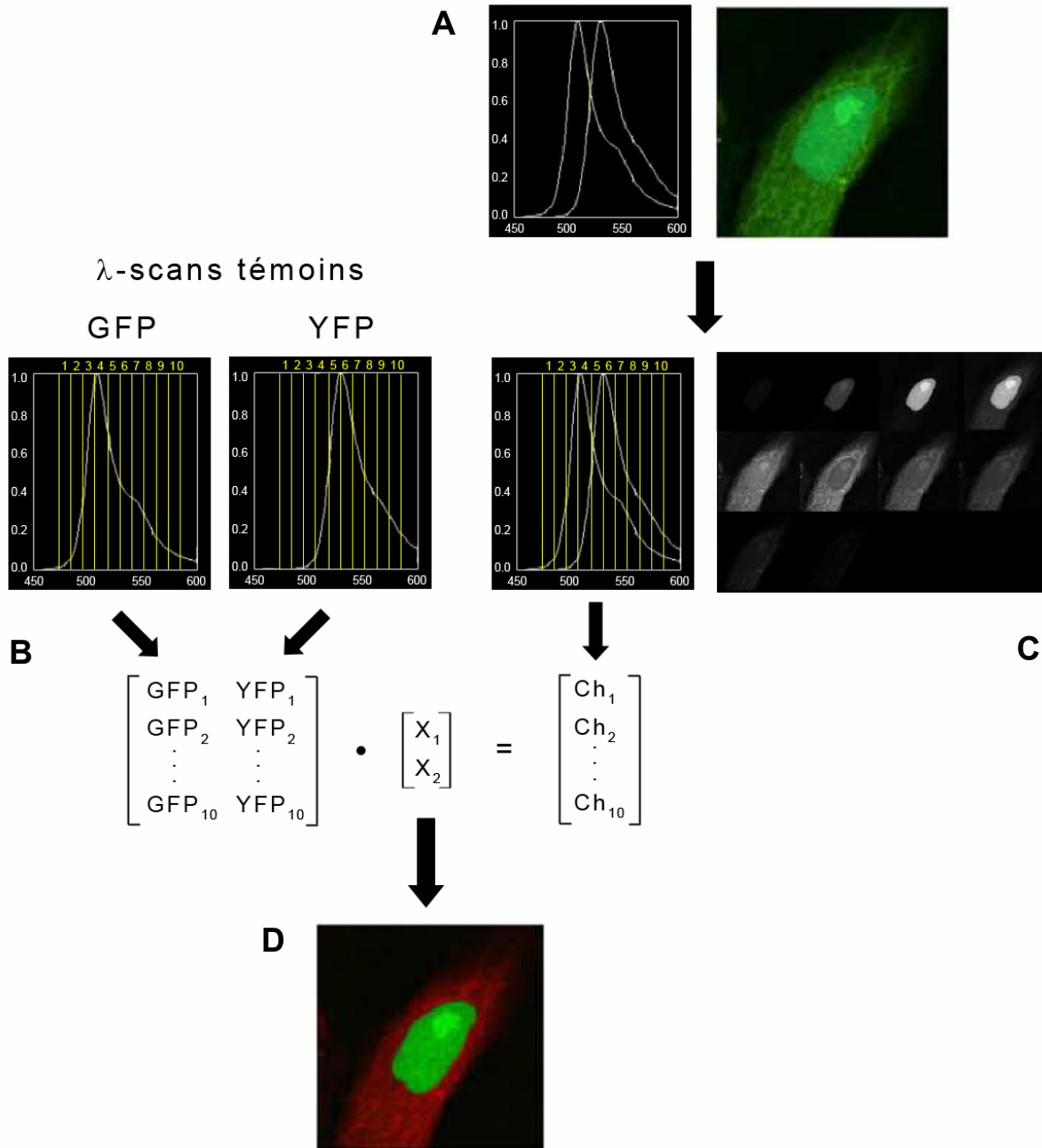


Figure II.2.3. Les étapes du « *linear unmixing* » pour un échantillon exprimant deux protéines marquées respectivement avec l'EGFP et l'EYFP.

Les spectres EGFP et EYFP se recouvrent en grande partie ce qui rend difficile la séparation des deux signaux tel que l'on peut l'observer sur l'image brut de l'échantillon (**A**). Les canaux de détection du λ -scan sont indiqués en jaune sur les spectres. L'analyse par λ -scan d'un échantillon exprimant uniquement l'EGFP et d'un échantillon exprimant uniquement l'EYFP permet de déterminer une matrice rendant compte de la contribution de chacun des deux fluorochrome pour chacun des canaux de détection (**B**). L'échantillon est analysé par λ -scan. Les images correspondant à chacun des canaux de détection sont représentées (**C**). La formule de « *linear unmixing* » est appliquée à chaque pixel afin de déduire la contribution de chaque fluorochrome (X_1 et X_2) et de reconstituer l'image réelle de l'échantillon (**D**).

II.2.1.3. Imagerie confocale sur cellules vivantes : « *linear unmixing* »

Lorsque ce projet a été initié, l'EGFP et l'EYFP ont été choisis pour marquer respectivement le récepteur muscarinique M_1 à l'acétylcholine et les protéines GASP-1 et -2. Ces deux marqueurs protéiques fluorescents sont parmi les plus employés en imagerie cellulaire et présentent l'avantage d'avoir une forte intensité de fluorescence et de ne pas s'oligomériser. Cependant, ils présentent des spectres d'émission qui se recouvrent fortement ce qui rend difficile leur séparation dans des expériences de colocalisation. En pratique, une grande quantité de la fluorescence émise doit être écartée en restreignant la fenêtre d'acquisition des signaux si l'on veut obtenir une bonne séparation des deux fluorochromes et éviter tout risque de mesurer la fluorescence d'un fluorochrome dans le canal de détection dédié à l'autre fluorochrome. Ceci est un problème majeur lorsque l'on désire réaliser des acquisitions sur cellules vivantes car il faut pouvoir collecter le maximum de signal de manière à limiter les quantités de protéine fluorescente qui devront être exprimées et l'intensité de la lumière d'excitation qui doit être utilisée, tous deux affectant la physiologie de la cellule. La technique d'imagerie spectrale associée au « *linear unmixing* » permet de détecter simultanément plusieurs fluorochromes et de déterminer leur contribution relative pour chaque pixel de l'image en exploitant leurs propriétés spectrales respectives (Zimmermann, T et al. 2003). L'information spectrale est acquise de manière séquentielle sous la forme d'une série d'images correspondant chacune à un intervalle de longueur d'onde, on parle de λ -scan. Dans un premier temps, des λ -scans sont réalisés sur des lignées cellulaires témoins exprimant le récepteur EGFP- M_1 seul et la protéine EYFP-GASP seule ce qui permet de déterminer le profil spectral de référence de chacun des deux fluorochromes. Puis un enregistrement spectral des cellules doublement marquées est réalisé pour chaque pixel de l'image. La méthode de « *linear unmixing* » va alors permettre de déterminer pour chaque pixel la contribution réelle de chacun des deux fluorochromes en terme d'intensité de fluorescence en se basant sur leur profil spectral de référence (Figure II.2.3).

Cette technique a été appliquée à des essais de microscopie confocale réalisés sur les lignées CHO vivantes stimulées avec un agoniste muscarinique afin d'étudier l'impact de GASP-1 et GASP-2 sur les phénomènes d'internalisation et de recyclage du récepteur M_1 . Dans ces essais, l'internalisation du récepteur a été évaluée en dénombrant les vésicules fluorescentes de l'endosome de tri qui se forment au cours du temps. Le recyclage a quant à lui été évalué en suivant la variation de la taille et de l'intensité de fluorescence de

l'endosome de recyclage au cours du traitement avec l'agoniste muscarinique ainsi qu'après l'arrêt du traitement. La colocalisation des deux partenaires d'interaction, M₁ et GASP, a également été visualisée en microscopie confocale à l'aide de la technique d'imagerie spectrale associée à la méthode de « *linear unmixing* ».

La microscopie sur cellules vivantes est une technique parfaitement adaptée pour suivre les conséquences sur les RCPG d'une stimulation avec un agoniste notamment sur des temps courts qui ne sont pas accessibles avec la technique de liaison de ligand radioactif. Ces deux techniques sont néanmoins complémentaires et la mesure de la liaison de ligand radioactif permet d'évaluer une population cellulaire plus vaste et plus hétérogène que ne le peut la microscopie confocale.

II.2.3. Résumé des résultats

Nos résultats peuvent être résumés ainsi :

- La fusion de l'EGFP à l'extrémité extracellulaire du récepteur M₁ n'affecte pas la liaison du ligand, ni la transduction du signal, ni l'internalisation du récepteur.
- Le récepteur M₁ colocalise fortement avec GASP-2 au niveau de la membrane plasmique des cellules CHO à l'état de repos alors qu'entre M₁ et GASP-1 aucune colocalisation n'est détectée à l'état de repos.
- La stimulation du récepteur M₁ avec la pilocarpine, un agoniste muscarinique, provoque son internalisation au niveau de l'endosome de tri qui évolue ensuite pour fusionner avec l'endosome de recyclage. Lorsque GASP-2 est coexprimé avec M₁, la formation des vésicules d'endocytose est accélérée et l'endosome de recyclage augmente de taille plus rapidement en comparaison des lignées cellulaires qui expriment le récepteur M₁ seul ou avec GASP-1. L'arrêt de la stimulation des cellules provoque la diminution de la taille de l'endosome de recyclage et de la fluorescence associée. Cette diminution est plus lente lorsque GASP-1 est coexprimée avec M₁ par comparaison aux lignées cellulaires qui expriment le récepteur M₁ seul ou avec GASP-2.

- Lors d'un traitement prolongé (20 heures) des cellules coexprimant le récepteur M₁ et GASP-1 ou GASP-2 avec le carbachol, un agoniste muscarinique, nous avons observé que la dégradation du récepteur M₁ est augmentée en présence de GASP-1 mais pas de GASP-2.

L'ensemble de ces résultats est présenté plus en détail dans la publication n°3.

II.2.4. Publication n°3

Modulation of the intracellular trafficking of the acetylcholine muscarinic M₁ receptor by GASP1 and GASP2

Julien Boeuf^{§*}, Agnès Janoshazi^{‡*}, Isabelle Bertin[§] and Frédéric Simonin[§]

[§] *ÉCOLE SUPÉRIEURE DE BIOTECHNOLOGIE DE STRASBOURG, DÉPARTEMENT RÉCEPTEURS ET PROTÉINES MEMBRANAIRES, UMR-7175 / INSTITUT GILBERT LAUSTRIAT LC1, CNRS - UNIVERSITÉ LOUIS PASTEUR, ILLKIRCH, FRANCE.*

[‡] *Institut de Science et d'Ingénierie Supramoléculaires, Laboratoire de Biologie Chimique, UMR-7006, CNRS - Université Louis Pasteur, Strasbourg, France.*

** These authors contributed equally to this work.*

Correspondence and reprint requests should be addressed to Frédéric Simonin, UMR-7175 / LC1, Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg, bld Sébastien Brandt, 67412 Illkirch, France. E-mail: simonin@esbs.u-strasbg.fr

ABSTRACT

The activity of G protein-coupled receptors (GPCRs) is tightly controlled by the endocytic pathway. Following ligand-induced desensitization and endocytosis GPCRs are targeted to the lysosomal or recycling pathways, and then be recycled back to the plasma membrane or degraded into the lysosome. Recently, we have identified a novel family of proteins, namely GASPs for G protein-coupled receptor associated sorting proteins, which interact with numerous GPCRs. The first member of this family, GASP1, was shown to direct fast-degrading receptors towards the lysosomal pathway. But little is known about the role of GASPs in the postendocytic trafficking of slow-degrading receptors such as the acetylcholine muscarinic M₁ receptor. We hereby present a study on the regulation of intracellular trafficking of the M₁ receptor following either acute or prolonged agonist stimulation, in the presence of either GASP1 or its closest homologue, GASP2. We show that GASP1 blocks M₁ receptor into the recycling endosome upon short agonist treatment and favour the its down-regulation during prolonged agonist treatment, while GASP2 accelerates both its internalization and its targeting into the recycling endosome. These data show for the first time an implication of GASPs in the postendocytic sorting of slow-degrading receptors and suggest that GASP1 and GASP2 could have a divergent contribution to this phenomenon.

INTRODUCTION

G protein-coupled receptors (GPCRs) form one of the largest human families of protein with around 850 members (Vassilatis, DK et al. 2003; Fredriksson, R et al. 2005). GPCRs, which are activated by a large variety of endogenous ligand and exogenous stimuli, are involved in numerous physiological processes. They represent the most intensively studied targets for drug development accounting for more than 30 % of marketed small-molecule therapeutics used in man (Hopkins, AL et al. 2002).

Upon stimulation, GPCRs undergo rapid desensitization and internalization which lead to the dampening of receptor signalling. This phenomenon is mainly mediated by G protein-coupled receptor kinases (GRKs) and arrestins (Moore, CA et al. 2007). Following endocytosis, GPCRs can be either recycled back to the plasma membrane or sorted toward the lysosomal degradative pathway, which has been proposed to be responsible for the prolonged down-regulation of receptor sites. These phenomena are tightly regulated and highly depend on primary structure of each receptor, particularly their carboxy-terminal tail which is one of the most divergent domains within GPCR sequences. Much less is known about the mechanisms that govern the postendocytic sorting of these receptors. Several proteins that interact with the carboxy-terminal tail of different GPCRs have been shown to be critically involved in addressing receptors toward recycling or degradation pathways. Among them the PDZ domain protein NHERF/EBP50 and the N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) have been shown to be important for efficient receptor recycling (Cong, M et al. 2001; Weinman, EJ et al. 2006) while sorting nexin 1 (SNX1) and G protein-coupled receptor associated sorting protein 1 (GASP1) have been shown to mediate postendocytic lysosomal sorting of GPCRs (Wang, Y et al. 2002; Whistler, JL et al. 2002).

GASP1 is the first member of a family of ten proteins that display a conserved carboxy-terminal domain involved in the interaction with GPCRs (Simonin, F et al. 2004). In vitro, GASP1 interacts with the intracellular tail of numerous GPCRs (Heydorn, A et al. 2004; Simonin, F et al. 2004) and two conserved residues located within putative helix 8 of this region have been shown to be critical for this interaction (Simonin, F et al. 2004). These data suggest a wide role of GASP1 in the postendocytic sorting of GPCRs. Its functional implication in receptor down-regulation has been shown for delta opioid receptor, dopamine D₂ receptor, and cannabinoid CB₁ receptor (Whistler, JL et al. 2002; Bartlett, SE et al. 2005; Martini, L et al. 2007). In all cases, overexpression of a dominant negative mutant of GASP1, prevented in vitro agonist-induced degradation of these receptors. Furthermore, in ventral tegmental area slices, anti-GASP1 antibody feeding improved D₂ receptor resensitization after

agonist stimulation, while viral overexpression of GASP1 dominant negative mutant in the dorsal horn of the spinal cord reduced the development of cannabinoid antinociceptive tolerance (Bartlett, SE et al. 2005; Tappe-Theodor, A et al. 2007). Altogether, these data led to the hypothesis that GASP1 is critically involved in the down-regulation of fast-degrading GPCRs upon repeated agonist stimulation.

Previous *in vitro* studies have shown that GASP1 also binds to some GPCRs that are preferably recycled upon stimulation including acetylcholine muscarinic M₁- and adrenergic β_2 -receptors (Whistler, JL et al. 2002; Heydorn, A et al. 2004; Simonin, F et al. 2004). These data suggest that GASP1 could also be implicated in the postendocytic sorting of these receptors. In addition, we have reported that the second member of the GASP family, GASP2, interacts *in vitro* with several GPCR C-tails (Simonin, F et al. 2004) suggesting that it could also modulate trafficking of GPCRs. In this study we sought to determine the role played by GASP1 and GASP2 in the modulation of the activity and postendocytic fate of the slow-degrading acetylcholine muscarinic M₁ receptor (M₁R). To this purpose we generated stable cell lines co-expressing green fluorescent protein (EGFP) tagged M₁R and yellow fluorescent protein (EYFP) tagged GASP1 or GASP2. We show here that the presence of GASP1 or GASP2 neither modify the affinity of M₁ receptor for its ligands nor agonist-induced calcium mobilization. Upon stimulation, M₁R internalization and accumulation in the recycling endosome is accelerated by GASP2 while GASP1 impairs its outflow from the recycling endosome. Finally GASP1 but not GASP2 increases M₁R down-regulation following prolonged agonist treatment. This study provides the first evidence that both GASP1 and GASP2 can modulate the postendocytic trafficking of slow-degrading receptors like M₁R and suggest that GASPs may play a larger role in receptor trafficking and degradation than previously suspected.

MATERIAL AND METHODS

Generation of constructs

A cDNA encoding a signal peptide followed by residues 3-230 of the green fluorescent protein (EGFP, Clontech) was fused upstream to the cDNA encoding the human acetylcholine muscarinic M₁ receptor (M₁R) and inserted into the pcDNA3.1/Neomycin (+) vector (Ilien, B et al. 2003). The cDNA encoding GASP1 was amplified by PCR from human genomic DNA (Simonin, F et al. 2004) and the cDNA encoding GASP2 was purchased from Invitrogen. The sequence encoding the enhanced yellow fluorescent protein (EYFP, Clontech) was fused

upstream to these two cDNA, which were inserted into the pcDNA3.1/Hygromycin (+) vector. All constructs were verified by DNA sequencing.

Cell culture

Chinese hamster ovary (CHO) cells were maintained in HAMF12 (1:1) supplemented Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM/HAMF12, Gibco) containing 5 % (v/v) foetal calf serum (HyClone), penicillin and streptomycin (100 U/ml and 100 µg/ml) antibiotics and 2 mM L-glutamine at 37°C in a water-saturated atmosphere containing 5 % CO₂. Fluorescent protein-tagged constructs were stably expressed in CHO cells after transfection with Lipofectamine2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. To generate homogenous stable cell lines, cells were sorted by FACS and then propagated in appropriated selection media (0.6 mg/ml Neomycin, 0.4 mg/ml Hygromycin). CHO cell line expressing the human wild-type M₁R used as control was obtained from D. Servent.

Intracellular calcium mobilization assay

CHO cells stably co-expressing EGFP-M₁R (M₁R) and EYFP-GASP1 (GASP1) or EYFP-GASP2 (GASP2) were grown to 80 % confluency on 10-cm plates. Cells were rinsed two times with HEPES buffer [137.5 mM NaCl, 1.25 mM MgCl₂/6H₂O, 1.25 mM CaCl₂/6H₂O, 6 mM KCl, 10 mM glucose, 10 mM HEPES and 0.4 mM NaH₂PO₄, pH 7.4]. Cells were then placed in HEPES buffer containing 2 µM cell-permeant calcium indicator Fluo-4 (Molecular Probes), 2.5 mM Probenecid (Molecular Probes) and 0.1 % BSA at 37°C in darkness for 60 min. Next, cells were harvested with trypsin, washed by centrifugation (1,000 × g for 5 min) and resuspended in HEPES buffer containing 2.5 mM Probenecid and 0.1 % BSA. Cell suspension (100,000 cells/ml) was incubated at 21°C in darkness for 30 min. Fluorescence acquisition was done on a 1-ml cell suspension in a spectrofluorimeter (Fluorolog, SPEX) with excitation and emission parameters set at 495 nm and 520 nm respectively and under constant stirring at 21°C. After fluorescence baseline acquisition, the cell calcium influx response was assessed in the presence of the appropriated concentration of acetylcholine (ACh, 0.001–100 nM). Maximal fluorescence signal was measured by cell lysis in the presence of 25 µM digitonin.

Muscarinic M₁ receptor binding assay

Muscarinic M₁ receptor binding sites were measured on whole cell using the two non-

selective ligands [^3H]N-methylscopolamine ([^3H]NMS, 78 Ci/mmol, PerkinElmer), which is membrane-unpermeant and [^3H]N-quinuclidinyl benzilate ([^3H]QNB, 54 Ci/mmol, PerkinElmer), which is membrane-permeant.

For Scatchard analysis, the cells were grown to 80 % confluency on 10-cm plates, harvested with trypsin, washed two times by centrifugation ($1,000 \times g$ for 5 min) and resuspended in 150 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4). Cells were counted by FACS and 100,000 cells per tube were incubated in a final volume of 0.5-ml at 37°C for 60 min in 150 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) with appropriated concentration of [^3H]QNB (5–500 pM).

For internalisation and down-regulation studies, the cells were seeded in 6-well plates at a density of 200,000–300,000 cells/well. Monolayers of cell were treated for various times (1–20 h) in the presence of 100 μM carbachol at 37°C in DMEM/HAMF12 medium. The cells were harvested with trypsin, washed two times by centrifugation ($1,000 \times g$ for 5 min) and resuspended in 150 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) containing 320 mM sucrose. The equivalent of 100,000 cells were incubated at 37°C for 60 min with 800 nM [^3H]QNB or at 20°C for 120 min with 500 nM [^3H]NMS in a 0.5-ml final volume of 150 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) containing 320 mM sucrose.

Total and nonspecific binding were determined in the absence or in the presence of 10 μM atropine, respectively. Samples were then filtered through glass fibre filters pre-treated with 0.5 % polyethylenimine (GF/B, Whatman) in a cell harvester apparatus (Brandel). Filters were washed three times with 4 ml of ice-cold sodium phosphate buffer. Radioactivity was measured by scintillation counting (Packard 2100 TR, PerkinElmer). All experiments were done in triplicate and repeated at least three times. Scatchard analysis was performed using Prism 4 software (GraphPad software) to calculate K_d , B_{max} and EC50 values.

Confocal microscopy on living cells

Cells were plated 36 h before the analysis on 35-mm glass bottom dishes (Bioptechs Inc) and visualized using a Leica SP2AOBS confocal microscope with laser excitation lines of 488 nm and 514 nm for EGFP tagged $M_1\text{R}$ and EYFP tagged GASP proteins and transmitted light. Temperature was maintained at 37°C using a Delta T[®] Open Dish System (Bioptechs Inc). Images of EGFP and EYFP emission were recorded simultaneously with the transmitted light images. The emission-recording channel was carefully chosen for EGFP using 493 to 505 nm emission channel interval. Due to the strong overlap of the emission spectra of EGFP and EYFP tags we used lambda image acquisition and linear unmixing analysis (Leica software) to distinguish EGFP and EYFP in double-labelled samples. For each unmixing experiment, a

pure EGFP and EYFP spectra were acquired from reference single-labelled samples and saved for subsequent linear unmixing analysis. The complex spectrum composed by both EGFP and EYFP in double-labelled samples was recorded using lambda image acquisition from 493 to 600 nm with 10 images. Then the complex signal was reduced to its individual, weighted, signal components by linear unmixing. Time-lapse studies were performed by recording lambda images every two minutes or using two different emission intervals 493-505 nm and 540-600 nm for EGFP and EYFP, respectively with two different excitation wavelengths (488 nm and 514 nm). To ensure consistency among z-plane images during time-lapse study, we took at least 3 to 5 z-plane images and manually selected only one plane for the time-lapse analysis. To visualize receptor internalization, cells were treated with 100 μ M pilocarpine and lambda images were acquired every 2 min over a 60 min period. To calculate the internalization kinetic of the M₁R, 1- μ m diameter dots corresponding to the early endosomes were defined and its population was measured using ImageJ software and subtracting background for each image. Some experiments needed manual counting of the number of dots due to the high background fluorescence. To calculate the recycling kinetics of the M₁R, one ROI in the middle of the cell in the highest fluorescence intensity spot corresponding to the recycling endosome was selected and the relative intensity changes of this ROI was followed by time, including at least 5 to 10 individual cells per experiment. Co-localization study was performed and two proteins were considered to co-localized if the observed signals of the two corresponding labels are non-zero at the same pixel (i.e., co-localized). The quantitative estimation of co-localization is given as the co-localization coefficients (Manders, EM et al. 1992). To quantify the co-localized fraction of each pair of tagged interacting partners, a threshold value for each tag signal was estimated and subtracted. Bleed-through in each of the two tags emission signals was subtracted using the linear unmixing method.

RESULTS

Generation and characterization of stable cell lines co-expressing EGFP-M₁R and EYFP-GASP1 or EYFP-GASP2

In a previous study we have shown that GASP1 and GASP2 display a strong interaction with the carboxyl-terminal tail of muscarinic M₁ receptor (Simonin, F et al. 2004). In order to investigate the implication of GASP1 and GASP2 in the regulation of the postendocytic trafficking of muscarinic M₁ receptor, we generated CHO cell lines stably expressing EGFP-

M₁R (M₁R) alone or co-expressing M₁R with EYFP-GASP1 (GASP1) or EYFP-GASP2 (GASP2). CHO cells did not express endogenous GASP1 or GASP2 as judged by western blot experiments with GASP antibody. In order to avoid any artefact due to GASP overexpression we selected clones that expressed moderate levels of GASP1 and GASP2 as compared to endogenous levels expressed in SH-SY5Y cells (Figure 1). Binding parameters of M₁R were assessed in the three cell lines and compared to a control CHO cell line expressing the wild-type M₁R (wtM₁R) (Lee, SW et al. 1994). As shown in table 1, K_d and B_{max} values obtained from cells expressing M₁R alone were similar to control cells expressing wtM₁R, indicating that neither the affinity of M₁R for [³H]QNB, nor M₁R expression level were affected by EGFP fusion to the NH₂-terminus of the receptor. GASP1 and GASP2 had no influence on these parameters. We then measured agonist-induced Ca²⁺ intracellular release in these cell lines. EC₅₀ value for Ach in cells expressing M₁R was significantly higher than the one obtained for wtM₁R suggesting that Ach signalling is slightly improved by the presence of EGFP at that NH₂-terminus of the receptor. No significant difference was observed in maximal response (Table 1). Results obtained with cells co-expressing M₁R and GASP1 or GASP2 were similar to those obtained with cells expressing M₁R alone suggesting that the presence of GASP1 or GASP2 does not affect M₁R signalling. Finally, we compared agonist-induced internalization of M₁R and wtM₁R using a radioligand binding assay on whole cells. As expected, the number of cell surface binding sites decreased over a period of 20 hours of carbachol treatment (Figure 2). No significant difference was observed between wtM₁R and M₁R. Altogether, these results indicated that M₁R is fully functional and that GASP1 and GASP2 do not affect its ligand binding capacity and signalling properties.

GASP1 and GASP2 modulate M₁R internalization and recycling

GASP1 and GASP2 interact with the carboxy-terminal tail of muscarinic M₁ receptor *in vitro*. Therefore, we first look at GASP1 and GASP1 subcellular localization in cells that were not stimulated with muscarinic agonist. For cell line co-expressing M₁R and GASP1, cellular distribution analysis revealed no co-localization between these two proteins (Figure 3B right panel). GASP1 is expressed in the cytoplasm while the receptor is exclusively expressed at the plasma membrane. This distribution was similar to that observed in cells expressing the receptor alone (not shown) or GASP1 alone (Figure 3A). For cell line co-expressing M₁R and GASP2, cellular distribution analysis of these two proteins revealed a strong co-localization at the plasma membrane and in cytoplasmic vesicles (Figure 3B right panel) while in cells

expressing GASP2 alone, only a cytoplasmic distribution was observed (Figure 3A). These results suggested that at the resting state GASP2 but not GASP1 interacts with M₁R receptor leading to a relocalization of GASP2 at the plasma membrane.

Muscarinic M₁ receptor has been shown to be a slow-degrading receptor, which is mainly recycled back to the cell membrane following short agonist treatment. We thus examined whether this process was modulated by GASP1 or GASP2. Cells expressing M₁R alone or co-expressing M₁R and GASP1 or GASP2 were stimulated with pilocarpine for 1 hour and observed by time-lapse confocal microscopy. The EGFP fluorescent light emission associated to the receptor was measured either using 488 nm excitation wavelength and recording images between 493 and 505 nm or by lambda image acquisition from 493 to 600 nm. EGFP and EYFP contribution to this signal was determined later by linear unmixing using pre-recorded pure spectra of each fluorochrome.

In order to establish a quantitative method to measure internalization kinetics of M₁R, cytoplasmic fluorescent dots corresponding to early endosomes were counted in cells treated with pilocarpine. The time-dependent early endosomes number variation fit a one-phase exponential. In presence of GASP2, the number of early endosomes containing M₁R increased faster than in cells expressing M₁R alone or in the presence of GASP1 with an internalization constant (k_1/k_{-1}) that was significantly lower than the one obtained with M₁R/GASP1 and M₁R cell lines (Figure 4B and C). These results indicated that GASP2, but not GASP1, accelerates the internalization of M₁R.

Upon internalization, M₁R was sorted toward the recycling pathway. Early endosomes containing M₁R were gathered to constitute a bigger and brighter unique perinuclear structure. Cell incubation with Texas-Red-tagged transferrin indicated that this structure corresponds to the recycling endosome (Figure 5A). Increase of recycling endosome fluorescence intensity was correlated with the recruitment of early endosomes containing M₁R. In the presence of GASP2, but not GASP1, this increase appeared earlier than in absence of GASPs (Figure 5B) and half-time constant ($t_{1/2}$) of M₁R/GASP2 cell line was significantly lower than the one obtained for M₁R/GASP1 and M₁R cell lines (Figure 5C). These results suggested that GASP2, but not GASP1, accelerates the intracellular trafficking of M₁R from the early endosomes to the recycling endosome.

In order to assess the recycling of M₁R, after 1-hour pilocarpine stimulation, internalization was blocked with a saturating concentration of atropine and the decrease of EGFP fluorescence signal associated to the recycling endosome was followed by confocal microscopy. Recycling endosome fluorescence intensity decreased slower when GASP1, but

not GASP2, was co-expressed with M₁R as compared to the cell expressing M₁R alone (Figure 6). This suggested that GASP1, but not GASP2, slows down the recycling of muscarinic M₁ receptor. Collectively, these results indicated that GASP1 and GASP2 are both implicated in the intracellular trafficking of the muscarinic M₁ receptor with GASP2 accelerating internalization and targeting of M₁R to the recycling endosome and GASP1 slowing down its recycling to the plasma membrane.

GASP1 increase M₁R degradation under sustained stimulation

As a role in lysosomal sorting of the fast-degrading receptors has been previously shown for GASP1, we decided to investigate whether GASP1 or GASP2 could modulate M₁R down regulation upon sustained agonist stimulation. Cells expressing M₁R alone or co-expressing M₁R and GASP1 or GASP2 were stimulated with carbachol up to 20 hours and cell surface and total number of muscarinic M₁ receptors were measured using [³H]NMS and [³H]QNB, respectively (Figure 7). A similar decrease in cell surface receptors was observed in the presence or absence of GASPs (Figure 7A and B). Conversely, the total number of M₁R appeared to decrease faster in cells expressing GASP1 than in cells expressing M₁R alone or in the presence of GASP2 (Figure 7C and D). After 8 hours of carbachol stimulation, the total number M₁R was still about 100 % in the absence of GASP1 while a 40 % decrease was observed in its presence indicating that GASP1 accelerates M₁R degradation upon chronic stimulation.

DISCUSSION

GASP1 is a cytoplasmic protein that interacts with numerous GPCRs (Heydorn, A et al. 2004; Simonin, F et al. 2004). Several lines of evidence suggest that GASP1 is involved in the postendocytic sorting of fast-degrading GPCRs toward the lysosomal pathway (Whistler, JL et al. 2002; Bartlett, SE et al. 2005; Martini, L et al. 2007). Although GASP1 has been previously shown to interact with some slow-degrading GPCRs, including adrenergic β_2 - and muscarinic M₁-receptors, little is known about its implication in the intracellular sorting of this kind of receptor. Previous studies have shown that in CHO cells M₁R undergoes degradation following sustained agonist treatment (Shockley, MS et al. 1997) but regulatory elements for this phenomenon remain unknown. We show here that, in the presence of GASP1, degradation of M₁ receptor is accelerated and that the total number of receptors after prolonged agonist treatment is significantly lower. In addition, we observed that GASP1

strongly impairs M₁R export from the recycling endosome after one hour of agonist treatment. Collectively, these data suggest that GASP1 could favour M₁R degradation by blocking its recycling at the level of the recycling endosome.

In a previous report, we have shown that GASP1 is the first member of a family of ten proteins. Among these proteins, its closest homologue, GASP2, also interacts with several GPCRs C-tail *in vitro* including M₁R (Simonin, F et al. 2004) suggesting that it could be implicated in the regulation of agonist-induced trafficking and degradation of this receptor. According to this hypothesis, we show in this study that GASP2 accelerates both agonist-induced internalisation and targeting toward the recycling endosome upon short agonist treatment but does not affects M₁R degradation after prolonged agonist treatment. This indicates that GASP2 could accelerate M₁ receptor resensitization. From these data we propose that GASP1 and GASP2 might play opposite roles in the regulation of M₁R resensitization with GASP1 that would favour degradation and GASP2 that would accelerate recycling. This model could even be more complicated since we have shown recently that M₁R can also interact with other members of the GASP family including GASP-3 and GASP-7 (manuscript in preparation).

In conclusion we show here that at least two members of the GASP family can modulate M₁R trafficking and degradation indicating that GASPs could play a larger role in agonist-induced trafficking of GPCRs than previously suspected. The fact that GASP1 and GASP2 oppositely regulate this phenomenon opens the possibility for a specific response of this receptor to a wide range of physiological situations.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by The Ministère de l'Éducation Nationale de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MENSER) fellowship, The Association pour la Recherche sur le Cancer (N°3423), The Fondation pour la Recherche Médicale, The Centre National de la Recherche Scientifique, The Université Louis Pasteur. We thank the Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire core facilities for excellent technical assistance.

REFERENCES

- Bartlett, S. E., J. Enquist, et al. (2005). "Dopamine responsiveness is regulated by targeted sorting of D2 receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(32): 11521-6.
- Cong, M., S. J. Perry, et al. (2001). "Binding of the beta2 adrenergic receptor to N-ethylmaleimide-sensitive factor regulates receptor recycling." J Biol Chem **276**(48): 45145-52.
- Fredriksson, R. and H. B. Schioth (2005). "The repertoire of G-protein-coupled receptors in fully sequenced genomes." Mol Pharmacol **67**(5): 1414-25.
- Heydorn, A., B. P. Sondergaard, et al. (2004). "A library of 7TM receptor C-terminal tails. Interactions with the proposed post-endocytic sorting proteins ERM-binding phosphoprotein 50 (EBP50), N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF), sorting nexin 1 (SNX1), and G protein-coupled receptor-associated sorting protein (GASP)." J Biol Chem **279**(52): 54291-303.
- Hopkins, A. L. and C. R. Groom (2002). "The druggable genome." Nat Rev Drug Discov **1**(9): 727-30.
- Ilien, B., C. Franchet, et al. (2003). "Fluorescence resonance energy transfer to probe human M1 muscarinic receptor structure and drug binding properties." J Neurochem **85**(3): 768-78.
- Lee, S. W., C. W. Woo, et al. (1994). "Selectivity of oxomemazine for the M1 muscarinic receptors." Arch Pharm Res **17**(6): 443-51.
- Manders, E. M., J. Stap, et al. (1992). "Dynamics of three-dimensional replication patterns during the S-phase, analysed by double labelling of DNA and confocal microscopy." J Cell Sci **103** (Pt 3): 857-62.
- Martini, L., M. Waldhoer, et al. (2007). "Ligand-induced down-regulation of the cannabinoid 1 receptor is mediated by the G-protein-coupled receptor-associated sorting protein GASP1." Faseb J **21**(3): 802-11.
- Moore, C. A., S. K. Milano, et al. (2007). "Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins." Annu Rev Physiol **69**: 451-82.
- Shockley, M. S., N. T. Burford, et al. (1997). "Residues specifically involved in down-regulation but not internalization of the m1 muscarinic acetylcholine receptor." J Neurochem **68**(2): 601-9.
- Simonin, F., P. Karcher, et al. (2004). "Identification of a novel family of G protein-coupled

- receptor associated sorting proteins." J Neurochem **89**(3): 766-75.
- Tappe-Theodor, A., N. Agarwal, et al. (2007). "A molecular basis of analgesic tolerance to cannabinoids." J Neurosci **27**(15): 4165-77.
- Vassilatis, D. K., J. G. Hohmann, et al. (2003). "The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(8): 4903-4908.
- Wang, Y., Y. Zhou, et al. (2002). "Down-regulation of protease-activated receptor-1 is regulated by sorting nexin 1." Mol Biol Cell **13**(6): 1965-76.
- Weinman, E. J., R. A. Hall, et al. (2006). "The association of NHERF adaptor proteins with g protein-coupled receptors and receptor tyrosine kinases." Annu Rev Physiol **68**: 491-505.
- Whistler, J. L., J. Enquist, et al. (2002). "Modulation of postendocytic sorting of G protein-coupled receptors." Science **297**(5581): 615-20.

Cell line	Binding parameters		Signal transduction	
	K_d (pM)	B_{max} (fmol/10 ⁶ cells)	EC50 (nM)	Max. response (% of max. fluo.)
wtM₁R	64	204	15 ± 0.5	40.3 ± 2.3
M₁R	41.5 ± 4.3	180 ± 0.3	1.4 ± 0.3	44.2 ± 0.9
M₁R GASP1	43.8 ± 10	211.5 ± 0.5	2.2 ± 1	47.5 ± 5.6
M₁R GASP2	63.7 ± 3	212 ± 0.1	4.7 ± 0.8	43.8 ± 1.8

Table 1. Pharmacological characterization of CHO cells stably expressing wtM₁R, M₁R and co-expressing M₁R and GASP1 or GASP2.

Binding parameters were determined as described in “Material and methods” using [³H]QNB. Acetylcholine-induced calcium intracellular release parameters were determined as described in “Material and methods”. Data are means ± S.E.M of 2 different experiments performed in triplicate.

FIGURES LEGENDS

Figure 1. Western blot analysis of cells stably expressing EYFP tagged GASP1 and GASP2. Equivalent protein extract amount of wild-type SH-SY5Y and CHO cells were separated by SDS-PAGE. GASP1 and GASP2 expression levels were assessed using GASP antibody.

Figure 2. Internalisation of wtM₁R and EGFP tagged M₁R. Cells were treated for the indicated time in abscissa in the presence of 100 μ M carbachol. Number of receptors at the cell surface was determined using [³H]NMS. Receptor internalisation is expressed in percent of cell surface binding sites of untreated cells. Data are means $\pm$ S.E.M of 3 to 6 different experiments performed in triplicate. Statistical analysis revealed no significant differences between the two cell lines.

Figure 3. Stable cell lines co-expressing M₁R and GASP1 or GASP2. Untreated cells were observed by confocal microscopy. To ensure minimal emission bleed-through in the two channels, EGFP and EYFP, we have used lambda image acquisition and linear unmixing analysis (see material and methods). The muscarinic M₁ receptor is visualized in green and the GASPs are visualized in red. The co-localized pixels were determined and are shown in the merged picture. These images are representative of numerous cells examined in different independent experiments.

Figure 4. Internalization kinetic of M₁R in the presence or absence of GASP1 or GASP2. M₁R internalisation was assessed by confocal microscopy on living cell stimulated with 100 μ M pilocarpine at 37°C for 60 min. Spectral image acquisition from 493 to 600 nm with 10 images were performed every 2 min over 60 min period, then later on analysed by linear unmixing. For each image of the EGFP channel, the fluorescent dots of $\sim 1 \mu$ m diameter corresponding to the early endosomes were counted manually or using ImageJ software (**A**). For each time point, the number of dots is represented as a percent of the maximal number of dots counted at the end of the kinetic (**B**). The kinetic constant was obtained by fitting with one exponential [$A_t = A \times (1 - e^{-k_2/k-2}) + A_0$], where A_t is the number of dots at t time, A is the maximal number of dots and A_0 is the basal number of dots at t = 0 (**C**).

Figure 5. Kinetic of recycling endosome formation in the presence or absence of GASP1 or GASP2. Recycling endosome (arrows) was defined as the gathering place of early endosomes and was distinguished from them by its size, which was at least 3 times larger and by its fluorescence intensity, which was 2 to 4 times brighter. Identification of the recycling endosome was further confirmed by incubating cells in presence of Texas red-coupled transferrin (TR) (A). Recycling endosome formation was assessed by measuring the fluorescence intensity change of ROI, which were defined from the last image of “unmixed” image series. For each time point, the fluorescence intensity is represented in arbitrary unit for the 3 cell lines (B). Instead of calculating the kinetic constant of recycling endosome formation by using two exponential 5 parameters fit, we determined the time needed to get 50 % of the full fluorescence intensity increase ($t_{1/2}$), which is a sufficiently good indicator of the recycling endosome formation kinetic (C).

Figure 6. Kinetic of the M₁R recycling in the presence or absence of GASP1 or GASP2. M₁R recycling was assessed by measuring the decrease of the fluorescence intensity in the recycling endosome. After a 100- μ M pilocarpine treatment at 37°C for 60 min, a saturating concentration of atropine (1 μ M) was added to the media to prevent internalization. Spectral image acquisition performed from 493 to 600 nm with 10 images every 2 min for additional 60 min at 37°C. ROI were defined from the first image of the “unmixed” image series. The decrease of fluorescence intensity is represented in arbitrary unit for each cell lines.

Figure 7. Internalisation and down-regulation of M₁R in the presence or in the absence of GASP1 or GASP2. Cells were treated for the indicated time in abscissa in the presence of 100 μ M carbachol. The number of receptors at the cell surface was determined using [³H]NMS and the receptor internalisation is expressed in percent of cell surface binding sites of untreated cells (A) and (B). The total number of receptors in cells was determined using [³H]QNB and receptor degradation was expressed in percent of total binding sites of untreated cells (C and D). Data are means $\pm$ S.E.M of 3-7 different experiments performed in triplicate. * $p < 0.05$ denote significant difference (assessed by one-way ANOVA).

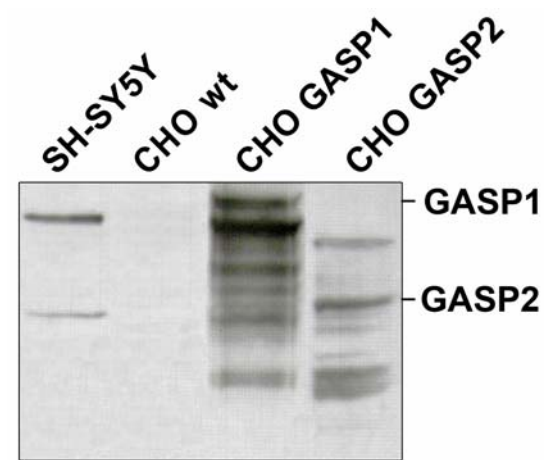


Figure 1.

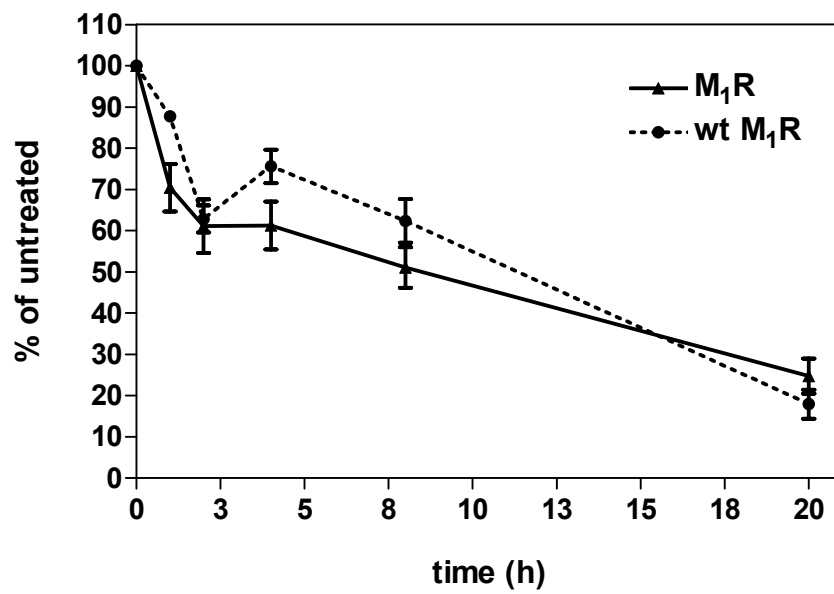


Figure 2.

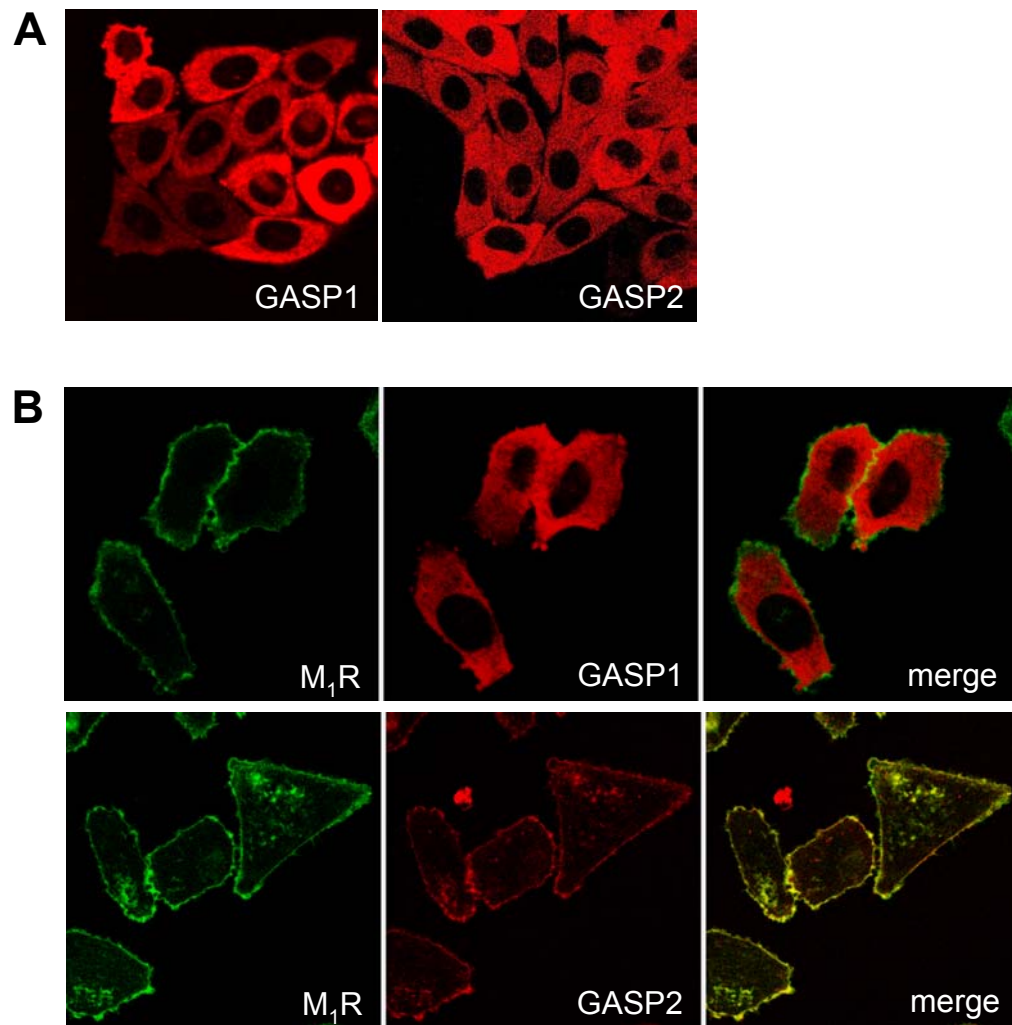


Figure 3.

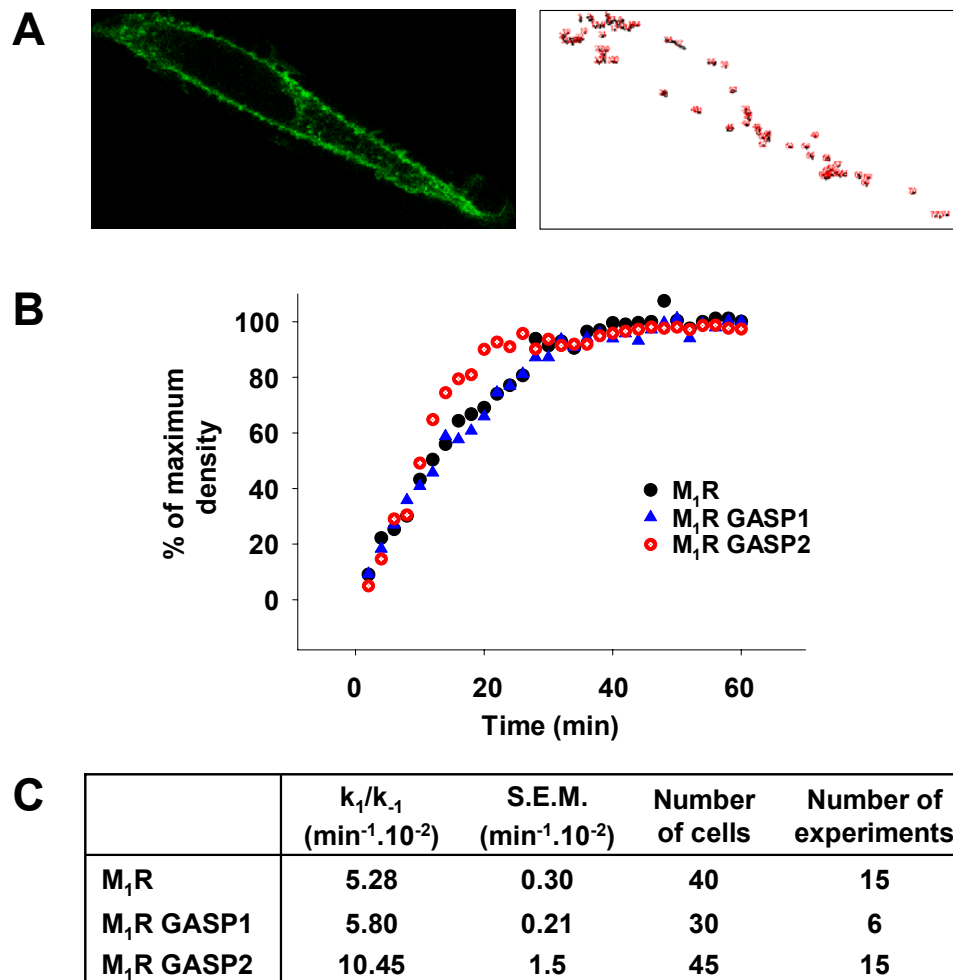


Figure 4.

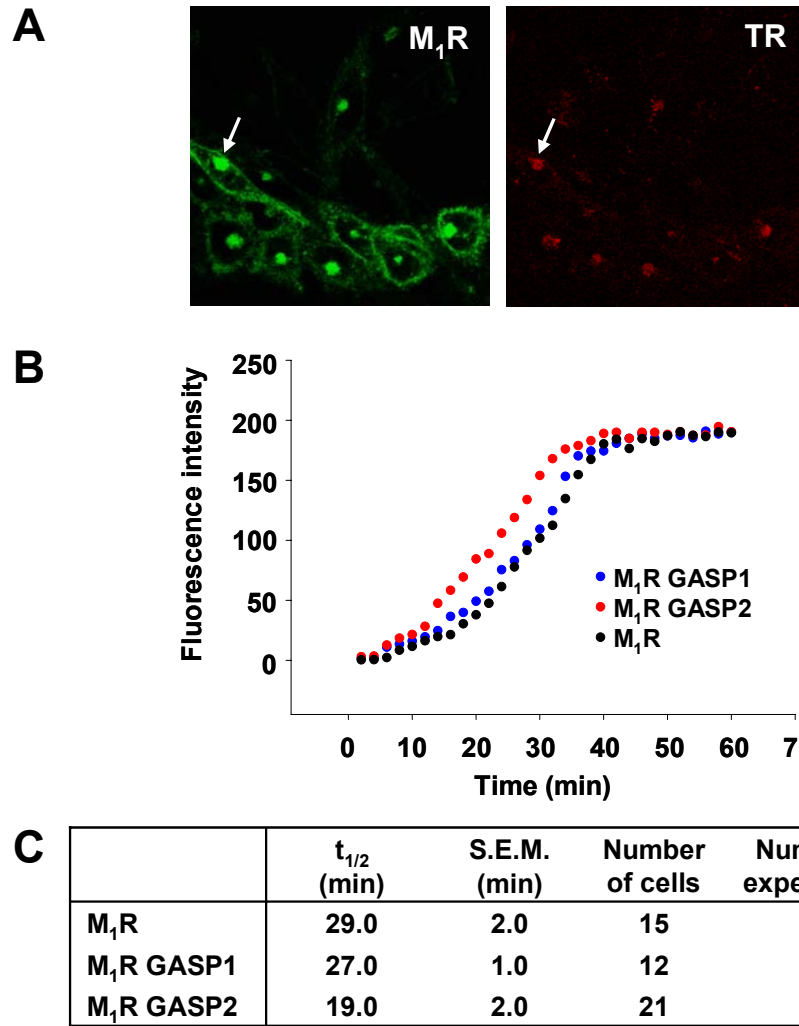


Figure 5.

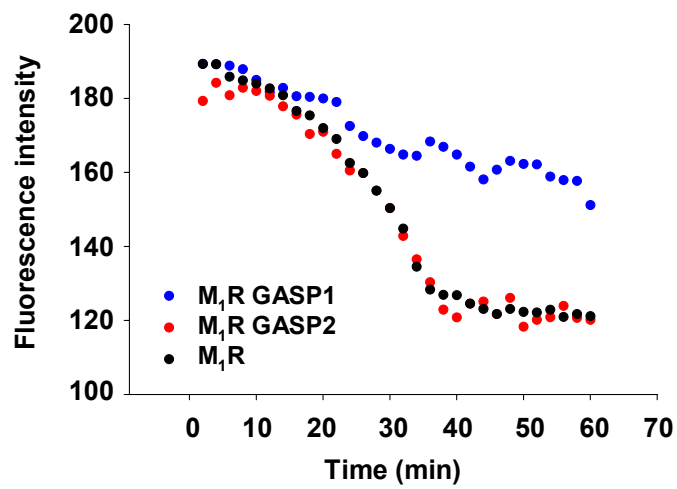


Figure 6.

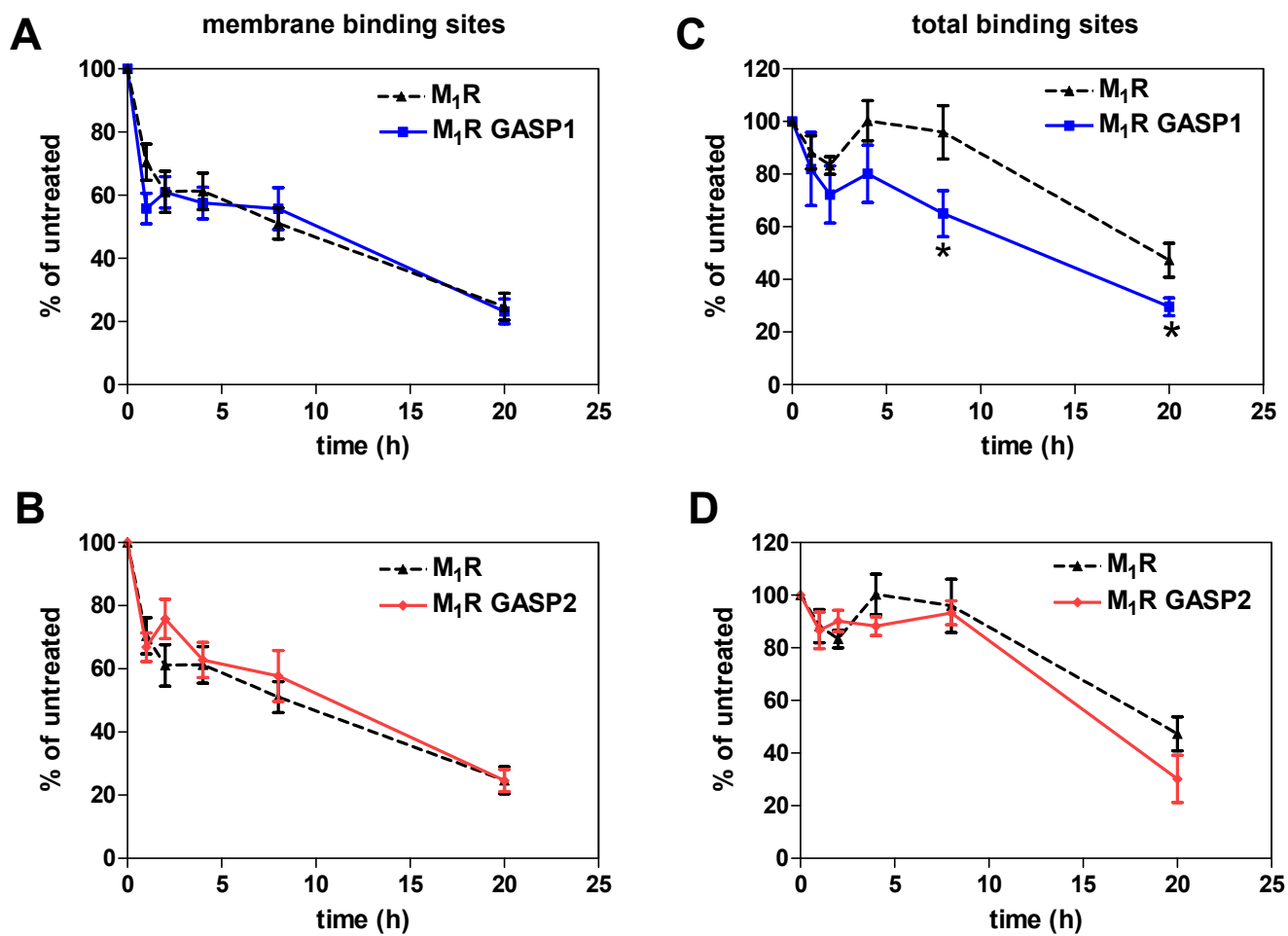


Figure 7.

II.2.5. Éléments de discussion

Les connaissances actuelles sur les mécanismes impliqués dans la régulation du trafic intracellulaire du récepteur muscarinique M_1 à l'acétylcholine sont limitées comparativement à d'autres RCPG plus largement étudiés tel que le récepteur β_2AR . Comme la plupart des RCPG, le récepteur M_1 est désensibilisé puis internalisé après avoir été activé par la liaison de son agoniste. Ce processus est initié par l'action de la protéine kinase GRK2 qui phosphoryle les résidus sérine et thréonine d'une séquence spécifique située dans la 3^{ème} boucle intracellulaire du récepteur (Lameh, J et al. 1992; Moro, O et al. 1993; Haga, K et al. 1996). Mais il a également été montré que la 3^{ème} boucle intracellulaire et l'extrémité carboxyl-terminale du récepteur M_1 peuvent être phosphorylées par la PKC de manière indépendante de la liaison de l'agoniste, ce qui suggère que ce récepteur puisse être aussi désensibilisé de façon hétérologue (Haga, K et al. 1996). La désensibilisation du récepteur M_1 implique la β -arrestine2 qui est rapidement recrutée au niveau de la membrane lorsque le récepteur est stimulé (Santini, F et al. 2000). Cette affinité plus forte du récepteur M_1 pour la β -arrestine2 par rapport à la β -arrestine1 est caractéristique des récepteurs qui recyclent rapidement après leur internalisation comme le récepteur β_2AR . En effet, ces récepteurs internalisent avec la β -arrestine2 puis se dissocient rapidement pour être resensibilisés (Anborgh, PH et al. 2000) (voir également chapitres I.2.2.1 et I.2.3.1, respectivement pages 17 et 28). L'internalisation du récepteur M_1 passe par la voie des vésicules tapissées de clathrine. Elle fait intervenir la β -arrestine2 qui interagit à la fois avec le récepteur et la clathrine. La surexpression en système hétérologue de β -arrestines mutées inaptes à interagir avec la clathrine ou avec le récepteur provoque ainsi l'inhibition de l'internalisation de M_1 en jouant le rôle de dominant négatif (Vogler, O et al. 1999; Claing, A et al. 2000). L'internalisation du récepteur M_1 fait également intervenir la dynamine. Une étude a ainsi montré qu'une dynamine constitutivement inactive, en raison de la mutation du site de phosphorylation de la tyrosyl-kinase c-Src, bloque l'internalisation du récepteur (Werbonat, Y et al. 2000). Enfin, le domaine carboxyl-terminal du récepteur M_1 présente une séquence de type di-leucine, semblable à celle impliquée dans l'internalisation des récepteurs β_2AR , CXCR₄ ou CXCR₂ (voir chapitre I.2.2.3 et Tableau I.2, respectivement pages 21 et 22). Néanmoins, aucune étude ne s'est intéressée à l'heure actuelle au rôle potentiel de cette séquence dans les mécanismes d'internalisation du récepteur M_1 . Le récepteur M_1 est un récepteur qui recycle rapidement (Vogler, O et al. 1998; Krudewig, R et al. 2000), cependant à l'inverse du récepteur β_2AR , les mécanismes mis en œuvres dans ce phénomène sont encore mal compris. Aucune séquence de type PDZ n'a été

identifiée au sein de son domaine carboxyl-terminal et aucune interaction avec NHERF/EBP50 n'a été rapportée. Une étude a toutefois révélé une interaction *in vitro* entre le récepteur M₁ et la protéine NSF (Heydorn, A et al. 2004) qui a notamment été impliquée dans le recyclage du récepteur β_2 AR. NSF pourrait ainsi participer au recyclage du récepteur M₁. La régulation négative est un phénomène qui ne se développe qu'après plusieurs heures de stimulation des récepteurs M₁ à l'aide d'un agoniste muscarinique. Il a été montré qu'une délétion de séquence à l'intérieur de la 3^{ème} boucle intracellulaire du récepteur M₁ pouvait conduire à une diminution de plus de 50% de la régulation négative de ce récepteur (Shapiro, RA et al. 1989). De la même manière, des mutations ponctuelles spécifiques des 2^{ème} et 3^{ème} boucles intracellulaires préviennent totalement la régulation négative dans les cellules CHO sans affecter l'internalisation ni la signalisation du récepteur (Shockley, MS et al. 1997). Enfin, une étude a montré l'interaction *in vitro* du récepteur M₁ avec d'une part la protéine SNX1 qui est notamment impliquée dans la dégradation lysosomale du récepteur PAR₁ et d'autre part avec une forme tronquée de GASP-1 correspondant à sa portion carboxyl-terminale (Heydorn, A et al. 2004). Les résultats que nous avons présenté dans les publications n°1 et 2 (voir page 73) confirment que le domaine carboxyl-terminal du récepteur M₁ interagit *in vitro* avec GASP-1 et montrent également qu'il interagit de manière significative avec GASP-2 et GASP-3.

Les expériences de microscopie confocale qui ont été réalisées ici sur les cellules CHO co-exprimant le récepteur EGFP-M₁ et la protéine EYFP-GASP1 ou EYFP-GASP2 ont montré une implication de GASP-1 et GASP-2 dans la régulation du trafic intracellulaire du récepteur M₁ et cela à différents niveaux. Ainsi, GASP-2 accélère l'internalisation du récepteur M₁. Originellement, deux méthodes de microscopie confocale ont été utilisées afin d'évaluer l'internalisation du récepteur M₁ au cours de la stimulation des cellules. La première méthode consiste à mesurer la variation au cours du temps de l'intensité de fluorescence associée à la membrane cytoplasmique en définissant des régions d'intérêts (ROI) appropriées. La deuxième méthode repose sur le dénombrement au cours du temps de la population des vésicules fluorescentes appartenant à l'endosome de tri (grains d'environ 1 μ m de diamètre) qui apparaissent avec la stimulation des cellules. Cependant, le signal de fluorescence associé à la membrane cytoplasmique n'est pas net. En effet, la membrane apparaît comme légèrement floue et notamment la face intracellulaire qui prend un aspect « ouatée ». Ceci est dû à un phénomène de va et vient des récepteurs entre la membrane et l'espace cytoplasmique situé immédiatement en dessous d'elle. Ce phénomène de recyclage

rapide des récepteurs est probablement relié à leur activité constitutive qui a précédemment été décrit dans les cellules CHO à l'aide d'antagonistes (atropine et NMS) bloquant la faible activation basale de la voie de la PLC par le récepteur (Jakubik, J et al. 1995). Ce phénomène affecte ainsi la mesure de l'intensité de la fluorescence membranaire. Par ailleurs, il est difficile de déterminer des ROI précises en raison des mouvements de la membrane. C'est pour ces raisons que la seconde méthode, basée sur le dénombrement des vésicules fluorescentes de l'endosome de tri, a été privilégiée. Une autre technique intéressante qui est la microscopie de fluorescence par réflexion totale (TIRF) aurait pu être utilisée ici afin de mesurer la variation de l'intensité de la fluorescence membranaire. C'est une technique spécifique à l'observation de la membrane cytoplasmique adjacente à la surface de verre sur laquelle sont cultivées les cellules. Elle présente l'avantage de disposer d'une grande surface membranaire pour la mesure de la fluorescence et permet d'obtenir une épaisseur de coupe optique comprise entre 100 et 200 nm (contre 600 nm en microscopie confocale). En effet, le mode d'illumination par réflexion totale interne excite les fluorochromes sur une très faible profondeur au-delà de la surface de verre en produisant une onde évanescence, ce qui permettrait de visualiser précisément l'internalisation du récepteur M_1 . Le rôle de GASP-2 dans l'internalisation du récepteur M_1 est par ailleurs corrélé avec sa relocalisation au niveau de la membrane des cellules à l'état de repos. En effet, la protéine GASP-2 présente une distribution cytoplasmique lorsqu'elle est exprimée seule mais se relocalise à la membrane avec le récepteur M_1 lorsqu'ils sont conjointement exprimés. Ceci suggère que GASP-2 interagit avec le récepteur M_1 à l'état de repos.

GASP-2 provoque également la relocalisation précoce du récepteur M_1 au niveau de l'endosome de recyclage. L'endosome de recyclage est une structure facilement distinguishable. De type tubulo-vésiculaire, son positionnement est périnucléaire et proche du centrosome et de l'appareil de Golgi (Yamashiro, DJ et al. 1984). Elle se distingue également de l'endosome de tri par sa taille plus importante (au moins 3 fois supérieure) et par sa plus forte intensité de fluorescence. Le passage par l'endosome de recyclage est l'étape limitante du recyclage des récepteurs et notamment du récepteur de la transferrine (Presley, JF et al. 1993) qui colocalise avec le récepteur M_1 fluorescent au niveau de cette structure comme nous l'avons montré. Cependant, nous n'avons pas évalué si les récepteurs M_1 présents dans l'endosome de recyclage provenaient uniquement de l'internalisation, ce qui pourrait être évalué en bloquant par exemple la synthèse protéique *de novo* à l'aide de cycloheximide ou en bloquant la transcription à l'aide d'actinomycine D. Par ailleurs, il n'est pas à exclure que la relocalisation

précoce de M₁ au niveau de l'endosome de recyclage soit le résultat de l'accélération de son internalisation et que GASP-2 n'ait par conséquent pas d'effet directe sur cette relocalisation.

Quant à GASP-1, il semble ralentir le départ des récepteurs M₁ accumulés dans l'endosome de recyclage au cours de l'internalisation. Ceci a été observé en bloquant toute nouvelle internalisation du récepteur M₁ à l'aide d'une concentration saturante d'antagoniste (atropine). Cependant, nous ne pouvons pas conclure sur un effet inhibiteur de GASP-1 sur le recyclage du récepteur M₁ étant donné que la réapparition du récepteur à la membrane suite à l'arrêt de la stimulation n'a pas été suivie. Là aussi, la technique de TIRF pourrait s'avérer judicieuse pour évaluer ce phénomène. GASP-1 favorise également la régulation négative du récepteur M₁ au cours d'une période de stimulation prolongée. Le récepteur M₁ est un récepteur à dégradation lente. La stimulation prolongée des cellules à l'aide d'un agoniste muscarinique conduit ainsi à l'internalisation et à l'accumulation dans le cytoplasme des récepteurs M₁ dont le nombre total ne varie pas durant les premières heures de traitement. Ce n'est qu'après 8 heures de traitement que les récepteurs sont dégradés. En présence de GASP-1, il apparaît que les récepteurs ne sont pas accumulés dans le cytoplasme mais dégradés dès les premières heures de traitement. Ces observations sont par ailleurs en accord avec celles de D. Thompson et de ses collaborateurs qui ont montré que les GASP favorisent la régulation négative du récepteur β_2 AR, un autre récepteur à dégradation lente, lorsque son motif de liaison PDZ est retiré. En effet, le récepteur β_2 AR dans sa forme sauvage interagit sélectivement avec NHERF/EBP50, par rapport à GASP, via son motif de liaison PDZ et est recyclé. Bien que le récepteur M₁ soit un récepteur à dégradation lente, l'absence de motif de liaison PDZ au sein de sa séquence pourrait expliquer son interaction avec GASP-1 et l'accroissement de sa dégradation lors d'une stimulation prolongée en présence de GASP-1. Ainsi, dans des conditions physiologiques particulières telle que la déplétion de certains facteurs cytoplasmiques de recyclage (NHERF/EBP50 par exemple), il serait possible à GASP-1 d'interagir avec d'autres récepteurs à dégradation lente, les redirigeant vers la voie de dégradation lysosomale. Pour conclure, ces résultats indiquent que GASP-1 favorise la régulation négative du récepteur M₁, ce qui permet d'étendre aux récepteurs à dégradation lente les résultats préalablement obtenus pour les récepteurs à dégradation rapide.

II.3. Étude du rôle physiologique de GASP-1 chez l'animal

II.3.1. GASP-1 est impliqué dans les réponses comportementales liées à l'administration de cocaïne

Introduction

Publication n°4

Éléments de discussion

II.3.2. GASP-1 et les rythmes circadiens

Introduction

Problématique et objectifs

Méthode

Résultats

Éléments de discussion

II.3.1. GASP-1 est impliqué dans les réponses comportementales liées à l'administration de cocaïne

II.3.1.1. Introduction

II.3.1.1.1. L'action de la cocaïne sur le circuit de la récompense

La dépendance à la cocaïne et aux autres drogues d'abus se caractérise principalement par la recherche compulsive de drogue, l'incapacité à en limiter la prise et l'apparition de troubles psychologiques ou émotionnels (dysphorie, apathie, anxiété ou encore irritabilité) lors de l'arrêt de sa consommation (Koob, GF et al. 2006). Le comportement de recherche et de consommation de la plupart des drogues d'abus est dû à leur pouvoir renforçant positif, c'est à dire lorsque leurs effets sont perçus comme gratifiants et associés au plaisir. Ce renforcement positif est dû à la stimulation, par les drogues d'abus et plus particulièrement par les psychostimulants telle que la cocaïne, de structures cérébrales spécifiques qui constituent ce que l'on appelle le circuit de la récompense. Manger, boire, se reproduire ou avoir un comportement maternel sont toutes des activités essentielles pour la survie de l'individu et de l'espèce. Au cours de l'évolution, la sélection naturelle a associé à ces comportements de fortes sensations de satisfaction et un circuit de la récompense s'est donc mis en place pour favoriser les comportements reliés à nos besoins fondamentaux (Shizgal, P et al. 1977; Kelley, AE et al. 2002). Ce circuit s'est ensuite développé pour nous inciter à répéter les expériences plaisantes apprises au cours de la vie. Le circuit de la récompense est donc au cœur de notre activité mentale et oriente tous nos comportements. C'est pourquoi les drogues d'abus, en activant ce circuit de la récompense et en produisant une sensation subjective de plaisir, vont pousser l'individu à réitérer la consommation de drogue qui va progressivement devenir compulsive et prendre le pas sur tout autre comportement (Hyman, SE et al. 2006).

II.3.1.1.2. Aspect neurobiologique de l'action de la cocaïne

II.3.1.1.2.1. Le système dopaminergique

Toutes les drogues d'abus augmentent le taux extracellulaire de dopamine et facilitent la transmission dopaminergique dans le système nerveux central (Di Chiara, G et al. 1988; Koob, GF 1992). La cocaïne n'échappe pas à cette règle et de nombreuses études

pharmacologiques ont montré l'importance du rôle de la dopamine dans la mise en place de ses effets renforçants (Woolverton, WL et al. 1992). Du point de vue pharmacologique, la cocaïne agit en bloquant les transporteurs pré-synaptiques de recapture des monoamines (dopamine, noradrénaline et sérotonine) ce qui a pour conséquence de provoquer l'augmentation de leur concentration synaptique. Une littérature abondante sur ce sujet indique que les effets addictifs de la cocaïne sont principalement dus à l'augmentation du taux de dopamine au niveau de la voie mesocorticolimbique qui constitue un élément majeur du système de la récompense (Heikkila, RE et al. 1975; Koob, GF 1992). Cette voie prend ses origines dans l'aire tegmentale ventrale (ATV) dont les neurones dopaminergiques projettent sur différentes structures tels que le cortex préfrontal, l'hippocampe, l'amygdale et le noyau accumbens (NAc) qui forme la partie ventrale du striatum (Figure II.3.1.1) (Fallon, JH et al. 1978; Swanson, LW 1982). Le striatum, composé par le NAc et le caudate-putamen, est une structure d'un intérêt particulier qui relie le système limbique et le système moteur (Mogenson, GJ et al. 1980) et qui semble être le siège principal de l'action addictive des drogues d'abus telle que la cocaïne (Koob, GF 1992).

La transmission dopaminergique est assurée par cinq sous-types de récepteurs couplés aux protéines G désignés de D_1 à D_5 . Chaque sous-type de récepteur dopaminergique peut être catégorisé en tant que récepteur D_1 -like (D_1 et D_5) ou D_2 -like (D_2 , D_3 et D_4) en fonction de leurs homologies de séquence et de leurs propriétés pharmacologiques (Kebabian, JW et al. 1972; Sibley, DR et al. 1993). Dans la voie mesocorticolimbique, ces deux catégories de récepteur dopaminergique exercent des effets intracellulaires opposés via leur couplage aux protéines G. En effet, les récepteurs D_1 -like sont couplés à G_s qui active la voie de l'AMPc et les récepteurs D_2 -like sont couplés à $G_{i/o}$ qui inhibe la voie de l'AMPc (Sibley, DR et al. 1993). Les récepteurs D_2 -like sont par ailleurs capables d'augmenter la conductance potassique en activant les canaux à rectification entrante (Jackson, DM et al. 1994) et d'atténuer l'influx de calcium via la sous-unité $G_{\beta\gamma}$ qui inactive les canaux voltage-dépendants Ca_v2 (Missale, C et al. 1998). Les récepteurs dopaminergiques sont fortement enrichis dans le striatum (NAc et caudate-putamen) et les tubercules olfactifs et dans une moindre mesure dans l'hippocampe, le cortex frontal, l'amygdale, l'hypothalamus et le thalamus (Meador, JP et al. 1995). Dans le striatum, les récepteurs D_1 sont post-synaptiques et portés par les neurones GABAergiques de la voie striato-pallidale directe (voie motrice) (Figure II.3.1.1). Leur stimulation amplifie le potentiel d'action des neurones, favorisant la libération de neuromodulateurs. Quant aux récepteurs D_2 , ils sont soit : 1/ post-synaptiques lorsqu'ils sont

portés par les neurones GABAergiques de la voie striato-pallidale indirecte (voie motrice) ; leur stimulation provoque alors l'inhibition du potentiel d'action. 2/ pré-synaptiques lorsqu'ils sont portés par les neurones afférents où ils jouent le rôle d'autorécepteur exerçant un rétrocontrôle négatif sur la libération de la dopamine soit en induisant l'inhibition de la tyrosine hydroxylase (enzyme limitante de la voie de biosynthèse de la dopamine), soit en potentialisation l'action du transporteur de la dopamine (Figure II.3.1.1).

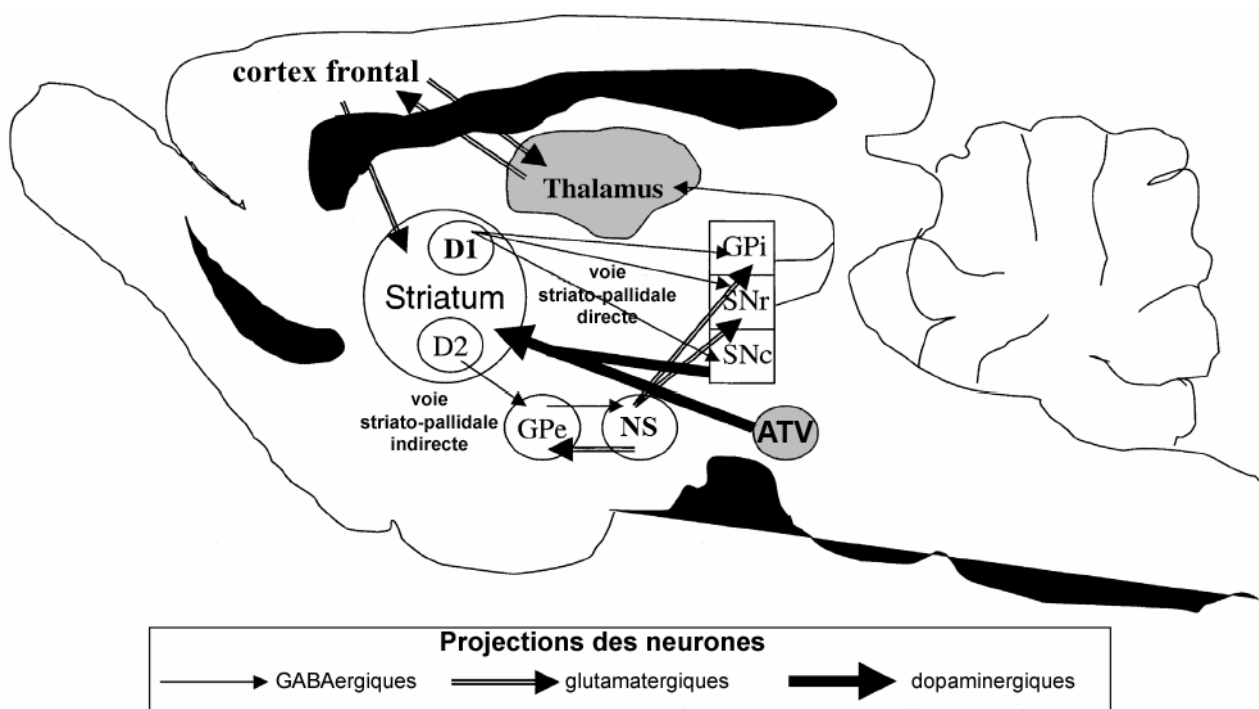


Figure II.3.1.1. Localisation anatomique simplifiée des systèmes importants pour l'action pharmacologique de la cocaïne.

Plusieurs systèmes de neurotransmetteurs sont impliqués dans le système de la récompense et dans le développement des effets comportementaux de la cocaïne. Cependant l'accent est mis plus particulièrement sur le système dopaminergique considéré comme produisant la plupart des effets de la cocaïne. Abréviations : GPe, globus pallidus externe ; GPi, globus pallidus interne ; SNc, substance noire (portion compacte) ; SNr, substance noire (portion réticulée) ; NS, noyaux sous-thalamiques ; ATV, aire tegmentale ventrale.

II.3.1.1.2.2. Le système cholinergique

Les effets de la cocaïne ne sont pas uniquement imputables à son action sur le système dopaminergique. D'autres systèmes neuromodulateurs sont impliqués dans le développement de ces effets : le système sérotoninergique, la sérotonine module notamment la libération de dopamine dans le striatum (Muller, CP et al. 2003) ; les systèmes des endorphines (opioïde et cannabinoïde) (Arnold, JC 2005) ; le système glutamatergique impliqué dans les phénomènes de potentialisation/dépression à long terme (LTP/LTD, processus de plasticité synaptique conduisant à une adaptation à long terme de la réponse des neurones) qui apparaissent au niveau du striatum, du NAc et de l'ATV (Wolf, ME 2002; Thomas, MJ et al. 2003; Kalivas, PW 2004) ; le peptide CART (*cocaine and amphetamine-regulated transcript*), sorte de psychostimulant endogène (Jaworski, JN et al. 2003). Le système cholinergique semble également jouer un rôle prépondérant dans les processus d'addiction liés à la consommation de cocaïne. De manière générale, ce système est fortement impliqué dans des processus cognitifs supérieurs (Pepeu, G et al. 2004) et plus particulièrement dans les processus d'apprentissage et de mémorisation dont le rôle dans le développement de la dépendance aux drogues d'abus a été démontré (Dackis, CA et al. 2001; Hyman, SE 2005). Au niveau du striatum, l'administration de cocaïne provoque l'augmentation du taux d'acétylcholine (Imperato, A et al. 1993; Zocchi, A et al. 1994; Mark, GP et al. 1999). Cette augmentation est le résultat de l'activation indirecte par la cocaïne des récepteurs D₁ situés sur les interneurones cholinergiques du striatum (Imperato, A et al. 1993; Consolo, S et al. 1999). Les neurones cholinergiques stimulés par cette augmentation du taux d'acétylcholine vont moduler à leur tour la libération de dopamine dans le striatum (Zhang, W et al. 2002). Il a par ailleurs été montré que l'activation des récepteurs cholinergiques dans le NAc était nécessaire à l'acquisition des effets renforçants positifs liés à l'administration de drogue (Crespo, JA et al. 2006). Enfin, une étude a présenté l'existence d'une corrélation directe entre le nombre d'interneurones cholinergiques activés dans le NAc et le striatum dorsal et la quantité de cocaïne autoadministrée chez le rat (Berlanga, ML et al. 2003). L'ensemble de ces éléments montre que le système cholinergique joue un rôle important dans le développement des effets de la cocaïne.

II.3.1.1.3. Problématique : GASP-1 et la stimulation prolongée des RCPG *in vivo*

L'implication de GASP-1 dans la régulation du trafic intracellulaire des récepteurs couplés aux protéines G et plus particulièrement l'orientation vers le compartiment lysosomal du récepteur aux opioïdes δ , du récepteur à la dopamine D_2 et du récepteur aux cannabinoïdes CB_1 suggère un rôle important de GASP-1 dans les phénomènes d'adaptation liés à la stimulation prolongée des RCPG. Cependant, peu d'éléments permettent de faire le lien entre la régulation du trafic intracellulaire des RCPG par GASP-1 qui est observée *in vitro* et le développement de mécanismes adaptatifs liés à la stimulation répétée de ces récepteurs. À l'heure actuelle, deux études se sont intéressées au rôle *in vivo* de GASP-1. S. E. Bartlett et ses collaborateurs ont montré dans des expériences *ex vivo* sur coupe de cerveau de rat que GASP-1 était impliqué dans l'inhibition de la réponse électrophysiologique des neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale (ATV) suite à leur stimulation prolongée à l'aide d'un agoniste sélectif des récepteurs D_2 (Bartlett, SE et al. 2005). Les auteurs de cette étude ont proposé que l'interaction de GASP-1 avec le récepteur D_2 soit à l'origine de la régulation négative de ce récepteur provoquant ainsi la disparition de la réponse électrophysiologique. Ainsi, l'utilisation d'anticorps dirigés contre GASP-1, capables d'inhiber l'interaction avec le récepteur D_2 , permet de prévenir cette désensibilisation prolongée et de restaurer la réponse électrophysiologique des neurones dopaminergiques de l'ATV.

Une autre étude, menée par A. Tappe-Theodor et ses collaborateurs, a montré que GASP-1 était impliqué dans le développement de la tolérance aux effets analgésiques des cannabinoïdes chez la souris (Tappe-Theodor, A et al. 2007). GASP-1 interagit avec le récepteur aux cannabinoïdes CB_1 dans le système nerveux. GASP-1 est notamment exprimé au niveau de la moelle épinière ainsi qu'au niveau des ganglions des racines dorsales, dans les neurones nociceptifs impliqués dans le traitement de la douleur et dans l'analgésie induite par les cannabinoïdes. La surexpression d'un dominant négatif de GASP-1 dans la corne dorsale de la moelle épinière de souris, par injection de virions recombinants, permet d'inhiber spécifiquement dans cette région et de manière durable l'interaction entre le récepteur CB_1 et GASP-1. Cette inhibition prévient la régulation négative des récepteurs CB_1 causée par l'administration chronique de cannabinoïdes et permet de limiter significativement le développement de la tolérance à l'effet analgésique des cannabinoïdes. Cette étude apporte pour la première fois la preuve d'un lien entre la régulation du trafic intracellulaire d'un

RCPG par GASP-1 et la mise en place de phénomènes adaptatifs liés à la stimulation prolongée de ce récepteur chez l'animal.

Ces deux études suggèrent qu'en prévenant l'interaction entre GASP-1 et les RCPG, il serait possible d'augmenter l'effet de leur stimulation au cours d'un traitement chronique avec un agoniste.

II.3.1.1.4. Les objectifs

Afin d'évaluer l'hypothèse selon laquelle GASP-1 serait impliqué dans les mécanismes adaptatifs qui se développent *in vivo* lors de la stimulation prolongée des RCPG, des animaux génétiquement déficients en GASP-1 ont été obtenus grâce à la technique de recombinaison homologue. En raison du rôle joué par GASP-1 dans la désensibilisation prolongée des neurones dopaminergiques de l'ATV montré par S. E. Bartlett et ses collaborateurs (Bartlett, SE et al. 2005), nous avons étudié les conséquences comportementales liées à l'administration aiguë et chronique de cocaïne chez les souris déficientes en GASP-1 et leurs homologues sauvages. Nous avons évalué d'une part l'effet locomoteur de la cocaïne dans des essais de sensibilisation et d'autre part les effets renforçants et récompensants de la cocaïne dans des essais d'autoadministration de cocaïne.

Les systèmes dopaminergique et cholinergique semblent conjointement impliqués dans le développement des effets comportementaux de la cocaïne. Par ailleurs, l'administration de cocaïne provoque l'augmentation à la fois du taux de dopamine et d'acétylcholine dans le striatum. Dans le cas d'une administration répétée et prolongée, la persistance de cette augmentation pourrait conduire à la régulation négative des récepteurs dopaminergiques et muscariniques. L'équipe de J. Whistler a par ailleurs proposé que GASP-1 dirige les récepteurs à dégradation rapide vers le compartiment lysosomal suite à leur stimulation (Whistler, JL et al. 2002). S. E. Bartlett et ses collaborateurs ont également montré que GASP-1 favorise sélectivement la dégradation du récepteur à la dopamine D₂ par rapport au D₁ (Bartlett, SE et al. 2005). Compte tenu de ces éléments, il nous est apparu important d'évaluer l'impact de l'absence de GASP-1 sur la densité des récepteurs dopaminergiques et cholinergiques dans le système nerveux central des souris ayant reçu un traitement cocaïne prolongé. Pour cela, la principale structure cérébrale ciblée par l'action de la cocaïne, le striatum, a été prélevée sur ces animaux et des essais de liaison de ligand radiomarqués ont été réalisés.

II.3.1.1.5. L'étude des effets comportementaux de la cocaïne

Nous avons étudié les effets comportementaux de l'administration aiguë et chronique de cocaïne sur les souris déficientes en GASP-1 et sur leurs homologues sauvages à l'aide de deux tests que nous allons présenter brièvement.

II.3.1.1.5.1. L'autoadministration de cocaïne

Le système de la récompense est également présent chez les animaux. Ces derniers apprennent facilement à réaliser une action simple conduisant à l'obtention d'une dose de substance addictive et répètent cette action. En effet, la plupart des drogues d'abus consommées par l'homme sont également addictives pour les animaux (Mello, NK et al. 1979). Ainsi, depuis la première observation de ce phénomène d'autoadministration de drogue chez les animaux en 1962 (Weeks, JR 1962), ce comportement est devenu un modèle couramment employé pour évaluer les propriétés récompensantes et renforçantes de la plupart des drogues d'abus. Ce modèle présente l'avantage de rassembler les trois phases qui caractérisent la dépendance aux drogues d'abus chez l'homme, c'est à dire l'acquisition, le maintien et la rechute. Nous allons décrire brièvement le test d'autoadministration de cocaïne que nous avons employé dans notre étude.

Dans le test d'autoadministration de cocaïne, les animaux sont équipés d'un cathéter placé dans leur veine jugulaire qui est relié à une pompe programmable délivrant la cocaïne. Cette pompe est asservie à un système déclenchant l'injection de cocaïne lorsque la souris introduit son museau dans un orifice spécifique situé sur une des parois de la chambre de test. Un signal lumineux positionné au dessus de l'orifice s'active lors de chaque injection, jouant le rôle de stimulus discriminatif. Ce stimulus indique à l'animal dans quelles circonstances l'administration de cocaïne a lieu. Une fois l'injection effectuée, l'orifice reste inactivé durant 30 secondes. L'un des effets majeur de l'administration de cocaïne est l'augmentation de l'activité locomotrice et donc de l'activité exploratoire de l'animal, ce qui pourrait le conduire à s'administrer la drogue de façon involontaire. Afin de distinguer une augmentation non spécifique de l'activité exploratoire de l'animal d'une réponse comportemental d'autoadministration de cocaïne liée aux effets récompensants de la drogue, un orifice inactif (qui ne déclenche pas d'injection de drogue) s'ajoute au dispositif. Ainsi, on peut mesurer la sélectivité de l'animal pour l'orifice actif et s'assurer que l'autoadministration de drogue est due à une action volontaire de la part de l'animal. La dose de cocaïne délivrée à chaque

injection est de 1 mg/kg. Les effets comportementaux produits par la cocaïne en fonction de la dose injectée suivent une courbe en U inversé. Ainsi les doses en dessous d'un certain seuil ne permettent pas le maintien d'un comportement d'autoadministration dû à un effet renforçant probablement insuffisant. À l'inverse, les doses au-delà d'un certain seuil produisent des comportements d'autoadministration erratiques voir l'arrêt de toute réponse comportementale probablement imputable à des effets indésirables (sédation par exemple). À cet égard, une courbe dose-effet a été établie pour les animaux sauvages et la dose de 1 mg/kg a été choisie sur la base de ces résultats. Durant 10 jours, les souris vont suivre quotidiennement une session de 2 heures d'entraînement à l'autoadministration de cocaïne dans la chambre de test décrite. Au début de chaque session, une première dose de cocaïne est automatiquement délivrée. Lors des premières sessions, la souris va naturellement explorer son environnement à l'aide du museau et de ses vibrisses, et déclencher une injection de cocaïne à chaque exploration de l'orifice actif. Rapidement, l'animal va faire l'association entre les effets récompensants ressentis lors de l'injection de cocaïne et l'action de mettre son museau dans l'orifice actif. Ceci conduit l'animal à délaisser l'orifice inactif au profit de l'orifice actif et s'administrer de façon répétée la cocaïne.

Une fois un comportement robuste d'autoadministration acquis, l'aspect renforçant positif de la cocaïne est mesuré en faisant croître graduellement le nombre d'explorations de l'orifice actif nécessaire à l'obtention d'une injection de drogue de 1 mg/kg selon la séquence suivante : 1-2-3-5-12-18-27-40-60-90 explorations pour une injection. La nécessité pour l'animal de produire un effort de plus en plus important pour maintenir l'administration de la même dose de cocaïne permet d'évaluer sa motivation et son désir d'obtenir les effets récompensants de la drogue (Arnold, JM et al. 1997). Lorsque l'effort à fournir dépasse le bénéfice, l'animal cesse de s'administrer la drogue et le dernier palier atteint par l'animal au cours d'une session de 2 heures détermine le point de rupture. Plus le point de rupture est élevé, plus la motivation de l'animal est forte ce qui signifie par conséquent que l'animal est plus sensible aux effets addictifs de la drogue.

II.3.1.1.5.2. La sensibilisation à l'effet hyperlocomoteur

L'administration répétée et discontinue de cocaïne conduit à une augmentation progressive et durable dans le temps de certains de ses effets comportementaux et notamment de l'activité locomotrice (Stewart, J et al. 1993). Ce phénomène est appelé sensibilisation et peut se définir comme l'inverse du phénomène de tolérance. La sensibilisation a été fortement

étudiée et une analogie a par ailleurs été proposée avec le comportement de recherche compulsive de drogue qui est caractéristique de l'addiction (Robinson, TE et al. 1993). Le test de sensibilisation à l'activité locomotrice de la cocaïne que nous avons employé dans notre étude est brièvement décrit ici.

L'activité locomotrice est mesurée en plaçant l'animal dans une chambre d'expérimentation parcourue par plusieurs faisceaux infrarouges. En se déplaçant, l'animal va couper ces faisceaux, et le nombre d'interruptions de faisceaux comptabilisé au cours d'une session de test de 2 heures va déterminer l'activité locomotrice de l'animal. Les animaux sont répartis en deux groupes, un groupe recevant la cocaïne et un groupe témoin recevant une solution saline. Le groupe témoin permet de déterminer l'activité locomotrice basale des animaux. Les animaux sont injectés une fois par jour avec une dose de cocaïne (20 mg/kg) et cela tous les jours durant 10 jours. L'activité locomotrice est mesurée immédiatement après l'injection et durant 2 heures aux jours 1, 4, 7 et 10 afin de suivre l'apparition de la sensibilisation. Puis les animaux sont privés de drogue durant 4 jours (du jour 10 au jour 14). Finalement les animaux reçoivent une dernière dose de cocaïne ou de solution saline le jour 15 et leur activité locomotrice est mesurée afin d'évaluer la pérennité du phénomène de sensibilisation.

II.3.1.2. Résumé des résultats

Les résultats obtenus lors de l'évaluation des effets comportementaux provoqués par l'administration de cocaïne peuvent être résumés ainsi :

- L'injection de cocaïne (20 mg/kg/jour) induit un effet hyperlocomoteur chez les souris génétiquement déficientes en GASP-1 et chez les souris sauvages comparativement aux animaux injectés avec une solution saline. Cet effet augmente progressivement au cours des 10 jours de traitement cocaïne (1 injection par jour) indiquant le développement de la sensibilisation à la cocaïne. Les souris déficientes en GASP-1 présentent une activité locomotrice systématiquement plus faible que les souris sauvages. L'augmentation de l'effet hyperlocomoteur de la cocaïne est maintenu après quatre jours de privation en drogue chez les souris sauvages et mutantes, indiquant que la sensibilisation à l'effet locomoteur de la cocaïne s'établit de la même manière pour les souris des deux génotypes.
- Les souris des deux génotypes présentent une réponse comportementale à la

cocaïne en s'administrent la drogue. Cependant, à l'issue des 10 jours d'entraînement, seulement 50% des souris déficientes en GASP-1 ont acquis un comportement robuste d'autoadministration comparativement aux souris sauvages qui sont 86% à rentrer dans les critères d'acceptations. Néanmoins, entre les souris sauvages et mutantes ayant acquis ce comportement d'autoadministration, aucune différence significative n'a été mesurée pour le point de rupture. Il apparaît ainsi que les effets renforçants de la cocaïne ne sont pas altérés par l'absence de GASP-1, cependant les souris déficientes en GASP-1 acquièrent avec plus de difficulté le comportement d'autoadministration de cocaïne comparé aux souris sauvages.

Les résultats de essais de liaison de ligands radioactifs, réalisés sur le striatum des animaux sacrifiés après les tests comportementaux, peuvent être résumés ainsi :

- La densité des récepteurs dopaminergiques et muscariniques dans le striatum des souris ayant subi le test de sensibilisation a été évaluée. Aucune différence significative n'a été observée entre les souris sauvages et mutantes qu'elles aient été injectées avec de la cocaïne ou avec une solution saline. De la même manière, aucune différence significative n'a été observée entre les souris injectées avec de la cocaïne et les souris injectées avec une solution saline pour les deux génotypes.
- La densité des récepteurs dopaminergiques et muscariniques dans le striatum des souris qui se sont administrées de façon chronique de la cocaïne est plus basse que chez les souris traitées avec une solution saline. Cette diminution de la densité des récepteurs est par ailleurs significativement plus importante chez les souris déficientes en GASP-1 comparé aux souris sauvages. Ceci suggère que la présence de GASP-1 limiterait la dégradation des récepteurs dopaminergiques et muscariniques lors d'un traitement chronique en cocaïne.

L'ensemble de ces résultats est présenté plus en détails dans la publication n°4.

II.3.1.3. Publication n°4

Attenuated behavioural responses to acute and chronic cocaine in GASP-1 deficient mice

Julien Boeuf*, José Manuel Trigo*, Paul Klosen, Rafael Maldonado and
Frédéric Simonin

From The École Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg, Département Récepteurs et Protéines Membranaires, UMR-7175 / Institut Gilbert Laustriat LC1, CNRS - Université Louis Pasteur, Illkirch, France (JB and FS); The Laboratori de Neurofarmacologia, Departament de Ciències Experimentals I de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain (JMT and RM); The Institut de Neurosciences Cellulaire et Intégrative, Département de Neurobiologie des Rythmes, UMR-7168 / LC2, CNRS - Université Louis Pasteur, IFR des Neurosciences, Strasbourg, France (PK).

JB and JMT contributed equally to this work

Correspondence should be addressed to Frédéric Simonin, UMR-7175 / LC1, Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg, bld S. Brandt, 67412 Illkirch, France; **simonin@esbs.u-strasbg.fr**

Key Words: GASP-1 deficient mice, sensitization to cocaine locomotor effects, cocaine self-administration acquisition, striatum, dopamine and muscarinic receptor density

ABSTRACT

Background: GASP-1 interacts with G protein-coupled receptors (GPCRs) and is implicated in their postendocytic sorting. GASP-1 regulates D₂ receptor signalling in dopaminergic neurons of the ventral tegmental area and is involved in the tolerance to the antinociceptive effects of cannabinoids. Therefore, preventing GASP-1 interaction with GPCRs might provide a means to limit the decrease in receptor signalling upon sustained-agonist treatment.

Methods: GASP-1 knockout (KO) and wild-type (WT) mice were tested for sensitization to the hyperlocomotor effects induced by cocaine. Additional mice were trained to acquire intravenous self-administration of cocaine on a fixed ratio 1 schedule of reinforcement, and the motivational value of cocaine was then assessed using a progressive ratio schedule of reinforcement. The dopamine and muscarinic receptor densities were quantitatively evaluated in the striatum of WT and KO mice tested for sensitization and self-administration.

Results: Acute and sensitized cocaine-hyperlocomotor effects were attenuated in KO mice. A decrease in acquisition of cocaine self-administration was observed in GASP-1 deficient mice, which was associated with a severe down-regulation of dopamine and muscarinic receptors in the striatum of KO mice.

Conclusions: These data indicate that GASP-1 participates in acute and chronic behavioural responses induced by cocaine and are in agreement with a role of GASP-1 in down-regulation of GPCRs. In contrast to previous studies, our data suggest that GASP-1 negatively regulates receptor degradation upon chronic stimulation.

INTRODUCTION

G protein-coupled receptors (GPCRs) form one of the largest protein family encoded by the human genome with around 850 members (Fredriksson and Schioth 2005; Vassilatis et al 2003). GPCRs are activated by a large variety of endogenous ligands and are involved in numerous physiological processes in the central nervous system. They are the most intensively studied targets for drug development, accounting for more than 30% of marketed small-molecule therapeutics used in humans (Hopkins and Groom 2002).

GPCRs undergo rapid desensitization and internalization upon stimulation. They can be either recycled back to the cell surface or degraded by lysosomal or proteasomal pathway following their endocytosis. These phenomena are tightly regulated and are highly dependent on the primary structure of each receptor, particularly in their COOH-terminal tail. Arrestins and G protein-coupled receptor kinases (GRKs) are important players involved in desensitization and internalisation of GPCRs (Moore et al 2007). Much less is known about the mechanisms that govern the postendocytic sorting of these receptors. Several proteins that interact with the carboxy-terminal tail of different GPCRs are critically involved in addressing receptors toward recycling or degradation pathways (Cong et al 2001; Wang et al 2002; Weinman et al 2006). Amongst them, GPCR associated sorting protein 1 (GASP-1) has been shown to mediate postendocytic lysosomal sorting of GPCRs (Whistler et al 2002).

GASP-1 is the first member of a family of ten proteins, which display a conserved carboxy-terminal domain involved in the interaction with GPCRs (Simonin et al 2004). GASP-1 interacts *in vitro* with the intracellular tail of numerous GPCRs (Heydorn et al 2004; Simonin et al 2004) and two conserved residues located within putative helix 8 of this region have been shown to be critical for this interaction (Simonin et al 2004). These data suggest a wide role for GASP-1 in the postendocytic sorting of GPCRs. Its functional implication in receptor down-regulation has been shown for delta opioid-, dopamine D₂-, and cannabinoid CB₁-receptors (Bartlett et al 2005; Martini et al 2007; Whistler et al 2002). In all cases, overexpression of a dominant negative mutant of GASP-1 prevented *in vitro* agonist-induced degradation of these receptors. Furthermore, anti-GASP-1 antibody feeding improved D₂ receptor resensitization after agonist stimulation in ventral tegmental area (VTA) slices (Bartlett et al 2005), while viral overexpression of a GASP-1 dominant negative mutant in the dorsal horn of the spinal cord reduced the development of cannabinoid antinociceptive tolerance (Tappe-Theodor et al 2007). These data led to the hypothesis that preventing GASP-1 interactions with GPCRs might provide a means to limit the decrease in receptor signalling upon sustained agonist treatment (Bartlett et al 2005; Whistler et al 2002; Tappe-Theodor et al

2007).

In order to test this hypothesis we have generated GASP-1 knockout (KO) mice. Since GASP-1 seems to be important in dopamine receptor signalling, we have also examined the consequences of the absence of GASP-1 on cocaine reinforcing effects and sensitization to locomotor responses. Acute cocaine locomotor effects and sensitization were attenuated in KO mice. An impairment in the acquisition of cocaine self-administration was revealed in KO mice, associated with a severe down-regulation of dopamine and muscarinic receptors in the striatum. However, cocaine-reinforcing properties were similar in both genotypes.

MATERIALS AND METHODS

Drugs

Cocaine hydrochloride was obtained from Ministerio de Sanidad y Consumo (Spain) and dissolved in sterile 0.9% physiological saline.

Animals housing and welfare

Mice were housed by groups of five per cage with *ad libitum* food and water, in a temperature ($21 \pm 1^\circ\text{C}$)- and humidity ($65 \pm 10\%$)-controlled room under a normal 12/12 h light/dark cycle (lights on from 08:00 to 20:00). In self-administration studies, mice were maintained in a reversed 12/12 h light/dark cycle (lights off from 08:00 to 20:00). Sensitization studies took place during the light phase, while self-administration studies were performed during the dark phase of the light/dark cycle. Mice weighed 25-30 g at the beginning of the experiments. Behavioural tests and animal care were conducted in accordance with standard ethical guidelines (National Institutes of Health, 1995; European Communities Directive 86/609 EEC), and approved by the local ethical committee (CEEA-IMAS-UPF). All behavioural experiments were performed under blind conditions.

Production of *Gprasp1*^{-/-} mice

The *Gprasp1* mutant mouse line was established at the MCI/ICS (Mouse Clinical Institute - Institut Clinique de la Souris, Illkirch, France; <http://www-mci.u-strasbg.fr>). To construct the targeting vector, two DNA fragments corresponding to the 5' (4.1-kb) and 3' (3.6-kb) homology arms were amplified by high fidelity PCR from 129S2/SvPas mouse embryonic

stem (ES) cells genomic DNA. The amplified fragments were subcloned into a MCI proprietary vector upstream and downstream of a 1.9-kb Neomycin resistance cassette. The linearized construct was electroporated into 129S2/SvPas mouse ES cells. After neomycin selection, targeted resistant clones were identified by PCR using external primers and further confirmed by Southern blot analysis using a ^{32}P -labelled Neo probe following Hind III (5') and Bgl II (3') digestions of the genomic DNA. A positive ES clone was microinjected into C57BL/6J blastocysts and gave rise to chimeric offspring, which in turn were mated with C57BL/6J mice. Agouti-coat pups were genotyped by PCR, showing the germline transmission.

PCR analysis was done by using two sets of primers: a F1-R1 primer set, which allows to discriminate the WT allele by using a WT locus specific primer R1; and a F2-R2 primer set, which permits to discriminate the mutant allele by using a Neo specific primer F2. F1 and R2 primers are specific to the 5' and 3' homology arm, respectively, which are both present in WT and mutant alleles. F1-R1 and F2-R2 primer sets gave 288-bp and 710-bp PCR fragments, respectively.

Anti-GASP-1 antibodies

Polyclonal antibodies directed against the 924-1395 AA portion of human GASP-1 were produced in rabbit (Antibody facility of The Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch, France; <http://www-igbmc.u-strasbg.fr>). The antibodies were purified by affinity chromatography on sepharose resin coupled with the purified antigenic portion of GASP-1.

Non-radioactive in situ hybridization

Adult GASP-1 KO and WT control mice were sacrificed and their brains were dissected out, postfixed and embedded in polyethylene glycol as described previously (Klosen et al 1993). Brain serial coronal sections (8 μm thick) were mounted on slides (SuperFrost, Menzel-Gläzer) and postfixed for 10 min at room temperature in 4% phosphate-buffered formaldehyde, rinsed in PBS and digested for 30 min at 37°C with 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ proteinase K (Roche) in PBS. Proteinase K digestion was stopped with 2% phosphate-buffered formaldehyde for 5 min on ice. After three washes in PBS for 10 min each, sections were acetylated twice for 10 min in 100 mM triethanolamine, 0.25% acetic anhydride. After two 10-min rinses in PBS, sections were equilibrated in 5 x SSC, 0.05% Tween-20 before hybridization.

Hybridization was performed for 40 h at 54°C with 200 ng/ml labelled sense or antisense probes in 50% formamide, 5 x SSC, 5 x Denhardt's solution and 500 µg/ml salmon sperm DNA. Stringency rinses were performed 6 times for 10 min in 0.1 x SSC at 72°C.

Digoxigenin-labelled bound probes were detected with alkaline phosphatase-labelled anti-digoxigenin antibodies (Roche). Alkaline phosphatase activity was detected with bromo-chloro-indolyl phosphate and nitroblue tetrazolium in the presence of 5% polyvinyl alcohol (70,000-100,000 MW, Sigma).

Locomotor activity sensitization

The locomotor responses induced by cocaine (20 mg/kg, i.p.) were measured by using individual locomotor activity boxes (9x20x11 cm; Imetronic) as previously described (Castane et al 2002). The sensitization procedure was similar to the protocol previously described by Zhang et al (2006), with slight modifications. In our study, animals were habituated for 1 h in the locomotor activity boxes. For the following 2 sessions, all mice received saline (1 ml/100 g, i.p.), and their locomotor responses were recorded for 1 h after the injection to measure baseline motor activity. Mice were thereafter treated with cocaine (20 mg/kg, i.p.) or saline during 10 consecutive days. , Five days after the last chronic administration (day 15), the expression of sensitization was evaluated with an acute challenge (cocaine 20 mg/kg, i.p. or saline).

Drug self-administration

Apparatus. Self-administration training and testing were performed in 16 operant chambers (Model ENV-307A-CT, Med-Associates), as previously described (Trigo et al 2007).

Surgery. Mice were anaesthetized with a ketamine/xylazine mixture (5:1; 1 ml/100 g body weight, i.p.) and then implanted with an indwelling i.v. silastic catheter in the right jugular vein, as previously described (Trigo et al 2007). After surgery, mice were individually housed. Potency of the catheters was evaluated periodically (once a week), and whenever drug self-administration behaviour appeared to deviate dramatically from the one previously observed, by infusing 0.1 ml of thiopental (5 mg/ml) through the catheter. If prominent signs of anaesthesia were not apparent within 3 s of the infusion, the corresponding mice were removed from the experiment.

Self-administration procedure. Four days after surgery, mice were trained to nose-poke under a fixed ratio 1 (FR1) schedule of reinforcement in order to receive cocaine (1 mg/kg/infusion) during 10 days as previously described (Trigo et al 2007). Stable acquisition

of self-administration behaviour was achieved when all of the following conditions were met: 1) less than 20% deviation from the mean of the total number of reinforcers earned in three consecutive sessions (80% stability), 2) at least 75% responding on the active hole, and 3) a minimum of 10 reinforcers earned per session. When stability had been acquired, mice were tested on a progressive ratio (PR) schedule of reinforcement as previously described (Trigo et al 2006)

Brain collection and total homogenates preparation

Mice from both sensitization and self-administration studies were killed 60 min after the last session, and their brains were rapidly removed. Brain areas were dissected on ice, frozen on dry ice and stored at - 80°C until used. For each brain area, 3-5 tissue samples per group were pooled and homogenized (Ultra-Turrax DI 18 Disperser, IKA) for 30 s in 20 volumes (w/v) of ice-cold 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), and washed twice by centrifugation (20,000 x g, 10 min, 4°C). Pellets were resuspended in fresh buffer and homogenized by 5-10 strokes in a glass Potter apparatus. Protein concentrations were determined (BCA assay kit, Pierce) and adjusted to 1 mg/ml.

Binding assays

Muscarinic (M-like) receptor binding sites were measured using the non-selective ligand [³H]-N-methylscopolamine ([³H]-NMS, 78 Ci/mmol, PerkinElmer) according to Dombrowski et al (1983), with minor modifications. Total homogenates (10 µg/assay) were incubated for 120 min at 20°C with 3 nM [³H]-NMS in 150 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) in a final volume of 0.2 mL. Non-specific binding was assessed in the presence of 10 µM atropine.

Dopaminergic receptor binding sites were measured using [³H]-SCH 23390 (D₁-like) and [³H]-spiperone (D₂-like) as previously described (Madras et al 1988; Xu et al 1991). Total homogenates (50 µg/assay) were incubated for 60 min at 37°C with 6 nM [³H]-SCH 23390 (85 Ci/mmol, PerkinElmer) for D₁-like receptors or 3 nM [³H]-spiperone (15 Ci/mmol, PerkinElmer) for D₂-like receptors in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA in a final volume of 0.2 mL. For D₂-like, 5 µM mianserin was added into the buffer to block serotonergic sites. Non-specific binding was defined with 10 µM (+)butaclamol.

After the incubation, samples were filtered through 0.5% polyethylenimine pre-incubated glass fibre filters (GF/B, Whatman) in a cell harvester apparatus (Brandel). Filters were

washed three times with 4 mL of ice-cold sodium phosphate or Tris-HCl buffer for muscarinic and dopaminergic receptors binding assays, respectively. Radioactivity was measured by scintillation counting (Packard 2100 TR, PerkinElmer).

Statistical analysis

Locomotor activity data were analyzed by two-way repeated measures ANOVA. Differences between saline and cocaine treatments for each genotype were analyzed by one-way ANOVA when appropriate. For cocaine self-administration studies, two-way repeated measures ANOVA was first used. Discrimination between the active and the inactive holes for each genotype, and the data of the PR studies were analyzed using one-way ANOVAs. Binding data were analyzed using one-way ANOVA and unpaired two-tailed *t*-tests. $p < 0.05$ was considered to denote statistical significance.

RESULTS

Generation of GASP-1 deficient mice

In order to selectively knockout the G protein-coupled receptor associated sorting protein-1 gene (*Gprasp1*), a targeting vector in which exons 5 to 11 of GASP-1 were replaced by a neomycin cassette was constructed (Figure 1A). Correct targeting of the construct was confirmed by PCR (not shown) and Southern blot analysis of neomycin resistant ES cells (Figure 1B). Targeted ES cells were further used to generate GASP-1 deficient mice. Germline transmission of the mutation was confirmed by PCR analysis of mouse genomic DNA (Figure 1C). Finally, western-blot analysis showed that GASP-1 was absent in brain of GASP-1 homozygous mice (Figure 1D). GASP-1 KO animals were healthy and had no gross abnormalities. There were no obvious differences in number of males and females in the offspring of mutant animals. Moreover, targeted deletion of *Gprasp1* did neither alter the overall brain architecture nor the general behaviour of mice in ordinary conditions.

***Gprasp2* gene expression in GASP-1 KO mice**

Since the second member of the GASP family, GASP-2, displays close sequence homology with GASP-1, the consequences of *Gprasp1* deletion on *Gprasp2* expression was assessed by *in situ* hybridization (Figure 2). *Gprasp2* expression was present in both WT and KO mice in

the lateral (LS) and medial septal areas, down to the diagonal band of Broca and in the ventral pallidum (Figure 2A and B). *Gprasp2* mRNA positive cells were also observed in the shell of the nucleus accumbens along the medial aspect of the anterior commissure (ac). Only a few *Gprasp2* mRNA positive cells were detected in the caudate putamen (CPu) (Figure 2A, B, C and D). *Gprasp2* expression was easily detected in the globus pallidus (GP) (Figure 2C and D). No obvious differences were revealed in *Gprasp2* expression level between WT (Figure 2A and C) and KO (Figure 2B and D) mice. These results suggest that the absence of GASP-1 was not compensated by changes in expression or distribution of GASP-2.

Behavioural responses of GASP-1 KO mice upon cocaine treatment

Dopamine D₂ receptors, have been previously shown to interact with GASP-1 and disruption of this interaction in primary neurons facilitated recovery of D₂ responses (Bartlett et al 2005). We therefore examined the behavioural responses of GASP-1 KO mice to cocaine treatment in two different paradigms, locomotor sensitization, in which cocaine was administered by non-contingent injections, and self-administration, which corresponds to a daily contingent administration of the drug.

In the locomotor sensitization paradigm, mice received a daily injection of cocaine (20 mg/kg, i.p.) or saline for 10 consecutive days, and the effects of an additional challenge to cocaine were evaluated at day 15. The first acute cocaine administration significantly increased locomotor activity only in WT [$F_{(1,19)} = 17.375$, $p < 0.01$], but not in KO animals (comparisons to saline groups). Successive injections of cocaine significantly increased the locomotor response with respect to the first acute administration, in both genotypes, although a more reliable response was revealed in WT than in KO mice (significant locomotor enhancement for 7 days out of 10 in WT mice versus 4 days out of 10 in KO mice, data not shown). At day 15, a significant increase in locomotion compared to the response after the first cocaine injection, was only revealed in WT mice [$F_{(1,9)} = 8.479$, $p < 0.05$] (Figure 3). Altogether, these data indicate a decrease in cocaine acute locomotor responses and sensitization in GASP-1 KO animals.

Cocaine reinforcing properties were evaluated in the self-administration paradigm. Both genotypes acquired and maintained a reliable operant response to self-administrated cocaine (1 mg/kg/infusion), as shown by patent discrimination between the active and the inactive holes during the whole experimental sequence (Figure 4A). For KO mice, two-way ANOVA showed a significant effect of hole [$F_{(1,26)} = 23.628$, $p < 0.001$] and of the interaction between these two factors [$F_{(9,234)} = 6.681$, $p < 0.001$] without significant effect of day [$F_{(9,234)} = 1.011$,

NS]. Two-way ANOVA in WT mice showed significant effect of hole [$F_{(1,26)} = 61.674$, $p < 0.001$] without significant effect of either day [$F_{(9,234)} = 1.272$, NS], or interaction between these two factors [$F_{(9,234)} = 1.216$, NS]. Whereas 85.71% of the WT mice trained to self-administer cocaine reached the acquisition criteria, only 50% of the KO animals reached these criteria. Pearson χ^2 analysis revealed a significant decrease in the percentage of acquisition in KO animals compared to WT mice ($\chi^2 = 4.094$, $p < 0.05$). Mean time to achieve the acquisition criteria was similar in both genotypes (3.33 ± 0.64 days in WT and of 3.28 ± 0.83 days in KO). Differences in the number of cocaine infusions obtained by both genotypes were analyzed using two-way ANOVA. A significant effect of day was observed [$F_{(9,252)} = 2.712$, $p < 0.01$] without effect of either genotype [$F_{(1,28)} = 1.560$, NS], or interaction between these two factors [$F_{(9,252)} = 0.803$, NS]. In order to evaluate whether WT and KO mice showed differences in the reinforcing strength of the drug, a PR schedule was performed in mice achieving the acquisition criteria during the FR training. No significant differences were observed in the breaking points reached by KO and WT mice (Figure 4B). These results indicate an impairment in the acquisition of cocaine self-administration in GASP-1 KO mice. However those mutants reaching the acquisition criteria displayed similar reinforcing properties of cocaine than WT mice.

Increased down-regulation of striatal dopamine and muscarinic receptors in GASP-1 KO

GASP-1 has been proposed to mediate receptor down-regulation after chronic agonist treatment (Bartlett et al 2005; Tappe-Theodor et al 2007; Whistler et al 2002). In order to investigate whether the difference observed between WT and GASP-1 KO animals in the acquisition of cocaine self-administration could be related to a differential numbers of dopamine and muscarinic receptors between both genotypes, we measured these respective binding sites in the striatum of WT and KO mice chronically exposed to cocaine. Untreated WT and KO mice expressed similar levels of dopamine and muscarinic receptors in the striatum (Table 1). As expected, WT animals displayed an important decrease in dopamine and muscarinic receptors after chronic self-administration of cocaine (Table 1). This down-regulation was even more pronounced in GASP-1 KO animals, with more severe decreases than in WT mice: additional down-regulation of 39% in D₁-like receptors, of 53% in D₂-like receptors and of 31% in M-like receptors compared, to WT mice (Table 1 and Figure 5). These data are in agreement with previous studies suggesting a role of GASP-1 in down-

regulation of GPCRs upon sustained stimulation. However, the present results indicate that GASP-1 would decrease rather than stimulate receptor down-regulation.

Mice exposed to the sensitization paradigm were also sacrificed on day 15 after the last acute injection of cocaine or saline and striatal dopamine and muscarinic receptor levels were assessed. No significant differences were found in receptor levels in any experimental group (Table 1). This negative result could be due to the mode of cocaine administration (passive versus active) or linked to the disruption of cocaine injection during five days before the last administration, which could allow the animals to recover their initial receptor levels.

DISCUSSION

GASP-1 is a cytoplasmic protein predominantly expressed in the nervous system, which interacts with numerous GPCRs (Heydorn et al 2004). Several lines of evidence suggest that GASP-1 is involved in the down-regulation of GPCRs upon chronic agonist stimulation and that disrupting the interaction between GASP-1 and GPCRs could improve *in vivo* receptor signalling upon sustained stimulation (Bartlett et al 2005; Tappe-Theodor et al 2007). However, these results are based on the use of high amounts of either antibody or truncated form of GASP-1, which could lead to unspecific effects. In order to circumvent this problem, a mouse line in which GASP-1 gene has been disrupted by homologous recombination was generated. We present here the first characterization of GASP-1 KO mice in which the behavioural and biochemical consequences of acute and chronic cocaine administration were studied. In the absence of GASP-1, we observed reduced acute cocaine locomotor effects and sensitization compared to those obtained in WT mice. The acquisition of cocaine self-administration was significantly impaired in the absence of GASP-1, since only 50% of GASP-1 deficient animals reached the acquisition criteria during the training period, while 86% of WT mice reached these criteria. However, cocaine reinforcing effects were similar in WT mice and in those GASP-1 KO mice achieving the acquisition criteria. Altogether, these data suggest that the presence of GASP-1 is required for the acute and chronic behavioural responses to cocaine, and disagree with the hypothesis that blunting the interaction of GASP-1 with GPCRs would increase the effect of agonist stimulation during chronic treatment.

Dopamine receptors are primary responsible for the locomotor and reinforcing effects of cocaine (see Koob and Le Moal 2006). Moreover, a secondary elevation of acetylcholine concentrations, due to dopamine activation, has been shown in the striatum following cocaine

administration, which has been associated with its reinforcing effects (see Williams and Adinoff 2007). The literature describing the effects of repeated cocaine administration on striatal dopamine and muscarinic receptor densities reports contradictory results (either down-regulation, up-regulation or no alteration in receptor densities), depending on the cocaine dose, schedule and way of administration (contingent or non-contingent) (reviewed in Williams and Adinoff 2007). Here we report that cocaine self-administration induced a decrease in striatal dopamine and muscarinic receptor levels, consistent with an adaptive response to the chronic stimulation provoked by a contingent administration. This decrease was more severe in GASP-1 deficient mice than in WT animals. This result is in agreement with a role of GASP-1 in postendocytic sorting of GPCRs and suggests that GASP-1 is positively implicated in the recycling rather than in the lysosomal sorting of these receptors. A previous study has proposed that GASP-1 interacts specifically with D₂ but not D₁ receptors, and that this interaction results in the fast degradation of D₂ receptors (Bartlett et al 2005). Our data rather suggest that GASP-1 could interact *in vivo* with a broader range of GPCRs, including both fast and slow degrading receptors, and that this interaction would favour their recycling back to the plasma membrane. The severe down-regulation of muscarinic receptors in the striatum of KO animals after cocaine self-administration is consistent with our previous observation showing that GASP-1 interacts *in vitro* with acetylcholine muscarinic M₁ and M₂ receptor subtypes (Simonin et al 2004), and further supports a positive role of GASP-1 in receptor recycling.

Several lines of evidence from animal models and human neuroimaging studies suggest that chronic exposure to cocaine is associated with low striatal dopamine D₂ receptor availability. Thus, D₂ receptor densities were decreased in the striatum of nonhuman primates after chronic cocaine self-administration (Moore et al 1998; Nader et al 2002). In humans, positron emission tomography has shown persistent low striatal D₂ receptor availability in chronic cocaine consumers (Martinez et al 2004; Volkow et al 1993). Despite of the decreased levels of D₂-like receptors in the striatum of GASP-1 KO mice, the number of infusions and the motivational value of cocaine in the self-administration paradigm were not modified in these mutants. Interestingly, the acquisition of cocaine self-administration was impaired in GASP-1 KO mice. This impairment could be due to the decrease in the striatal D₁-like receptors observed in GASP-1 KO mice, since the acquisition of cocaine self-administration was reported to be altered in D₁ knockout mice (Caine et al 2007). D₁ receptors were also shown to be involved in the locomotor activating effects of cocaine (Cabib et al 1991; Xu et al 2000). The decreased locomotor effects observed after an acute cocaine administration in GASP-1

KO mice could therefore also be related to altered D₁ receptor signaling.

In conclusion our results point to GASP-1 as an important molecular component in the behavioural responses to cocaine treatment, and further support a potential role for this protein in postendocytic sorting and/or signaling upon sustained stimulation of GPCRs. Moreover, they suggest that GASP-1 could promote recycling rather than degradation of GPCRs, under these experimental conditions.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by The Ministère de l'Education Nationale de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MENSER) fellowship, The Association pour la Recherche sur le Cancer (N°3423), The Fondation pour la Recherche Médicale, The Centre National de la Recherche Scientifique, The Université Louis Pasteur, The Ministerio de Educacion y Ciencia (SAF2007-64062), The Instituto de Salud Carlos III (RD06/001/001) “Ayudas para contratos posdoctorales de perfeccionamiento” and Generalitat de Catalunya (20055GR00131). We thank The Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire core facilities for excellent technical assistance.

REFERENCES

- Bartlett SE, Enquist J, Hopf FW, Lee JH, Gladher F, Kharazia V, et al (2005): Dopamine responsiveness is regulated by targeted sorting of D2 receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:11521-11526.
- Cabib S, Castellano C, Cestari V, Filibeck U, Puglisi-Allegra S (1991): D1 and D2 receptor antagonists differently affect cocaine-induced locomotor hyperactivity in the mouse. *Psychopharmacology* 105:335-339.
- Caine SB, Thomsen M, Gabriel KI, Berkowitz JS, Gold LH, Koob GF, et al (2007): Lack of self-administration of cocaine in dopamine D1 receptor knock-out mice. *J Neurosci* 27:13140-13150.
- Castane A, Valjent E, Ledent C, Parmentier M, Maldonado R, Valverde O (2002): Lack of CB1 cannabinoid receptors modifies nicotine behavioural responses, but not nicotine abstinence. *Neuropharmacology* 43:857-867.
- Cong M, Perry SJ, Hu LA, Hanson PI, Claing A, Lefkowitz RJ (2001): Binding of the beta2 adrenergic receptor to N-ethylmaleimide-sensitive factor regulates receptor recycling. *The Journal of biological chemistry* 276:45145-45152.
- Dombrowski AM, Jerkins AA, Kauffman FC (1983): Muscarinic receptor binding and oxidative enzyme activities in the adult rat superior cervical ganglion: effects of 6-hydroxydopamine and nerve growth factor. *J Neurosci* 3:1963-1970.
- Fredriksson R, Schioth HB (2005): The repertoire of G-protein-coupled receptors in fully sequenced genomes. *Molecular pharmacology* 67:1414-1425.
- Heydorn A, Sondergaard BP, Ersboll B, Holst B, Nielsen FC, Haft CR, et al (2004): A library of 7TM receptor C-terminal tails. Interactions with the proposed post-endocytic sorting proteins ERM-binding phosphoprotein 50 (EBP50), N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF), sorting nexin 1 (SNX1), and G protein-coupled receptor-associated sorting protein (GASP). *The Journal of biological chemistry* 279:54291-54303.
- Hopkins AL, Groom CR (2002): The druggable genome. *Nat Rev Drug Discov* 1:727-730.
- Klosen P, Maessen X, van den Bosch de Aguilar P (1993): PEG embedding for immunocytochemistry: application to the analysis of immunoreactivity loss during histological processing. *J Histochem Cytochem* 41:455-463.
- Koob GF, Le Moal M (2006): *Neurobiology of addiction*, Elsevier ed: Academic Press.
- Madras BK, Fahey MA, Canfield DR, Spealman RD (1988): D1 and D2 dopamine receptors

- in caudate-putamen of nonhuman primates (*Macaca fascicularis*). *Journal of neurochemistry* 51:934-943.
- Martinez D, Broft A, Foltin RW, Slifstein M, Hwang DR, Huang Y, et al (2004): Cocaine dependence and d2 receptor availability in the functional subdivisions of the striatum: relationship with cocaine-seeking behavior. *Neuropsychopharmacology* 29:1190-1202.
- Martini L, Waldhoer M, Pusch M, Kharazia V, Fong J, Lee JH, et al (2007): Ligand-induced down-regulation of the cannabinoid 1 receptor is mediated by the G-protein-coupled receptor-associated sorting protein GASP1. *Faseb J* 21:802-811.
- Moore CA, Milano SK, Benovic JL (2007): Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annual review of physiology* 69:451-482.
- Moore RJ, Vinsant SL, Nader MA, Porrino LJ, Friedman DP (1998): Effect of cocaine self-administration on dopamine D2 receptors in rhesus monkeys. *Synapse (New York, NY)* 30:88-96.
- Nader MA, Daunais JB, Moore T, Nader SH, Moore RJ, Smith HR, et al (2002): Effects of cocaine self-administration on striatal dopamine systems in rhesus monkeys: initial and chronic exposure. *Neuropsychopharmacology* 27:35-46.
- Simonin F, Karcher P, Boeuf JJ, Matifas A, Kieffer BL (2004): Identification of a novel family of G protein-coupled receptor associated sorting proteins. *Journal of neurochemistry* 89:766-775.
- Tappe-Theodor A, Agarwal N, Katona I, Rubino T, Martini L, Swiercz J, et al (2007): A molecular basis of analgesic tolerance to cannabinoids. *J Neurosci* 27:4165-4177.
- Trigo JM, Panayi F, Soria G, Maldonado R, Robledo P (2006): A reliable model of intravenous MDMA self-administration in naive mice. *Psychopharmacology* 184:212-220.
- Trigo JM, Renoir T, Lanfumey L, Hamon M, Lesch KP, Robledo P, et al (2007): 3,4-methylenedioxymethamphetamine self-administration is abolished in serotonin transporter knockout mice. *Biological psychiatry* 62:669-679.
- Vassilatis DK, Hohmann JG, Zeng H, Li F, Ranchalis JE, Mortrud MT, et al (2003): The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:4903-4908.
- Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ, Hitzemann R, Logan J, Schlyer DJ, et al (1993): Decreased dopamine D2 receptor availability is associated with reduced frontal metabolism in cocaine abusers. *Synapse (New York, NY)* 14:169-177.

- Wang Y, Zhou Y, Szabo K, Haft CR, Trejo J (2002): Down-regulation of protease-activated receptor-1 is regulated by sorting nexin 1. *Molecular biology of the cell* 13:1965-1976.
- Weinman EJ, Hall RA, Friedman PA, Liu-Chen LY, Shenolikar S (2006): The association of NHERF adaptor proteins with g protein-coupled receptors and receptor tyrosine kinases. *Annual review of physiology* 68:491-505.
- Whistler JL, Enquist J, Marley A, Fong J, Gladher F, Tsuruda P, et al (2002): Modulation of postendocytic sorting of G protein-coupled receptors. *Science (New York, NY)* 297:615-620.
- Williams MJ, Adinoff B (2007): The Role of Acetylcholine in Cocaine Addiction. *Neuropsychopharmacology*.
- Xu M, Guo Y, Vorhees CV, Zhang J (2000): Behavioral responses to cocaine and amphetamine administration in mice lacking the dopamine D1 receptor. *Brain Res* 852:198-207.
- Xu SX, Hatada Y, Black LE, Creese I, Sibley DR (1991): N-(p-isothiocyanatophenethyl)piperone, a selective and irreversible antagonist of D2 dopamine receptors in brain. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 257:608-615.
- Zhang J, Zhang L, Jiao H, Zhang Q, Zhang D, Lou D, et al (2006): c-Fos facilitates the acquisition and extinction of cocaine-induced persistent changes. *J Neurosci* 26:13287-13296.

TABLE/FIGURE LEGENDS

Table 1. Dopamine and muscarinic receptor densities in the striatum of WT and KO mice subjected to a repeated cocaine treatment in sensitization and self-administration paradigms. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$, cocaine-treated animals versus saline control (assessed by one-way ANOVA).

Receptor	Treatment	Bmax ($\pm$ SEM) (pmole/mg)	
		WT	KO
D ₁ -like	Saline	1.63 (0.01)	1.89 (0.18)
	Sensitization	1.51 (0.17)	1.48 (0.30)
	Self-administration	0.96 (0.11) *	0.58 (0.13) ***
D ₂ -like	Saline	0.94 (0.13)	1.05 (0.19)
	Sensitization	0.73 (0.14)	0.81 (0.02)
	Self-administration	0.55 (0.05) *	0.26 (0.08) ***
Muscarinic-like	Saline	3.49 (0.41)	3.89 (0.50)
	Sensitization	2.79 (0.34)	3.09 (0.38)
	Self-administration	1.57 (0.11) ***	1.10 (0.15) ***

Figure 1. Targeted disruption of *Gprasp1*. In (A), a schematic diagram illustrating the WT *Gprasp1* allele, the targeting vector and the recombinant allele. Non-coding and coding exons are represented as open and filled boxes, respectively. 5' and 3' homology arms are shown as grey boxes. The 12.6-kb targeting vector includes the plasmid vector, the 5' and 3' homology arms and the neomycin-resistance (Neo) cassette. Position of the probes and the length of restriction fragments used for the Southern blot are denoted by hatched boxes and arrows, respectively. Position of primers used for genotyping is shown with arrowheads. In (B), representative results of Southern blot analysis of targeted neomycin-resistant clones. HindIII and BglII-digested DNAs were hybridized with the Neo probe as shown in (A). In (C), representative PCR genotyping analysis of homozygous and heterozygous mice offspring. A 288-bp fragment was amplified with the F1/R1 primer set, which is specific for the WT allele. A 710-bp fragment was amplified with the F2/R2 primer set, which is specific for the mutant

allele. In **(D)**, western blot analysis of WT (+/+) and mutant (-/-) mice brain homogenates. The primary antibody recognized a 195-kDa protein corresponding to GASP-1 and a 110-kDa protein corresponding to its closest homologue, GASP-2.

Figure 2. Expression levels of *Gprasp2* mRNA in brains of *Gprasp1* KO (-/-) and WT (+/+) mice. *Gprasp2* was expressed in the lateral septal (LS) area, down to the diagonal band of Broca and in the ventral pallidum, in *Gprasp1* KO **(B)** and WT **(A)** mice. *Gprasp2* mRNA was also detected in the shell of the nucleus accumbens along the medial aspect of the anterior commissure (ac). *Gprasp2* mRNA positive cells were observed in the GP, at the interface of the caudate putamen (CPu) and the globus pallidus (GP), whereas very few cells expressed *Gprasp2* in the CPu of both genotypes **(C,D)**. Scale bar = 100 μ m.

Figure 3. Sensitization to the locomotor effect of cocaine administration. Saline versus cocaine treatments are represented in abscissa. Average locomotor activities + SEM in 1-h acquisition session are represented in ordinates. Basal locomotor activity was determined by a saline injection (open bar). Daily cocaine (20mg/kg, i.p.)- or saline control-injections began at day 1 until day 10, and locomotor activities were assessed at day 1, 4, 7 and 10. Sensitization was measured at day 15 with a challenging cocaine injection. ## $p < 0.01$, day 1 versus saline control; * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ days versus day 1 (assessed by two-way ANOVA).

Figure 4. Establishment of cocaine self-administration and reinforcing effects of cocaine. In **(A)**, the session number is represented in abscissa. Average nose-pokes + SEM in 2-h acquisition sessions under the FR 1 schedule are represented in ordinates. Cocaine dose was 1.0 mg/kg per injection during the acquisition. Filled circles show the data for reinforced nose-pokes (active hole) and open circles show the data for non-reinforced nose-pokes (inactive hole). Data with WT mice are represented on the left panel, and with GASP-1 KO mice on the right panel. In **(B)**, the breaking point achieved by GASP-1 KO (filled bar) and WT (open bar) mice under PR schedule for the dose they were trained on (1.0 mg/kg/injection), are shown. Values represent group mean + SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$, active versus inactive hole (assessed by two-way ANOVA).

Figure 5. Effect of the absence of GASP-1 on striatal dopamine and muscarinic receptor levels after chronic cocaine self-administration. GASP-1 KO and WT mice subjected to the self-administration paradigm were sacrificed on the last day and their striatum were dissected out. D₁-, D₂- and M-like receptor binding assays were performed on total striatal homogenates. The numbers of the D₁-, D₂- and M-like receptor binding sites in the mutant mice (hatched bar) are given as a percent of the corresponding values in control WT mice (filled bar). Values represent the mean $\pm$ SEM of six independent experiments. * $p < 0.05$, KO versus WT control (assessed by t-test).

FIGURES

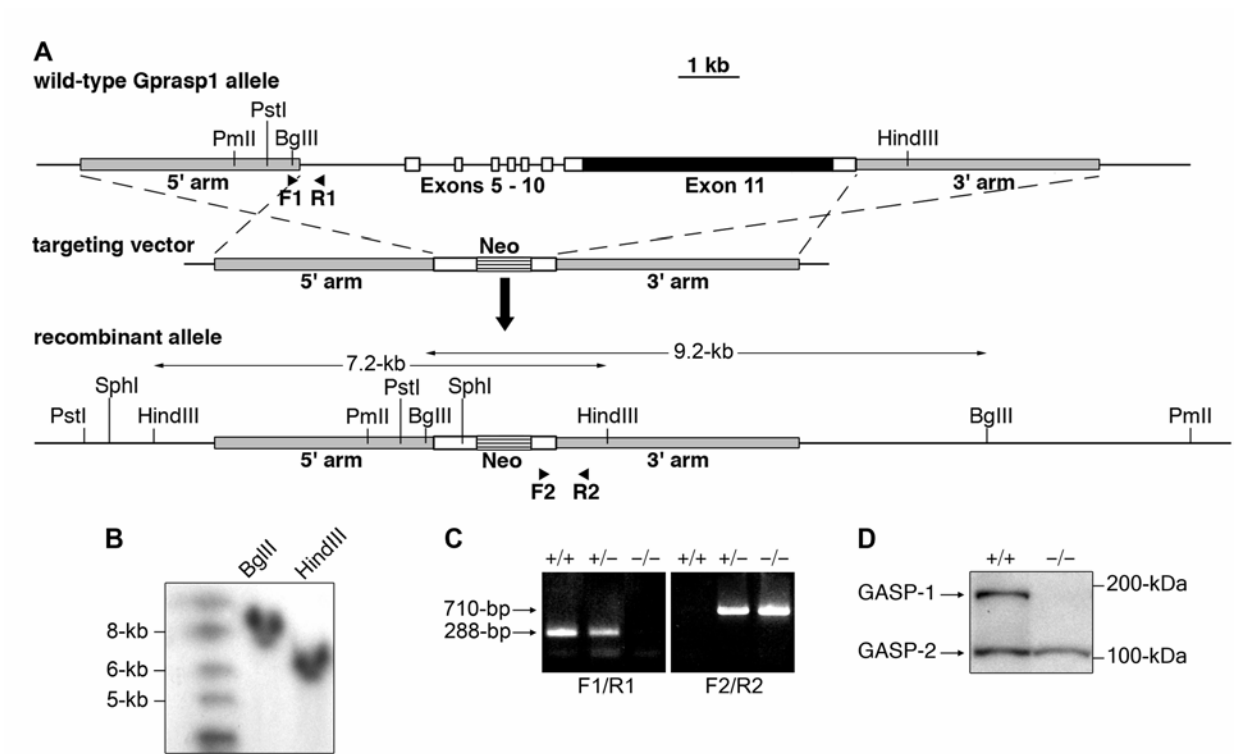


Figure 1.

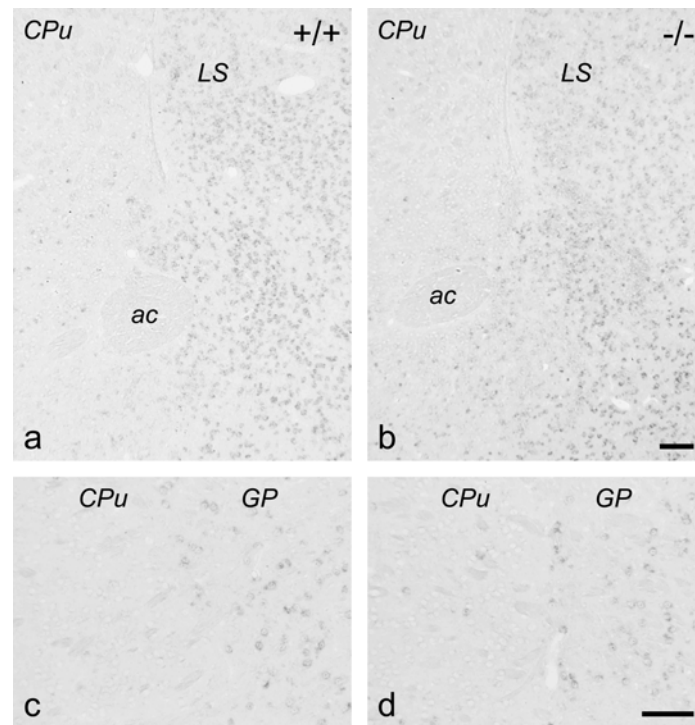


Figure 2.

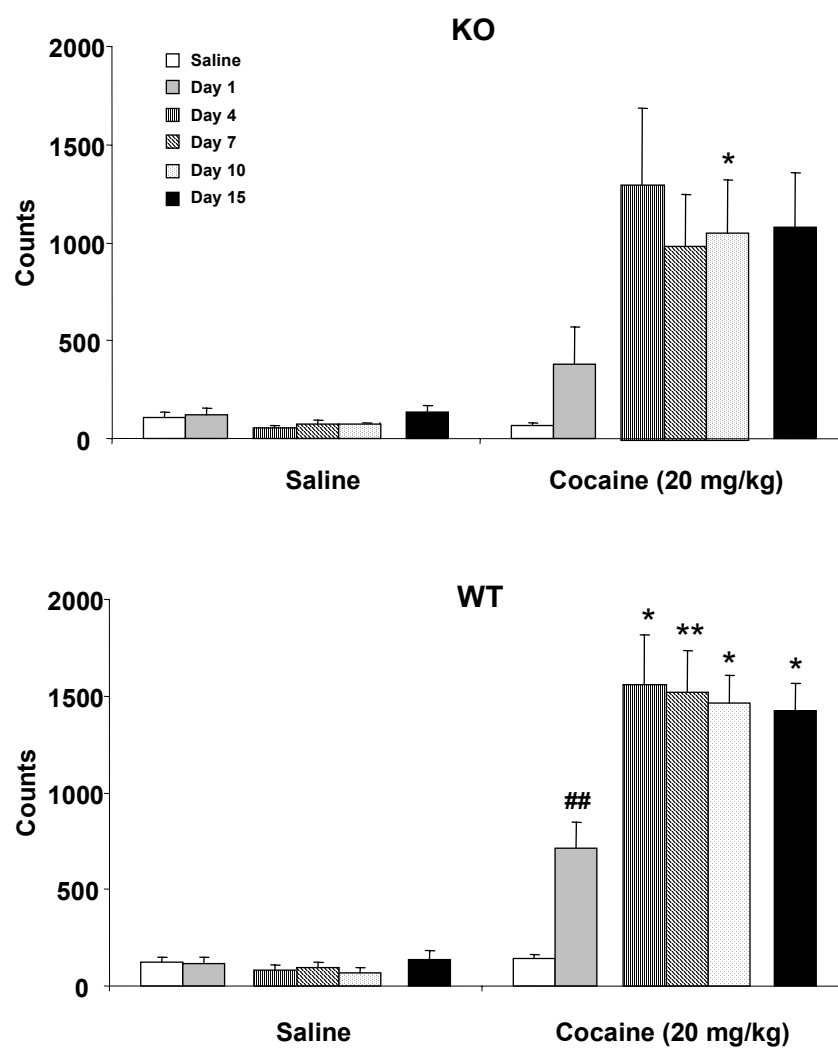


Figure 3.

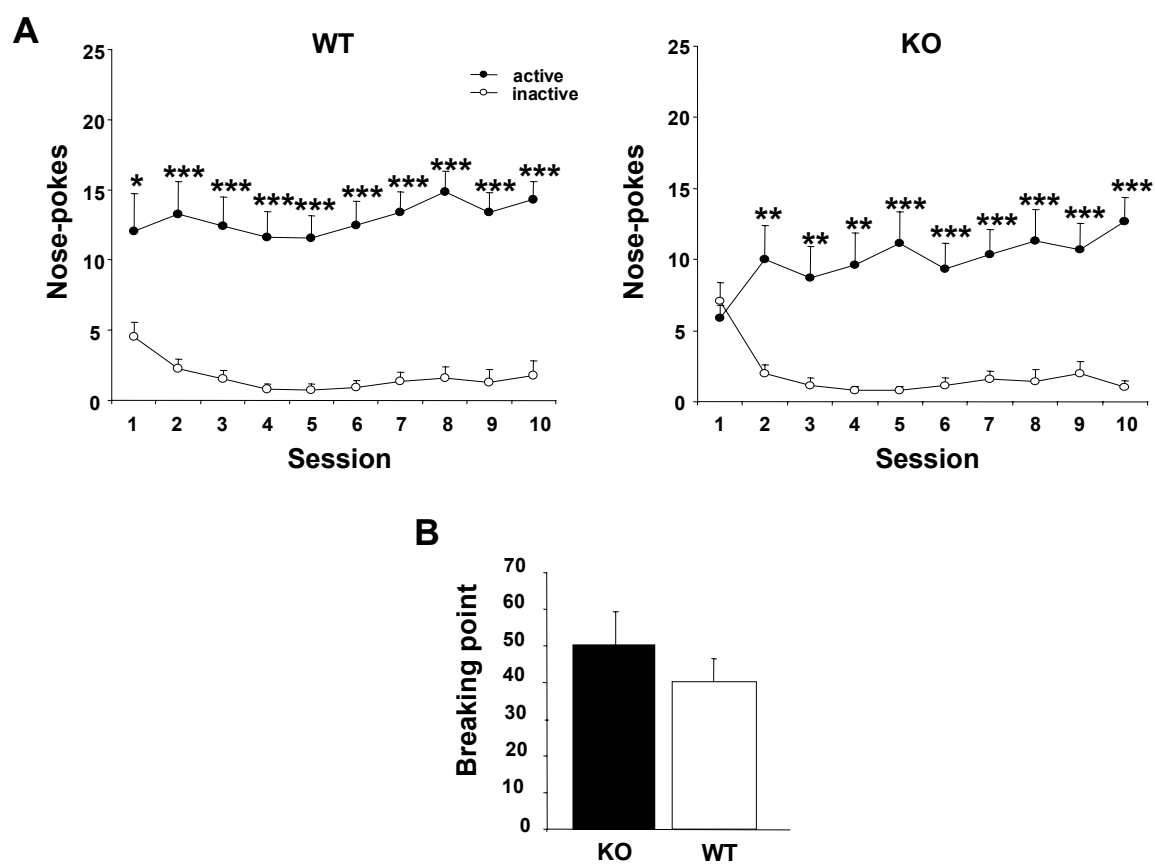


Figure 4.

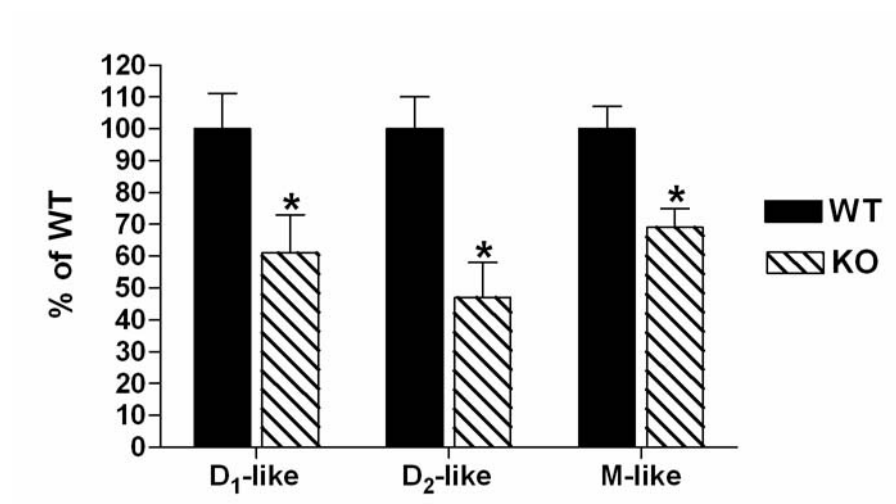


Figure 5.

II.3.1.4. Éléments de discussion

II.3.1.4.1. Les effets comportementaux de la cocaïne

Plusieurs éléments de la littérature suggèrent que GASP-1 est impliqué dans la régulation négative des RCPG suite à leur activation chronique avec un agoniste et que l'inhibition de l'interaction *in vivo* entre GASP-1 et les RCPG pourrait favoriser la signalisation de ces récepteurs lors de leur stimulation prolongée (Bartlett, SE et al. 2005; Tappe-Theodor, A et al. 2007). Cependant, ces études reposent sur des traitements réalisés à l'aide de grande quantité d'anticorps dirigés contre GASP-1 ou sur la surexpression d'une forme tronquée de GASP-1 servant de dominant négatif. L'utilisation de telles méthodes visant à inhiber l'interaction entre GASP-1 et les RCPG peut conduire à des effets non spécifiques. Pour éviter ce type de problème, nous avons voulu développer une autre approche nous permettant d'étudier la fonction de GASP-1 *in vivo* et nous avons généré des souris dont le gène codant pour GASP-1 a été éliminé par recombinaison homologue. Nous avons évalué chez ces souris mutantes les conséquences comportementales d'une administration aiguë et chronique de cocaïne. En l'absence de GASP-1, nous avons observé une diminution de l'effet hyperlocomoteur de la cocaïne administrée en aiguë ou après sensibilisation et cela comparativement aux effets mesurés chez les souris sauvages. L'acquisition du comportement d'autoadministration de cocaïne est également perturbée chez les souris déficientes en GASP-1 qui ne sont que 50% à entrer dans les critères d'acceptation à l'issue de la période d'entraînement de 10 jours, contre 86% pour les souris sauvages. Il semble donc apparaître que GASP-1 participe à l'acquisition du comportement d'autoadministration. Cependant, nous ne pouvons pas exclure que cette difficulté à acquérir un comportement d'autoadministration chez les souris déficientes en GASP-1 ne soit pas liée à des différences de performances, par exemple en terme d'apprentissage ou de mémorisation, entre les souris sauvages et les souris mutantes. Différents tests existent et permettent d'évaluer la mémoire chez les souris. Parmi eux on peut distinguer le test du labyrinthe en Y qui fait plus particulièrement appel à la mémoire de travail et le test de la piscine de Morris qui permet d'évaluer la mémoire spatiale de l'animal. De tels tests pourraient être ainsi développés afin de savoir si des capacités mémorielles plus basses chez les souris déficientes en GASP-1 pourraient expliquer leur difficulté à acquérir un comportement d'autoadministration. Toutefois, chez les souris déficientes en GASP-1 ayant acquis le comportement d'autoadministration, les effets renforçants positifs de la cocaïne sont équivalents à ceux mesurés chez les souris sauvages. Dans l'ensemble, ces résultats indiquent que la présence de GASP-1 est nécessaire au

développement complet de la réponse comportementale liée à l'administration aiguë ou chronique de cocaïne, mais sont en désaccord avec l'hypothèse proposant que la prévention de l'interaction entre GASP-1 et les RCPG puisse augmenter l'effet de leur stimulation au cours d'un traitement chronique avec un agoniste.

II.3.1.4.2. Les effets biochimiques de la cocaïne au niveau du striatum

La cocaïne produit ses effets psychomoteurs et renforçants en agissant sur le système dopaminergique (Koob, GF et al. 2006). En bloquant les transporteurs responsables de la recapture des monoamines libérées par les neurones, elle provoque l'augmentation de la concentration extracellulaire en dopamine. Dans le striatum, principale cible de l'action de la cocaïne, l'augmentation du taux de dopamine va stimuler les interneurons cholinergiques provoquant la libération d'acétylcholine (Imperato, A et al. 1993; Consolo, S et al. 1999). Ainsi, l'exposition répétée à la cocaïne se traduit par une augmentation persistante du taux de dopamine et d'acétylcholine dans le striatum, ce qui devrait potentiellement conduire à la régulation négative de leurs récepteurs respectifs. Cependant, l'effet de l'administration répétée de cocaïne sur la densité des récepteurs dopaminergiques constitue toujours un point litigieux. Des études ont diversement rapporté une diminution (Kleven, MS et al. 1990; Zeigler, S et al. 1991; Laurier, LG et al. 1994; Maggos, CE et al. 1998), une augmentation (Alburges, ME et al. 1993; Macedo, DS et al. 2004) ainsi qu'aucune modification (Mayfield, RD et al. 1992; Sousa, FC et al. 1999) de la densité des récepteurs D₁ dans le striatum d'animaux traités avec de la cocaïne. De la même manière, d'autres études ont rapporté une augmentation (Kleven, MS et al. 1990; Peris, J et al. 1990; Zeigler, S et al. 1991; Sousa, FC et al. 1999; Macedo, DS et al. 2004), une diminution (Volkow, ND et al. 1993; Maggos, CE et al. 1998; Moore, RJ et al. 1998) ainsi qu'aucun changement (Alburges, ME et al. 1993; Laurier, LG et al. 1994; Maggos, CE et al. 1998) de la densité des récepteurs D₂ dans le striatum. Il ressort de cette inconstance que la densité des récepteurs dopaminergiques dépend de nombreux facteurs expérimentaux tels que les doses de cocaïne utilisées, la voie d'administration, le mode d'administration (actif ou passif) ainsi que de la durée du traitement et de la période de sevrage, c'est à dire le temps qui sépare la dernière administration de cocaïne du moment où est réalisé la mesure de la densité des récepteurs. En ce qui concerne la densité des récepteurs à l'acétylcholine, la littérature est moins abondante. Une diminution de la densité des récepteurs muscariniques a été observée dans le striatum de rat suite à un

traitement cocaïne de 7 jours, à raison de 20 et 30 mg/kg/jour (Macedo, DS et al. 2004). Cette diminution a également été observée après plusieurs jours de sevrage. Une autre étude avait montré précédemment une telle diminution suite à l'administration continue de cocaïne durant 5 jours (Zeigler, S et al. 1991). À l'opposé F. C. Sousa et ses collaborateurs ont montré une augmentation de la densité des récepteurs muscariniques de type M₁ et M₂ après un traitement cocaïne de 7 jours (Sousa, FC et al. 1999). Cependant, les doses de 5 et 10 mg/kg employées dans ces essais sont plus faibles que celles utilisées par D. S. Macedo et ses collaborateurs, ce qui pourrait expliquer une telle différence. Pour notre part, les résultats obtenus montrent que l'autoadministration de cocaïne provoque une diminution de près de la moitié des récepteurs dopaminergiques et muscariniques du striatum, ce qui est parfaitement cohérent avec une adaptation à une stimulation chronique de ces récepteurs par la cocaïne. De plus, cette diminution est nettement plus marquée chez les souris déficientes en GASP-1. Ces résultats sont donc en accord avec un rôle de GASP-1 dans le tri postendocytyque des RCPG, mais suggèrent qu'il favoriserait leur recyclage plutôt que leur dégradation lysosomale, ce qui est en opposition totale avec le rôle proposé jusqu'à présent pour cette protéine.

S. E. Bartlett et ses collaborateurs ont proposé précédemment que GASP-1 interagisse préférentiellement avec le récepteur D₂ en contexte cellulaire et que cette interaction conduit à la dégradation de D₂ lorsqu'il est stimulé avec un agoniste alors que D₁ est recyclé vers la membrane plasmique (Bartlett, SE et al. 2005). Nos résultats suggèrent pourtant que GASP-1 est impliqué à la fois dans le tri postendocytyque du récepteur D₂ et du récepteur D₁. Ceci pourrait indiquer que *in vivo* dans des conditions spécifiques, plus particulièrement lors d'une stimulation chronique, le profil d'interaction de GASP-1 avec les RCPG soit plus étendu que ce qui avait été anticipé, incluant des récepteurs à dégradation rapide et à dégradation lente. De plus, le fait que la densité des récepteurs muscariniques soit diminuée dans le striatum des souris déficientes en GASP-1 après l'autoadministration chronique de cocaïne est en accord avec les interactions que nous avons précédemment révélées *in vitro* entre GASP-1 et les récepteurs muscariniques M₁ et M₂ et renforce l'idée que GASP-1 puisse être impliqué positivement dans le recyclage de ces récepteurs.

Nous avons montré que l'autoadministration chronique de cocaïne provoque la diminution de la densité des récepteurs dopaminergiques et muscariniques dans le striatum. Cependant, une telle diminution n'a pas été constatée chez les souris qui ont été testées pour la sensibilisation à l'effet locomoteur de la cocaïne. La quantité globale de drogue reçue par les animaux dans les tests de sensibilisation et d'autoadministration sont sensiblement les

mêmes et ne permettent pas d'expliquer cette différence. En effet, au cours d'une session d'autoadministration, les souris vont s'injecter en moyenne entre 12 et 16 doses de 1 mg/kg de cocaïne, alors que pour le test de sensibilisation une dose unique de 20 mg/kg est injectée. Bien que dans le test de sensibilisation les animaux aient été traités tous les jours durant 10 jours avec une dose de 20 mg/kg de cocaïne, une période de sevrage de 5 jours a séparé cette période de traitement chronique de la dernière injection de cocaïne après laquelle les animaux ont été sacrifiés et la densité des récepteurs mesurée. Cette dernière injection de cocaïne peut donc s'apparenter à une injection aiguë, ce qui pourrait expliquer l'absence de modification de la densité des récepteurs chez ces animaux comparativement aux animaux naïfs. Par ailleurs, il faut également tenir compte du fait que dans les tests de sensibilisation, les souris sont traitées à la cocaïne de manière passive et non pas active comme c'est le cas dans les essais d'autoadministration où la souris s'administre la drogue de façon volontaire et opérante. Comme nous l'avons souligné précédemment, le mode d'administration est un paramètre qui peut influencer sur les conséquences biochimiques de l'exposition à la cocaïne. Une étude a ainsi comparé les conséquences d'une administration active à une administration passive de cocaïne en terme de densité de récepteur D₂ dans le striatum de rat et des différences significatives ont été observées entre des rats appariés de telle sorte qu'un des deux rats reçoit de manière passive une injection de cocaïne à chaque fois que l'autre rat s'administre de façon active la drogue (Stefanski, R et al. 2007). Le mode d'administration de la cocaïne et par conséquent l'aspect motivation lié à l'administration de drogue pourrait donc expliquer les différences observées entre les tests de sensibilisation et d'autoadministration.

II.3.1.4.3. Existe-t-il un lien entre les réponses comportementales et les modifications biochimiques observées

Bien que les effets comportementaux de la cocaïne soient facilement observables, les mécanismes neurobiologiques qui les sous-tendent sont moins apparents. En raison de la complexité de ces mécanismes il est difficile de faire le lien entre des modifications visibles du comportement et des altérations biochimiques. La littérature rapporte cependant certains éléments issus d'études réalisées sur des modèles animaux et sur des humains par neuroimagerie, qui indiquent qu'une exposition chronique à la cocaïne est corrélée à une faible disponibilité des récepteurs dopaminergiques D₂ dans le striatum. Il a ainsi été montré que la densité des récepteurs D₂ est significativement abaissée dans le striatum de primates

non humains après une autoadministration chronique de cocaïne (Moore, RJ et al. 1998 ; Nader, MA et al. 2002). D'autres études ont été réalisées chez l'homme à l'aide de la technique de tomographie par émission de positron montrant une faible disponibilité des récepteurs D₂ dans le striatum de consommateurs chroniques de cocaïne (Volkow, ND et al. 1993; Martinez, D et al. 2004). De plus, M. A. Nader et ses collaborateurs ont établi que la densité en récepteur D₂ chez le singe était inversement proportionnelle à sa propension à s'administrer de la cocaïne (Nader, MA et al. 2006). Bien que nos résultats montrent que la densité des récepteurs D₂-like est sensiblement plus faible dans le striatum des souris déficientes en GASP-1 comparativement aux souris sauvages, nous n'avons pas détecté de différences significatives en terme de nombre d'injections de cocaïne ni en terme d'effet renforçant de la cocaïne entre les deux génotypes.

Dans cette étude, nous avons montré que les souris déficientes en GASP-1 présentaient une plus grande difficulté à acquérir un comportement robuste d'autoadministration de cocaïne comparativement à leurs homologues sauvages. Nous proposons ici que cette différence en terme de densité de récepteurs entre les souris déficientes en GASP-1 et les souris sauvages soit à l'origine de l'altération du comportement d'autoadministration de cocaïne observé chez les souris mutantes. En effet, des modèles murins déficients en récepteurs D₁ ou D₂ ont été utilisés dans différentes études afin d'investiguer les rôles respectifs de ces deux récepteurs dans les réponses comportementales liées à l'administration prolongée de cocaïne. Il a notamment été montré que les souris déficientes en récepteur D₂ acquièrent normalement un comportement d'autoadministration (Caine, SB et al. 2002) alors que les souris déficientes en récepteur D₁ n'y parviennent pas (Caine, SB et al. 2007), ce qui indique que le récepteur D₁ joue un rôle important dans le développement des effets récompensants et renforçants produits par la cocaïne. Ainsi la densité plus faible en récepteur D₁ que nous avons observé dans le striatum des souris déficientes en GASP-1 pourrait être à l'origine de leur difficulté à acquérir un comportement d'autoadministration de cocaïne.

Plusieurs études suggèrent également que le récepteur D₁ joue un rôle important dans la modification de l'activité locomotrice induite par la cocaïne (McCreary, AC et al. 1993; Xu, M et al. 1994; Ushijima, I et al. 1995). Ainsi, des souris prétraitées avec un antagoniste spécifique des récepteurs D₁-like, le SCH23390, montrent une atténuation de la réponse locomotrice à l'administration de cocaïne (Cabib, S et al. 1991). Ceci a été confirmé par la suite dans des études chez le rat. Un prétraitement avec le SCH23390 bloque l'augmentation

de l'activité locomotrice induite par l'administration répétée de cocaïne alors que les antagonistes des récepteurs D₂-like tels que l'halopéridol ou le raclopride ne produisent pas ces effets (McCreary, AC et al. 1993; Ushijima, I et al. 1995). Le rôle du récepteur D₁ dans le développement de la sensibilisation à l'effet locomoteur de la cocaïne a également été montré dans une étude sur des souris déficientes en récepteur D₁. Dans cette étude les souris mutantes ont montré une activité locomotrice induite par la cocaïne qui est inférieure à celle induite chez les souris sauvages et bien qu'une augmentation de cette activité ait été observée au long des séances de test, elle ne dépasse pas celle des souris mutantes injectées avec une solution saline indiquant l'absence de sensibilisation (Xu, M et al. 2000). Par ailleurs, il a été proposé que l'administration répétée de cocaïne provoque l'activation de la voie de l'AMPc (Self, DW et al. 1995; Crawford, CA et al. 2004) qui est notamment stimulée par l'activation des récepteurs D₁-like qui sont couplés à la protéine G_s. L'activation de la voie de l'AMPc conduit à l'activation de la PKA qui a été impliquée dans le développement de la sensibilisation à la cocaïne. En effet, des études ont montré une augmentation plus importante de l'activité locomotrice induite par la cocaïne chez des rats ayant reçu des injections d'activateur de la PKA (8-bromo-AMPc) dans le NAc par rapport à des rats ayant reçu des injections d'inhibiteur de la PKA (RP-CPT-AMPc) (Miserendino, MJ et al. 1995). Par conséquent, l'effet hyperlocomoteur sensiblement plus faible qui a été enregistré chez les souris déficientes en GASP-1 après l'administration de cocaïne en aiguë pourrait s'expliquer par un défaut de la signalisation des récepteurs D₁-like. Ceci serait en accord avec la baisse significativement plus importante de la densité des récepteurs D₁-like observée dans le striatum des souris mutantes qui se sont administrées de la cocaïne en chronique. Bien qu'une telle diminution de la densité des récepteurs D₁-like n'ait pas été observée dans le striatum des souris sensibilisées à la cocaïne, il n'est pas à exclure que la période de sevrage de 5 jours précédant la dernière injection et le sacrifice de ces animaux ait permis la restauration de la densité des récepteurs.

Finalement, il pourrait être envisagé de développer des essais *in vivo* simplifiés afin d'étudier de manière plus spécifique le rôle de GASP-1 dans l'adaptation à la stimulation prolongée de récepteurs d'intérêts tels que les récepteurs dopaminergiques ou cholinergiques. Plus particulièrement, les souris sauvages et déficientes en GASP-1 pourraient être traitées de manière chronique, en systémique ou localement au niveau de structures cérébrales déterminées, à l'aide d'agonistes sélectifs et les densités en récepteurs pourraient être évalués

pour différentes durées de traitement. Au regard de l'étude menée par A. Tappe-Theodor et ses collaborateurs sur le rôle de GASP-1 dans le développement de la tolérance à l'effet analgésique des cannabinoïdes, les souris déficientes en GASP-1 pourraient également représenter un excellent modèle pour confirmer les résultats précédemment obtenus dans cette étude.

II.3.2. GASP-1 et les rythmes circadiens

II.3.2.1. Introduction : les rythmes circadiens

Les rythmes biologiques sont observés chez l'homme, dans le monde animal et végétal, à tous les niveaux d'organisation : écosystème, population, individus, systèmes d'organes, organes isolés, tissus, cellules et fractions subcellulaires (Touitou, Y et al. 1994). La chronobiologie étudie et quantifie les mécanismes de la structure temporelle biologique. Un rythme biologique se définit comme une suite de variations physiologiques et comportementales statistiquement significatives, déterminant en fonction du temps des oscillations de forme reproductible. Il s'agit donc d'un phénomène périodique et prévisible. Les rythmes sont appelés circadiens (du latin *circa diem*, environ un jour) si leur période, qui représente la durée d'un cycle complet de la variation rythmique étudiée, est d'environ 24 heures (24 ± 4 h). Ce sont les rythmes dont l'étude chez l'homme a été la plus approfondie. Des rythmes de fréquence autre que circadienne ont pu également être mis en évidence chez l'homme, on parle alors de rythmes ultradiens (inférieur à 20 h, par exemple l'électrocardiogramme ou l'électroencéphalogramme) ou infradiens (au-delà de 28 h, par exemple l'hibernation de certains mammifère).

II.3.2.1.1. Les deux composantes des rythmes circadiens

Notre vie est rythmée par des facteurs exogènes environnementaux (Honma, K et al. 1995; Duffy, JF et al. 1996; Klerman, EB et al. 1998) et par des facteurs endogènes génétiques (Katzenberg, D et al. 1998; Jones, CR et al. 1999; Steeves, TD et al. 1999).

La composante exogène. Les paramètres qui caractérisent un rythme biologique dépendent pour une part de facteurs de l'environnement tels que les alternances lumière-obscurité, veille-sommeil, chaud-froid, l'alternance des saisons. Ces facteurs ne créent pas les rythmes, ils ne font que les moduler. On les appelle synchroniseurs, ou agents entraînants, ou agents donneurs de temps.

La composante endogène. En supprimant la composante exogène d'un rythme biologique, on peut mettre ainsi expérimentalement en évidence la composante endogène. Il est possible en effet de contrôler les alternances lumière-obscurité, les alternances veille-sommeil, notamment lors d'expériences dites « hors du temps ». Lorsqu'un sujet est soumis à

de telles conditions environnementales, sans aucun repère temporel et libre de ses actions, ses rythmes biologiques sont conservés, à ceci près que la période est légèrement différente de 24 heures. De tels rythmes, qui ne suivent plus la période de nos synchroniseurs de 24 heures, comme celle de l'alternance lumière-obscurité, sont appelés rythmes en libre cours.

II.3.2.1.2. L'horloge biologique interne ou système circadien

La plupart des organismes vivants possèdent une horloge biologique endogène capable de mesurer le temps et qui va leur permettre de s'adapter aux variations cycliques de leur environnement. L'une des caractéristiques principales de cette horloge biologique est sa capacité à fonctionner de façon autonome même si l'organisme est privé de toute indication extérieure de temps et assure la succession des périodes de veille et d'éveil. Elle régule de nombreux processus métaboliques afin d'optimiser le fonctionnement de l'organisme au cours d'une journée. Par exemple, durant la nuit la température de notre corps baisse et la mélatonine synthétisée par la glande pinéale déclenche l'entrée dans la phase de sommeil. Durant le sommeil, la sécrétion d'hormone de croissance nous permet de nous reconstruire alors que l'activation du système adrénocorticotrope au début de la journée nous prépare à mobiliser nos ressources physique et mentales.

II.3.2.1.3. Le noyau suprachiasmatique

Les rythmes circadiens sont générés par des horloges cellulaires endogènes. On trouve ces horloges cellulaires dans de nombreux tissus, cependant il existe chez les mammifères une horloge centrale qui coordonne toutes ces horloges périphériques. Cette horloge centrale est localisée dans les noyaux suprachiasmatiques (NSC) de l'hypothalamus antérieur (Moore, RY et al. 1998). Au nombre de deux, ces noyaux sont situés de part et d'autre du troisième ventricule, au-dessus du chiasma optique et sont composés d'un grand nombre de neurones exclusivement GABAergiques (10.000 chez la souris). Les neurones de la partie centrale des NSC expriment le VIP (*Vasoactive Intestinal Peptide*) et ceux de la partie corticale expriment la vasopressine (Abrahamson, EE et al. 2001). Interconnectés, ils se synchronisent grâce au GABA et au VIP (Liu, C et al. 2000; Harmar, AJ et al. 2002). Les NSC jouent le rôle de chef d'orchestre des rythmes circadiens. Ainsi, une lésion au niveau des NSC chez le hamster, le rat ou la souris provoque la disparition des rythmes de certaines fonctions physiologiques et la transplantation de tissu sain de NSC chez l'animal lésé permet de restaurer cette rythmicité

qui présente alors les propriétés du donneur (Ralph, MR et al. 1990).

L'horloge endogène du NSC est capable de générer des rythmes circadiens de façon autonome. Cependant, sa période est légèrement inférieure à 24 heures, c'est pourquoi la lumière joue un rôle essentiel dans l'ajustement des rythmes circadiens à l'environnement photopériodique. En effet, la partie centrale du NSC reçoit des projections nerveuses en provenance de la rétine qui lui transmet des « informations photoniques » (Moore, RY et al. 1972) ce qui provoque l'activation de l'expression de gènes, via la voie du facteur CREB, dont notamment les gènes horloge *Period1* (*Per1*) et *Period2* (*Per2*) (Travnickova-Bendova, Z et al. 2002). Cette synchronisation est nécessaire afin de maintenir nos rythmes physiologiques en phase avec notre environnement dont les rythmes sont basés sur des cycles de 24 heures. En absence d'informations photoniques renseignant le NSC sur l'écoulement du temps, c'est-à-dire dans des conditions lumineuses constantes par exemple, on observe un décalage progressif des rythmes physiologiques qui se calent sur la période endogène de l'horloge centrale. Par ailleurs, le NSC reçoit également des informations non « photoniques » de neurones à neuropeptide Y et à sérotonine provenant du thalamus et des noyaux du raphé. À l'inverse, ces connections provoquent l'inhibition de l'expression des gènes *Period*. Le NSC reçoit des informations mais il en envoie surtout, afin de contrôler l'ensemble des rythmes circadiens. Il envoie des informations au système nerveux central, à l'hypothalamus et à la glande pinéale essentiellement, pour réguler certains taux hormonaux, la température du corps et les périodes de veille et d'éveil. Il projette également vers la périphérie sur le système autonome qui innerve les viscères. Ces informations sont notamment transmises par le TGF α , la prokinéticyne 2 (PK2) ou la vasopressine qui sont synthétisés et libérés par les neurones du NSC. Le NSC coordonne également l'ensemble des horloges périphériques. Ces horloges sont dévolues à la génération de rythmes spécifiques à chaque tissu. Cependant, à l'inverse du NSC, ces rythmes ne sont pas robustes et leur amplitude décroît lorsque ces tissus sont maintenus en culture *in vitro* (Abe, M et al. 2002), c'est pourquoi les horloges périphériques sont entraînées par le NSC.

II.3.2.1.4. Les mécanismes intracellulaires des rythmes

Il a été montré que des neurones isolés de NSC maintenus en culture *in vitro* parviennent à conserver la rythmicité de leur activité électrophysiologique (Welsh, DK et al. 1995). Ceci indique que les rythmes circadiens sont déclenchés de manière autonome par des

mécanismes moléculaires intracellulaires. Ces mécanismes présentent une grande similarité quelle que soit l'espèce considérée. Ils font intervenir des éléments activateurs et répresseurs, les protéines horloges, qui participent à des boucles rétroactives de régulation de la transcription impliquant des réactions de modification post-traductionnelle et de dimérisation des protéines horloges.

Les protéines horloges Period (Per) et Cryptochrome (Cry) sont exprimées dans le NSC avec un pic à la fin du jour. Les protéines Per et Cry vont alors se dimériser puis entrer dans le noyau pour inhiber l'expression de leurs propres gènes et des gènes contrôlés par l'horloge biologique en réprimant le facteur de transcription Clock/Bmal1 (Figure II.3.2.1). La translocation dans le noyau du dimère Per/Cry est régulée par des réactions de phosphorylation des protéines Per et Cry catalysées par la caséine kinase 1 ϵ (CK1 ϵ) qui interagit avec Per. La répression du dimère Clock/Bmal1 dure tout au long de la période d'obscurité et s'arrête avec la dissociation progressive du dimère Per/Cry et la dégradation de Per. Clock et Bmal1 sont le produit de l'expression de deux autres gènes horloges. Clock est exprimé de manière constitutive dans le NSC alors que Bmal1 présente un pic d'expression à la fin de la période d'obscurité. Ce décalage de 12 heures de l'expression de Bmal1 par rapport à Per est dû à l'action d'un autre facteur de transcription, Rev-erb α , dont l'expression est régulée par le dimère Clock/Bmal1 lui-même (Figure II.3.2.1). Exprimé à la fin du jour, Rev-erb α inhibe l'expression de Bmal1 durant la période d'obscurité. Le décalage de l'expression de Bmal1 permet d'obtenir un taux maximum de dimère Clock/Bmal1 au moment où le taux de dimère Per/Cry est au plus bas, favorisant ainsi l'initiation d'une nouvelle phase d'expression des gènes (Hastings, MH et al. 2003).

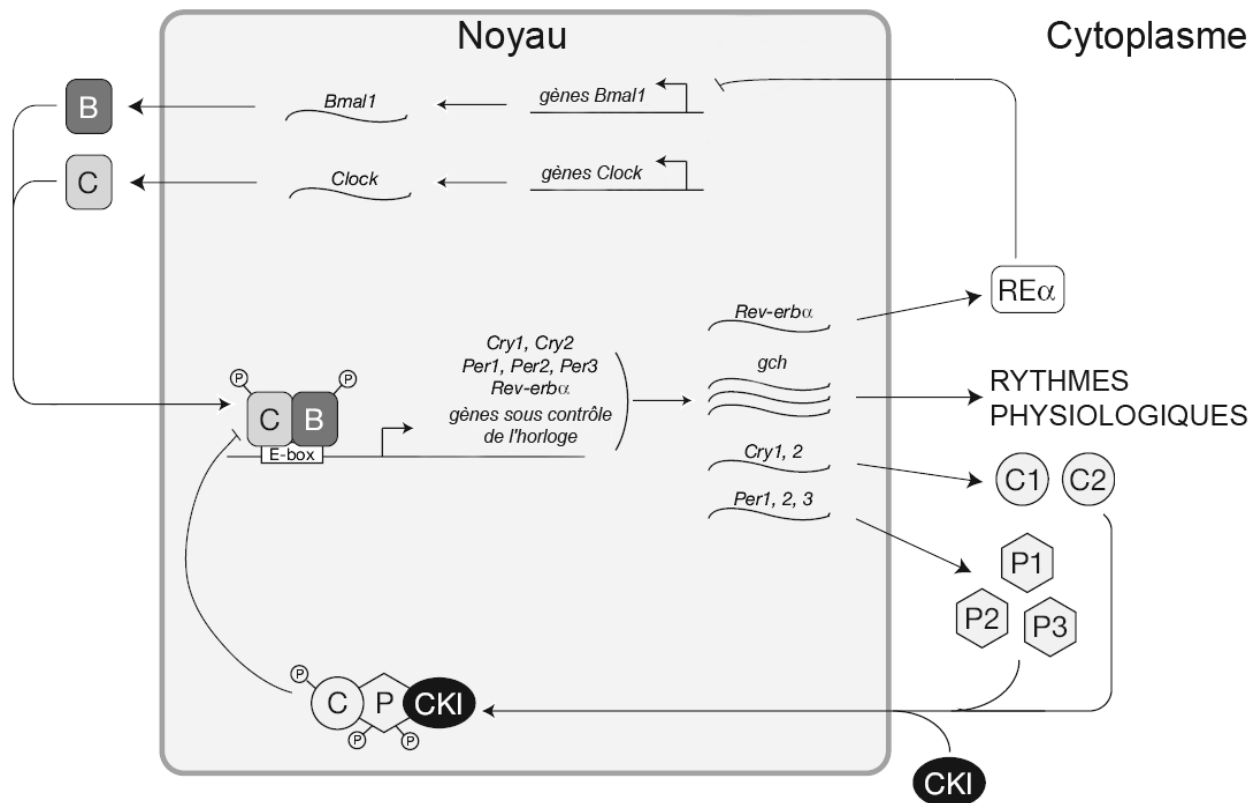


Figure II.3.2.1. Représentation schématique de l'horloge biologique moléculaire des mammifères.

Clock et Bmal (rectangles C et B) se dimérisent et activent l'expression des gènes horloges ainsi que des gènes contrôlés par l'horloge biologique (*gch*) via un élément *E-box* situé au niveau du promoteur de ces gènes et qui est reconnu notamment par le domaine de liaison de l'ADN bHLH (hélice-boucle-hélice basique) caractéristique des protéines horloge. Rev-erb α (RE α) réprime l'expression du gène *Bmal1*. Les protéines Cry (cercle C) et Per (losange P) se dimérisent puis sont phosphorylées par la caséine kinase 1 ϵ (CK1). Ils pénètrent dans le noyau où ils inhibent le dimère Clock/Bmal.

L'importance de la protéine Per2 dans la régulation des rythmes circadiens a été montrée à la fois chez l'homme et dans des modèles murins. Ainsi, la suppression de la portion du gène *Per2* codant pour le domaine d'interaction protéique PAS conduit à une instabilité des rythmes suivie d'une arythmie chez la souris (Zheng, B et al. 1999). Chez l'homme, une mutation du gène *Per2* prévenant la phosphorylation de Per2 par CK1 ϵ a été impliquée dans le syndrome familial de phase de sommeil avancée (FASPS) (Toh, KL et al. 2001). De la même manière, il a été observé qu'une mutation de CK1 ϵ entraînant la perte de son activité kinase conduit à une hypophosphorylation de Per2 et une réduction de la période circadienne chez le hamster (Lowrey, PL et al. 2000). L'étude de modèles murins déficients en protéines Period a confirmé l'importance de Per1 et Per2 dans la régulation des rythmes bien que leurs fonctions semblent différentes. En effet, il apparaît que Per2 régule positivement l'expression rythmique des gènes contrôlés par l'horloge biologique alors que Per1 semble influencer la fonction d'horloge au niveau post-traductionnel et réguler la stabilité d'autres protéines horloges en interagissant avec elles (Bae, K et al. 2001).

Globalement l'ensemble de ces éléments montre que les protéines Per1 et Per2 jouent un rôle critique dans la régulation des rythmes circadiens. Leur fonction est par ailleurs finement régulée par des modifications post-traductionnelles ou par l'interaction avec des facteurs protéiques cytoplasmiques.

II.3.2.2. Problématique et objectifs

Une équipe japonaise, cherchant à identifier de nouveaux partenaires d'interaction de la protéine Period1, a isolé lors d'un criblage en double hybride chez la levure une nouvelle protéine de 180 KDa qu'ils ont nommé PIPS pour *Per1 Interacting Protein of the Suprachiasmatic nucleus* (Matsuki, T et al. 2001). Cette protéine a été identifiée à partir d'une banque de cDNA issue d'hypothalamus de rat à l'aide du domaine d'interaction protéique PAS de la protéine Per1. En réalité, PIPS n'est autre que GASP-1 qui n'avait pas encore été identifié en tant que telle à ce moment là. T. Matsuki et ses collaborateurs ont confirmé dans cette étude l'interaction entre Per1 et GASP-1 dans des essais *in vitro* de *GST-pull down* ainsi que dans des essais en contexte cellulaire de coimmunoprécipitation et de colocalisation en microscopie confocale. Les observations en microscopie confocale ont notamment montrées que Per1 provoquait la relocalisation de GASP-1 dans le noyau. Ils ont également montré par immunohistochimie sur coupe de cerveau que GASP-1 était fortement exprimé au niveau du

noyau suprachiasmatique, l'horloge interne de l'organisme. Dans l'ensemble, ces résultats suggéraient que GASP-1 puisse moduler l'activité du facteur de transcription Per1 et ainsi jouer un rôle dans la régulation des rythmes.

Afin d'explorer cette hypothèse nous avons réalisé, en collaboration avec l'équipe de Neurobiologie des Rythmes du professeur P. Pévet, des mesures de la variation circadienne de l'activité de souris déficientes en GASP-1 selon différents paradigmes visant à déterminer la période endogène de l'horloge biologique de ces animaux et sa capacité à se synchroniser avec son environnement. De plus, les protéines horloges impliquées dans la régulation du rythme circadien ayant une expression qui oscille entre le jour et la nuit, nous avons évalué si le niveau d'expression de GASP-1 était lui aussi affecté par l'alternance jour/nuit. Par ailleurs, il existe chez les mammifères deux autres protéines Period, Per2 et Per3, qui sont également impliquées dans la régulation des rythmes et qui présentent une grande homologie de séquence avec Per1. Afin d'évaluer leur capacité à interagir avec GASP-1 ainsi qu'avec son plus proche homologue, GASP-2, nous avons réalisé des essais de *GST-pull down* entre les protéines Period et les protéines GASP. Pour compléter ces expériences, nous avons généré des lignées cellulaires CHO exprimant de manière stable les protéines Period et les protéines GASP fusionnées à des marqueurs fluorescents dans le but de réaliser des expériences de colocalisation en microscopie confocale et d'évaluer l'influence de l'expression de GASP-1 et GASP-2 sur la distribution subcellulaire des protéines Period.

II.3.2.3. La mesure des rythmes par actimétrie

Le rôle joué par GASP-1 dans la régulation des rythmes circadiens a été évalué à l'aide d'un modèle murin génétiquement déficient en GASP-1. L'étude du cycle d'activité-repos est commode pour évaluer la fonction circadienne, c'est pourquoi nous avons réalisé des tests d'actimétrie sur ces souris déficientes en GASP-1 et sur leurs homologues sauvages. Deux types d'activités ont été mesurés à l'aide de deux dispositifs différents. L'activité locomotrice volontaire a été mesurée grâce à une roue placée dans les cages des animaux et le nombre de tours de roue effectués par jour a été comptabilisé. L'activité globale a également été suivie à l'aide du système télémétrique Vitalview utilisant un transpondeur qui est implanté, sous anesthésie à l'isoflurane, sous la peau de l'animal. L'activité globale inclut l'activité locomotrice, l'activité d'épouillage et de prise de boisson et de nourriture. Durant la période de mesure de l'activité, l'évolution du poids des animaux ainsi que leur consommation d'eau et de nourriture ont également été contrôlées.

Afin de mesurer différents paramètres du rythme d'activité-repos, nous avons fait varier les conditions environnementales de lumière selon le programme suivant. Après l'implantation du transpondeur, les animaux ont été soumis à des cycles de lumière/obscurité de 12/12h (lumière allumée de 7h à 19h) et leur activité a été suivie durant 3 semaines dans le but de déterminer les horaires d'activité ainsi que de quantifier cette activité (Mendoza, J et al. 2005). Puis les animaux ont été placés durant 2 semaines dans des conditions d'obscurité constante afin de mesurer la période endogène (τ) du rythme circadien. Après 5 semaines de récupération en cycles lumière/obscurité de 12/12h (lumière allumée de 7h à 19h), les horaires où la lumière s'allume et s'éteint ont été avancées de 8 heures (lumière allumée de 23h à 11h) durant 3 semaines puis retardées de 8 heures (lumière allumée de 7h à 19h) durant 3 semaines. Ces expériences de décalage brutal des indices extérieurs de temps ou *jet lag* permettent d'évaluer la capacité de l'horloge biologique interne des souris à se resynchroniser.

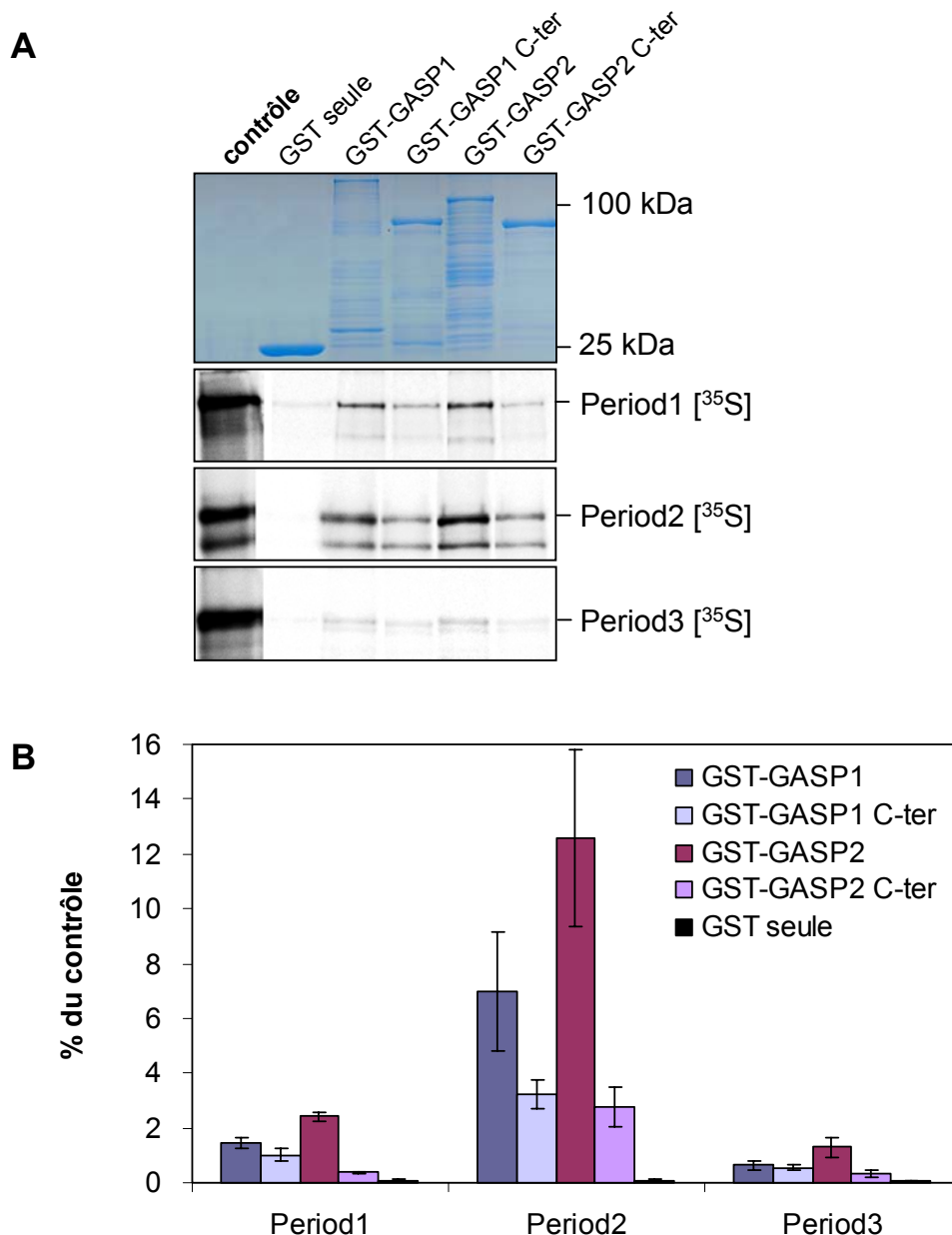


Figure II.3.2.2. Interaction entre les protéines Period1, 2 et 3 et les protéines GASP-1, GASP-2 et de leurs domaines carboxyl-terminaux respectifs.

Les complexes formés par les protéines Period radiomarquées à la méthionine-[^{35}S] et les protéines GASP fusionnées à la GST sont séparés sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes. En guise de contrôle, une fraction des protéines Period radiomarquées utilisées dans l'essai est déposée sur gel. Le gel est coloré au bleu de Coomassie pour révéler les protéines de fusion avec la GST puis analysé au PhosphorImager afin de révéler les protéines Period radiomarquées (**A**). Les bandes correspondant aux protéines Period radiomarquées sont quantifiées et les résultats sont exprimés en pourcentage de la quantité de protéine radiomarquée contrôle mise en jeu dans l'essai (**B**).

II.3.2.4. Résultats

II.3.2.4.1. Interaction *in vitro* de GASP-1 et GASP-2 avec les protéines Period

T. Matsuki et ses collaborateurs ont rapporté une interaction entre la protéine horloge Per1 et GASP-1 (Matsuki, T et al. 2001). Afin de confirmer cette interaction et d'élargir cette étude à l'homologue le plus proche de GASP-1, GASP-2, et aux deux autres protéines Period, Per2 et Per3, nous avons réalisé des essais d'interaction *in vitro* entre ces différents partenaires à l'aide de la technique de *GST-pull down*. Les séquences codant pour les protéines Period ont été sous-clonées dans le vecteur pGEX-4T afin de permettre leur expression en bactérie sous la forme de protéines de fusion avec la GST. Cependant, les essais préliminaires d'expression des protéines GST-Period en bactérie ont révélé un rendement de production faible. En outre, les essais de purification ont montré que ces protéines étaient produites majoritairement sous la forme de corps d'inclusion insolubles. Malgré des essais de mise au point des conditions de culture et d'expression des protéines de fusion, nous ne sommes pas parvenu à produire des protéines GST-Period solubles. Pour circonvenir à ce problème technique, nous avons décidé d'inverser notre stratégie en produisant en bactérie les protéines GASP-1, GASP-2 et leurs domaines carboxyl-terminaux (soit les acides aminés 924 à 1395 pour GASP-1 et les acides aminés 367 à 838 pour GASP-2) en fusion avec la GST et en marquant les protéines Per1, Per2 et Per3 à la méthionine-[³⁵S].

Les résultats des essais de *GST-pull down* sont présentés dans la figure II.3.2.2. Dans tous les cas, le témoin de la GST seule n'interagit quasiment pas avec les protéines Period. Par contre, des interactions significatives ont été détectées entre les différents GASP fusionnés à la GST et les protéines Per1, Per2 et Per3 (Figure II.3.2.2.A). La quantification au PhosphorImager de l'intensité des bandes nous a permis de déterminer les pourcentages des protéines Period radiomarquées mises en jeu dans l'essai qui ont interagi avec GASP-1, GASP-2 et leur domaines carboxyl-terminaux respectifs (Figure II.3.2.2.B). Les protéines Period1 et Period3 n'interagissent que très faiblement avec les différents GASP (entre 1 et 2%). Pour la protéine Per2, des niveaux d'interaction plus élevés ont été détectés. Per2 interagit plus fortement avec GASP-2 (13%) qu'avec GASP-1 (7%). Par ailleurs, les quantités de protéine Per2 retenues par GASP-1 et GASP-2 sont significativement plus importantes que celles retenues par leurs portions carboxyl-terminales (3%). Ceci indique que la portion amino-terminale de GASP-1 et GASP-2 contient des déterminants importants pour l'interaction avec Per2.

Dans l'ensemble, ces résultats confirment l'interaction observée entre GASP-1 et Period1 par Matsuki et collaborateurs. Cependant, l'interaction de Period1 et Period3 avec les GASP est faible et il apparaît que Period2 est un bien meilleur partenaire d'interaction des GASP. De plus, la portion amino-terminale de GASP-1 et GASP-2 semble jouer un rôle important dans l'interaction avec la protéine Period2.

II.3.2.4.2. Colocalisation en contexte cellulaire de GASP-1 et GASP-2 avec les protéines Period

T. Matsuki et collaborateurs ont montré que Per1 provoquait la relocalisation de GASP-1 au niveau du noyau lorsque ces deux protéines étaient coexprimées en contexte cellulaire (Matsuki, T et al. 2001). Dans le but d'évaluer les conséquences de l'interaction entre les GASP et les protéines Period sur leur localisation subcellulaire, nous avons généré des lignées de cellules CHO dans lesquelles les protéines Period, fusionnées à la mCherry, sont coexprimées de façon stable avec GASP-1 ou GASP-2 fusionnés à l'EYFP. Nous avons également réalisé les lignées cellulaires témoins exprimant de façon stable les protéines mCherry-Period ou les protéines EYFP-GASP seules. Ces cellules ont été cultivées sur lamelles, fixées, montées sur lames et observées au microscope confocal. L'EYFP et la mCherry ont été excitées avec des raies laser à 514 nm et 568 nm. Les acquisitions ont été réalisées entre 525 et 560 nm pour l'EYFP et entre 580 et 650 nm pour la mCherry. Dans tous les cas, nous avons contrôlé expérimentalement que dans nos conditions d'observation, la fluorescence émise par l'EYFP n'était pas détectée par le canal dédié à la mCherry et inversement.

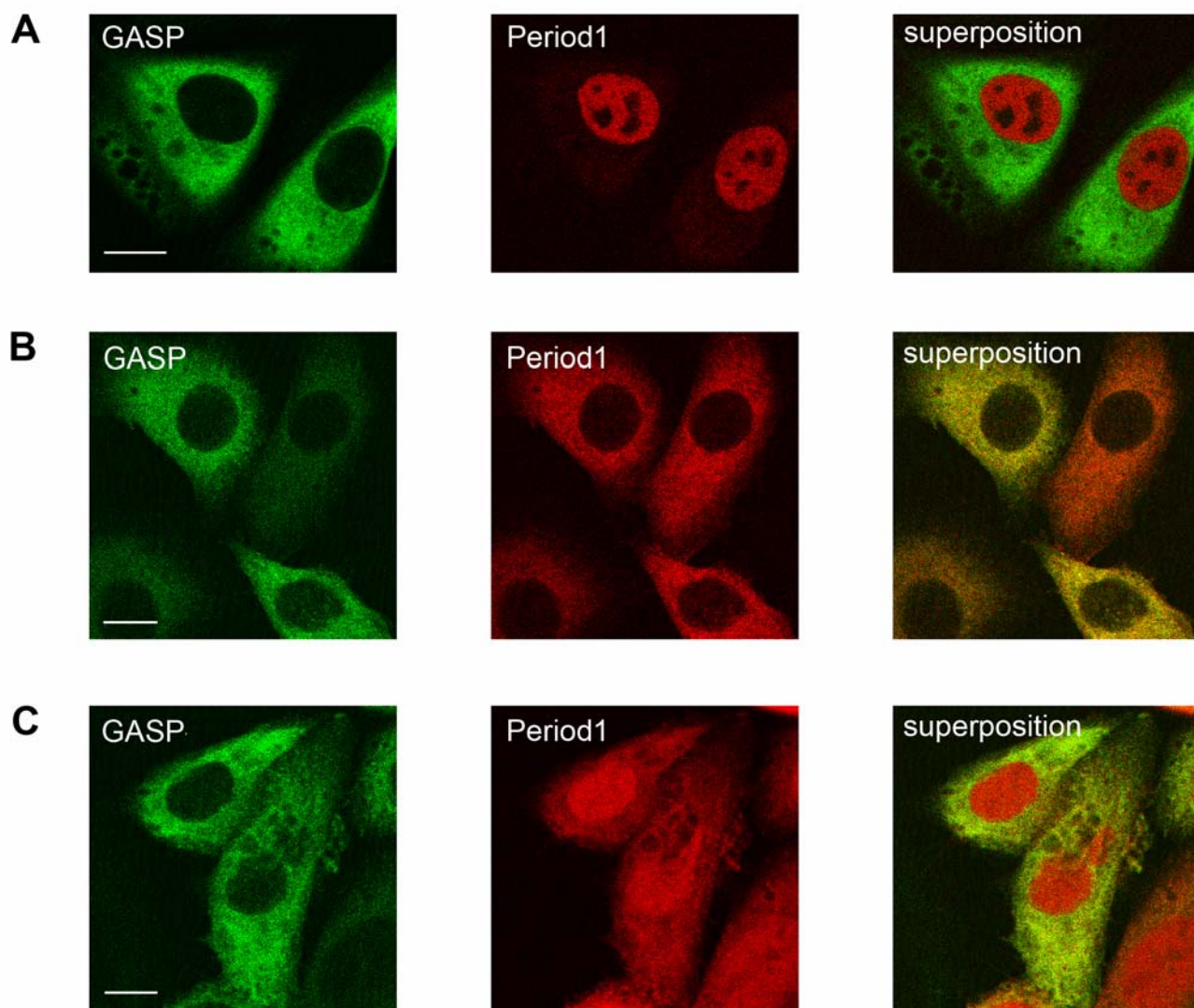


Figure II.3.2.3. Images par microscopie confocale des lignées cellulaires CHO exprimant la protéine Period1 fusionnée à la mCherry et GASP-1 ou GASP-2 fusionnés à l'EYFP.

Les profils d'expression sont sensiblement équivalents entre la lignée GASP-1/Period1 et GASP-2/Period1. Les GASP présentent une localisation exclusivement cytoplasmique. La protéine Period1 est localisée majoritairement dans le noyau (**A**) mais peut également être présente dans le cytoplasme (**B**) ou à la fois dans le noyau et le cytoplasme (**C**). Lorsque Period1 est exprimé dans le cytoplasme elle présente un profil de localisation très similaire à celui des GASP (**B** et **C**, 3^{ème} colonne). La barre blanche représente 10 μm.

Les cellules CHO exprimant uniquement Per1 montrent différents profils de localisation de cette protéine. Bien que dans la grande majorité des cellules observées Per1 a une localisation nucléaire, on trouve certaines cellules qui expriment Per1 dans le cytoplasme et d'autres à la fois dans le noyau et le cytoplasme. Ces observations semblent être en accord avec la fonction de Per1. En effet, ce facteur de transcription est synthétisé dans le cytoplasme puis pénètre dans le noyau grâce à sa séquence de localisation nucléaire pour y réguler l'expression de son propre gène et de gènes impliqués dans les rythmes circadiens. Dans les cellules exprimant simultanément Per1 et GASP-1 ou GASP-2, la localisation des GASP est exclusivement cytoplasmique ce qui est conforme à ce que l'on peut observer pour des cellules exprimant uniquement GASP-1 ou GASP-2. Ceci indique que la localisation des GASP n'est pas affectée par l'expression de la protéine Per1. À l'inverse, l'expression des GASP semble affecter la localisation de la protéine Per1 et les cellules dans lesquelles Per1 est localisé dans le cytoplasme sont plus nombreuses (Figure II.3.2.6). Par ailleurs, lorsque Per1 et GASP-1 ou GASP-2 sont exprimés simultanément dans le cytoplasme des cellules CHO, leurs profils de localisation sont très similaires (Figure II.3.2.3). Ceci suggère que ces protéines colocalisent *in vivo*. Cependant, il est difficile de conclure quant à une colocalisation du fait de l'absence d'association avec une structure cytoplasmique particulière. Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que Period1 interagit avec les GASP en contexte cellulaire et que cette interaction entraîne sa rétention au niveau du cytoplasme.

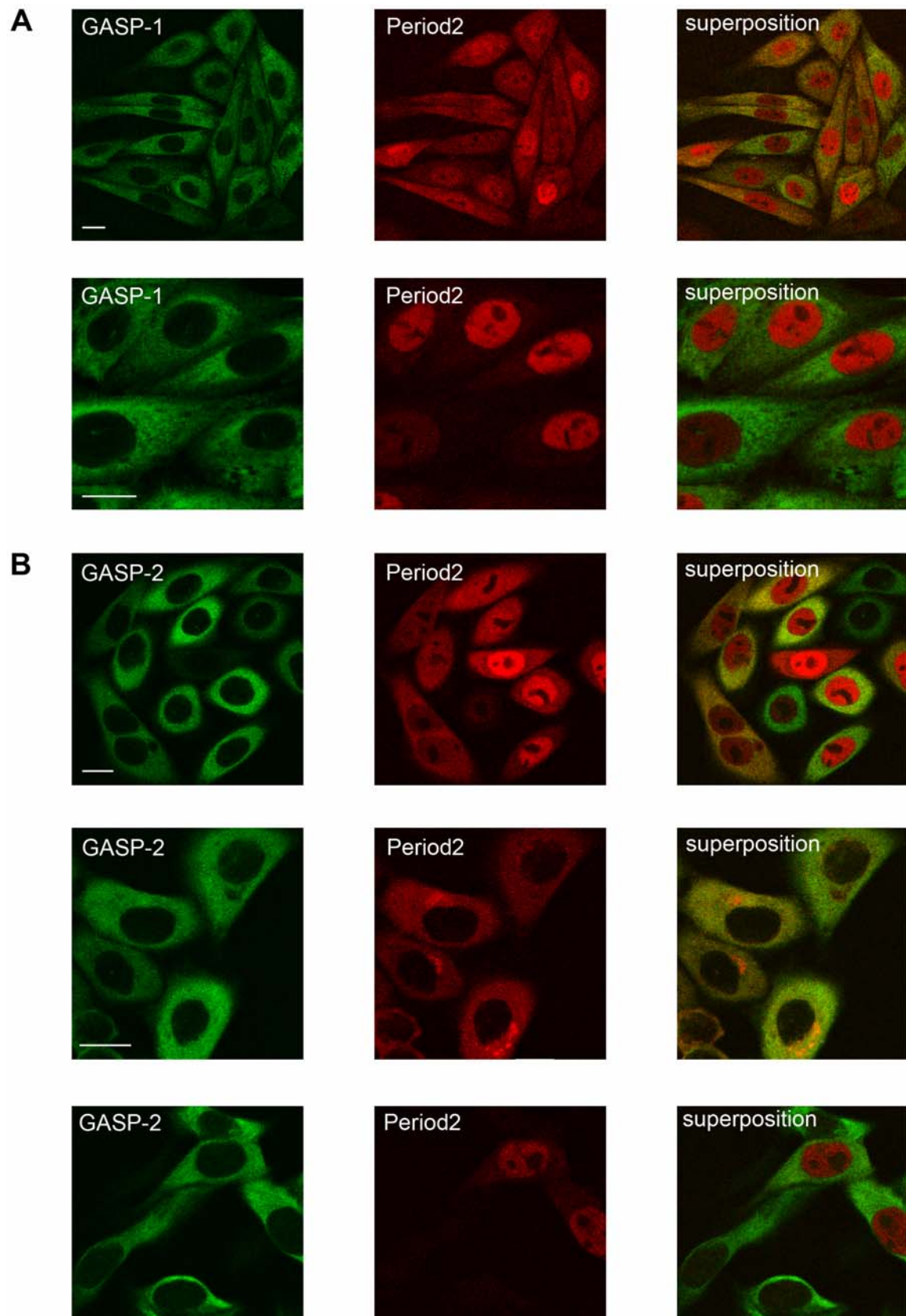
De manière similaire à ce qui a été observé pour Per1, les cellules CHO exprimant uniquement Per2 présentent trois profils de localisation de cette protéine : une localisation exclusivement nucléaire qui est le profil majoritairement observé, une localisation exclusivement cytoplasmique et une localisation mixte à la fois dans le cytoplasme et le noyau. Dans les cellules exprimant simultanément Per2 et GASP-1 ou GASP-2, la localisation des GASP est exclusivement cytoplasmique ce qui est conforme à ce que l'on peut observer pour des cellules exprimant uniquement GASP-1 ou GASP-2 (Figure II.3.2.4). Ceci montre que la localisation des GASP n'est pas affectée par l'expression de la protéine Per2. À l'inverse, l'expression des GASP semble affecter la localisation de la protéine Per2 et les cellules qui expriment Per2 à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau sont à présent majoritaires (Figure II.3.2.6). Par ailleurs, lorsque Per2 et GASP-1 ou GASP-2 sont exprimés simultanément dans le cytoplasme des cellules CHO, leurs profils de localisation sont très similaires (Figure II.3.2.4). Ceci suggère que ces protéines colocalisent *in vivo*. Cependant, il est difficile de conclure quant à une colocalisation du fait de l'absence d'association avec une

structure cytoplasmique particulière. Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que Period2 interagit avec les GASP en contexte cellulaire et que cette interaction entraîne sa rétention au niveau du cytoplasme.

La protéine Per3 présente des niveaux d'expression en cellules CHO qui sont globalement plus faible que ceux obtenus pour les protéines Per1 et Per2. Néanmoins, les cellules exprimant uniquement Per3 montrent une localisation à la fois nucléaire et cytoplasmique de cette protéine. Ce profil de localisation n'est pas modifié par l'expression simultanée de GASP-1 ou GASP-2 qui sont exclusivement localisés dans le cytoplasme (Figure II.3.2.5). Par ailleurs, le profil de localisation cytoplasmique de Per3 est très similaire à celui des GASP ce qui suggère une colocalisation de ces protéines *in vivo*. Cependant, il est difficile de conclure quant à une colocalisation du fait de l'absence d'association avec une structure cytoplasmique particulière.

Figure II.3.2.4. Images par microscopie confocale des lignées cellulaires CHO exprimant la protéine Period2 fusionnée à la mCherry et GASP-1 ou GASP-2 fusionnés à l'EYFP.

Les GASP présentent une localisation exclusivement cytoplasmique. Lorsque la protéine Period2 est coexprimée avec GASP-1, sa localisation est nucléaire ou à la fois nucléaire et cytoplasmique (**A**). Lorsque la protéine Period2 est coexprimée avec GASP-2, sa localisation est nucléaire, cytoplasmique ou à la fois nucléaire et cytoplasmique (**B**). Les profils de localisation des GASP et de Period2 dans le cytoplasme sont très similaires (**A**, 1^{ère} ligne ; **B**, 1^{ère} et 2^{ème} ligne). La barre blanche représente 10 µm.



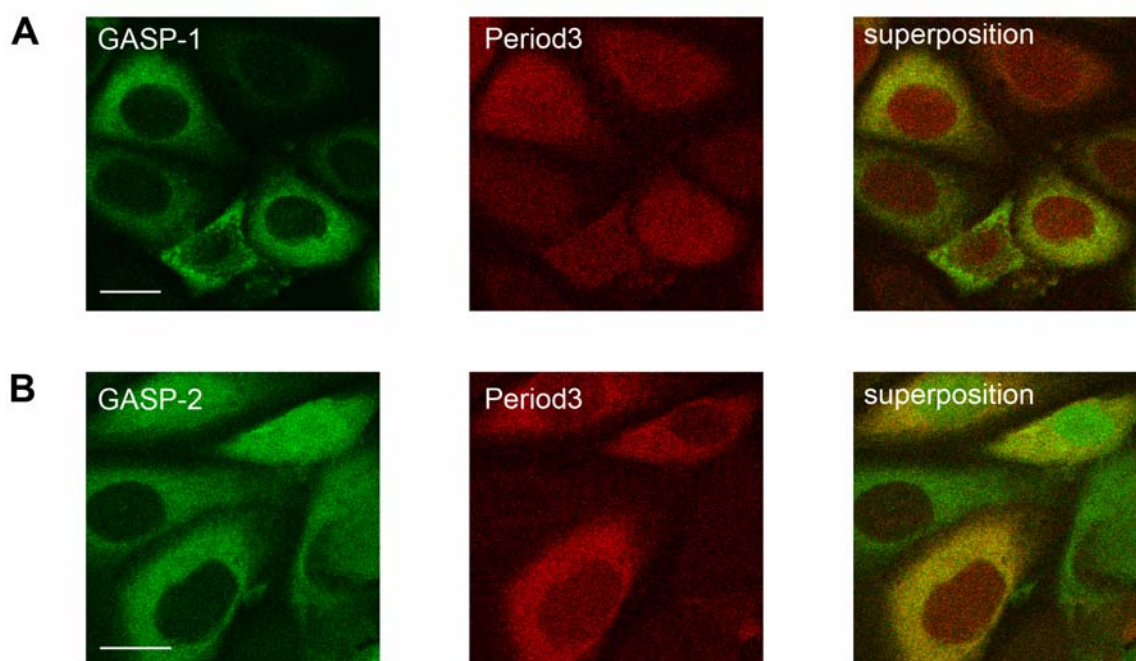


Figure II.3.2.5. Images par microscopie confocale des lignées cellulaires CHO exprimant la protéine Period3 fusionnée à la mCherry et GASP-1 ou GASP-2 fusionnés à l'EYFP.

Les profils d'expression sont sensiblement équivalents entre les lignées exprimant GASP-1 (**A**) ou GASP-2 (**B**). Les GASP sont localisés exclusivement dans le cytoplasme alors que la protéine Period3 est localisée à la fois dans le noyau et le cytoplasme. Les profils de localisation cytoplasmique des GASP et de Period3 sont très similaires (**A** et **B**, 3^{ème} colonne). La barre blanche représente 10 μ m.

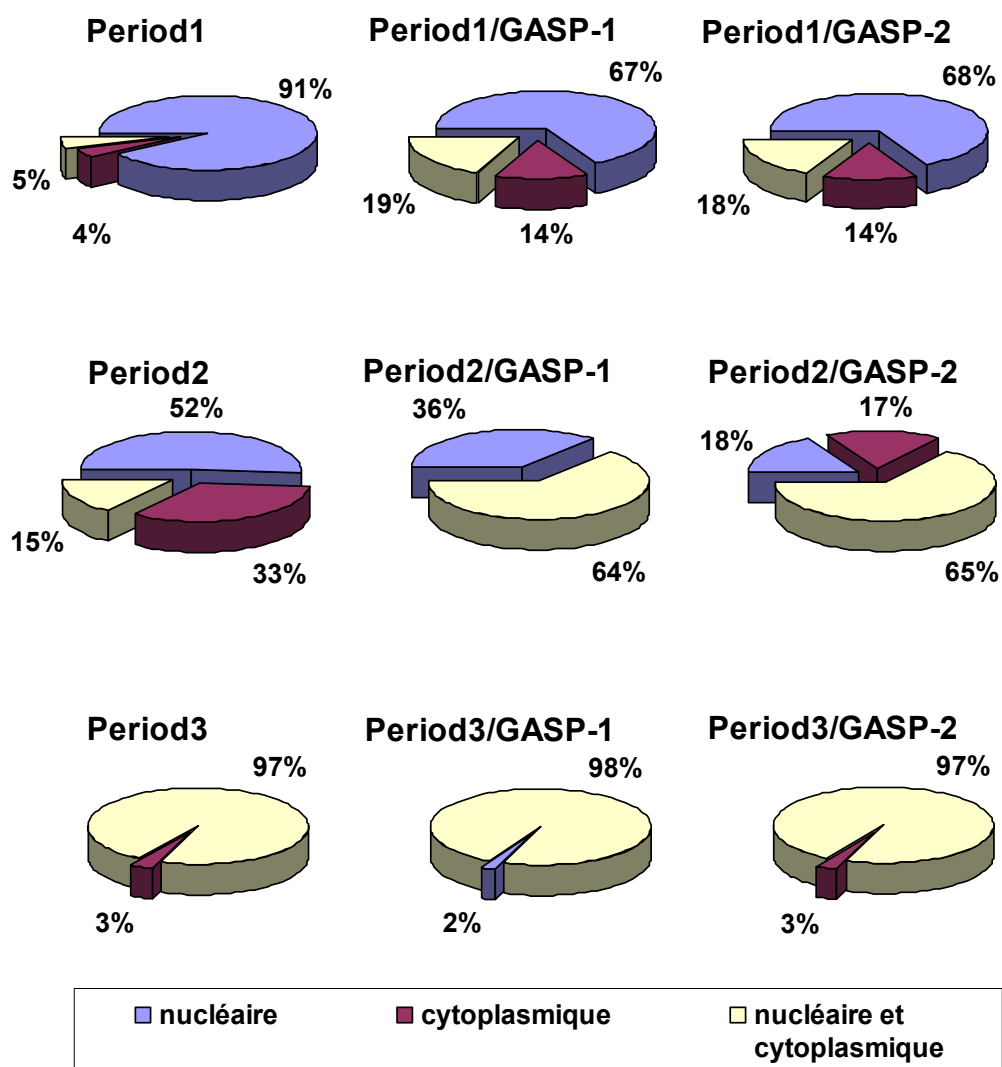


Figure II.3.2.6. Localisation subcellulaire des protéines mCherry-Per1, 2 ou 3 exprimées seules ou coexprimées avec EYFP-GASP-1 ou EYFP-GASP-2.

Pour chaque lignée cellulaire, 300 cellules ont été observées en moyenne.

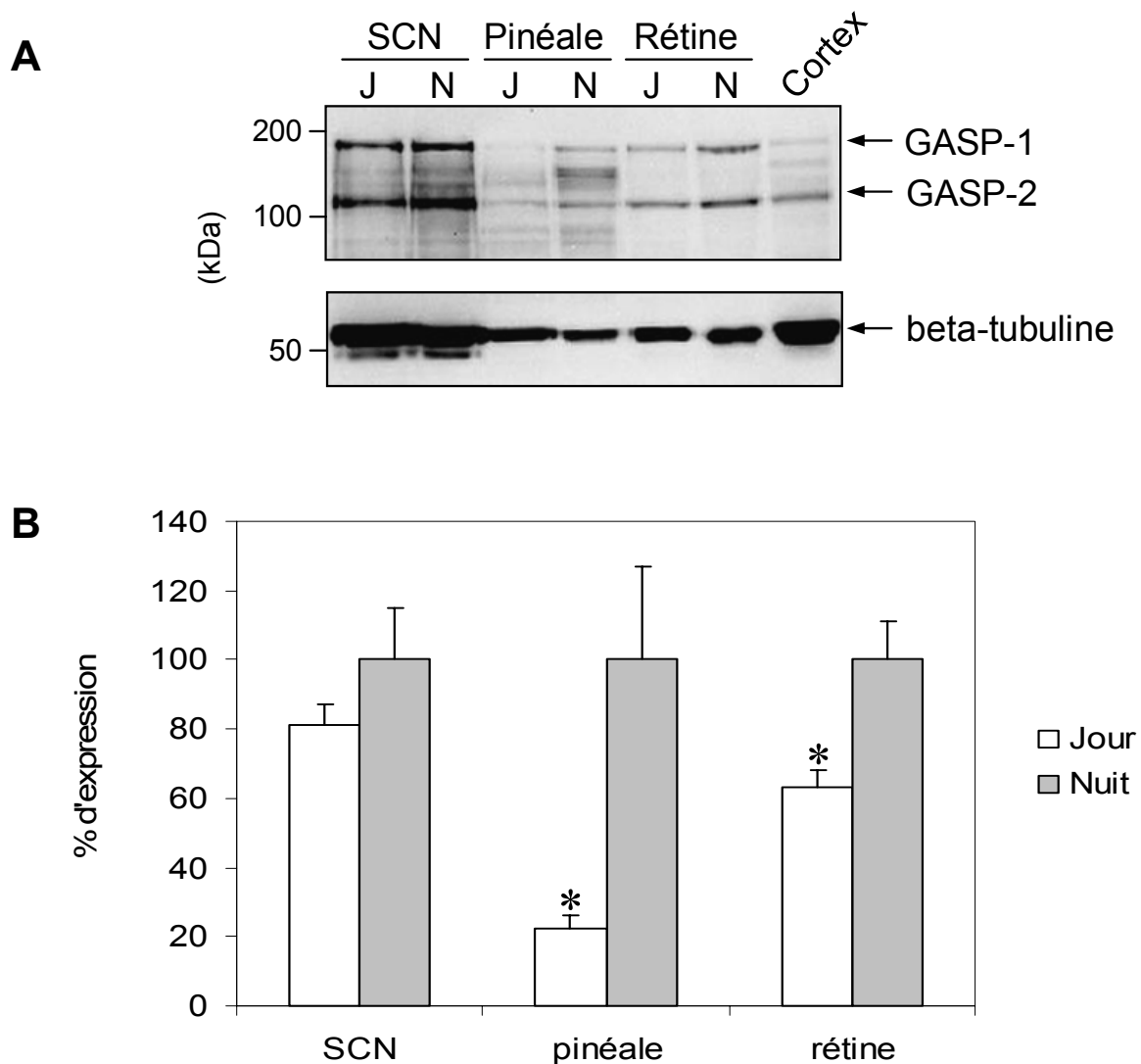


Figure II.3.2.7. Comparaison de l'expression de GASP-1 entre le jour et la nuit dans le noyau suprachiasmatique (NSC), la glande pinéale et la rétine de rat.

Les extraits préparés à partir des structures prélevées à 12h d'intervalle sont analysés en western blot par immunochimiluminescence. La moitié supérieure de la membrane est incubée avec un anticorps spécifique de GASP-1 et GASP-2 et la moitié inférieure avec un anticorps spécifique de la β -tubuline (A). L'intensité du signal de chimiluminescence est quantifiée par une caméra CCD à l'aide du système VersaDoc (Biorad) et l'intensité de la bande correspondant à GASP-1 est normalisée par rapport au contrôle interne de la β -tubuline. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'expression de GASP-1 par rapport à l'échantillon de nuit (B).

II.3.2.4.3. Variation de l'expression de GASP-1 entre jour et nuit

De nombreux gènes présentent une expression qui est régulée de manière circadienne par l'horloge biologique interne. Ce sont notamment les gènes codant pour certaines protéines horloges mais également des gènes impliqués dans le contrôle des rythmes circadiens. Afin d'évaluer si l'expression de GASP-1 et GASP-2 est sous la dépendance de l'horloge circadienne, nous avons prélevé sur deux groupes de rats à 12 heures d'intervalle le NSC, la rétine, la glande pinéale et le cortex. Les extraits obtenus à partir des structures prélevées sur les animaux ont été séparés sur gel d'agarose puis transférés sur membrane de nitrocellulose pour être analysés par la méthode d'immunochimiluminescence. Les intensités des bandes correspondant aux protéines GASP-1 et GASP-2 ont été mesurées à l'aide d'une caméra CCD couplée au système VersaDoc (Biorad) et normalisées par rapport au contrôle de la β -tubuline dont l'expression ne varie pas entre le jour et la nuit. La figure II.3.2.7 montre les résultats qui ont été obtenus pour ces essais. On observe tout d'abord que les protéines GASP-1 et GASP-2 sont enrichies dans la glande pinéale, la rétine et plus particulièrement dans le NSC comparativement aux niveaux d'expressions relevés dans le cortex (Figure II.3.2.7.A). La quantification des bandes correspondant à GASP-1 montre par ailleurs une diminution significative de son expression au cours de la période de jour dans la glande pinéale et dans la rétine mais pas dans le NSC ni dans le cortex (Figure II.3.2.7.B). Dans l'ensemble, l'enrichissement en GASP-1 et GASP-2 dans des structures fortement impliquées dans la production et l'entretien des rythmes circadiens ainsi que l'oscillation circadienne de leur expression dans certaines de ces structures semble confirmer que GASP-1 et peut être GASP-2 puissent jouer un rôle dans la régulation de ces rythmes.

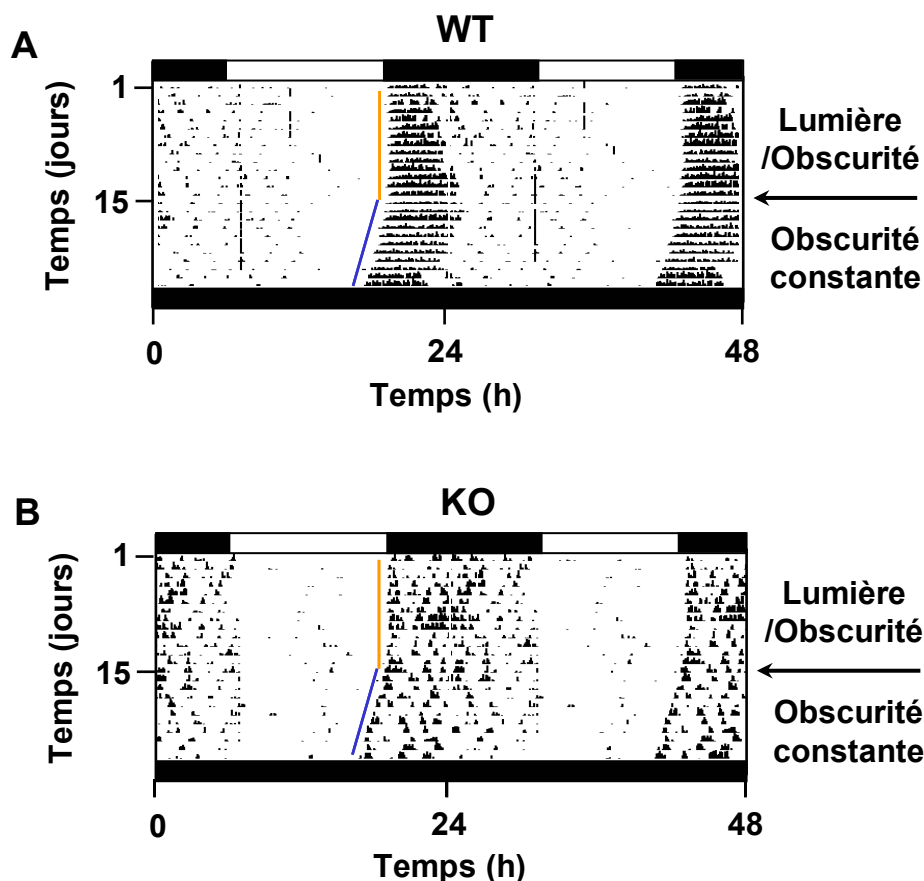


Figure II.3.2.8. Actogrammes représentatifs montrant l'activité des souris sauvages (WT) et déficientes en GASP-1 (KO) en cycle lumière/obscurité (12h/12h) puis en obscurité constante.

En abscisse est représenté le temps en heure (de 0 à 48h) et en ordonnée le temps en jour. Une ligne de l'actogramme correspond à deux jours consécutifs (J et J+1). Mais l'actogramme est redondant, c'est à dire que le jour J+1 est repris sur la ligne suivante qui est donc formée des jours J+1 et J+2 et ainsi de suite pour les lignes suivantes. La frise placée au-dessus des actogrammes représente l'alternance des périodes de lumière (7h – 19h) et d'obscurité (19h – 7h). Le trait orange indique le début de la phase d'activité durant la période d'alternance lumière/obscurité et le trait bleu indique le début de la phase d'activité durant la période d'obscurité constante.

II.3.2.4.4. Influence de GASP-1 sur la régulation des rythmes circadiens

Nous avons évalué l'impact de l'absence de GASP-1 sur la régulation des rythmes circadiens chez l'animal. Dans ce but, l'activité de souris déficientes en GASP-1 et de leurs homologues sauvages a été évaluée dans des conditions d'éclairage standards avec une alternance jour/nuit toutes les 12h, puis dans des conditions d'obscurité constante et enfin après un décalage de la phase d'alternance jour/nuit qui a tout d'abord été avancée de 8 heures puis retardée de 8 heures. Dans des conditions d'éclairage standards, les souris sauvages et les souris mutantes débutent leur période d'activité au même moment (Figure II.3.2.8), soit respectivement à 19h 02min (± 2 min) et 18h 56min (± 1 min) en moyenne (Figure II.3.2.9.A), ce qui correspond à l'heure d'extinction de la lumière programmée à 19h00. La figure II.3.2.8 montre que les souris sauvages sont très actives durant les 5 à 6 premières heures qui suivent l'extinction de la lumière puis cette activité chute et reste faible jusqu'à la fin de la période d'obscurité. Pour les souris mutantes, cette activité est plus irrégulière et se développe tout au long de la période d'obscurité. Bien que l'activité locomotrice des souris mutantes soit plus faible que celle des souris sauvages, la différence n'est pas significative (Figure II.3.2.9.B).

Dans un deuxième temps, la période endogène de l'horloge biologique interne des souris sauvages et mutantes a été mesurée. La figure II.3.2.8 montre l'activité des souris placées dans une obscurité constante. On observe qu'en absence d'indices extérieurs de temps, les souris des deux génotypes entrent dans leur phase d'activité un peu plus tôt chaque jours. La période endogène (τ) de l'horloge biologique interne, définie par le temps séparant le début de deux phases d'activité successives, est de 23h 34min (± 9 min) chez les souris sauvages et de 23h 33min (± 6 min) chez les souris mutantes en moyenne (Figure II.3.2.9.C). Ceci indique que l'absence de GASP-1 n'affecte pas la période endogène de l'horloge biologique des souris mutantes.

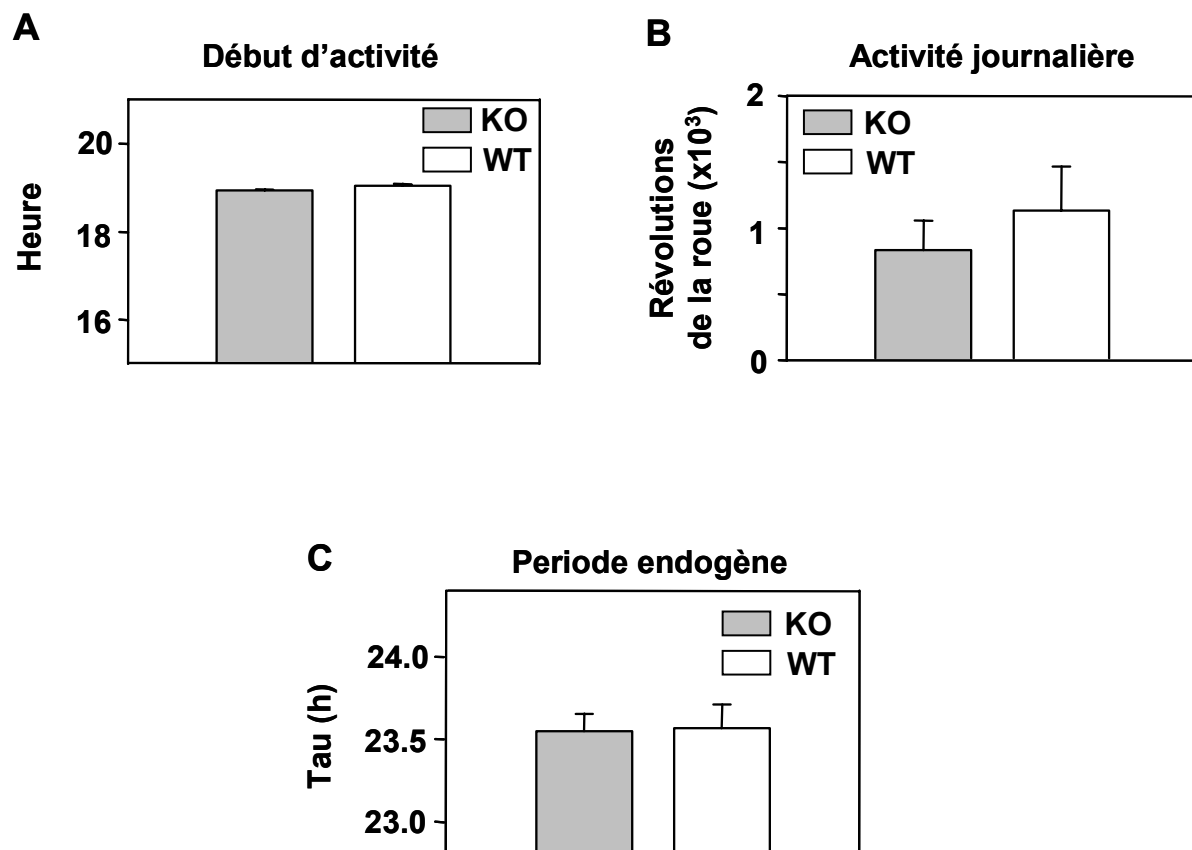


Figure II.3.2.9. Comparaison des paramètres du rythme de veille/activité entre les souris sauvages (WT) et déficientes en GASP-1 (KO).

Les souris sauvages (WT) et déficientes en GASP-1 (KO) débutent leur phase d'activité à la même heure, qui correspond au début de la période d'obscurité (A). L'activité locomotrice journalière mesurée en nombre de tours de roue réalisés dans une période de 24 heures est représentée pour les souris WT et KO (B). La période endogène τ de l'horloge interne exprimée en heures a été déterminée chez les souris WT et KO dans des conditions d'obscurité constante et correspond au temps qui sépare le début de deux périodes d'activité successives (C).

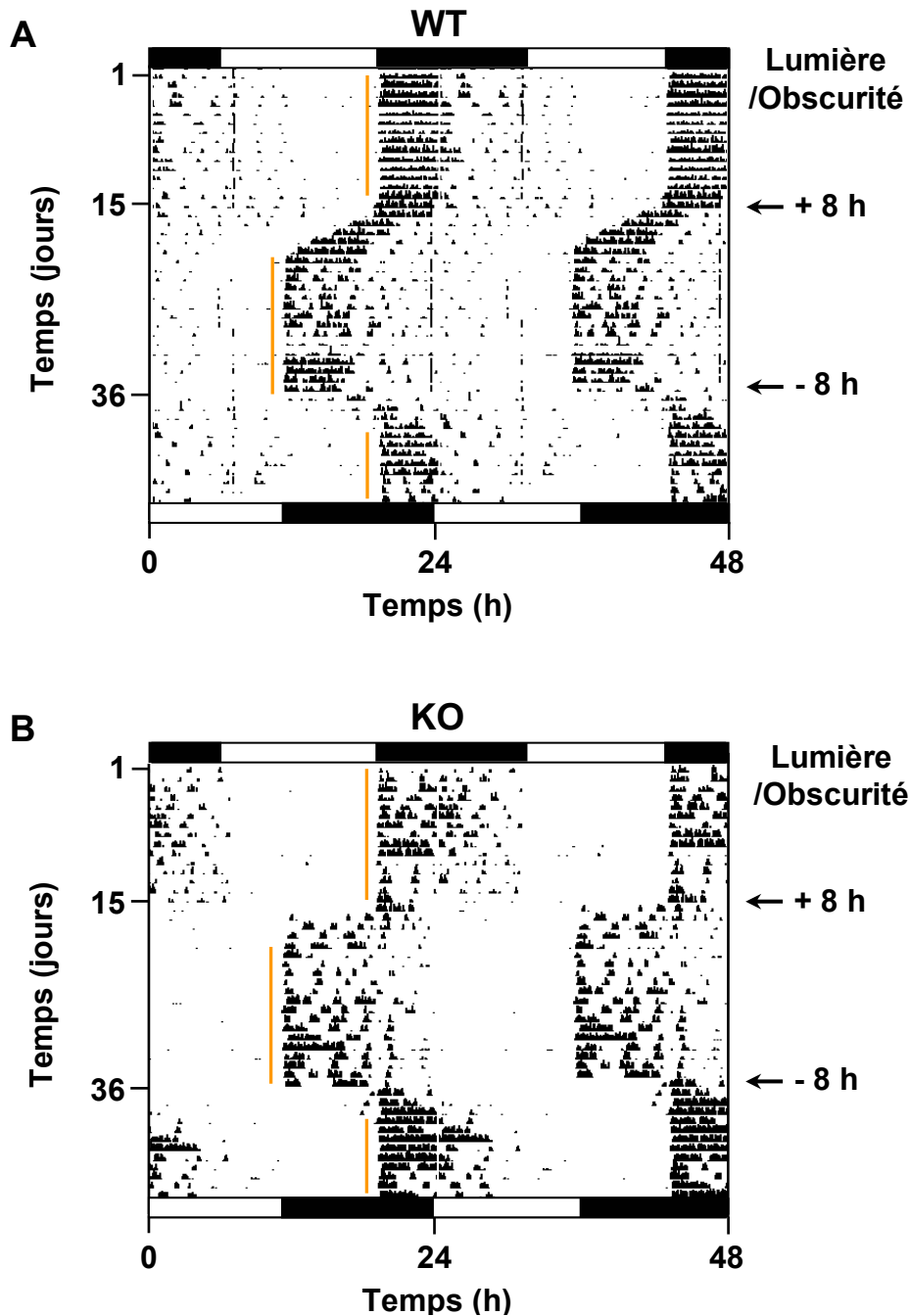


Figure II.3.2.10. Actogrammes représentatifs montrant l'activité des souris sauvages (WT) et déficientes en GASP-1 (KO) soumises au test de *jet lag*.

En abscisse est représenté le temps en heure (de 0 à 48h) et en ordonnée le temps en jour. Une ligne de l'actogramme correspond à deux jours consécutifs (J et J+1). Mais l'actogramme est redondant, c'est à dire que le jour J+1 est repris sur la ligne suivante qui est donc formée des jours J+1 et J+2 et ainsi de suite pour les lignes suivantes. Les frises de temps placées au dessus et en dessous des actogrammes représentent respectivement les cycles de lumière/obscurité avant et après le décalage de +8h (avancement) des horaires d'allumage et d'extinction de la lumière. Les périodes de stabilité des rythmes sont symbolisées en orange.

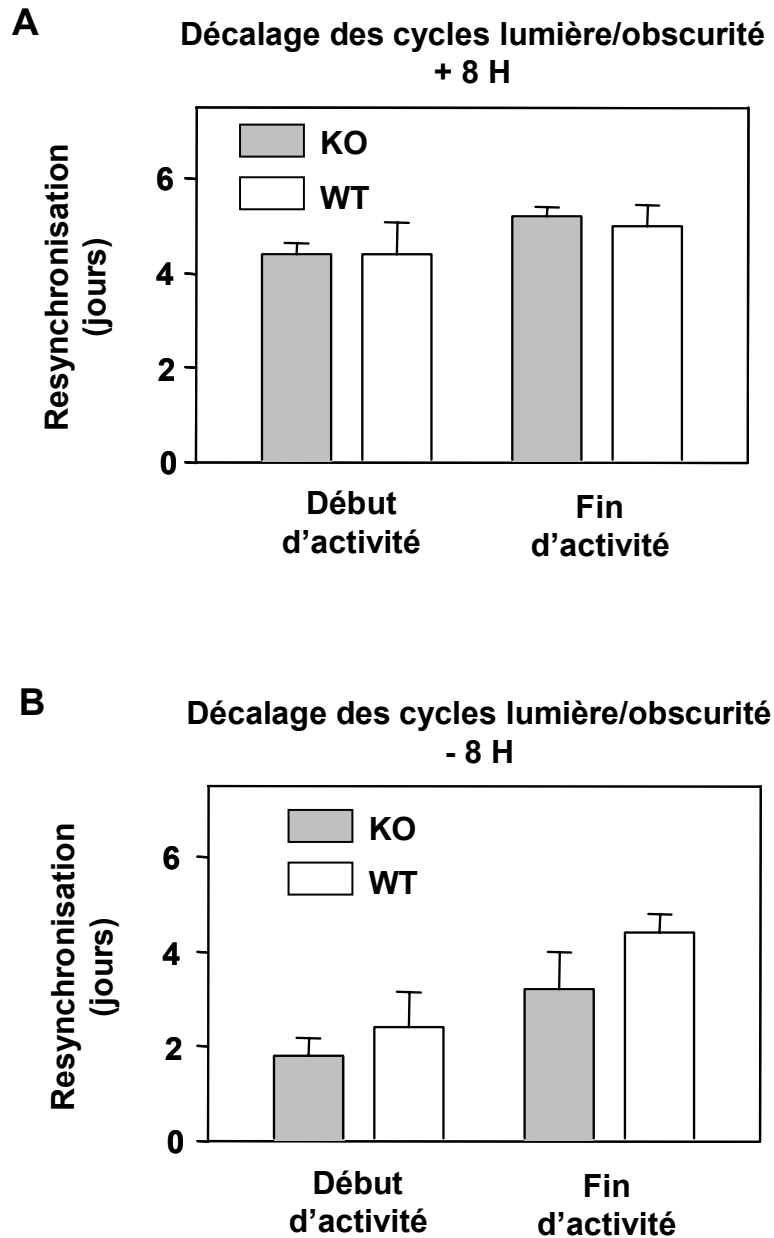


Figure II.3.2.11. Représentation graphique du temps de resynchronisation du rythme de veille/activité chez les souris sauvages (WT) et déficientes en GASP-1 (KO).

Dans un premier temps, la resynchronisation du rythme a été suivie après que les horaires ou la lumière s'allume et s'éteint aient été avancés de 8 heures (**A**). Puis, la resynchronisation du rythme a été suivie après que ces mêmes horaires aient été retardés de 8 heures (**B**). En ordonnées sont représentés le nombre de jours écoulés entre l'application du décalage des cycles lumière/obscurité et la stabilisation des horaires de début et de fin de la phase d'activité des souris WT et KO.

Enfin, la capacité de l'horloge biologique interne à se resynchroniser avec son environnement a été évaluée chez les souris sauvages et mutantes. Pour cela, les horaires où la lumière s'allume et s'éteint ont été avancées de 8 heures (lumière allumée de 23h à 11h au lieu de 7h à 19h), créant ainsi un décalage de phase entre les cycles de lumière/obscurité et les cycles veille/activité des souris. La figure II.3.2.10 montre l'activité des souris qui a été mesurée après que la programmation des périodes de lumière et d'obscurité ait été modifiée pour débiter 8h plus tôt. On observe que les souris resynchronisent progressivement leur cycle de veille/activité sur le nouveau cycle lumière/obscurité. Cette resynchronisation prend plusieurs jours jusqu'à ce que les deux cycles soient à nouveau en phase et que les heures où débute et se termine l'activité des souris soient à nouveau stables. Le temps nécessaire à la resynchronisation de l'entrée en phase d'activité est en moyenne de 4,4 jours chez les souris sauvages ($\pm 0,68$) et les souris mutantes ($\pm 0,25$). Pour la resynchronisation de la fin de phase d'activité, le temps nécessaire est en moyenne de 5 jours ($\pm 0,45$) pour les souris sauvages et de 5,2 jours ($\pm 0,2$) pour les souris mutantes (Figure II.3.2.11.A). Une fois les rythmes resynchronisés, l'expérience a été répétée à l'inverse en retardant de 8 heures les horaires où la lumière s'allume et s'éteint (lumière à nouveau allumée de 7h à 19h au lieu de 23h à 11h). La figure II.3.2.10 montre les résultats de la mesure de l'activité des souris après que la programmation des périodes de lumière et d'obscurité ait été modifiée pour débiter 8h plus tard. Comme précédemment, les souris resynchronisent progressivement leur cycle de veille/activité sur le nouveau cycle lumière/obscurité. Le temps nécessaire à la resynchronisation de l'entrée en phase d'activité est en moyenne de 2,4 jours ($\pm 0,75$) pour les souris sauvages et de 1,8 jours ($\pm 0,37$) pour les souris mutantes. Pour la resynchronisation de la fin de phase d'activité, le temps nécessaires est en moyenne de 4,4 jours ($\pm 0,4$) pour les souris sauvages et de 3,2 jours ($\pm 0,8$) pour les souris mutantes (Figure II.3.2.11.B). Dans l'ensemble, aucune différence significative n'a été observée entre les souris sauvages et les souris mutantes en terme de resynchronisation des rythmes suggérant que GASP-1 ne soit pas impliqué dans la régulation de ce phénomène.

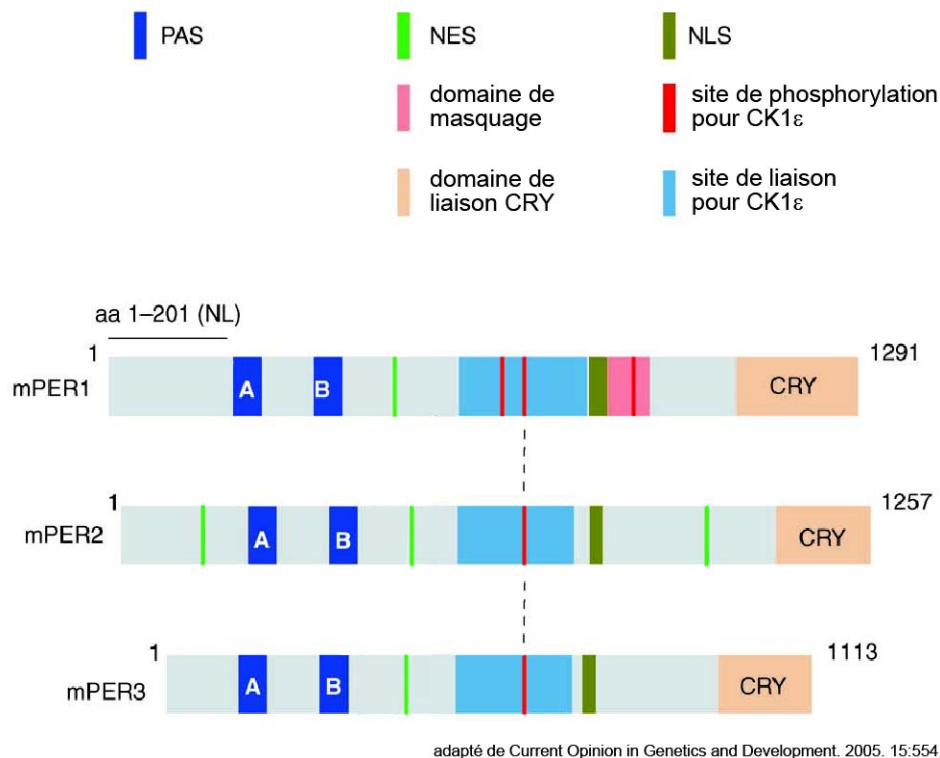


Figure II.3.2.12. Représentation schématique des trois protéines Period de souris et de leurs principaux domaines.

Abréviations : PAS, PER-ARNT-SIM (trois protéines identifiées chez la drosophile et contenant ce domaine d'interaction protéique) ; NES, signal d'export nucléaire ; NLS, signal de localisation nucléaire ; CRY, cryptochrome ; CK1, caséine kinase 1.

II.3.2.5. Éléments de discussion

II.3.2.5.1. Les GASP interagissent avec les protéines Period

Les protéines horloges Period tiennent une place centrale dans la biochimie des rythmes circadiens en régulant l'expression rythmique de nombreux gènes dont leurs propres gènes. Les mutations ou les délétions des gènes *Period* conduisent notamment à des altérations de la période endogène ou à des arythmies de l'horloge biologique interne (Bae, K et al. 2001; Cermakian, N et al. 2001; Zheng, B et al. 2001). La fonction des protéines Period est notamment modulée par leur interaction avec d'autres protéines tel que les protéines Cry et CK1 ϵ (Sassone-Corsi, P 1995). Les résultats que nous avons obtenus montrent que les trois protéines Period sont également capables d'interagir *in vitro* avec GASP-1 et GASP-2. Ces résultats confirment l'interaction qui a été observée précédemment entre la protéine Per1 et GASP-1 par T. Matsuki et ses collaborateurs (Matsuki, T et al. 2001). Les auteurs de cette étude ont notamment proposé que les deux domaines d'interaction protéique PAS (Figure II.3.2.12) de la protéine Per1 soient impliqués dans l'interaction avec GASP-1. Ces deux domaines conservés sont également présents chez les protéines Per2 et Per3 dont nous avons montré la capacité à interagir *in vitro* avec GASP-1 et GASP-2, ce qui confirme le rôle joué par le domaine PAS dans l'interaction entre les protéines Period et les protéines GASP. Cependant, des différences ont été constatées entre les trois protéines Period en terme de profil d'interaction avec les GASP, ce qui suggère que des déterminants spécifiques à chaque protéine Period seraient également impliqués dans leur interaction avec les GASP.

Nos résultats montrent que la portion amino-terminale des GASP contient des déterminants importants pour l'interaction avec les protéines Period et plus particulièrement Per2 bien que le domaine carboxyl-terminal joue également un rôle dans ce phénomène. Ces résultats font échos aux observations de T. Matsuki et ses collaborateurs qui ont identifié au sein de la portion amino-terminale de GASP-1 deux domaines impliqués dans l'interaction avec Per1.

II.3.2.5.2. La localisation subcellulaire des protéines Period dépend de la présence des GASP

Les études réalisées en contexte cellulaire montrent un profil de localisation cytoplasmique très similaire entre les protéines GASP (-1 et -2) et les protéines Per1 et Per2. Ces résultats suggèrent fortement que ces partenaires colocalisent *in vivo*. Cependant,

l'absence d'association avec une structure cytoplasmique particulière rend difficile toute conclusion quant à une colocalisation. Une investigation plus poussée basée sur des essais de FRET pourrait ainsi être initiée afin de préciser s'il existe une réelle proximité spatiale entre ces partenaires ce qui permettrait de confirmer leur interaction en contexte cellulaire. Malgré tout, les résultats obtenus en microscopie confocale apportent des éléments intéressants en terme de localisation subcellulaire des partenaires GASP et Period. Ils montrent notamment que les protéines GASP ont une localisation cytoplasmique qui n'est pas affectée par l'expression des protéines Period. Ceci est en contradiction avec les observations faites par T. Matsuki et ses collaborateurs qui ont proposé que la localisation subcellulaire de GASP-1 soit contrôlée par Per1 qui provoque sa relocalisation partielle au niveau du noyau (Matsuki, T et al. 2001). Cette différence de localisation subcellulaire des GASP pourrait s'expliquer par le fait que nos observations ont été réalisées avec des cellules CHO exprimant de manière stable les deux partenaires alors que T. Matsuki et ses collaborateurs ont réalisé leurs observations avec des cellules COS-7 cotransfectées de façon transitoire. Ainsi, les niveaux de surexpression obtenus pourraient fortement influencer les profils de localisation subcellulaire de ces deux partenaires.

À l'inverse, les résultats que nous avons obtenus indiquent que l'expression des protéines GASP modifie la distribution subcellulaire des protéines Per1 et Per2 mais pas celle de la protéine Per3. En effet, les protéines Per1 et Per2, majoritairement localisées dans le noyau, se relocalisent en partie dans le cytoplasme lorsqu'elles sont coexprimées avec les GASP. Dans l'ensemble, ces observations suggèrent que les protéines GASP favoriseraient la rétention des protéines Per1 et Per2 au niveau du cytoplasme. Il a été montré dans des cellules HEK en culture que l'interaction entre Per1 et Per2 entraîne la relocalisation de Per1 dans le cytoplasme (Vielhaber, E et al. 2000). La dimérisation entre Per1 et Per2 a lieu grâce à l'interaction de leurs domaines PAS respectifs (Yildiz, O et al. 2005). Comme nous venons de le voir précédemment, ce domaine a été impliqué dans l'interaction de Per1 avec GASP-1 (Matsuki, T et al. 2001). Nous pouvons donc supposer que l'interaction des protéines Period, via leur domaine PAS, avec d'autres protéines telles que les GASP puisse également conduire à leur relocalisation dans le cytoplasme comme nous l'avons observé en microscopie confocale dans les cellules CHO. Les protéines GASP pourraient ainsi servir de protéines d'ancrage retenant dans le cytoplasme les protéines Period en masquant par exemple leur séquence de localisation nucléaire (NLS) ou en empêchant l'interaction d'autres protéines contrôlant leur localisation subcellulaire tel que la kinase CK1 ϵ (Figure II.3.2.12). En effet,

CK1 ϵ régule à la fois la localisation nucléaire et cytoplasmique de Per1 en phosphorylant des résidus spécifiques. Il a été montré que CK1 ϵ phosphoryle les résidus sérines et thréonines se trouvant dans le domaine de masquage de mPer1 (acides aminés 902 à 916) (Figure II.3.2.12) adjacent au NLS, provoquant ainsi l'inactivation du NLS et conduisant à la localisation cytoplasmique de mPer1 (Vielhaber, E et al. 2000). À l'inverse, CK1 ϵ phosphoryle également les résidus Ser⁶⁶¹ et Ser⁶⁶³ situé au sein de l'autre motif de phosphorylation (acides aminés 653 à 663) (Figure II.3.2.12) et induit la translocation dans le noyau de mPer1 (Takano, A et al. 2004). De la même manière, CK1 ϵ phosphoryle mPer3 (acides aminés 611 à 628) et induit la relocalisation de mPer3 dans le noyau (Akashi, M et al. 2002).

Les études de microscopie confocale présentées ici ont été réalisées sur des cellules à l'état de repos. Étant donné l'implication des protéines GASP dans la régulation du trafic intracellulaire des RCPG, il pourrait être intéressant d'observer la localisation subcellulaire des protéines Period dans des cellules stimulées avec différents agonistes des RCPG. Par ailleurs des modèles cellulaires plus physiologiques pourraient être mis en place tel que des cultures primaires de neurone de NSC ou la lignée cellulaire SCN2.2 qui correspond à des neurones de NSC de rat immortalisés (Earnest, DJ et al. 1999). Ces modèles présenteraient l'avantage d'exprimer de manière endogène les protéines Period et les protéines GASP. De plus, le métabolisme et l'expression des protéines Period oscillent de façon circadienne dans ces cellules (Earnest, DJ et al. 1999) et des expériences d'ARN interférentiel permettrait d'évaluer l'impact de la présence ou de l'absence des GASP sur ces oscillations.

II.3.2.5.3. GASP-1 et les rythmes circadiens chez la souris

Un grand nombre de variables physiologiques oscillent au cours d'une journée de 24 heures et la plus part de ces oscillations sont contrôlées par le système circadien. L'activité locomotrice fait partie de ces variables placées sous la dépendance de l'horloge biologique interne. Ainsi, dans le but d'étudier le rôle potentiel de GASP-1 dans la régulation des rythmes circadiens, nous avons suivis l'activité locomotrice de souris sauvages et de souris déficientes en GASP-1. Les résultats de mesure d'activité obtenus n'ont montré aucunes différences significatives entre les deux génotypes que se soit en terme d'activité locomotrice journalière, de période endogène de l'horloge biologique interne ou de resynchronisation des rythmes d'activité. Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que l'absence de la protéine GASP-1 n'affecte en rien la régulation des rythmes circadiens chez la souris dans les

conditions ou ils ont été évalués ici. Cependant, plusieurs éléments nous permettent de nuancer ces conclusions :

- Tout d'abord, nous avons observé que les souris déficientes en GASP-1 développent une activité locomotrice journalière plus basse que celle de leurs homologues sauvages bien qu'aucune différence significative n'ait pu être mise en évidence. De la même manière, après un décalage positif de 8 heures des phases de lumière et d'obscurité, une tendance des animaux mutants à se resynchroniser plus rapidement que leur homologues sauvages a été observée, mais là encore de manière non significative. Les expériences d'actimétrie présentées ici ont été réalisées sur des groupes de 5 individus, nous ne pouvons donc pas exclure que la mise en œuvre de ces mêmes essais sur des groupes d'animaux plus importants permettrait peut-être d'obtenir pour ces paramètres des différences significatives entre les souris sauvages et mutantes.
- Ensuite, les résultats obtenus *in vitro* et en contexte cellulaire suggèrent que non seulement GASP-1 mais également son plus proche homologue, GASP-2, interagissent avec les protéines Period. De plus, GASP-1 comme GASP-2 sont très fortement exprimés au niveau du noyau suprachiasmatique, siège central de l'horloge biologique interne. GASP-1 et GASP-2 sont également fortement exprimés dans d'autres structures impliquées dans la régulation des rythmes circadiens tel que la rétine ou la glande pinéale. Les neurones de la rétine projettent sur le NSC et synchronise l'horloge endogène avec les conditions de lumière ambiante. Quant à la glande pinéale, elle synthétise sous le contrôle du NSC la mélatonine qui est l'hormone régulant la durée de la phase de sommeil. Si les GASP jouent un rôle commun dans la régulation des rythmes circadiens, il n'est pas à exclure que la déficience en GASP-1 chez les animaux mutants puisse être compensée par GASP-2 au niveau fonctionnel, ce qui rendrait difficile la mise en évidence d'un phénotype associé au déficit en GASP-1. Des essais d'hybridation *in situ* ont été réalisés sur des cerveaux de souris sauvages et déficientes en GASP-1 à l'aide d'une sonde spécifique de GASP-2 et n'ont révélé aucune différence significative en terme de niveaux d'ARNm de GASP-2. Cependant, cette méthode n'est pas quantitative et ne rend pas compte du niveau d'expression de la protéine GASP-2. C'est pourquoi nous avons prélevé les NSC de souris sauvages et mutantes, sacrifiées de jour et de nuit, afin de doser en Western blot par

immunochimioluminescence la quantité de protéine GASP-2 exprimée dans cette structure. Les résultats de ces essais en cours devraient nous permettre de mettre en évidence un éventuel phénomène de compensation.

- Pour finir, il est important de tenir compte du fait que la régulation des rythmes circadiens fait intervenir de nombreux processus moléculaires et biochimiques complexes et interconnectés. Ainsi, bien qu'aucune différence significative n'ait été constatée entre les animaux sauvages et les animaux mutants, il n'est pas à exclure que les GASP puissent moduler de manière fine l'horloge endogène et que ces effets n'aient pu être décelés à l'aide des tests que nous avons employé ici.

Par ailleurs, l'interaction entre les GASP et les protéines Period pourrait être reliée à une autre fonction et plus particulièrement à l'établissement de la dépendance aux drogues d'abus comme la cocaïne ou l'alcool (Abarca, C et al. 2002; Spanagel, R et al. 2005). Une étude a ainsi montré chez la souris qu'une déficience en protéines Period conduisait à des altérations des comportements liés à l'administration répétée de cocaïne (Abarca, C et al. 2002). Notamment, les souris déficientes en Per1 présentent une absence de sensibilisation à l'effet locomoteur de la cocaïne alors que les souris déficientes en Per2 présentent une hypersensibilisation. De plus, comparativement aux souris sauvages, les souris déficientes en Per1 ne montrent pas de préférence pour le compartiment associé à la drogue dans le paradigme de préférence de place conditionnée alors que les souris déficientes en Per2 montrent une préférence très marquée pour ce compartiment. Ces résultats suggèrent que Per1 et Per2 régulent de façon opposée les comportements associés à l'administration de cocaïne. De plus, il a été observé dans cette étude que les effets comportementaux liés à l'administration répétée de cocaïne étaient plus marqués au début de la phase lumineuse, là où l'expression des protéines Period est maximum. Les résultats que nous avons obtenus en terme de sensibilisation à l'effet locomoteur de la cocaïne sur les animaux déficients en GASP-1 montrent une diminution globale de l'effet hyperlocomoteur de la cocaïne sur ces animaux par rapport aux animaux sauvages. De plus, les résultats que nous avons obtenus ici indiquent que les GASP pourraient réguler l'activité des protéines Per1 et Per2. Au regard de l'ensemble de ces éléments, il serait séduisant d'imaginer que les GASP puissent moduler les effets comportementaux liés à l'administration de la cocaïne par leur action sur le système circadien et plus particulièrement sur les protéines horloges Period. Ainsi, il pourrait être intéressant de réaliser de nouvelles études des effets comportementaux liés à l'administration

de cocaïne chez les souris sauvages et déficientes en GASP-1 et cela à deux moments différents de la journée, lorsque l'expression des protéines Period est maximum et lorsqu'elle est minimum.

III. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

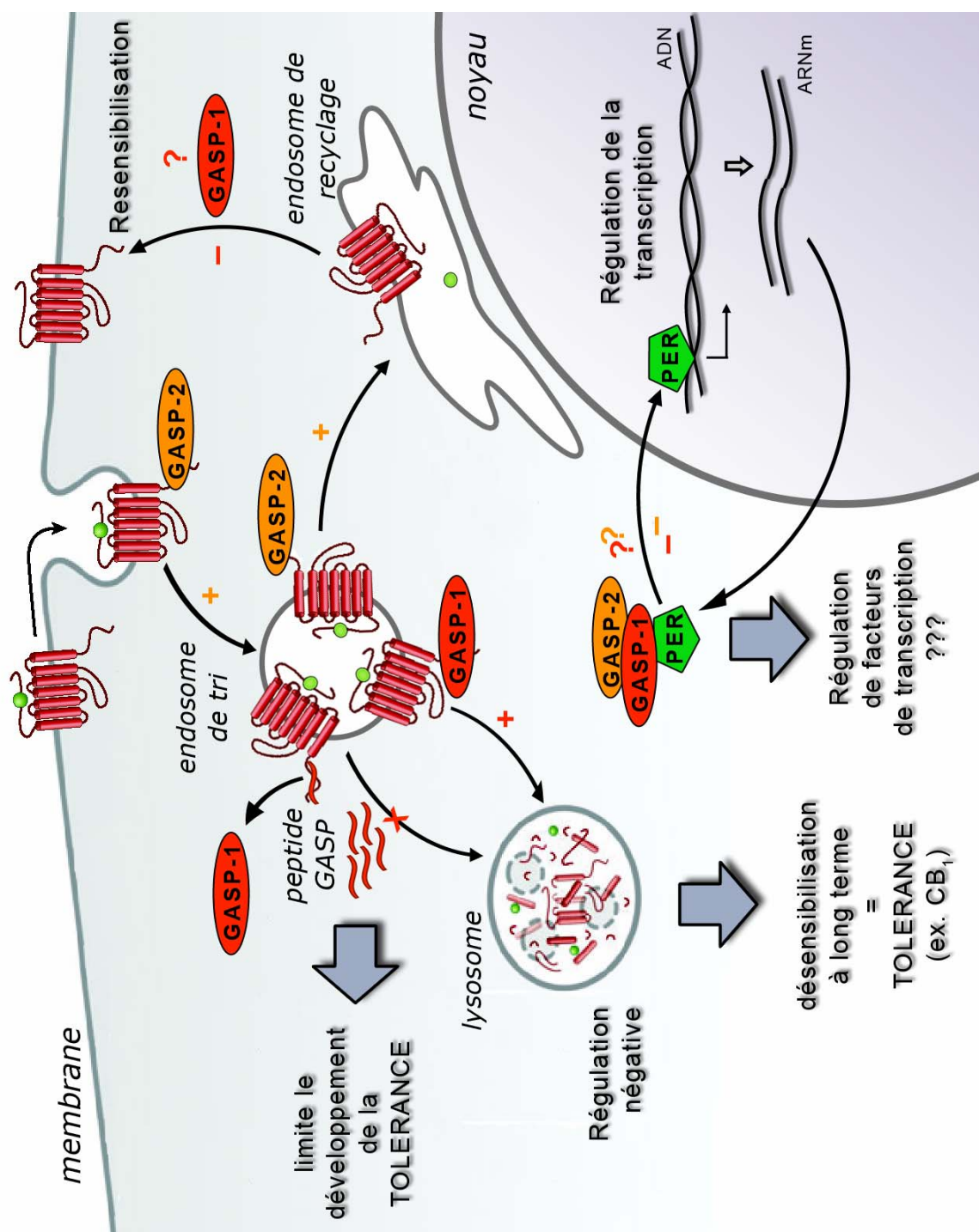


Figure III.1. Schéma résumant les résultats obtenus et les hypothèses qui feront l'objet de travaux ultérieurs.

Il est aujourd'hui incontestable que la machinerie de tri postendocytaire, en régulant le nombre et la localisation membranaire des récepteurs couplés aux protéines G, peut profondément affecter la réponse cellulaire aux ligands endogènes comme aux composés pharmacologiques et ainsi conduire *in vivo* à des conséquences fonctionnelles profondes. Des progrès considérables ont été réalisés ces dernières années dans la compréhension des mécanismes biochimiques qui régissent le tri postendocytaire des RCPG. Il apparaît ainsi que ces mécanismes sont hautement régulés, faisant intervenir un grand nombre de protéines cytoplasmiques interagissant avec les récepteurs parmi lesquelles les protéines GASP que nous avons récemment identifiées. Les résultats que nous avons obtenus et les hypothèses que nous proposons sont présentés de manière synthétique dans la figure III.1.

Les travaux réalisés dans le cadre de ce projet de thèse ont permis de confirmer l'existence d'une famille de 10 protéines GASP fortement homologues qui interagissent avec le domaine carboxyl-terminal d'un grand nombre de RCPG issus des familles 1, 2 et Frizzled. La présence de deux résidus conservés au sein de l'hélice 8 putative de ces RCPG pourrait expliquer cette capacité à interagir avec les GASP. La famille des protéines GASP se divise en deux sous-familles en fonction de leur capacité à interagir avec les RCPG. La sous-famille 1 comprend les GASP-1 à -5 qui interagissent fortement avec le domaine carboxyl-terminal des RCPG et la sous-famille 2 comprend les GASP-6 à -10 qui interagissent plus faiblement avec le domaine carboxyl-terminal des RCPG. Nous avons notamment montré qu'une petite séquence répétée présente chez les GASP de la sous-famille 1 joue un rôle critique dans l'interaction avec les récepteurs et constitue un nouveau motif d'interaction protéine-protéine que nous avons appelée le motif GASP. Nous avons par la suite développé un petit peptide dérivé de ce motif GASP qui est capable d'inhiber l'interaction *in vitro* entre les GASP et le domaine carboxyl-terminal des RCPG. Ce peptide pourrait représenter un outil d'une grande valeur pour explorer *in vivo* le rôle des GASP dans la régulation de l'activité des RCPG. Actuellement des essais ont été initiés avec le peptide GASP afin de limiter la régulation négative du récepteur δ aux opioïdes dans un modèle cellulaire physiologique. Récemment, la protéine GASP-1 a été impliquée dans le développement de la tolérance à l'effet analgésique des cannabinoïdes chez la souris (Tappe-Theodor, A et al. 2007). Il a été montré que l'inhibition de l'interaction entre GASP-1 et le récepteur CB₁ à l'aide d'un virus recombinant codant pour un dominant négatif de GASP-1, limitait le développement de la tolérance à l'effet analgésique des cannabinoïdes. Ces données suggèrent donc que notre peptide GASP, en bloquant l'interaction entre les protéines GASP et les RCPG et en limitant la régulation

négative de ces récepteurs lors de leur stimulation, pourrait constituer à terme un moyen efficace pour réduire les phénomènes de tolérance liés à l'utilisation prolongée de certains médicaments. Les GASP pourraient ainsi représenter de nouvelles cibles thérapeutiques d'intérêt.

La protéine GASP-1 a été impliquée dans la régulation négative de plusieurs RCPG qui sont dégradés rapidement après leur internalisation tel que le récepteur δ aux opioïdes ou le récepteur D_2 à la dopamine. Nos travaux ont permis d'étendre cette fonction aux récepteurs à recyclage rapide avec plus particulièrement le récepteur muscarinique M_1 à l'acétylcholine dont la régulation négative est déclenchée précocement en présence de GASP-1 au cours d'un traitement prolongé avec un agoniste muscarinique (à partir de 4 heures de traitement). Par ailleurs, GASP-1 semble également ralentir le recyclage du récepteur muscarinique M_1 qui tarde à quitter l'endosome de recyclage en présence de GASP-1 lorsque les cellules cessent d'être stimulées. De plus, nous avons montré pour la première fois que la protéine GASP-2 était également impliquée dans la régulation du trafic intracellulaire des RCPG. En effet, GASP-2 accélère la relocalisation du récepteur muscarinique M_1 au niveau de l'endosome de tri consécutivement à sa stimulation et favorise ensuite son transport vers l'endosome de recyclage. À l'opposé de GASP-1, la protéine GASP-2 n'est pas impliquée dans la régulation négative du récepteur muscarinique M_1 et semble plutôt jouer un rôle dans la resensibilisation des récepteurs à recyclage rapide. Ces résultats viennent ajouter un niveau de complexité supplémentaire dans la compréhension de la fonction des protéines GASP qui pourraient être impliquées dans plusieurs étapes clés du trafic intracellulaire des RCPG. Il convient à présent de préciser les mécanismes par lesquels les GASP modulent le trafic intracellulaire des RCPG. Pour cela, l'identification de nouveaux partenaires d'interaction des GASP pourrait fournir de nouveaux éléments de compréhension.

Les animaux génétiquement modifiés déficients en GASP-1 constituent un outil formidable pour évaluer la fonction *in vivo* de cette nouvelle protéine. Ces animaux nous ont permis de proposer une implication de GASP-1 dans le développement des effets comportementaux liés à l'administration aiguë et chronique de cocaïne. L'absence de GASP-1 chez ces animaux semble affecter la réponse hyperlocomotrice qui est diminuée lors de l'administration de cocaïne. De plus, l'acquisition d'un comportement d'autoadministration de la cocaïne est moins aisé pour les animaux déficients en GASP-1 et est associé à une densité moindre en récepteur dopaminergiques et muscariniques au niveau du striatum par rapport aux animaux sauvages. Ces résultats suggèrent chez ces animaux une altération du

système de la récompense dont le striatum est l'une des structures majeures. Cependant l'implication de GASP-1 dans d'autres processus cognitifs pourrait également être à l'origine de tels effets et nous envisageons de poursuivre la caractérisation de nos animaux mutants en les soumettant notamment à de nouveaux tests comportementaux visant à explorer leurs capacités mnésiques. Bien que nous n'ayons pas pu mettre en évidence un phénotype particulier associé aux rythmes circadiens chez les animaux mutants, nous avons pu montrer que les protéines GASP-1 et GASP-2 sont fortement enrichies dans le noyau suprachiasmatique et qu'elles interagissent avec les protéines horloges Period modifiant ainsi leur localisation subcellulaire en système hétérologue. Ces données pourraient suggérer un rôle des GASP dans la régulation de l'activité de facteurs impliqués dans l'expression des gènes telles que les protéines Period. Une telle hypothèse est par ailleurs corroborée par de récents résultats, obtenus au laboratoire, indiquant que GASP-2 est capable d'interagir avec le facteur suppresseur de tumeur BARD1 et se relocalise avec lui au niveau du noyau. La fonction des protéines GASP semble ne pas seulement se limiter à la régulation du trafic intracellulaire des RCPG mais pourrait également tenir un rôle central dans la régulation de l'expression des gènes.

IV. MATÉRIEL ET MÉTHODES

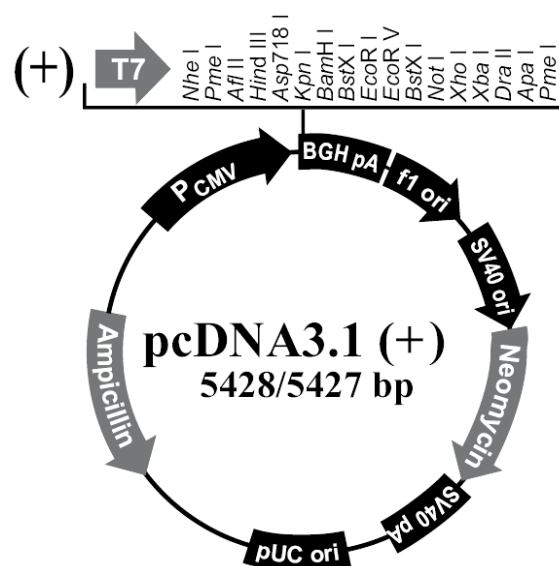


Figure IV.1. Vecteurs d'expression eucaryote pcDNA3.1/Néo.

Ampicillin, gène de résistance à l'ampicilline (β -lactamase); BGH pA, signal de polyadénylation issu de l'hormone de croissance bovine ; CMV, promoteur cytomégalovirus humain ; Néomycin, gène de résistance au G418 ; pUC ori : origine de réplication dans *E. coli* ; SV4O ori : origine de réplication dans les cellules Cos contenant l'antigène T ; SV40 pA : signal de polyadénylation de l'ARNm ; T7 : promoteur/site d'amorce T7.

IV.1. Biologie moléculaire

Les techniques standard utilisées sont celles décrites par J. Sambrook, E.F. Fritsch et T. Maniatis (1989). La mise en place des stratégies de clonages et la simulation des réactions de biologie moléculaire ont été réalisées à l'aide des logiciels « EnzymeX » pour Mac OS X et « GCG 8.0 » sous Unix. L'ensemble des plasmides utilisés et des fragments de PCR obtenus ont été contrôlés par séquençage réalisé par la plate-forme de séquençage d'ADN de l'IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch).

IV.1.1. Les plasmides

IV.1.1.1. Les plasmides pcDNA3.1/Néo et Hygro

pcDNA3.1 (Invitrogen) est un vecteur d'expression eucaryote dérivé de pcDNA3 et développé pour obtenir un fort niveau d'expression stable ou transitoire de protéine recombinante dans des cellules hôte de mammifère. Il contient un promoteur CMV (*human cytomegalovirus*) permettant un fort taux d'expression dans la plupart des cellules eucaryotes et un gène de résistance soit à la néomycine, nommée également G418 (pcDNA3.1/Neo), soit à l'hygromycine (pcDNA3.1/Hygro) permettant une sélection des cellules ayant reçu ou intégré le plasmide. Le vecteur pcDNA3.1 possède également un gène de résistance à l'ampicilline qui permet de sélectionner les bactéries transformées avec ce plasmide lors du clonage ou de l'amplification plasmidique (Figure IV.1).

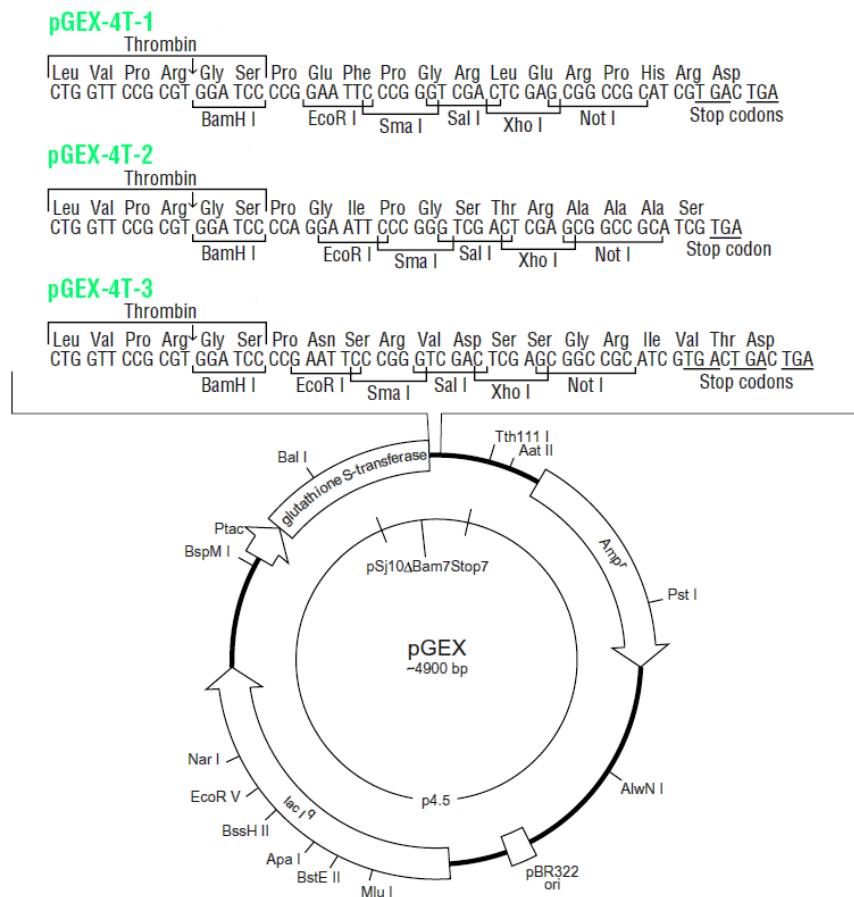


Figure IV.2. Vecteurs d'expression bactérien pGEX.

Amp^R, gène de résistance à l'ampicilline (β-lactamase) ; BGH pA, signal de polyadénylation issu de l'hormone de croissance bovine ; glutathione S-transférase, gène codant pour la GST ; lacI^Q, gène du répresseur LacI ; pBR322 ori, origine de répllication dans *E. coli* ; Ptac, promoteur inductible *tac* réprimé par LacI ; Thrombin, site de clivage pour la thrombine.

IV.1.1.2. Le plasmide pGEX

pGEX (Amersham Bioscience) est un vecteur d'expression bactérienne qui permet d'obtenir des protéines fusionnées avec la Glutathion-S-transférase (GST) en N-terminal. La GST est une enzyme de détoxification issue de *Schistosoma japonicum* de 226 acides aminés environ. Elle catalyse la formation d'adduits de molécules réactives avec le cofacteur glutathion et a ainsi la propriété de se fixer à des résines greffées avec le glutathion. L'expression de la protéine de fusion avec la GST est sous la dépendance d'un promoteur *tac* qui est inductible à l'isopropyl β -D thiogalactoside (IPTG), un analogue du lactose. Le vecteur pGEX possède le gène *lacI^Q* codant pour l'expression du répresseur LacI qui se fixe sur l'opérateur du promoteur *tac* et inhibe ainsi l'expression de la protéine de fusion. L'IPTG se fixe sur LacI et inhibe son interaction avec le promoteur *tac* permettant alors la surexpression de la protéine de fusion avec la GST (Figure IV.2).

IV.1.2. Les clonages par réaction de polymérisation en chaîne

Les amplifications d'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) ont été réalisées dans un thermocycleur (Gene Amp PCR system 9700, Applied Biosystems). Les ADN polymérases qui ont été utilisées pour les PCR sont la Pfu (Promega) issue de *Pyrococcus furiosus* et la Phusion™ (Finnzymes) qui est aussi une enzyme de type *Pyrococcus* fusionnée avec un domaine accroissant sa processivité. Elles possèdent toutes deux une activité exonucléasique 3' vers 5' de correction des erreurs. L'ADN polymérase Phusion™ permet de générer de longs fragments d'ADN avec une rapidité accrue et un taux d'erreurs moindre d'environ $4,4 \times 10^{-7}$ (6x moins que la *Pyrococcus furiosus* et 50x moins que la *Thermus aquaticus*). Les conditions de PCR ont été établies selon les recommandations des fabricants. Les amorces d'ADN utilisées pour amplifier les fragments d'intérêts ont été synthétisées et purifiées par SigmaGenosis (Sigma). La préparation des fragments d'ADN amplifiés par PCR ou obtenus par digestion enzymatique a été réalisée par séparation sur gel d'agarose (0,5 à 1%) puis par purification des bandes d'intérêt à l'aide du kit Nucleospin® Extract® (Macherey-Nagel) selon le protocole du fabricant. La ligation des fragments d'ADN avec les vecteurs a été réalisée à l'aide du kit de ligation rapide T4 DNA ligase (Fermentas) selon le protocole du fabricant.

IV.1.3. Les souches bactériennes

Les bactéries utilisées pour la production de plasmides ou la production de protéines recombinantes ont été cultivées en suspension dans du milieu LB (10 g/L tryptone ; 5 g/L d'extrait de levure ; 10 g/L NaCl) stérile, à 37°C et sous agitation vigoureuse. Pour les clonages, les bactéries compétentes transformées ont été étalées sur des boîtes de Pétri LB/Agar (1,5%) supplémentées avec l'agent de sélection adéquat et incubées sur la nuit à 37°C.

IV.1.3.1. *E. coli* TOP10[®] et XL1-Blue : clonage et amplification plasmidique

La souche *Escherichia coli* TOP10[®] (Invitrogen) est utilisée pour le clonage et l'amplification des plasmides en raison de sa grande compétence pour des transformations par méthode chimique (jusqu'à 10⁹ cfu/μg d'ADN contrôle pUC19).

La souche *Escherichia coli* XL1-Blue est également utilisée pour le clonage et l'amplification des plasmides mais présente une compétence plus faible de l'ordre de 10⁶ à 10⁷ cfu/μg d'ADN contrôle. Cette souche non commerciale est rendue chimiocompétente par la méthode TSS décrite ci-dessous.

IV.1.3.2. *E. coli* BL21 Rosetta2 : expression de protéines recombinantes

La souche *Escherichia coli* BL21 est une souche permettant la surexpression de protéines recombinantes. Issue d'un variant d' *E. coli*, *E. coli* B834, elle est dépourvue de certaines protéases (OmpT, Lon). La souche *E. coli* BL21 Rosetta2 (Novagen) est dédiée à l'expression de protéines eucaryotes contenant des codons rarement utilisés chez *E. coli*. Elle possède un plasmide surproduisant sept ARNt supplémentaires pour la traduction des sept codons rares correspondants et offre ainsi une traduction protéique qui n'est pas limitée par l'usage des codons de *E. coli*. Ce plasmide possède un gène de résistance au chloramphénicol permettant de sélectionner cette souche bactérienne et de maintenir ses caractéristiques. Les *E. coli* BL21 Rosetta2 sont rendues chimiocompétentes par la méthode TSS décrite ci-dessous.

IV.1.4. Préparation de bactéries compétentes et transformation bactérienne

Les bactéries *E. coli* XL1-Blue et B121 Rosetta2 sont rendues chimiocompétentes par la méthode TSS décrite brièvement ici. Une culture de 100 mL de LB estensemencée au 1/100^e avec une préculture à saturation de *E. coli* XL1-Blue ou B121 Rosetta2 et incubée à 37°C avec agitation jusqu'à atteindre une DO à 600 nm comprise entre 0,5 et 0,6. La culture est arrêtée sur de la glace et les bactéries sont récoltées par centrifugation à 5000×g durant 10 min à 4°C. Le culot est repris dans 10 mL de solution TSS (5%(p/v) LB ; 10%(p/v) PEG 8000 ; 50 mM MgCl₂) et incubé 30 min à 4°C. Finalement 5%(v/v) de DMSO est ajouté et les bactéries compétentes sont aliquotées et stockées à -80°C. La compétence est déterminée par transformation d'un aliquot avec 1 ng de plasmide contrôle.

Les bactéries *E. coli* XL1-Blue, TOP10[®] et B121 Rosetta2 sont transformées par la méthode chimique. Un aliquot de bactéries compétentes est décongelé sur de la glace puis le plasmide à transformer est ajouté. Les bactéries sont incubées successivement 30 min sur glace, 90 s à 42°C et 5 min sur glace. 800 µl de milieu SOC (20 g/L tryptone ; 5 g/L d'extrait de levure ; 0,5 g/L NaCl ; 10 mM MgCl₂ ; 2,5 mM KCl ; 1% glucose) sont ajoutés et l'incubation est poursuivie 45 min à 37°C avec agitation. Les bactéries sont enfin étalées sur boîte LB/Agar supplémentée avec 100 µg/mL d'ampicilline (additionné de 34 µg/mL de chloramphénicol pour la souche B121 Rosetta2) pour sélectionner les transformants.

IV.1.5. Amplification plasmidique

Les plasmides ont été produits dans des bactéries *E. coli* XL1-Blue ou TOP10[®] et trois méthodes ont été utilisées pour les purifier : les minis préparations à l'aide soit de la méthode TENS soit du kit Nucleospin[®] Plasmid[®] (Macherey-Nagel) et les maxis préparations à l'aide du kit de purification d'ADN plasmique Nucleobond[®] PC 500 (Macherey-Nagel). Ces méthodes sont basées sur le principe de la lyse alcaline. Pour le criblage des colonies de bactéries transformées, des minis préparations TENS ont été réalisées. 2 ml de LB/ampicilline (100µg/mL) sontensemencés avec une colonie. Les bactéries sont cultivées pendant la nuit à 37°C sous agitation. 1,5 ml de culture sont centrifugés 3 min à 5000×g. Le culot bactérien est resuspendu dans 50 à 100 µl de milieu de culture. Les bactéries sont lysées avec 300 µl de TENS (10 mM Tris-HCl pH 8 ; 1mM EDTA pH 8 ; 0,1 N NaOH ; 0,5% SDS) puis on ajoute 150 µl de NaOAc (3 M, pH 5,2). L'ensemble est homogénéisé par inversion, incubé 5 min à

4°C puis centrifugé pendant 5 min à 13000×g. Le surnageant contenant l'ADN est précipité avec 900 µl d'éthanol absolu puis centrifugé 10 min à 13000×g. Le culot est lavé avec 1 ml d'éthanol à 70%, séché puis resuspendu dans 50 µl de TE (10 mM Tris-HCl pH 8 ; 1mM EDTA pH 8). L'ADN plasmidique ainsi préparé peut être digéré afin d'identifier les clones positifs mais il est impropre pour le séquençage en raison de la présence d'ARN. Afin de séquencer les clones positifs, de l'ADN plasmidique « propre » est préparé à l'aide du kit Nucleospin® Plasmid® (Macherey-Nagel) selon le protocole du fabricant puis les concentrations en ADN et la qualité des préparations sont déterminées par spectroscopie à 260 nm et 280 nm (contamination ARN). Le séquençage des fragments de PCR clonés est réalisé par la plate-forme de séquençage d'ADN de l'IGBMC. Des maxis préparation d'ADN plasmidique sont réalisées pour les clones positifs vérifiés par séquençage à l'aide du kit de purification d'ADN Nucleobond® PC 500 (Macherey-Nagel) selon le protocole du fabricant puis les concentrations en ADN et la qualité des préparations sont déterminées par spectroscopie à 260 nm et 280 nm.

IV.1.6.Stratégies de clonage et de mutagenèse

IV.1.6.1. Clonage et mutagenèse des protéines de la famille GASP

IV.1.6.1.1. Les ADNc codant pour les protéines GASP

L'ADN complémentaire (ADNc) codant pour la portion carboxyl-terminale de GASP-1 identifiée par criblage en double hybride chez la levure, a été sous-cloné dans le vecteur d'expression eucaryote pcDNA3/Néo. L'ADNc complet codant pour GASP-1 a été obtenu par PCR sur de l'ADN génomique et sous-cloné EcoRI dans pcDNA3/Néo. L'ADNc codant pour GASP-2, sous-cloné dans pCMVSPORT6, a été obtenu par voie commerciale auprès de la société Invitrogen puis sous-cloné dans pcDNA3.1/Néo. L'ADNc codant pour GASP-3, sous-cloné dans pBluescript II SK (+), a été obtenu auprès de l'Institut Kazusa de recherche sur l'ADN au Japon (<http://www.kazusa.or.jp/huge/>) puis a été sous-cloné dans le vecteur d'expression pcDNA3/Néo. Les ADNc codant pour les GASP-5 à -10, sous-clonés dans pCMVSPORT6, ont été obtenus auprès d'Invitrogen puis sous-clonés dans pcDNA3.1/Néo.

IV.1.6.1.2. Construction des vecteurs codants pour les mutants tronqués de GASP-1 et GASP-2

Treize mutants tronqués de GASP-1 et deux de GASP-2 ont été réalisés. Les ADNc codant pour ces mutants ont été obtenus par PCR réalisées sur les ADNc complets codant pour GASP-1 et GASP-2 (pcDNA3/Néo-GASP-1 et pCMVsport6-GASP-2) à l'aide de couples d'amorces contenant respectivement les sites de restriction KpnI et EcoRI pour les mutants de GASP-1 et XhoI et EcoRI pour les mutants de GASP-2. Les ADNc ainsi obtenus ont été clonés dans le vecteur d'expression pcDNA3.1/Néo et contrôlés par séquençage. Ces mutants tronqués sont représentés schématiquement dans les figures IV.3 et IV.4.

IV.1.6.1.3. Construction des vecteurs codants pour les mutants ponctuels de GASP-2

La famille GASP est caractérisée par un motif conservé de 15 acides aminés répété 22 fois chez GASP-1 et deux fois chez GASP-2 à -5. Trois mutants ponctuels de GASP-2 ont ainsi été réalisés en mutant soit le premier motif, soit le deuxième, soit les deux motifs à la fois. La mutation porte sur la partie centrale SWFW fortement conservée de ces motifs qui a été substituée par AAAA. La mutagenèse dirigée a été conduite selon la méthode de PCR « *Overlap extension* » décrite par Sambrook et Russell en 2001. Cette méthode repose sur deux séries de PCR. Brièvement, les deux premières amplifications génèrent deux fragments de l'ADN cible tout en introduisant la mutation désirée présente au sein d'une des deux amorces. Au cours de la troisième PCR, ces deux fragments dénaturés vont s'hybrider sur une région de recouvrement qui contient la mutation puis vont subir une élongation pour former l'ADN mutant double brin qui sera amplifié. Tout d'abord, les ADNc codants pour les deux mutants simples ont été obtenus et clonés dans pcDNA3.1/Néo. Puis l'un des deux mutants simples a servi d'ADN matriciel pour une nouvelle série de PCR visant à introduire la deuxième mutation et l'ADNc ainsi obtenu a été cloné dans pcDNA3.1/Néo. Ces trois formes mutées de GASP-2 sont représentées dans la figure IV.4.

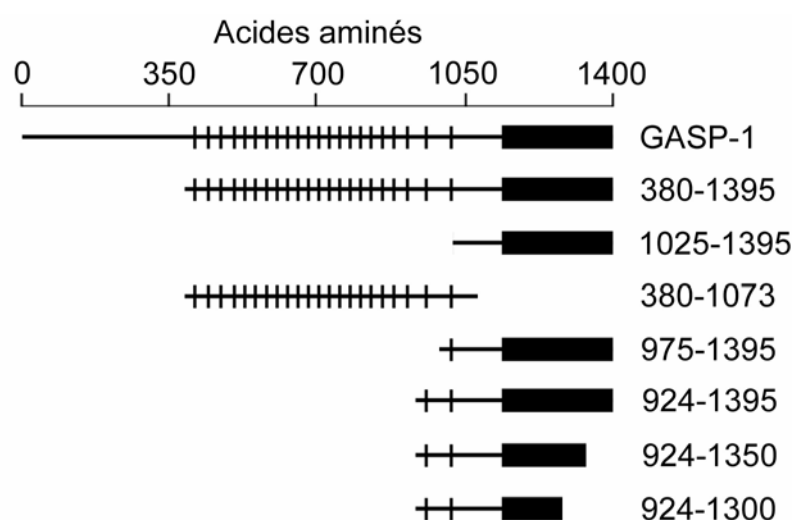


Figure IV.3. Représentation schématique des différents mutants tronqués de GASP-1.

Pour GASP-1 complet, les traits verticaux représentent les 22 motifs conservés et la boîte noire symbolise le domaine carboxyl-terminal commun aux membres de la famille GASP.

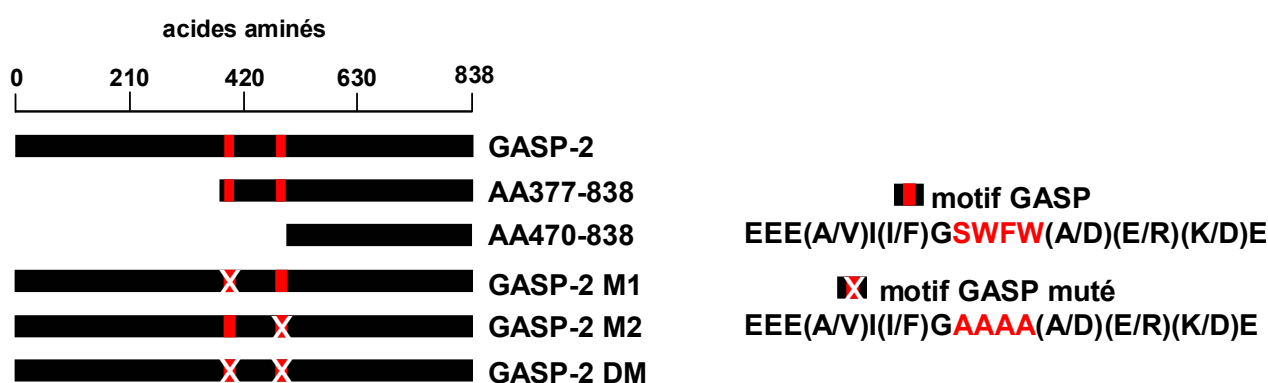


Figure IV.4. Représentation schématique des deux mutants tronqués et des trois mutants ponctuels de GASP-2.

IV.1.6.1.4. Construction des vecteurs codants pour GASP-2 et pour son domaine carboxyl-terminal fusionné à la GST

La séquence codant pour les 838 acides aminés de la protéine GASP-2 complète et celle codant pour les acides aminés 367 à 838 de GASP-2 ont été amplifiées par PCR à l'aide d'oligonucléotides contenant les sites de restriction SmaI et XhoI puis ont été clonées dans le vecteur d'expression bactérien pGEX-4T3.

IV.1.6.1.5. Les protéines GASP-1 et GASP-2 fusionnées à l'EYFP

Afin de suivre en contexte cellulaire les protéines GASP-1 et GASP-2, la protéine fluorescente EYFP a été fusionnée à leur extrémité amino-terminale. Tout d'abord, la séquence codant pour l'EYFP a été clonée dans le vecteur d'expression eucaryote pcDNA3.1/Hygro. Puis les deux ADNc codant pour GASP-1 et GASP-2 ont été sous-clonés en phase avec l'EYFP.

IV.1.6.2. Clonage et mutagenèse dirigée des domaines carboxyl-terminaux de RCPG

IV.1.6.2.1. Les vecteurs codant pour les domaines carboxyl-terminaux de RCPG fusionnés à la GST

Les ADNc codant pour le domaine carboxyl-terminal de 12 RCPG et de deux récepteurs d'hormone à un domaine transmembranaire ont été sous-clonés dans le vecteur pGEX-2T afin de permettre leur expression dans des bactéries sous la forme de protéines de fusion avec la GST. Ces plasmides sont répertoriés dans le Tableau IV.1.

Plasmide	Récepteur	Résidus codés	N° d'accession
pGEX-DOR	aux opioïdes delta	314-372	U10504
pGEX-MOR	aux opioïdes mu	334-400	L29301
pGEX-KOR	aux opioïdes kappa	326-380	U17298
pGEX-ORL ₁	de type opioïde 1	315-370	X77130
pGEX-M ₁	à l'acétylcholine muscarinique m1	414-460	X52068
pGEX-M ₂	à l'acétylcholine muscarinique m2	449-479	M16404
pGEX-β1AR	à l'adrénaline beta 1	373-477	J03019
pGEX-CALCR	à la calcitonine	407-490	L00587
pGEX-5HT ₇	à la sérotonine type 7	380-445	L21195
pGEX-H ₂	à l'histamine type 2	284-349	S57565
pGEX-TXA ₂	au thromboxane A ₂ alpha	304-343	D38081
pGEX-FZ ₄	frizzled type 4	493-537	AB032417
pGEX-TβR _{III}	au <i>transforming growth factor beta</i> type III	805-849	L07594
pGEX-IGF	à l' <i>insulin-like growth factor I</i>	1268-1367	X04434

Tableau IV.1. Les fusions des domaines carboxyl-terminaux de RCPG avec la GST

Plasmides codant pour le domaine carboxyl-terminal de récepteurs en fusion avec la GST. La numérotation des résidus du récepteur codés par le plasmide renvoie à la séquence protéine de référence dont le numéro d'accession est indiqué dans la dernière colonne.

IV.1.6.2.2. Mutants ponctuels des domaines carboxyl-terminaux des récepteurs δ aux opioïdes et β_1 à l'adrénaline.

Trois mutants ponctuels, deux simples et un double, du domaine carboxyl-terminal de DOR fusionné à la GST ont été réalisés. L'ADNc codant pour ces mutants a été obtenu par PCR puis sous-clonés dans le vecteur pGEX-2T. Ces mutations concernent la Phénylalanine 325 (F³²⁵) et la Lysine 326 (K³²⁶) de l'hélice 8 qui apparaissent fortement conservés au sein de la famille 1 des RCPG. Ces deux acides aminés ont été mutés en Alanine (DOR_{F325A}, DOR_{K326A} et DOR_{FK-AA}). Un double mutant de l'extrémité carboxyl-terminale du récepteur β_1 AR fusionné à la GST a également été réalisé. L'ADNc codant pour ce mutant a été obtenu par PCR puis sous-cloné dans le vecteur pGEX-2T. Les résidus Phénylalanine 386 (F³⁸⁶) et Arginine 387 (R³⁸⁷) ont été mutés en Alanine (β_1 AR_{FR-AA}).

Les mutations ont été réalisées par PCR selon la méthode « *Overlap extension* » décrite précédemment. Les ADN matriciels qui ont été utilisés sont les ADNc complets codant pour les récepteurs DOR et β_1 AR. Les fragments de PCR ont été clonés dans les sites BamHI et EcoRI de la cassette de clonage du vecteur pGEX-2T.

IV.1.6.2.3. Construction du vecteur codant pour le récepteur muscarinique M₁ fusionné à l'étiquette FLAG[®].

Afin d'évaluer en contexte cellulaire l'interaction de GASP-1 et GASP-2 avec le récepteur à l'acétylcholine muscarinique M₁ dans des essais de coimmunoprécipitation, le récepteur a été fusionné au niveau de son extrémité amino-terminale avec le tag FLAG[®] (DYKDDDDA), un octapeptide qui est reconnu par plusieurs anticorps commerciaux. Cette construction a également été complétée par une séquence d'adressage à la membrane issue de la sous-unité α_7 du récepteur nicotinique à l'acétylcholine du poulet. Également appelée peptide signal, cette séquence est reconnue de manière spécifique au moment de la synthèse de la protéine dans le réticulum endoplasmique (RE) et favorise son insertion dans la membrane. Une fois la protéine insérée dans la membrane, la séquence d'adressage est clivée par une peptidase spécifique présente dans la lumière du RE.

La construction a été obtenue par amplification par PCR de la séquence codant pour le récepteur M₁ à l'aide une amorce 5' contenant la séquence signal et l'étiquette FLAG[®]. Le fragment ainsi obtenu a été sous-cloné SpeI-XhoI dans le vecteur d'expression eucaryote pCEP4 possédant un gène de résistance à la néomycine.

IV.1.6.2.4. Le vecteur codant pour le récepteur à l'acétylcholine muscarinique M1 fusionné à l'EGFP.

Afin de pouvoir suivre en contexte cellulaire le récepteur à l'acétylcholine muscarinique M₁ et étudier l'influence de GASP-1 et GASP-2 sur son trafic intracellulaire, la fusion de ce récepteur avec la protéine fluorescente verte de méduse GFP a été employée. Cette construction est composée de la séquence codant pour le peptide signal d'adressage à la membrane issue de la sous-unité α_7 du récepteur nicotinique à l'acétylcholine du poulet, suivie de la séquence codant pour l'EGFP (Clontech) des résidus 3 à 230, puis la séquence codant pour le récepteur M₁. L'ensemble a été cloné dans le vecteur d'expression eucaryote pcDNA3.1/Néo. Cette construction nous a gracieusement été fournie par le docteur B. Ilien (École Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg).

IV.1.6.3. Construction des vecteurs codant pour les protéines Period fusionnées à la mCherry.

Les protéines Period sont au nombre de trois chez l'homme. Les ADNc codant pour Period1, 2 et 3, sous clonés dans pBluescript II SK (+), ont été obtenus auprès de l'Institut Kazusa de recherche sur l'ADN au Japon (<http://www.kazusa.or.jp/huge/>). Afin de produire des protéines Period radiomarquées à la méthionine [³⁵S], les ADNc ont été sous-clonés EcoRI dans pcDNA3.1/Néo.

Afin de générer des protéines Period fluorescentes pour les essais de colocalisation en microscopie confocale, Period1, 2 et 3 ont été fusionnées en phase avec la protéine fluorescente mCherry. L'ADNc codant pour la mCherry, sous-clonée dans pCMVSPORT6, nous a été fournis par le professeur R.Y. Tsien (*Howard Hughes Medical Institute*, Université de Californie à San Diego). Tout d'abord, la mCherry a été mutée par PCR de manière à supprimer son codon stop puis a été sous-clonée BamHI-EcoRI dans le vecteur d'expression eucaryote pcDNA3.1/Néo. Ensuite, les ADNc codant pour les protéines Period ont été sous-clonés dans le vecteur pcDNA3.1/Néo-mCherry, soit EcoRI pour Period1 et 3, soit EcoRV-XbaI pour Period2.

IV.2. Biologie cellulaire

IV.2.1. Les cellules de mammifère

Les cellules de mammifère décrites ci-dessous sont cultivées dans un incubateur à 37°C, sous une atmosphère à 5% de CO₂ et 95% d'humidité dans des boîtes de Pétri de 10cm de diamètre. Les cellules sont divisées entre 3 et 4 jours après l'ensemencement lorsqu'elles sont en phase de croissance exponentielle.

IV.2.1.1. Les cellules CHO

La lignée cellulaire CHO (*Chinese Hamster Ovary*) a été établie en 1957 par T.T. Puck à partir d'une biopsie d'ovaire d'hamster chinois dont les cellules ont été immortalisées. Les cellules CHO sont cultivées dans du milieu essentiel minimum de Eagle modifié par Dulbecco et supplémenté en HAMF12 (1:1), contenant de la glutamine (2 mM) et des antibiotiques (100 UI/mL pénicilline et 100 µg/mL streptomycine) en présence de 5%(v/v) de sérum de veau fœtal.

Par ailleurs, des agents de sélection sont ajoutés au milieu de culture. Ainsi toutes les lignées cellulaires exprimant le récepteur muscarinique hM₁ fusionné avec le tag FLAG[®] ou l'EGFP ou les protéines Periods fusionnées à la mCherry sont supplémentées en G418 (0,6 mg/mL) et toutes les lignées exprimant les protéines GASP sont supplémentées en hygromycine (0,4 mg/mL). Les lignées CHO non transfectées ou exprimant le récepteur muscarinique hM₁ sauvage ne sont pas supplémentées en agent de sélection.

Les cellules CHO sont adhérentes, il est donc nécessaire de les décrocher de leur support de culture pour les diviser. Dans ce but, les cellules sont incubées en présence de trypsine, une enzyme qui va dégrader les protéines de la membrane cytoplasmique responsables de l'adhérence des cellules avec le support ainsi que des cellules entre elles. Après avoir éliminé le milieu de culture, le tapis cellulaire est lavé deux fois avec 5 ml de trypsine diluée. Les cellules sont ensuite incubées 2 minutes à 37°C afin de permettre à la trypsine d'agir puis elles sont remises en suspension dans 5 ml de milieu de culture. La concentration en cellules de la suspension cellulaire est évaluée grâce à un hémocytomètre. Puis de nouvelles boîtes sont ensemencées à la concentration désirée à l'aide de cette suspension.

IV.2.1.2. Les cellules NG108-15

La lignée cellulaire NG108-15 établie en 1974 par Klee et Nirenberg est un hybride neuroblastome de souris (N18TG2) × gliome de rat (C6-BU1). Ces cellules expriment plusieurs récepteurs du système nerveux et plus particulièrement le récepteur δ aux opioïdes. Les cellules NG108-15 sont cultivées dans du milieu essentiel minimum de Eagle modifié par Dulbecco, contenant de la glutamine (2 mM), du glucose (1 g/L) et des antibiotiques (100 UI/mL pénicilline et 100 μ g/mL streptomycine) en présence de 10%(v/v) de sérum de veau fœtal inactivé à la chaleur.

Les cellules NG108-15 sont semi-adhérentes, un simple détachement mécanique est suffisant pour les récupérer. Elles sont ensuite reprises dans du milieu de culture pour servir à ensemercer de nouvelles boîtes de culture comme décrit précédemment.

IV.2.2. Transfection de cellules eucaryotes

Afin d'obtenir les lignées de cellules exprimant de manière stable les différentes protéines d'intérêt, des cellules CHO ont été transfectées avec les vecteurs d'expression eucaryotes contenant les ADNc codant pour ces protéines. Ces cellules ont été transfectées à l'aide de l'agent de transfection jetPEI™ (Polyplus®) qui est un composé de type polyéthylèneimine formant avec l'ADN des particules chargées positivement. Ces particules d'ADN interagissent avec les charges négatives du protéoglycane se trouvant à la surface de la cellule et ainsi pénètrent dans celle-ci par endocytose pour finalement être libérées dans le cytoplasme.

Pour cela, 24 h avant la transfection, les cellules CHO sontensemencées dans une plaque 6 puits ($0,4 \times 10^6$ cellules/puits). Le jour de la transfection le complexe d'ADN est préparé en mélangeant 100 μ l d'une solution de jetPEI™ (0,36 mM jetPEI™ ; 150 mM NaCl) avec 100 μ l d'une solution d'ADN plasmidique linéarisé au préalable par digestion enzymatique (3 μ g ADN ; 150 mM NaCl), puis incubés 20 min à température ambiante. Le complexe de transfection est additionné gouttes à gouttes dans le puits contenant les cellules CHO à 50% de confluence. Les cellules sont incubées 18 heures puis le milieu de culture est changé pour du milieu frais.

IV.2.3. Stabilisation des cellules transfectées : sélection par résistance aux antibiotiques, tri au FACS

48 h après la transfection, les cellules sont incubées dans du milieu de culture contenant l'agent de sélection pour lequel le plasmide transfecté porte le gène de résistance. À l'issue d'une période de sélection de 15 jours, seules les cellules ayant intégré le plasmide ont survécues et se sont développées. La concentration en agent de sélection utilisée a été déterminée au préalable en testant une gamme de concentrations sur des cellules non transfectées. La concentration retenue est la concentration la plus faible permettant d'obtenir une mortalité de 100% des cellules après 10 jours de culture en présence de l'agent de sélection.

Les niveaux d'expression en protéines recombinantes ont été évalués par microscopie à épifluorescence. Afin d'enrichir les lignées stables obtenues ou de les homogénéiser, elles ont été triées par FACS.

IV.3. Essai de *GST-pull down*

IV.3.1. Transcription et traduction *in vitro* des protéines radiomarquées

IV.3.1.1. Kit de transcription et traduction *in vitro*

Le kit TNT[®] Quick-Coupled Transcription/Translation (Promega) permet de réaliser de manière couplée la transcription et la traduction *in vitro* d'un gène eucaryote. Le mélange réactionnel est composé d'une RNA polymérase, de nucléotides et d'inhibiteur de ribonucléases contenus dans une solution saline d'extraits de réticulocytes. Le gène d'intérêt doit être cloné en aval d'une séquence amorce, de type T7 ou Sp6, pour permettre à la RNA polymérase de réaliser sa transcription.

IV.3.1.2. Marquage des protéines à la méthionine [³⁵S]

La production des différentes protéines GASP radiomarquées est réalisée à l'aide du kit TNT[®] Quick-Coupled Transcription/Translation (Promega) en présence de méthionine radiomarquée au soufre 35 (Meth-[³⁵S], PerkinElmer). La réaction est réalisée selon le

protocole du fabricant. Brièvement, 40 µl de milieu réactionnel TNT[®] est décongelé sur la glace puis 1 µg de plasmide pcDNA3.1 codant pour la protéine à marquer est ajouté avec 2 µl de Meth-[³⁵S] et le volume réactionnel est complété à 50 µl avec de l'eau exempte de nucléases. Le mélange est incubé 90 min à 30°C puis placé sur la glace pour arrêter la réaction. 2 µl sont prélevés et dilués dans du tampon de dénaturation (SDS/β-mercapto-éthanol/DTT) pour servir de témoin de marquage radioactif.

IV.3.2. Production en bactérie des protéines de fusion avec la GST

Les domaines carboxyl-terminaux de RCPG et les protéines Period en fusion avec la GST ont été produits dans des bactéries *E. coli* BL21 Rosetta2. Des bactéries compétentes de la souche Rosetta2 ont été transformées avec les plasmides pGEX codant pour les différentes protéines de fusion. Pour chacune des bactéries transformées, 200 ml de LB supplémenté avec 100 µg/mL d'ampicilline et 34 µg/mL de chloramphénicol ont étéensemencés au 1/100^e avec une préculture à saturation et cultivés à 37°C avec agitation jusqu'à atteindre une DO à 600 nm comprise entre 0,5 et 0,6 (phase de croissance exponentielle). La culture est alors induite à l'IPTG (1 mM final) durant 2 h à 37°C et sous agitation. La culture est placée sur la glace pour bloquer la croissance des bactéries qui sont récoltées par centrifugation à 5000×g durant 10 min à 4°C. Le culot de bactéries (1 g environ) est repris dans 10 ml de tampon PBS (140 mM NaCl ; 2,7 mM KCl ; 10 mM Na₂HPO₄ ; 1,8 mM KH₂PO₄ ; pH 7.3) froid et les bactéries sont lysées dans un désintégrateur de cellules sous une pression de 2 kbar. Le lysat brut est centrifugé pour éliminer les débris cellulaires. Le lysat clarifié ainsi obtenu est aliquoté avec 10% de glycérol et congelés à -20°C.

Un extrait de lysat brut et un extrait de lysat clarifié sont analysés sur gel de polyacrylamide coloré au Bleu de Coomassie afin de s'assurer d'une part de l'expression de la protéine de fusion et d'autre part de sa solubilisation en comparant le lysat brut et le lysat clarifié. En effet, lorsque la croissance est rapide et l'induction massive, il y a risque de formation de corps d'inclusion, agrégats intracellulaires insolubles de protéine dénaturée qui seront éliminés lors de l'étape de centrifugation. Dans ce cas, les conditions d'induction doivent être ajustées en terme de concentration en IPTG (0,1 à 1 mM), de température de culture (18°C à 37°C) et de durée (2 h à 24 h).

IV.3.3.Synthèse des peptides GASP

Un peptide de 24 acides aminés a été dérivé du motif GASP conservé que l'on trouve présent de manière répétée chez les cinq premiers membres de la famille GASP (GASP_{pep}). Ce peptide ainsi que son peptide témoin de même composition en acides aminés mais avec une séquence aléatoire (GASP_{scrbl}) ont été obtenus auprès de la société Genecust. Ces peptides ont été synthétisés avec une pureté $\geq 80\%$ et séparés par chromatographie liquide haute précision en phase inverse (RP-HPLC) couplée à une analyse par spectrométrie de masse.

IV.3.4.Essais de *GST-pull down* : interaction et compétition

IV.3.4.1. Interaction *in vitro* des différents partenaires

Classiquement, 100µl de lysat bactérien contenant les protéines en fusion avec la GST sont immobilisées sur 20µl de résine Sépharose-glutathion 4B (GE Healthcare) pendant une heure à 4°C sous agitation dans une solution de PBS et de triton X-100 à 1%. Les complexes ainsi formés sont lavés trois fois avec du tampon de liaison (20 mM Tris-HCl pH 8 ; 150 mM NaCl ; 1 mM EDTA ; 1 mM DTT ; 10% glycérol ; 1% triton X-100) puis incubés avec 10 µL de protéines radiomarquées dans le même tampon durant 1 h à 4°C et sous agitation douce. Après cinq lavages avec le tampon de liaison, la résine est resuspendue dans 20µl de tampon de dénaturation (SDS/β-mercapto-éthanol/DTT), incubée 10 min à 65°C, puis centrifugée 1 min à 3000 × g et les surnageants sont récupérés pour être analysés. Le déroulement de ces étapes est schématisé sur la figure IV.5.

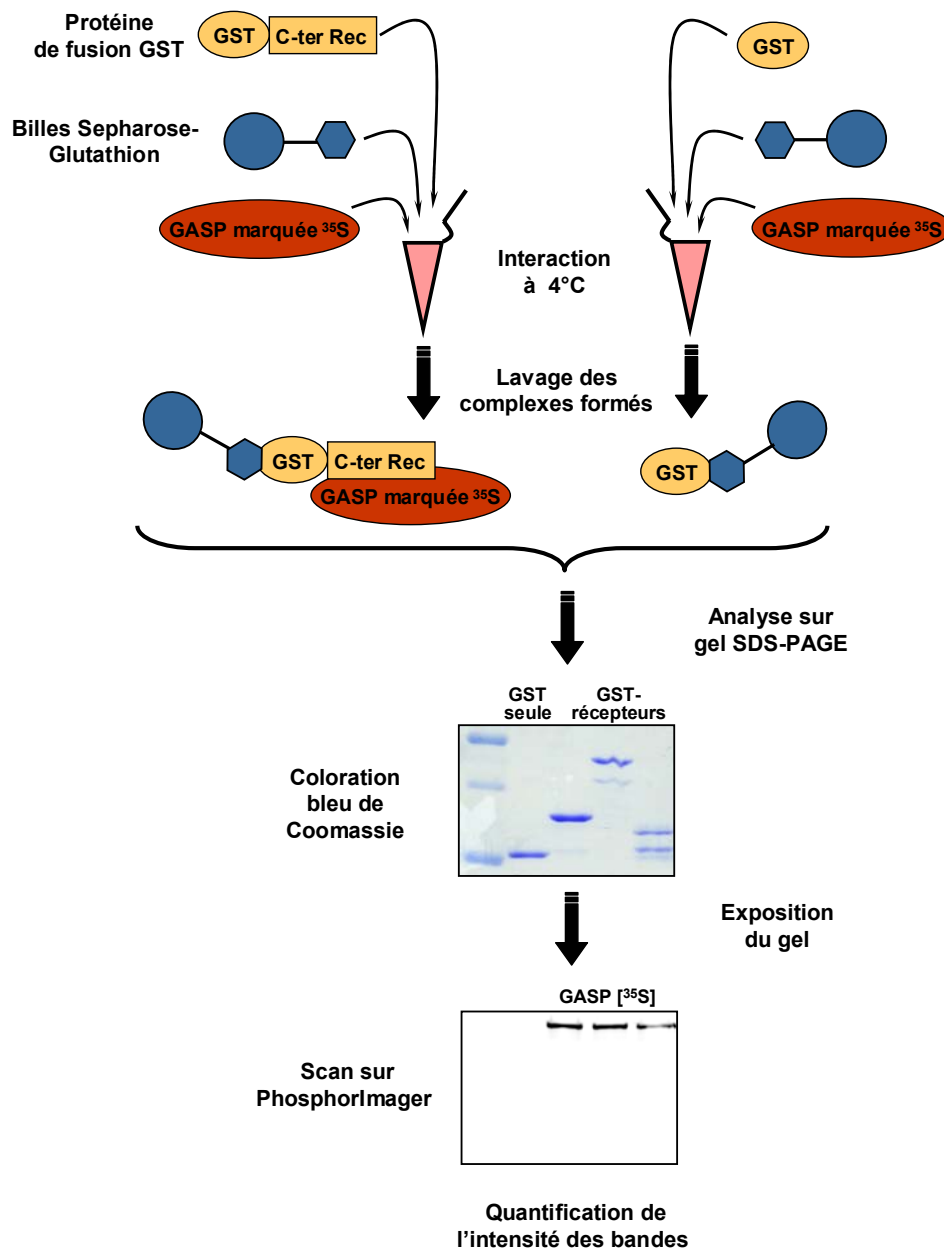


Figure IV.5. Représentation schématique du déroulement d'un essai de *GST-pull down*.

À gauche l'essai réalisé avec un extrait de bactérie exprimant l'extrémité carboxyl-terminale d'un récepteur (C-ter Rec) en fusion avec la GST et à droite le témoin négatif avec un extrait de bactérie exprimant la GST seule. Après incubation en présence de protéine GASP radiomarquée et de résine sépharose couplée au glutathion (cofacteur de la GST), les complexes formés retenus par la résine sont lavés et séparés sur gel dénaturant de polyacrylamide. Le gel est coloré au bleu de Coomassie afin de visualiser les récepteurs fusionnés à la GST et le témoin GST seul. Finalement le gel est exposé sur un écran sensible aux rayonnements β émis par le ^{35}S des protéines GASP et l'écran est scanné par un laser révélant ainsi les bandes correspondant aux protéines GASP retenues par les récepteurs.

IV.3.4.2. Essais de compétition en *GST-pull down*

Les essais de compétition pour la liaison avec les domaines carboxyl-terminaux de RCPG en fusion avec la GST ont été réalisés entre les GASP radiomarqués et les peptides synthétiques comme décrit ci-dessus avec quelques modifications. Le peptide GASP (GASPpep) ou son témoin négatif (GASPscrbl) sont incubés avec les protéines GASP radiomarquées et les protéines de fusion avec la GST immobilisées sur la résine Sépharose-glutathion 4B. Dans un premier temps la relation entre dose de GASPpep et effet inhibiteur de l'interaction GASP/RCPG a été évaluée dans des expériences de compétition pour la liaison avec le domaine carboxyl-terminal du récepteur β_1 AR fusionné à la GST réalisées entre GASP-2-[35 S] et une gamme de concentration de GASPpep (1, 10, 50, 100 et 250 μ M). Dans un deuxième temps des expériences de compétition pour la liaison avec les domaines carboxyl-terminaux des récepteurs β_1 AR, DOR, M_1 et CalR fusionnés à la GST ont été réalisées entre GASPpep, à 150 μ M final, et les GASP-1, -2 et -7 marqué à la Meth-[35 S].

IV.3.4.3. Analyse du surnageant

Les surnageants sont analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) en conditions dénaturantes avec les témoins de marquages radioactif des différentes protéines. Le gel est tout d'abord coloré au bleu de Coomassie afin de visualiser les protéines de fusion avec la GST, puis il est séché sur du papier 3M (Whatman) dans un dessiccateur de gel et analysé par imagerie au phosphore (Personal Molecular Imager FX, Biorad) afin de visualiser les protéines marquées à la Meth-[35 S]. L'intensité des signaux radioactifs obtenus est quantifiée à l'aide du logiciel Quantity One (Biorad) et normalisé par rapport aux témoins de marquage radioactif. Le déroulement de ces étapes est schématisé sur la figure IV.5.

IV.4. Mesure de liaison spécifique de ligand radioactif

Les techniques de liaison spécifique, ou *binding*, permettent de quantifier et caractériser les récepteurs membranaires par le biais de leur interaction avec un ligand radioactif, présentant une haute affinité pour le site de liaison de la protéine réceptrice. Ces techniques sont employées sur des préparations cellulaires ou tissulaires, ou sur leurs fractions subcellulaires plus ou moins enrichies en membrane plasmique.

IV.4.1. Les radioligands et ligands

IV.4.1.1. Les radioligands muscariniques

Deux ligands radioactifs ont été utilisés pour détecter les récepteurs à l'acétylcholine muscariniques : la [^3H]-N-méthylscopolamine ou [^3H]-NMS avec une activité spécifique de 78 Ci/mmol et le [^3H]-Quinuclidinyl benzilate ou [^3H]-QNB avec une activité spécifique de 53 Ci/mmol (PerkinElmer). Tous deux interagissent avec les récepteurs muscariniques, mais lorsqu'ils sont employés sur des cellules entières et selon les conditions d'incubation utilisées pour atteindre l'équilibre, l'un ([^3H]-QNB) interagit avec l'ensemble des récepteurs qu'ils soient membranaires ou cytoplasmiques alors que l'autre ([^3H]-NMS) ne traverse pas la membrane cellulaire et interagit exclusivement avec les récepteurs membranaires.

IV.4.1.2. Les radioligands dopaminergiques

Deux ligands radioactifs ont été utilisés pour détecter les récepteurs dopaminergiques : le [^3H]-SCH 23390 avec une activité spécifique de 85 Ci/mmol et la [^3H]-Spipérone avec une activité spécifique de 15 Ci/mmol (PerkinElmer). Le [^3H]-SCH 23390 est sélectif des récepteurs dopaminergique de type D₁-like (D₁ et D₅) mais présente néanmoins une affinité significative pour les récepteurs 5HT₂ à la sérotonine d'où la nécessité de bloquer ces sites aspécifiques en les saturant avec la miansérine (Sigma). La [^3H]-Spipérone est quant à elle sélective des récepteurs dopaminergiques de type D₂-like (D₂, D₃ et D₄) avec une différence de sélectivité entre les trois sous-types de récepteur D₂-like qui est peu marquée.

IV.4.1.3. Radioligand opioïde

Le nombre de sites opioïdes δ totaux a été déterminé chez les cellules NG108-15 à l'aide de la [^3H]-Diprénorphine, un ligand liposoluble avec une activité spécifique de 50 Ci/mmol (PerkinElmer).

IV.4.1.4. Les ligands

Afin de déterminer le bruit de fond (liaison aspécifique) lié à chaque type de ligand radioactif, les sites spécifiques de l'échantillon sont saturés à l'aide de ligands antagonistes non radioactifs également nommés ligands froids. L'atropine (Sigma) a été utilisée dans le cas

de la liaison des récepteurs muscariniques, le (+)butaclamol (Sigma) dans le cas de la liaison des récepteurs dopaminergiques et la naloxone (Sigma) dans le cas de la liaison des récepteurs δ aux opioïdes.

Afin d'étudier le trafic intracellulaire du récepteur à l'acétylcholine muscarinique M_1 et la régulation négative du récepteur δ aux opioïdes, des ligands agonistes ont été utilisés pour stimuler ces récepteurs et déclencher leur internalisation. L'acétylcholine et la pilocarpine (Sigma) ont été utilisées pour stimuler le récepteur M_1 et le SNC80 (Sigma) et le DPDPE (Sigma) ont été utilisés pour stimuler le récepteur DOR.

IV.4.2. Mesure du nombre de site à l'aide d'une concentration saturante de ligand radioactif

La quantification de la liaison de radioligand sur les récepteurs se fait en trois étapes : incubation, séparation et mesure (figure IV.6).

L'incubation est réalisée dans des tubes Minisorb™ (Nunc) et consiste à mettre en présence, dans un tampon, durant un temps déterminé et dans des conditions précises de température et de pH, le ligand et le récepteur. Durant cette incubation, le radioligand va se lier au récepteur avec un équilibre défini par la loi d'action de masse. Cependant, le radioligand va également se fixer à des sites non spécifiques et en pratique, la liaison totale du radioligand correspond à la somme de la liaison spécifique au récepteur et de la liaison non spécifique. En considérant la haute affinité d'un radioligand pour son récepteur (par exemple, K_D de l'ordre de 10^{-9} M), un excès de ligand non radioactif (10^{-6} M) pourra complètement masquer la liaison spécifique du radioligand sans affecter la liaison du radioligand aux sites de faible affinité considérés comme non spécifiques. La liaison spécifique pourra donc être déterminée en soustrayant la liaison non spécifique de la liaison totale.

La séparation est effectuée par filtration sous vide et élimine les molécules de radioligand restées libres dans le tampon, des molécules de radioligand fixées aux récepteurs membranaires. Un appareil de filtration (Brandel), relié à une pompe à vide, est garni de filtres en fibres de verre (Whatman® GF/B) imprégnés de Polyéthylèneimine (PEI) à 0,1% (Sigma). Le PEI neutralise les charges négatives de la silice, cause de liaison non spécifique en cas d'utilisation de radioligand protoné. Les échantillons sont filtrés rapidement et les tubes sont rincés à trois reprises avec du tampon froid afin minimiser la dissociation du radioligand.

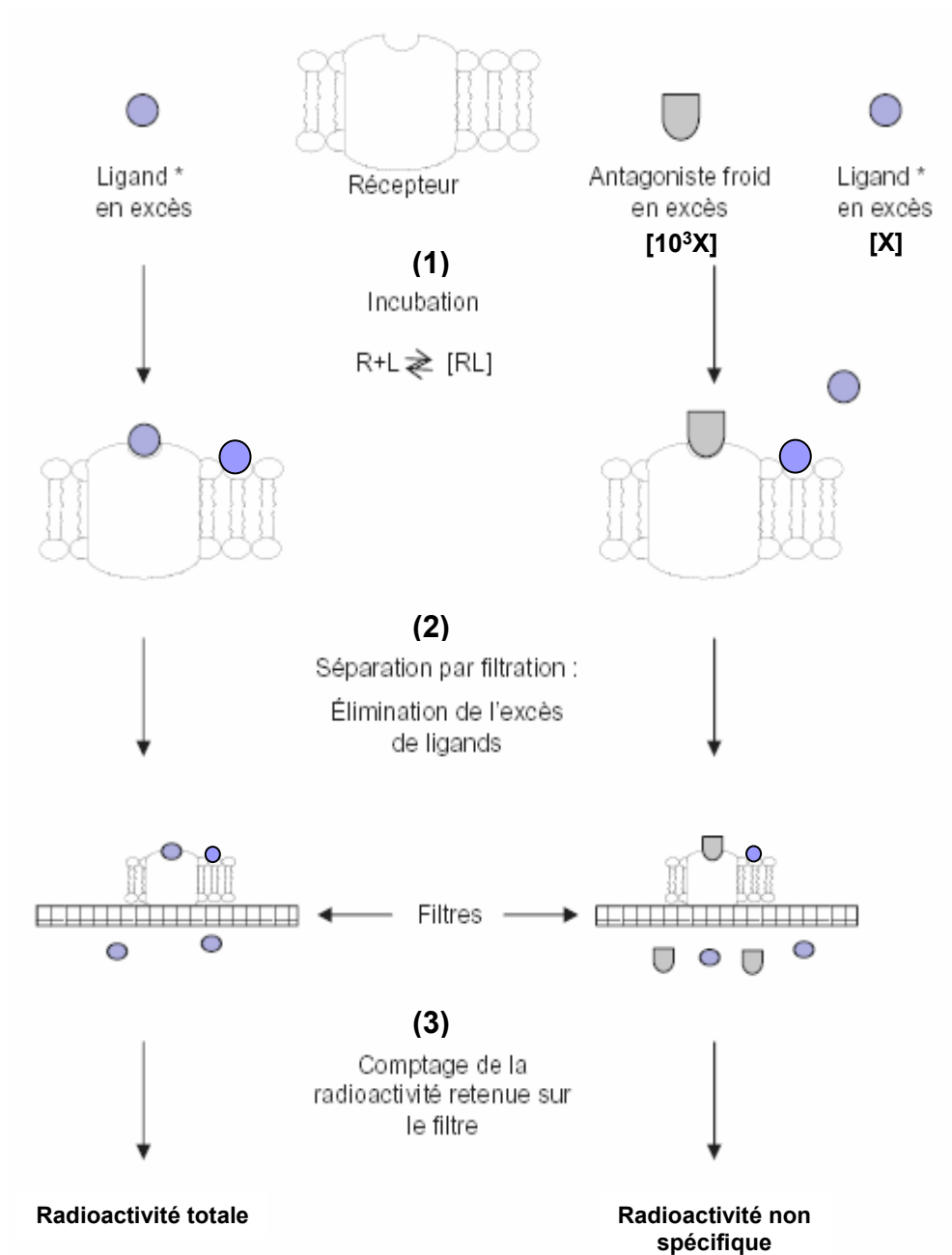


Figure IV.6. Représentation schématique des 3 étapes de l'essai de liaison de ligand radioactif.

Les étapes sont les suivantes : (1) incubation, (2) séparation et (3) mesure de la radioactivité. La radioactivité spécifique est déterminée en soustrayant la radioactivité non spécifique à la radioactivité totale.

La mesure de la radioactivité retenue sur les filtres est réalisée en les plaçant dans des fioles en polyéthylène (Packard Bioscience®) dans lesquelles on ajoute 3 mL de mélange de scintillation. Le tout est incubé puis compté en scintillation liquide. Les radioligands tritiés utilisés émettent des rayonnements β de faible énergie dont la détection s'effectue grâce au mélange de scintillation (ImmunoGold) qui contient un solvant organique, un émulsifiant et du fluor qui transforment l'énergie des rayons β du radioligand en énergie lumineuse mesurée par le scintillateur.

IV.4.2.1. Mesure du nombre de sites muscariniques et dopaminergiques dans différentes structures du cerveau de souris

La densité des récepteurs dopaminergiques et muscariniques a été mesurée en *binding* dans différentes structures cérébrales de la souris sauvage ou mutante, traitée ou non avec de la cocaïne. Les essais de *binding* ont été réalisés sur des homogénats de ces structures cérébrales. Une fois les souris sacrifiées, leurs cerveaux ont été disséqués et les différentes structures ont été congelées sur un lit de carboglace et stockées à -80°C . Les structures cérébrales disséquées ont ensuite été homogénéisées à l'Ultra-Turrax (DI 18 disperser, IKA) dans 20 volumes (p/v) de tampon froid Tris-HCl (50 mM à pH 7,4) et lavées par centrifugation ($20000 \times g$ durant 10 min à 4°C). Le culot ainsi obtenu a été repris dans du tampon frais et remis en suspension au Potter. La concentration en protéine de l'homogénat a été mesurée (BCA assay kit, Pierce) puis ramenée à 1 mg/ml.

La densité des récepteurs muscariniques a été évaluée sur 10 μg d'homogénat incubé dans un volume final de 0,2 ml de tampon phosphate (150 mM à pH 7,4) en présence de 3 nM de [^3H]-NMS. Les échantillons ont été incubés 2 h à 20°C et la liaison non spécifique a été déterminée à l'aide de 10 μM d'atropine.

La densité des récepteurs dopaminergiques de type D_1 et D_2 a été évaluée sur 50 μg d'homogénat incubé dans un volume final de 0,2 ml de tampon Tris-HCl (50 mM Tris-HCl ; 150 mM NaCl ; 5 mM MgCl_2 ; 1 mM EDTA à pH 7,4) en présence de 6 nM de [^3H]-SCH23390 pour les récepteurs D_1 et 3 nM de [^3H]-Spipérone pour les récepteurs D_2 . Pour les récepteurs D_1 , 5 μM de miansérine ont été ajoutés pour bloquer les récepteurs 5HT_2 . Les échantillons ont été incubés 1 h à 37°C et la liaison non spécifique a été déterminée à l'aide de 10 μM de (+)butaclamol.

IV.4.2.2. Mesure du nombre de sites muscariniques dans les lignées CHO

La mesure du nombre de récepteurs muscariniques M_1 a été réalisée sur des cellules CHO entières en suspension qui ont été incubées dans un volume final de 0,5 ml de tampon phosphate (150 mM à pH 7,4) en présence de 8 nM de [3 H]-QNB ou 5 nM de [3 H]-NMS. Les échantillons ont été incubés 1 h à 37°C pour le [3 H]-QNB et 2 h à 20°C pour la [3 H]-NMS. La liaison non spécifique a été déterminée à l'aide de 10 μ M d'atropine. Par ailleurs, les cellules ont été comptées par cytométrie en flux afin de pouvoir normaliser les résultats.

IV.5. Imagerie en microscopie confocale

L'interaction de GASP-1 et GASP-2 avec le récepteur à l'acétylcholine muscarinique M_1 ainsi que les conséquences de cette interaction sur le trafic intracellulaire de ce récepteur ont été évaluées en contexte cellulaire dans des expériences de colocalisation et de cinétique d'internalisation et de recyclage réalisées par microscopie confocale. Par ailleurs, l'interaction de GASP-1 et GASP-2 avec les protéines Period a également été évaluée en contexte cellulaire dans des essais de colocalisation en microscopie confocale. Différentes lignées cellulaires exprimant de manière stable ces différents partenaires d'interaction fusionnés à des marqueurs fluorescents ont ainsi été réalisées (voir chapitres IV.1 et IV.2).

Afin de pouvoir observer les cellules en microscopie confocale pour des essais de colocalisation, les cellules sont cultivées sur lamelles de verre au fond de puits de boîtes 12 puits jusqu'à atteindre une confluence comprise entre 70 et 80%. Les lamelles sont lavées au tampon PHEM (60 mM PIPES ; 25 mM HEPES ; 10 mM EGTA ; 2 mM AcOMg ; pH 6,9) puis les cellules sont incubées dans le tampon fixateur (4% paraformaldéhyde (PFA) ; 0,05% glutaraldéhyde ; 0,05% Triton X-100 dans du PHEM) durant 12 min. Les fonctions aldéhydes du PFA et du glutaraldéhyde vont former des liaisons covalentes avec les groupements amine des protéines cellulaires les reliant ainsi les unes aux autres. Après 3 lavages dans du tampon phosphate (150 mM PBS ; pH 7,4), les cellules sont incubées dans une solution de borohydrure de sodium (0,1% NaBH₄ ; 150 mM PBS) durant 2 fois 10 min. Le borohydrure de sodium est un réducteur doux des fonctions aldéhydes, du PFA et du glutaraldéhyde, qui n'auraient pas réagi lors de la fixation et qui provoquent une fluorescence non spécifique.

Finalement, les cellules sont lavées 3 fois avec du tampon phosphate, une fois avec de l'eau ultrafiltrée puis les lamelles sont montées sur lame de verre avec une goutte de Mowiol qui est laissé à polymériser durant 18 h.

Les acquisitions d'images ont été réalisées sur le système confocal TCS SP2 (Leica) couplé à un microscope DMIRE2 (Leica) inversé équipé d'un objectif à immersion 63×. La sélection de la zone d'intérêt et la mise au point d'approche sont réalisées en mode épifluorescence puis on bascule en mode confocale pour la mise au point fine qui est réalisée à partir du module de commande du système confocal TCS SP2. Le réglage de la longueur d'onde et de la puissance de la raie laser d'excitation (HeNe/ArKr), le choix du filtre dichroïque et le réglage de la fenêtre d'acquisition et du gain du photomultiplicateur sont réalisés pour chaque fluorochrome. Une fois ses réglages établis, ils ne seront plus modifiés au cours de la séance d'acquisition et seront appliqués à toutes les lignées cellulaires dans un souci de normalisation. Tout d'abord un λ scan de contrôle est réalisé sur les lignées cellulaires exprimant individuellement chacune des protéines fluorescentes afin de s'assurer des propriétés spectrales de chacun des marqueurs fluorescents fusionnés à ces protéines. Puis les prises de vues sont réalisées par 3 à 5 balayages unidirectionnels successifs à la vitesse de 400 Hz qui sont moyennés afin de diminuer le bruit de fond électronique. Le mode séquentiel est employé lorsqu'il y a deux fluorochromes, en stimulant d'abord le fluorochrome de longueur d'onde d'excitation la plus élevée afin d'éviter tout transfert d'énergie entre les deux fluorochromes.

Des dispositions particulières ont été mises en œuvre pour les prises de vues réalisées sur cellules vivantes, dans le cadre des essais de cinétique d'internalisation et de recyclage des récepteurs M_1 . Ainsi, les cellules ont été ensemencées la veille de l'essai dans des boîtes de Pétri 3 cm de diamètre disposant d'une lame de verre sertie dans le fond de la boîte permettant des prises de vues à l'aide d'un microscope inversé. Le microscope quant à lui est placé dans une enceinte close dont l'atmosphère est maintenue à 37°C et enrichie avec 5% de CO₂.

IV.6. Mesure de la libération de calcium intracellulaire

La signalisation des récepteurs M_1 fusionnés à l'EGFP a été évaluée par spectrofluorimétrie dans les lignées cellulaires CHO exprimant le récepteur seul ainsi que dans celles coexprimant le récepteur et GASP-1 ou GASP-2 fusionné à l'EYFP. La libération

de calcium intracellulaire a été mesurée à l'aide du Fluo-4 (Molecular Probes™), une sonde fluorescente ratiométrique qui pénètre les membranes et qui est activée par les estérases endogènes clivant sa fonction acétométhylester. Le Fluo-4 est excité à 485 nm et émet à 520 nm. L'acquisition des signaux de fluorescence est effectuée avec un spectrofluorimètre thermostaté (Fluorolog SPEX), équipé d'une lampe Xénon et de monochromateurs d'excitation et d'émission. Les photons sont détectés à l'aide d'un photomultiplicateur.

Les cellules sont incubées en présence de 2 μ M de Fluo-4 et de 2,5 mM de probénécide (Molecular Probes™) dans du tampon HEPES/BSA (137,5 mM de NaCl ; 1,25 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 1,25 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 6m M KCl ; 10 mM glucose ; 10 mM HEPES ; 0,4 mM NaH_2PO_4 ; 0,1% BSA ; pH 7,4) durant 1 heure à 37°C dans l'obscurité. Le probénécide, un inhibiteur du transport des acides organiques, prévient la fuite du Fluo-4 hors du cytoplasme. Les cellules sont récoltées par trypsinisation puis lavées et diluées à la concentration de 10^6 cellules/ml dans du tampon HEPES/BSA contenant 2,5 mM de probénécide. Les cellules sont incubées 30 min à 21°C dans l'obscurité afin de permettre aux estérases endogènes d'activer la sonde Fluo-4.

Un volume de 1 ml de suspension cellulaire est introduit dans une cuve en quartz et les cellules sont stimulées à l'aide du ligand, sous agitation et à 21°C. L'ajout de digitonine, un détergent qui lyse les cellules, permet d'obtenir la réponse maximum. Le signal fluorescent est normalisé grâce au signal maximum obtenu avec la digitonine et à la ligne de base.

IV.7. Anticorps primaire dirigé contre GASP-1

IV.7.1. Production d'anticorps dirigés contre GASP-1

Un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre la portion de GASP-1 comprise entre les résidus 924 et 1395 (GASP1₍₉₂₄₋₁₃₉₅₎) a été réalisé au service « Anticorps » à l'IGBMC. Brièvement, la protéine immunogène GASP1₍₉₂₄₋₁₃₉₅₎ a été produite sous la forme d'une protéine de fusion avec la GST dans des bactéries *E. coli* BL21 transformées avec le plasmide pGEX-2T-GASP1₍₉₂₄₋₁₃₉₅₎ puis purifiée par chromatographie d'affinité sur résine Sépharose-glutathion 4B (GE Healthcare). La protéine GST-GASP1₍₉₂₄₋₁₃₉₅₎ a été injectée en intrapéritonéal à un lapin en association avec de l'adjuvant de Freund afin de stimuler l'immunité cellulaire et renforcer la production d'immunoglobulines. Le taux d'anticorps présent dans le

sang du lapin a régulièrement été évalué par Western Blot jusqu'à ce qu'il ait atteint son maximum. À ce moment, le lapin a été sacrifié et le sérum contenant les anticorps dirigés contre GASP-1 a été obtenu à partir du sang prélevé.

IV.7.2. Purification des anticorps par chromatographie d'affinité

Les anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre GASP1₍₉₂₄₋₁₃₉₅₎ obtenus sous forme de sérum brut ont été purifiés par chromatographie d'affinité. Tout d'abord la séquence codant pour GASP1₍₉₂₄₋₁₃₉₅₎ a été clonée dans le vecteur pMAL-c2 (New England Biolabs) permettant l'expression dans des bactéries *E. coli* BI21 de GASP1₍₉₂₄₋₁₃₉₅₎ sous la forme d'une protéine de fusion avec la MBP (*maltose-binding protein*) qui a ensuite été purifiée par chromatographie d'affinité sur une résine amylose (New England Biolabs). La protéine MBP-GASP1₍₉₂₄₋₁₃₉₅₎ ainsi obtenue a été greffée sur une résine Sépharose 4B activée au bromure de cyanogène (GE Healthcare). Enfin, les anticorps dirigés contre GASP1₍₉₂₄₋₁₃₉₅₎ ont été purifiés par chromatographie d'affinité sur cette résine puis concentrés à l'aide du système Vivaspinn (Vivascience).

IV.8. Modèle murin déficient en protéine GASP-1

Afin d'explorer les fonctions physiologiques de la protéine GASP-1 au niveau de l'organisme entier, des animaux génétiquement modifiés ont été réalisés à l'Institut Clinique de la Souris (ICS, Illkirch). Le gène codant pour GASP-1 est localisé sur le chromosome X et est constitué de 12 exons. Les 11 premiers exons sont non codants, c'est-à-dire qu'ils sont transcrits en ARNm mais pas traduits. Quant au douzième exon, il code pour GASP-1 dans sa totalité. Les souris déficientes en GASP-1 ont été obtenues en supprimant les exons 6 à 12 à l'aide de la technique de recombinaison homologue. Pour cela un vecteur de ciblage a été réalisé, il contient un gène de résistance à la néomycine bordé par deux bras d'homologie 5' et 3' correspondant aux séquences situées en amont et en aval des exons 6 à 12 qui seront supprimés. Ces bras d'homologie ont été amplifiés par PCR sur de l'ADN génomique de cellule souche embryonnaire (ES) de souris 129S2/SvPas. Le vecteur linéarisé a été transféré par électroporation dans des cellules ES de souris 129S2/SvPas cultivées en présence de néomycine afin de sélectionner les cellules ayant intégré le gène de résistance à

cet antibiotique. Afin de s'assurer que la recombinaison homologue s'est déroulée correctement et que le gène de résistance à la néomycine a bien été intégré en lieu et place des exons 6 à 12 du gène *Gasp1*, les clones résistants à la néomycine ont été analysés par PCR à l'aide d'amorces externes et confirmés par Southern blot à l'aide de deux sondes externes 5' et 3' radiomarquée au ^{32}P d'une sonde interne spécifique à la séquence de la néomycine. Un clone de cellule ES positif a été transféré par microinjection à l'intérieur d'un embryon de souris C57BL/6J au stade blastocyste implanté dans une mère porteuse. La descendance chimérique (129S2/SvPas-C57BL/6J) ainsi obtenue a été mise en reproduction avec des souris C57BL/6J. Les souris à la fourrure agouti ont été génotypées par PCR pour confirmer la transmission de la mutation génétique à la lignée des cellules germinales. Finalement, l'absence de l'expression de la protéine GASP-1 a été confirmée par Western blot sur des extraits de cerveau.

Références bibliographiques

- Abarca, C., U. Albrecht, et al. (2002). "Cocaine sensitization and reward are under the influence of circadian genes and rhythm." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(13): 9026-30.
- Abe, M., E. D. Herzog, et al. (2002). "Circadian rhythms in isolated brain regions." J Neurosci **22**(1): 350-6.
- Abrahamson, E. E. and R. Y. Moore (2001). "Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections." Brain Res **916**(1-2): 172-91.
- Ahn, S., J. Kim, et al. (2002). "Src-dependent tyrosine phosphorylation regulates dynamin self-assembly and ligand-induced endocytosis of the epidermal growth factor receptor." J Biol Chem **277**(29): 26642-51.
- Ahn, S., S. Maudsley, et al. (1999). "Src-mediated tyrosine phosphorylation of dynamin is required for beta2-adrenergic receptor internalization and mitogen-activated protein kinase signaling." J Biol Chem **274**(3): 1185-8.
- Ahn, S., C. D. Nelson, et al. (2003). "Desensitization, internalization, and signaling functions of beta-arrestins demonstrated by RNA interference." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(4): 1740-4.
- Akashi, M., Y. Tsuchiya, et al. (2002). "Control of intracellular dynamics of mammalian period proteins by casein kinase I epsilon (CKIepsilon) and CKIdelta in cultured cells." Mol Cell Biol **22**(6): 1693-703.
- Akil, H., F. Meng, et al. (1997). "Molecular and neuroanatomical properties of the endogenous opioid systems: implications for the treatment of opiate addiction." Semin. Neurosci. **9**: 70-83.
- Akil, H., S. J. Watson, et al. (1984). "Endogenous opioids: Biology and function." Ann. Rev. Neurosci. **7**: 223-255.
- Alburges, M. E., N. Narang, et al. (1993). "Alterations in the dopaminergic receptor system after chronic administration of cocaine." Synapse **14**(4): 314-23.
- Anborgh, P. H., J. L. Seachrist, et al. (2000). "Receptor/beta-arrestin complex formation and the differential trafficking and resensitization of beta2-adrenergic and angiotensin II type 1A receptors." Mol Endocrinol **14**(12): 2040-53.
- Andrade, M. A., C. Perez-Iratxeta, et al. (2001). "Protein repeats: structures, functions, and evolution." J Struct Biol **134**(2-3): 117-31.
- Arnold, J. C. (2005). "The role of endocannabinoid transmission in cocaine addiction." Pharmacol Biochem Behav **81**(2): 396-406.
- Arnold, J. M. and D. C. Roberts (1997). "A critique of fixed and progressive ratio schedules used to examine the neural substrates of drug reinforcement." Pharmacol Biochem Behav **57**(3): 441-7.
- Attramadal, H., J. L. Arriza, et al. (1992). "Beta-arrestin2, a novel member of the arrestin/beta-arrestin gene family." J Biol Chem **267**(25): 17882-90.
- Backstrom, J. R., R. D. Price, et al. (2000). "Deletion of the serotonin 5-HT_{2C} receptor PDZ recognition motif prevents receptor phosphorylation and delays resensitization of receptor responses." J Biol Chem **275**(31): 23620-6.
- Bae, K., X. Jin, et al. (2001). "Differential functions of mPer1, mPer2, and mPer3 in the SCN circadian clock." Neuron **30**(2): 525-36.
- Ballesteros, J. A., A. D. Jensen, et al. (2001). "Activation of the beta 2-adrenergic receptor involves disruption of an ionic lock between the cytoplasmic ends of transmembrane segments 3 and 6." J Biol Chem **276**(31): 29171-7.

- Bartlett, S. E., J. Enquist, et al. (2005). "Dopamine responsiveness is regulated by targeted sorting of D2 receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(32): 11521-6.
- Benovic, J. L., H. Kuhn, et al. (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**(24): 8879-82.
- Berlanga, M. L., C. M. Olsen, et al. (2003). "Cholinergic interneurons of the nucleus accumbens and dorsal striatum are activated by the self-administration of cocaine." Neuroscience **120**(4): 1149-56.
- Bermak, J. C., M. Li, et al. (2001). "Regulation of transport of the dopamine D1 receptor by a new membrane-associated ER protein." Nat Cell Biol **3**(5): 492-8.
- Bockaert, J., L. Fagni, et al. (2004). "GPCR interacting proteins (GIP)." Pharmacol Ther **103**(3): 203-21.
- Bockaert, J., P. Marin, et al. (2003). "The 'magic tail' of G protein-coupled receptors: an anchorage for functional protein networks." FEBS Lett **546**(1): 65-72.
- Bohn, L. M., R. R. Gainetdinov, et al. (2000). "Mu-opioid receptor desensitization by beta-arrestin-2 determines morphine tolerance but not dependence." Nature **408**(6813): 720-3.
- Bohn, L. M., R. J. Lefkowitz, et al. (1999). "Enhanced morphine analgesia in mice lacking beta-arrestin 2." Science **286**(5449): 2495-8.
- Bonner, T. I. (1989). "The molecular basis of muscarinic receptor diversity." Trends Neurosci **12**(4): 148-51.
- Bosboom, J. L., D. Stoffers, et al. (2003). "The role of acetylcholine and dopamine in dementia and psychosis in Parkinson's disease." J Neural Transm Suppl(65): 185-95.
- Botto, J. M., J. Chabry, et al. (1998). "Stable expression of the mouse levocabastine-sensitive neurotensin receptor in HEK 293 cell line: binding properties, photoaffinity labeling, and internalization mechanism." Biochem Biophys Res Commun **243**(2): 585-90.
- Breivogel, C. S., S. R. Childers, et al. (1999). "Chronic delta9-tetrahydrocannabinol treatment produces a time-dependent loss of cannabinoid receptors and cannabinoid receptor-activated G proteins in rat brain." J Neurochem **73**(6): 2447-59.
- Bremnes, T., J. D. Paasche, et al. (2000). "Regulation and intracellular trafficking pathways of the endothelin receptors." J Biol Chem **275**(23): 17596-604.
- Bristow, M. R. (2000). "beta-adrenergic receptor blockade in chronic heart failure." Circulation **101**(5): 558-69.
- Bristow, M. R., R. Ginsburg, et al. (1982). "Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts." N Engl J Med **307**(4): 205-11.
- Brodde, O. E. (1993). "Beta-adrenoceptors in cardiac disease." Pharmacol Ther **60**(3): 405-30.
- Cabib, S., C. Castellano, et al. (1991). "D1 and D2 receptor antagonists differently affect cocaine-induced locomotor hyperactivity in the mouse." Psychopharmacology (Berl) **105**(3): 335-9.
- Caine, S. B., S. S. Negus, et al. (2002). "Role of dopamine D2-like receptors in cocaine self-administration: studies with D2 receptor mutant mice and novel D2 receptor antagonists." J Neurosci **22**(7): 2977-88.
- Caine, S. B., M. Thomsen, et al. (2007). "Lack of self-administration of cocaine in dopamine D1 receptor knock-out mice." J Neurosci **27**(48): 13140-50.
- Caligaris-Cappio, F. and G. Janossi (1985). "Surface markers in chronic lymphoid leukemia of B cell type." Seminars in hematology **XXII**(1): 1-12.
- Cao, T. T., H. W. Deacon, et al. (1999). "A kinase-regulated PDZ-domain interaction controls endocytic sorting of the beta2-adrenergic receptor." Nature **401**(6750): 286-90.
- Cermakian, N., L. Monaco, et al. (2001). "Altered behavioral rhythms and clock gene

- expression in mice with a targeted mutation in the Period1 gene." *Embo J* **20**(15): 3967-74.
- Chaturvedi, K., P. Bandari, et al. (2001). "Proteasome involvement in agonist-induced down-regulation of mu and delta opioid receptors." *J Biol Chem* **276**(15): 12345-55.
- Chen, W., K. C. Kirkbride, et al. (2003). "Beta-arrestin 2 mediates endocytosis of type III TGF-beta receptor and down-regulation of its signaling." *Science* **301**(5638): 1394-7.
- Chen, W., D. ten Berge, et al. (2003). "Dishevelled 2 recruits beta-arrestin 2 to mediate Wnt5A-stimulated endocytosis of Frizzled 4." *Science* **301**(5638): 1391-4.
- Cheng, Z. J., J. Zhao, et al. (2000). "beta-arrestin differentially regulates the chemokine receptor CXCR4-mediated signaling and receptor internalization, and this implicates multiple interaction sites between beta-arrestin and CXCR4." *J Biol Chem* **275**(4): 2479-85.
- Chuang, T. T., H. LeVine, 3rd, et al. (1995). "Phosphorylation and activation of beta-adrenergic receptor kinase by protein kinase C." *J Biol Chem* **270**(31): 18660-5.
- Claing, A., W. Chen, et al. (2001). "beta-Arrestin-mediated ADP-ribosylation factor 6 activation and beta 2-adrenergic receptor endocytosis." *J Biol Chem* **276**(45): 42509-13.
- Claing, A., S. J. Perry, et al. (2000). "Multiple endocytic pathways of G protein-coupled receptors delineated by GIT1 sensitivity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(3): 1119-24.
- Coates, J. C. (2003). "Armadillo repeat proteins: beyond the animal kingdom." *Trends Cell Biol* **13**(9): 463-71.
- Cong, M., S. J. Perry, et al. (2001). "Binding of the beta2 adrenergic receptor to N-ethylmaleimide-sensitive factor regulates receptor recycling." *J Biol Chem* **276**(48): 45145-52.
- Consolo, S., C. Caltavuturo, et al. (1999). "Different sensitivity of in vivo acetylcholine transmission to D1 receptor stimulation in shell and core of nucleus accumbens." *Neuroscience* **89**(4): 1209-17.
- Cottrell, G. S., B. Padilla, et al. (2006). "Ubiquitin-dependent down-regulation of the neurokinin-1 receptor." *J Biol Chem* **281**(38): 27773-83.
- Crawford, C. A., F. Y. Choi, et al. (2004). "Changes in PKA activity and Gs alpha and Golf alpha levels after amphetamine- and cocaine-induced behavioral sensitization." *Synapse* **51**(4): 241-8.
- Crespo, J. A., K. Sturm, et al. (2006). "Activation of muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors in the nucleus accumbens core is necessary for the acquisition of drug reinforcement." *J Neurosci* **26**(22): 6004-10.
- D'Souza-Schorey, C. and P. Chavrier (2006). "ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond." *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(5): 347-58.
- Daaka, Y., L. M. Luttrell, et al. (1997). "Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A." *Nature* **390**(6655): 88-91.
- Dackis, C. A. and C. P. O'Brien (2001). "Cocaine dependence: a disease of the brain's reward centers." *J Subst Abuse Treat* **21**(3): 111-7.
- De Vries, L., B. Zheng, et al. (2000). "The regulator of G protein signaling family." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **40**: 235-71.
- De Vry, J., K. R. Jentsch, et al. (2004). "Behavioral effects of cannabinoids show differential sensitivity to cannabinoid receptor blockade and tolerance development." *Behav Pharmacol* **15**(1): 1-12.
- Delaney, K. A., M. M. Murph, et al. (2002). "Transfer of M2 muscarinic acetylcholine receptors to clathrin-derived early endosomes following clathrin-independent endocytosis." *J Biol Chem* **277**(36): 33439-46.
- Delhay, M., A. Gravot, et al. (2007). "Identification of a Postendocytic Sorting Sequence in

- CCR5." Mol Pharmacol **72**(6): 1497-507.
- Delos Santos, N. M., L. A. Gardner, et al. (2006). "Characterization of the residues in helix 8 of the human beta1-adrenergic receptor that are involved in coupling the receptor to G proteins." J Biol Chem **281**(18): 12896-907.
- Di Chiara, G. and A. Imperato (1988). "Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(14): 5274-8.
- Dickenson, A. H. (1991). "Mechanisms of the analgesic action of opiates and opioids." British Medical Bulletin **47**(3): 690-702.
- Dixon, R. A., B. K. Kobilka, et al. (1986). "Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin." Nature **321**(6065): 75-9.
- Donaldson, J. G. (2003). "Multiple roles for Arf6: sorting, structuring, and signaling at the plasma membrane." J Biol Chem **278**(43): 41573-6.
- Duffy, J. F., R. E. Kronauer, et al. (1996). "Phase-shifting human circadian rhythms: influence of sleep timing, social contact and light exposure." J Physiol **495** (Pt 1): 289-97.
- Dupre, D. J., Z. Chen, et al. (2003). "Trafficking, ubiquitination, and down-regulation of the human platelet-activating factor receptor." J Biol Chem **278**(48): 48228-35.
- Earnest, D. J., F. Q. Liang, et al. (1999). "Establishment and characterization of adenoviral E1A immortalized cell lines derived from the rat suprachiasmatic nucleus." J Neurobiol **39**(1): 1-13.
- Earnest, D. J., F. Q. Liang, et al. (1999). "Immortal time: circadian clock properties of rat suprachiasmatic cell lines." Science **283**(5402): 693-5.
- Elorza, A., S. Sarnago, et al. (2000). "Agonist-dependent modulation of G protein-coupled receptor kinase 2 by mitogen-activated protein kinases." Mol Pharmacol **57**(4): 778-83.
- Exton, J. H. (1996). "Regulation of phosphoinositide phospholipases by hormones, neurotransmitters, and other agonists linked to G proteins." Annu Rev Pharmacol Toxicol **36**: 481-509.
- Fallon, J. H. and R. Y. Moore (1978). "Catecholamine innervation of the basal forebrain. IV. Topography of the dopamine projection to the basal forebrain and neostriatum." J Comp Neurol **180**(3): 545-80.
- Fan, G. H., L. A. Lapierre, et al. (2003). "Differential regulation of CXCR2 trafficking by Rab GTPases." Blood **101**(6): 2115-24.
- Fan, G. H., W. Yang, et al. (2001). "Identification of a motif in the carboxyl terminus of CXCR2 that is involved in adaptin 2 binding and receptor internalization." Biochemistry **40**(3): 791-800.
- Faussner, A., A. Bauer, et al. (2005). "The role of helix 8 and of the cytosolic C-termini in the internalization and signal transduction of B(1) and B(2) bradykinin receptors." Febs J **272**(1): 129-40.
- Foord, S. M., T. I. Bonner, et al. (2005). "International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list." Pharmacol Rev **57**(2): 279-88.
- Franke, R. R., B. Konig, et al. (1990). "Rhodopsin mutants that bind but fail to activate transducin." Science **250**(4977): 123-5.
- Frankel, A. D. and C. O. Pabo (1988). "Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus." Cell **55**(6): 1189-93.
- Franzoni, L., G. Nicastro, et al. (1997). "Structure of the C-terminal fragment 300-320 of the rat angiotensin II AT1A receptor and its relevance with respect to G-protein coupling." J Biol Chem **272**(15): 9734-41.
- Fredriksson, R., M. C. Lagerstrom, et al. (2003). "The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and

- fingerprints." Mol Pharmacol **63**(6): 1256-72.
- Futaki, S., I. Nakase, et al. (2007). "Arginine-rich peptides and their internalization mechanisms." Biochem Soc Trans **35**(Pt 4): 784-7.
- Gabilondo, A. M., J. Hegler, et al. (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**(23): 12285-90.
- Gage, R. M., K. A. Kim, et al. (2001). "A transplantable sorting signal that is sufficient to mediate rapid recycling of G protein-coupled receptors." J Biol Chem **276**(48): 44712-20.
- Gage, R. M., E. A. Matveeva, et al. (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**(5): 3305-13.
- Gaidarov, I., J. G. Krupnick, et al. (1999). "Arrestin function in G protein-coupled receptor endocytosis requires phosphoinositide binding." Embo J **18**(4): 871-81.
- Gaidarov, I., F. Santini, et al. (1999). "Spatial control of coated-pit dynamics in living cells." Nat Cell Biol **1**(1): 1-7.
- Galet, C., T. Hirakawa, et al. (2004). "The postendocytotic trafficking of the human lutropin receptor is mediated by a transferable motif consisting of the C-terminal cysteine and an upstream leucine." Mol Endocrinol **18**(2): 434-46.
- Goehler, H., M. Lalowski, et al. (2004). "A protein interaction network links GIT1, an enhancer of huntingtin aggregation, to Huntington's disease." Mol Cell **15**(6): 853-65.
- Gonzalez, S., M. Cebeira, et al. (2005). "Cannabinoid tolerance and dependence: a review of studies in laboratory animals." Pharmacol Biochem Behav **81**(2): 300-18.
- Goodmann, O. B., J. Jason, et al. (1996). " β -Arrestin acts as a clathrin adaptator in endocytosis of the β 2-adrenergic receptor." Nature **383**: 447-450.
- Grady, E. F., A. M. Garland, et al. (1995). "Delineation of the endocytic pathway of substance P and its seven-transmembrane domain NK1 receptor." Mol Biol Cell **6**(5): 509-24.
- Granzin, J., U. Wilden, et al. (1998). "X-ray crystal structure of arrestin from bovine rod outer segments." Nature **391**(6670): 918-21.
- Gruenberg, J. (2001). "The endocytic pathway: a mosaic of domains." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(10): 721-30.
- Gullapalli, A., B. L. Wolfe, et al. (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**(3): 1228-38.
- Gurevich, V. V. and J. L. Benovic (1997). "Mechanism of phosphorylation-recognition by visual arrestin and the transition of arrestin into a high affinity binding state." Mol Pharmacol **51**(1): 161-9.
- Gurevich, V. V., S. B. Dion, et al. (1995). "Arrestin interactions with G protein-coupled receptors. Direct binding studies of wild type and mutant arrestins with rhodopsin, beta 2-adrenergic, and m2 muscarinic cholinergic receptors." J Biol Chem **270**(2): 720-31.
- Gurevich, V. V., R. M. Richardson, et al. (1993). "Binding of wild type and chimeric arrestins to the m2 muscarinic cholinergic receptor." J Biol Chem **268**(23): 16879-82.
- Haga, K., K. Kameyama, et al. (1996). "Phosphorylation of human m1 muscarinic acetylcholine receptors by G protein-coupled receptor kinase 2 and protein kinase C." J Biol Chem **271**(5): 2776-82.
- Haga, K., H. Ogawa, et al. (1998). "GTP-binding-protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) binds and phosphorylates tubulin." Eur J Biochem **255**(2): 363-8.
- Hall, R. A., L. S. Ostedgaard, et al. (1998). "A C-terminal motif found in the beta2-adrenergic receptor, P2Y1 receptor and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

- determines binding to the Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor family of PDZ proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(15): 8496-501.
- Hall, R. A., R. T. Premont, et al. (1998). "The b2-adrenergic receptor interacts with the Na⁺/H⁺-exchanger regulatory factor to control Na⁺/H⁺ exchange." *Nature* **392**: 626- 630.
- Han, M., V. V. Gurevich, et al. (2001). "Crystal structure of beta-arrestin at 1.9 Å: possible mechanism of receptor binding and membrane Translocation." *Structure* **9**(9): 869-80.
- Hanyaloglu, A. C., E. McCullagh, et al. (2005). "Essential role of Hrs in a recycling mechanism mediating functional resensitization of cell signaling." *Embo J* **24**(13): 2265-83.
- Hanyaloglu, A. C. and M. von Zastrow (2007). "A novel sorting sequence in the beta2-adrenergic receptor switches recycling from default to the Hrs-dependent mechanism." *J Biol Chem* **282**(5): 3095-104.
- Harjes, P. and E. E. Wanker (2003). "The hunt for huntingtin function: interaction partners tell many different stories." *Trends Biochem Sci* **28**(8): 425-33.
- Harmar, A. J., H. M. Marston, et al. (2002). "The VPAC(2) receptor is essential for circadian function in the mouse suprachiasmatic nuclei." *Cell* **109**(4): 497-508.
- Hastings, M. H., A. B. Reddy, et al. (2003). "A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease." *Nat Rev Neurosci* **4**(8): 649-61.
- Heikkila, R. E., H. Orlansky, et al. (1975). "Studies on the distinction between uptake inhibition and release of (3H)dopamine in rat brain tissue slices." *Biochem Pharmacol* **24**(8): 847-52.
- Heim, R., A. B. Cubitt, et al. (1995). "Improved green fluorescence." *Nature* **373**(6516): 663-4.
- Henderson, B. R. (2005). "Regulation of BRCA1, BRCA2 and BARD1 intracellular trafficking." *Bioessays* **27**(9): 884-93.
- Henderson, R. and P. N. Unwin (1975). "Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy." *Nature* **257**(5521): 28-32.
- Herrero, I., M. T. Miras-Portugal, et al. (1998). "Functional switch from facilitation to inhibition in the control of glutamate release by metabotropic glutamate receptors." *J Biol Chem* **273**(4): 1951-8.
- Heydorn, A., B. P. Sondergaard, et al. (2004). "A library of 7TM receptor C-terminal tails. Interactions with the proposed post-endocytic sorting proteins ERM-binding phosphoprotein 50 (EBP50), N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF), sorting nexin 1 (SNX1), and G protein-coupled receptor-associated sorting protein (GASP)." *J Biol Chem* **279**(52): 54291-303.
- Hirakawa, T., C. Galet, et al. (2003). "GIPC binds to the human lutropin receptor (hLHR) through an unusual PDZ domain binding motif, and it regulates the sorting of the internalized human choriogonadotropin and the density of cell surface hLHR." *J Biol Chem* **278**(49): 49348-57.
- Hirsch, J. A., C. Schubert, et al. (1999). "The 2.8 Å crystal structure of visual arrestin: a model for arrestin's regulation." *Cell* **97**(2): 257-69.
- Honma, K., S. Honma, et al. (1995). "Differential effects of bright light and social cues on reentrainment of human circadian rhythms." *Am J Physiol* **268**(2 Pt 2): R528-35.
- Hopkins, A. L. and C. R. Groom (2002). "The druggable genome." *Nat Rev Drug Discov* **1**(9): 727-30.
- Horn, S. C., M. Lalowski, et al. (2006). "Huntingtin interacts with the receptor sorting family protein GASP2." *J Neural Transm* **113**(8): 1081-90.
- Houndolo, T., P. L. Boulay, et al. (2005). "G protein-coupled receptor endocytosis in ADP-ribosylation factor 6-depleted cells." *J Biol Chem* **280**(7): 5598-604.
- Hyman, S. E. (2005). "Addiction: a disease of learning and memory." *Am J Psychiatry*

- 162**(8): 1414-22.
- Hyman, S. E., R. C. Malenka, et al. (2006). "Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory." Annu Rev Neurosci **29**: 565-98.
- Imperato, A., M. C. Obinu, et al. (1993). "Effects of cocaine and amphetamine on acetylcholine release in the hippocampus and caudate nucleus." Eur J Pharmacol **238**(2-3): 377-81.
- Inglese, J., J. F. Glickman, et al. (1992). "Isoprenylation of a protein kinase. Requirement of farnesylation/alpha-carboxyl methylation for full enzymatic activity of rhodopsin kinase." J Biol Chem **267**(3): 1422-5.
- Innamorati, G., C. Le Gouill, et al. (2001). "The long and the short cycle. Alternative intracellular routes for trafficking of G-protein-coupled receptors." J Biol Chem **276**(16): 13096-103.
- Irminger-Finger, I., W. C. Leung, et al. (2001). "Identification of BARD1 as mediator between proapoptotic stress and p53-dependent apoptosis." Mol Cell **8**(6): 1255-66.
- Iwata, K., K. Ito, et al. (1999). "Dynamin and rab5 regulate GRK2-dependent internalization of dopamine D2 receptors." Eur J Biochem **263**(2): 596-602.
- Jackson, D. M. and A. Westlind-Danielsson (1994). "Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioural aspects." Pharmacol Ther **64**(2): 291-370.
- Jacob, C., G. S. Cottrell, et al. (2005). "c-Cbl mediates ubiquitination, degradation, and down-regulation of human protease-activated receptor 2." J Biol Chem **280**(16): 16076-87.
- Jacoby, E., R. Bouhelal, et al. (2006). "The 7 TM G-protein-coupled receptor target family." ChemMedChem **1**(8): 761-82.
- Jakubik, J., L. Bacakova, et al. (1995). "Constitutive activity of the M1-M4 subtypes of muscarinic receptors in transfected CHO cells and of muscarinic receptors in the heart cells revealed by negative antagonists." FEBS Lett **377**(2): 275-9.
- Jaworski, J. N., A. Vicentic, et al. (2003). "CART peptides are modulators of mesolimbic dopamine and psychostimulants." Life Sci **73**(6): 741-7.
- Jeanneteau, F., J. Diaz, et al. (2004). "Interactions of GIPC with dopamine D2, D3 but not D4 receptors define a novel mode of regulation of G protein-coupled receptors." Mol Biol Cell **15**(2): 696-705.
- Jin, L. Q., H. Y. Wang, et al. (2001). "Stimulated D(1) dopamine receptors couple to multiple Galpha proteins in different brain regions." J Neurochem **78**(5): 981-90.
- Jockers, R., S. Angers, et al. (1999). "Beta(2)-adrenergic receptor down-regulation. Evidence for a pathway that does not require endocytosis." J Biol Chem **274**(41): 28900-8.
- Jones, C. R., S. S. Campbell, et al. (1999). "Familial advanced sleep-phase syndrome: A short-period circadian rhythm variant in humans." Nat Med **5**(9): 1062-5.
- Kadomatsu, K. and T. Muramatsu (2004). "Midkine and pleiotrophin in neural development and cancer." Cancer Lett **204**(2): 127-43.
- Kaksonen, M., C. P. Toret, et al. (2005). "A modular design for the clathrin- and actin-mediated endocytosis machinery." Cell **123**(2): 305-20.
- Kalivas, P. W. (2004). "Glutamate systems in cocaine addiction." Curr Opin Pharmacol **4**(1): 23-9.
- Katragadda, M., M. W. Maciejewski, et al. (2004). "Structural studies of the putative helix 8 in the human beta(2) adrenergic receptor: an NMR study." Biochim Biophys Acta **1663**(1-2): 74-81.
- Katzenberg, D., T. Young, et al. (1998). "A CLOCK polymorphism associated with human diurnal preference." Sleep **21**(6): 569-76.
- Katzmann, D. J., M. Babst, et al. (2001). "Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I." Cell **106**(2): 145-55.

- Kebabian, J. W., G. L. Petzold, et al. (1972). "Dopamine-sensitive adenylate cyclase in caudate nucleus of rat brain, and its similarity to the "dopamine receptor"." Proc Natl Acad Sci U S A **69**(8): 2145-9.
- Kelley, A. E. and K. C. Berridge (2002). "The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs." J Neurosci **22**(9): 3306-11.
- Kieffer, B. L. (1995). "Recent advances in molecular recognition and signal transduction of active peptides: receptors for opioid peptides." Cell Mol Neurobiol **15**: 615-635.
- Kieselbach, T., K. D. Irrgang, et al. (1994). "A segment corresponding to amino acids Val170-Arg182 of bovine arrestin is capable of binding to phosphorylated rhodopsin." Eur J Biochem **226**(1): 87-97.
- Klerman, E. B., D. W. Rimmer, et al. (1998). "Nonphotic entrainment of the human circadian pacemaker." Am J Physiol **274**(4 Pt 2): R991-6.
- Kleven, M. S., B. D. Perry, et al. (1990). "Effects of repeated injections of cocaine on D1 and D2 dopamine receptors in rat brain." Brain Res **532**(1-2): 265-70.
- Kohout, T. A., F. S. Lin, et al. (2001). "beta-Arrestin 1 and 2 differentially regulate heptahelical receptor signaling and trafficking." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(4): 1601-6.
- Kojro, E. and F. Fahrenholz (1995). "Ligand-induced cleavage of the V2 vasopressin receptor by a plasma membrane metalloproteinase." J Biol Chem **270**(12): 6476-81.
- Konig, B., A. Arendt, et al. (1989). "Three cytoplasmic loops of rhodopsin interact with transducin." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(18): 6878-82.
- Koob, G. F. (1992). "Drug of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways." Trends Pharmacol. Sci. **13**: 177-184.
- Koob, G. F. (1992). "Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways." Trends Pharmacol Sci **13**(5): 177-84.
- Koob, G. F. and M. Le Moal (2006). Neurobiology of addiction, Academic Press.
- Kreek, M. J. (1996). "Opioid receptors: Some perspective from early studies of their role in normal physiology, stress responsivity, and in specific addictive diseases." Neurochem. Res. **21**: 1469-1488.
- Krishna, A. G., S. T. Menon, et al. (2002). "Evidence that helix 8 of rhodopsin acts as a membrane-dependent conformational switch." Biochemistry **41**(26): 8298-309.
- Krudewig, R., B. Langer, et al. (2000). "Distinct internalization of M2 muscarinic acetylcholine receptors confers selective and long-lasting desensitization of signaling to phospholipase C." J Neurochem **74**(4): 1721-30.
- Krueger, K. M., Y. Daaka, et al. (1997). "The role of sequestration in G protein-coupled receptor resensitization. Regulation of beta2-adrenergic receptor dephosphorylation by vesicular acidification." J Biol Chem **272**(1): 5-8.
- Kubo, T., K. Fukuda, et al. (1986). "Cloning, sequencing and expression of complementary DNA encoding the muscarinic acetylcholine receptor." Nature **323**(6087): 411-6.
- Kubo, T., A. Maeda, et al. (1986). "Primary structure of porcine cardiac muscarinic acetylcholine receptor deduced from the cDNA sequence." FEBS Lett **209**(2): 367-72.
- Kunapuli, P., V. V. Gurevich, et al. (1994). "Phospholipid-stimulated autophosphorylation activates the G protein-coupled receptor kinase GRK5." J Biol Chem **269**(14): 10209-12.
- Kurten, R. C., D. L. Cadena, et al. (1996). "Enhanced degradation of EGF receptors by a sorting nexin, SNX1." Science **272**(5264): 1008-10.
- Lameh, J., M. Philip, et al. (1992). "Hm1 muscarinic cholinergic receptor internalization requires a domain in the third cytoplasmic loop." J Biol Chem **267**(19): 13406-12.
- Laporte, S. A., R. H. Oakley, et al. (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**: 23120-23126.
- Laugwitz, K. L., A. Allgeier, et al. (1996). "The human thyrotropin receptor: a heptahelical receptor capable of stimulating members of all four G protein families." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(1): 116-20.
- Laurier, L. G., W. A. Corrigall, et al. (1994). "Dopamine receptor density, sensitivity and mRNA levels are altered following self-administration of cocaine in the rat." Brain Res **634**(1): 31-40.
- Lee, K. B., R. Pals-Rylaarsdam, et al. (1998). "Arrestin-independent internalization of the m1, m3, and m4 subtypes of muscarinic cholinergic receptors." J Biol Chem **273**(21): 12967-72.
- Lee, N. H., J. Earle-Hughes, et al. (1994). "Agonist-mediated destabilization of m1 muscarinic acetylcholine receptor mRNA. Elements involved in mRNA stability are localized in the 3'-untranslated region." J Biol Chem **269**(6): 4291-8.
- Leterrier, C., J. Laine, et al. (2006). "Constitutive activation drives compartment-selective endocytosis and axonal targeting of type 1 cannabinoid receptors." J Neurosci **26**(12): 3141-53.
- Li, J. G., J. L. Benovic, et al. (2000). "Mechanisms of agonist-induced down-regulation of the human kappa-opioid receptor: internalization is required for down-regulation." Mol Pharmacol **58**(4): 795-801.
- Li, J. G., C. Chen, et al. (2002). "Ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein-50/Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor (EBP50/NHERF) blocks U50,488H-induced down-regulation of the human kappa opioid receptor by enhancing its recycling rate." J Biol Chem **277**(30): 27545-52.
- Lin, F. T., Y. Daaka, et al. (1998). "beta-arrestins regulate mitogenic signaling and clathrin-mediated endocytosis of the insulin-like growth factor I receptor." J Biol Chem **273**(48): 31640-3.
- Liu-Chen, L. Y. (2004). "Agonist-induced regulation and trafficking of kappa opioid receptors." Life Sci **75**(5): 511-36.
- Liu, C. and S. M. Reppert (2000). "GABA synchronizes clock cells within the suprachiasmatic circadian clock." Neuron **25**(1): 123-8.
- Lohse, M. J., S. Andexinger, et al. (1992). "Receptor-specific desensitization with purified proteins. Kinase dependence and receptor specificity of beta-arrestin and arrestin in the beta 2-adrenergic receptor and rhodopsin systems." J Biol Chem **267**(12): 8558-64.
- Lohse, M. J., J. L. Benovic, et al. (1990). "beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function." Science **248**(4962): 1547-50.
- Lowrey, P. L., K. Shimomura, et al. (2000). "Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau." Science **288**(5465): 483-92.
- Luttrell, L. M., S. S. Ferguson, et al. (1999). "Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes." Science **283**(5402): 655-61.
- Ma, Y. C. and X. Y. Huang (2002). "Novel regulation and function of Src tyrosine kinase." Cell Mol Life Sci **59**(3): 456-62.
- Mace, G., M. Miaczynska, et al. (2005). "Phosphorylation of EEA1 by p38 MAP kinase regulates mu opioid receptor endocytosis." Embo J **24**(18): 3235-46.
- Macedo, D. S., E. E. Correia, et al. (2004). "Cocaine treatment causes early and long-lasting changes in muscarinic and dopaminergic receptors." Cell Mol Neurobiol **24**(1): 129-36.
- Mackie, K. (2006). "Cannabinoid receptors as therapeutic targets." Annu Rev Pharmacol Toxicol **46**: 101-22.
- Maggos, C. E., H. Tsukada, et al. (1998). "Sustained withdrawal allows normalization of in

- vivo [11C]N-methylspiperone dopamine D2 receptor binding after chronic binge cocaine: a positron emission tomography study in rats." Neuropsychopharmacology **19**(2): 146-53.
- Marchese, A. and J. L. Benovic (2001). "Agonist-promoted ubiquitination of the G protein-coupled receptor CXCR4 mediates lysosomal sorting." J Biol Chem **276**(49): 45509-12.
- Marchese, A., C. Raiborg, et al. (2003). "The E3 ubiquitin ligase AIP4 mediates ubiquitination and sorting of the G protein-coupled receptor CXCR4." Dev Cell **5**(5): 709-22.
- Marion, S., R. H. Oakley, et al. (2006). "A beta-arrestin binding determinant common to the second intracellular loops of rhodopsin family G protein-coupled receptors." J Biol Chem **281**(5): 2932-8.
- Mark, G. P., A. Hajnal, et al. (1999). "Self-administration of cocaine increases the release of acetylcholine to a greater extent than response-independent cocaine in the nucleus accumbens of rats." Psychopharmacology (Berl) **143**(1): 47-53.
- Marsicano, G. and B. Lutz (2006). "Neuromodulatory functions of the endocannabinoid system." J Endocrinol Invest **29**(3 Suppl): 27-46.
- Martin, B. R., L. J. Sim-Selley, et al. (2004). "Signaling pathways involved in the development of cannabinoid tolerance." Trends Pharmacol Sci **25**(6): 325-30.
- Martin, N. P., R. J. Lefkowitz, et al. (2003). "Regulation of V2 vasopressin receptor degradation by agonist-promoted ubiquitination." J Biol Chem **278**(46): 45954-9.
- Martinez, D., A. Broft, et al. (2004). "Cocaine dependence and d2 receptor availability in the functional subdivisions of the striatum: relationship with cocaine-seeking behavior." Neuropsychopharmacology **29**(6): 1190-202.
- Martini, L., M. Waldhoer, et al. (2007). "Ligand-induced down-regulation of the cannabinoid 1 receptor is mediated by the G-protein-coupled receptor-associated sorting protein GASP1." Faseb J **21**(3): 802-11.
- Matsuki, T., A. Kiyama, et al. (2001). "A novel protein interacts with a clock-related protein, rPer1." Brain Res **916**(1-2): 1-10.
- Mayer, D. J., J. Mao, et al. (1999). "Cellular mechanisms of neuropathic pain, morphine tolerance, and their interactions." Proc Natl Acad Sci U S A **96**: 7731-7736.
- Mayfield, R. D., G. Larson, et al. (1992). "Cocaine-induced behavioral sensitization and D1 dopamine receptor function in rat nucleus accumbens and striatum." Brain Res **573**(2): 331-5.
- Mayor, S., J. F. Presley, et al. (1993). "Sorting of membrane components from endosomes and subsequent recycling to the cell surface occurs by a bulk flow process." J Cell Biol **121**(6): 1257-69.
- McConalogue, K., O. Dery, et al. (1999). "Substance P-induced trafficking of beta-arrestins. The role of beta-arrestins in endocytosis of the neurokinin-1 receptor." J Biol Chem **274**(23): 16257-68.
- McCreary, A. C. and C. A. Marsden (1993). "Cocaine-induced behaviour: dopamine D1 receptor antagonism by SCH 23390 prevents expression of conditioned sensitisation following repeated administration of cocaine." Neuropharmacology **32**(4): 387-91.
- McDonald, P. H., N. L. Cote, et al. (1999). "Identification of NSF as a beta-arrestin1-binding protein. Implications for beta2-adrenergic receptor regulation." J Biol Chem **274**(16): 10677-80.
- Meador, J. P., J. E. Stein, et al. (1995). "Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine organisms." Rev Environ Contam Toxicol **143**: 79-165.
- Mello, N. K. and J. H. Mendelson (1979). "Effects of the neuropeptide DG-AVP on morphine and food self-administration by dependent rhesus monkey." Pharmacol Biochem

- Behav **10**(3): 415-9.
- Mendoza, J., C. Graff, et al. (2005). "Feeding cues after clock gene oscillations and photic responses in the suprachiasmatic nuclei of mice exposed to a light/dark cycle." J Neurosci **25**(6):1514-22.
- Mesulam, M. M. (1996). "The systems-level organization of cholinergic innervation in the human cerebral cortex and its alterations in Alzheimer's disease." Prog Brain Res **109**: 285-97.
- Milano, S. K., H. C. Pace, et al. (2002). "Scaffolding functions of arrestin-2 revealed by crystal structure and mutagenesis." Biochemistry **41**(10): 3321-8.
- Miserendino, M. J. and E. J. Nestler (1995). "Behavioral sensitization to cocaine: modulation by the cyclic AMP system in the nucleus accumbens." Brain Res **674**(2): 299-306.
- Missale, C., S. R. Nash, et al. (1998). "Dopamine receptors: from structure to function." Physiol Rev **78**(1): 189-225.
- Mogenson, G. J., D. L. Jones, et al. (1980). "From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system." Prog Neurobiol **14**(2-3): 69-97.
- Moore, R. J., S. L. Vinsant, et al. (1998). "Effect of cocaine self-administration on dopamine D2 receptors in rhesus monkeys." Synapse **30**(1): 88-96.
- Moore, R. Y. and N. J. Lenn (1972). "A retinohypothalamic projection in the rat." J Comp Neurol **146**(1): 1-14.
- Moore, R. Y. and R. Silver (1998). "Suprachiasmatic nucleus organization." Chronobiol Int **15**(5): 475-87.
- Moro, O., J. Lamah, et al. (1993). "Serine- and threonine-rich domain regulates internalization of muscarinic cholinergic receptors." J Biol Chem **268**(10): 6862-5.
- Mukherjee, S., V. V. Gurevich, et al. (2000). "The ADP ribosylation factor nucleotide exchange factor ARNO promotes beta-arrestin release necessary for luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor desensitization." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(11): 5901-6.
- Mukherjee, S., V. V. Gurevich, et al. (2002). "Aspartic acid 564 in the third cytoplasmic loop of the luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor is crucial for phosphorylation-independent interaction with arrestin2." J Biol Chem **277**(20): 17916-27.
- Mukherjee, S., K. Palczewski, et al. (1999). "beta-arrestin-dependent desensitization of luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor is prevented by a synthetic peptide corresponding to the third intracellular loop of the receptor." J Biol Chem **274**(19): 12984-9.
- Mukhopadhyay, S., S. M. Cowsik, et al. (1999). "Regulation of Gi by the CB1 cannabinoid receptor C-terminal juxtamembrane region: structural requirements determined by peptide analysis." Biochemistry **38**(11): 3447-55.
- Muller, C. P., R. J. Carey, et al. (2003). "Serotonin as an important mediator of cocaine's behavioral effects." Drugs Today (Barc) **39**(7): 497-511.
- Nader, M. A., J. B. Daunais, et al. (2002). "Effects of cocaine self-administration on striatal dopamine systems in rhesus monkeys: initial and chronic exposure." Neuropsychopharmacology **27**(1): 35-46.
- Nader, M. A., D. Morgan, et al. (2006). "PET imaging of dopamine D2 receptors during chronic cocaine self-administration in monkeys." Nat Neurosci **9**(8): 1050-6.
- Naga Prasad, S. V., L. S. Barak, et al. (2001). "Agonist-dependent recruitment of phosphoinositide 3-kinase to the membrane by beta-adrenergic receptor kinase 1. A role in receptor sequestration." J Biol Chem **276**(22): 18953-9.
- Naga Prasad, S. V., A. Jayatilleke, et al. (2005). "Protein kinase activity of phosphoinositide 3-kinase regulates beta-adrenergic receptor endocytosis." Nat Cell Biol **7**(8): 785-96.
- Nestler, E. J. and G. K. Aghajanian (1997). "Molecular and cellular basis of addiction."

Science **278**: 58-63.

- Nestler, E. J., B. T. Hope, et al. (1993). "Drug addiction: a model for the molecular basis of neural plasticity." Neuron **11**: 995-1006.
- O'Dowd, B. F., M. Hnatowich, et al. (1989). "Palmitoylation of the human beta 2-adrenergic receptor. Mutation of Cys341 in the carboxyl tail leads to an uncoupled nonpalmitoylated form of the receptor." J Biol Chem **264**(13): 7564-9.
- Oakley, R. H., S. A. Laporte, et al. (1999). "Association of beta-arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization." J Biol Chem **274**(45): 32248-57.
- Oakley, R. H., S. A. Laporte, et al. (2001). "Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled receptor-beta-arrestin complexes after receptor endocytosis*." J Biol Chem **276**(22): 19452-60.
- Oakley, R. H., S. A. Laporte, et al. (2000). "Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors." J Biol Chem **275**(22): 17201-10.
- Offermanns, S., T. Wieland, et al. (1994). "Transfected muscarinic acetylcholine receptors selectively couple to Gi-type G proteins and Gq/11." Mol Pharmacol **45**(5): 890-8.
- Ohno, H., J. Stewart, et al. (1995). "Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins." Science **269**(5232): 1872-5.
- Orsini, M. J., J. L. Parent, et al. (1999). "Trafficking of the HIV coreceptor CXCR4. Role of arrestins and identification of residues in the c-terminal tail that mediate receptor internalization." J Biol Chem **274**(43): 31076-86.
- Ovchinnikov, Y. A. (1987). "Structure of rhodopsin and bacteriorhodopsin." Photochem Photobiol **45**(6): 909-14.
- Paasche, J. D., T. Attramadal, et al. (2005). "Subtype-specific sorting of the ETA endothelin receptor by a novel endocytic recycling signal for G protein-coupled receptors." Mol Pharmacol **67**(5): 1581-90.
- Paing, M. M., C. A. Johnston, et al. (2006). "Clathrin adaptor AP2 regulates thrombin receptor constitutive internalization and endothelial cell resensitization." Mol Cell Biol **26**(8): 3231-42.
- Paing, M. M., B. R. Temple, et al. (2004). "A tyrosine-based sorting signal regulates intracellular trafficking of protease-activated receptor-1: multiple regulatory mechanisms for agonist-induced G protein-coupled receptor internalization." J Biol Chem **279**(21): 21938-47.
- Palczewski, K., T. Kumasaka, et al. (2000). "Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor." Science **289**: 739-745.
- Parent, J. L., P. Labrecque, et al. (2001). "Role of the differentially spliced carboxyl terminus in thromboxane A2 receptor trafficking: identification of a distinct motif for tonic internalization." J Biol Chem **276**(10): 7079-85.
- Parent, J. L., P. Labrecque, et al. (1999). "Internalization of the TXA2 receptor alpha and beta isoforms. Role of the differentially spliced cooh terminus in agonist-promoted receptor internalization." J Biol Chem **274**(13): 8941-8.
- Pasternak, G. W. (2001). "Insights into mu opioid pharmacology the role of mu opioid receptor subtypes." Life Sci **68**(19-20): 2213-9.
- Pepcu, G. and M. G. Giovannini (2004). "Changes in acetylcholine extracellular levels during cognitive processes." Learn Mem **11**(1): 21-7.
- Peris, J., S. J. Boyson, et al. (1990). "Persistence of neurochemical changes in dopamine systems after repeated cocaine administration." J Pharmacol Exp Ther **253**(1): 38-44.
- Perrais, D. and C. J. Merrifield (2005). "Dynamics of endocytic vesicle creation." Dev Cell **9**(5): 581-92.

- Petaja-Repo, U. E., M. Hogue, et al. (2001). "Newly synthesized human delta opioid receptors retained in the endoplasmic reticulum are retrotranslocated to the cytosol, deglycosylated, ubiquitinated, and degraded by the proteasome." *J Biol Chem* **276**(6): 4416-23.
- Peterson, M. G., N. Tanese, et al. (1990). "Functional domains and upstream activation properties of cloned human TATA binding protein." *Science* **248**(4963): 1625-30.
- Pfister, C., M. Chabre, et al. (1985). "Retinal S antigen identified as the 48K protein regulating light- dependent phosphodiesterase in rods." *Science* **228**(4701): 891-3.
- Ping, P., T. Anzai, et al. (1997). "Adenylyl cyclase and G protein receptor kinase expression during development of heart failure." *Am J Physiol* **273**(2 Pt 2): H707-17.
- Pippig, S., S. Andexinger, et al. (1995). "Sequestration and recycling of beta 2-adrenergic receptors permit receptor resensitization." *Mol Pharmacol* **47**(4): 666-76.
- Pitcher, J. A., J. Inglese, et al. (1992). "Role of beta gamma subunits of G proteins in targeting the beta-adrenergic receptor kinase to membrane-bound receptors." *Science* **257**(5074): 1264-7.
- Pitcher, J. A., J. J. Tesmer, et al. (1999). "Feedback inhibition of G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) activity by extracellular signal-regulated kinases." *J Biol Chem* **274**(49): 34531-4.
- Premont, R. T., A. Claing, et al. (1998). "beta2-Adrenergic receptor regulation by GIT1, a G protein-coupled receptor kinase-associated ADP ribosylation factor GTPase-activating protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(24): 14082-7.
- Premont, R. T., A. Claing, et al. (2000). "The GIT family of ADP-ribosylation factor GTPase-activating proteins. Functional diversity of GIT2 through alternative splicing." *J Biol Chem* **275**(29): 22373-80.
- Premont, R. T., J. Inglese, et al. (1995). "Protein kinases that phosphorylate activated G protein-coupled receptors." *Faseb J* **9**(2): 175-82.
- Presley, J. F., S. Mayor, et al. (1993). "The End2 mutation in CHO cells slows the exit of transferrin receptors from the recycling compartment but bulk membrane recycling is unaffected." *J Cell Biol* **122**(6): 1231-41.
- Ralph, M. R., R. G. Foster, et al. (1990). "Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period." *Science* **247**(4945): 975-8.
- Reppert, S. M. and D. R. Weaver (2002). "Coordination of circadian timing in mammals." *Nature* **418**(6901): 935-41.
- Rice, A. S. (2001). "Cannabinoids and pain." *Curr Opin Investig Drugs* **2**(3): 399-414.
- Robbins, J., S. J. Marsh, et al. (2006). "Probing the regulation of M (Kv7) potassium channels in intact neurons with membrane-targeted peptides." *J Neurosci* **26**(30): 7950-61.
- Robinson, T. E. and K. C. Berridge (1993). "The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction." *Brain Res Brain Res Rev* **18**(3): 247-91.
- Romero, J., E. Garcia-Palomero, et al. (1997). "Effects of chronic exposure to delta9-tetrahydrocannabinol on cannabinoid receptor binding and mRNA levels in several rat brain regions." *Brain Res Mol Brain Res* **46**(1-2): 100-8.
- Ross, E. M. and T. M. Wilkie (2000). "GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins." *Annu Rev Biochem* **69**: 795-827.
- Rubino, T., G. Forlani, et al. (2005). "Ras/ERK signalling in cannabinoid tolerance: from behaviour to cellular aspects." *J Neurochem* **93**(4): 984-91.
- Rubino, T., D. Vigano, et al. (2000). "Changes in the cannabinoid receptor binding, G protein coupling, and cyclic AMP cascade in the CNS of rats tolerant to and dependent on the synthetic cannabinoid compound CP55,940." *J Neurochem* **75**(5): 2080-6.
- Sachse, M., G. Ramm, et al. (2002). "Endosomes: multipurpose designs for integrating

- housekeeping and specialized tasks." Histochem Cell Biol **117**(2): 91-104.
- Sakmar, T. P. (1998). "Rhodopsin: a prototypical G protein-coupled receptor." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **59**: 1-34.
- Sano, T., K. Ohyama, et al. (1997). "A domain for G protein coupling in carboxyl-terminal tail of rat angiotensin II receptor type 1A." J Biol Chem **272**(38): 23631-6.
- Santini, F., R. B. Penn, et al. (2000). "Selective recruitment of arrestin-3 to clathrin coated pits upon stimulation of G protein-coupled receptors." J Cell Sci **113** (Pt 13): 2463-70.
- Sarnago, S., A. Elorza, et al. (1999). "Agonist-dependent phosphorylation of the G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) by Src tyrosine kinase." J Biol Chem **274**(48): 34411-6.
- Sassone-Corsi, P. (1995). "Transcription factors responsive to cAMP." Annu Rev Cell Dev Biol **11**: 355-77.
- Schmidlin, F., O. Dery, et al. (2001). "Dynamin and Rab5a-dependent trafficking and signaling of the neurokinin 1 receptor." J Biol Chem **276**(27): 25427-37.
- Seachrist, J. L., P. H. Anborgh, et al. (2000). "beta 2-adrenergic receptor internalization, endosomal sorting, and plasma membrane recycling are regulated by rab GTPases." J Biol Chem **275**(35): 27221-8.
- Seachrist, J. L., S. A. Laporte, et al. (2002). "Rab5 association with the angiotensin II type 1A receptor promotes Rab5 GTP binding and vesicular fusion." J Biol Chem **277**(1): 679-85.
- Self, D. W. and E. J. Nestler (1995). "Molecular mechanisms of drug reinforcement and addiction." Annu Rev Neurosci **18**: 463-95.
- Shapiro, M. J. and S. R. Coughlin (1998). "Separate signals for agonist-independent and agonist-triggered trafficking of protease-activated receptor 1." J Biol Chem **273**(44): 29009-14.
- Shapiro, R. A. and N. M. Nathanson (1989). "Deletion analysis of the mouse m1 muscarinic acetylcholine receptor: effects on phosphoinositide metabolism and down-regulation." Biochemistry **28**(22): 8946-50.
- Sheng, M. and C. Sala (2001). "PDZ domains and the organization of supramolecular complexes." Annu Rev Neurosci **24**: 1-29.
- Shenoy, S. K., M. T. Drake, et al. (2006). "beta-arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the beta2 adrenergic receptor." J Biol Chem **281**(2): 1261-73.
- Shenoy, S. K. and R. J. Lefkowitz (2003). "Trafficking patterns of beta-arrestin and G protein-coupled receptors determined by the kinetics of beta-arrestin deubiquitination." J Biol Chem **278**(16): 14498-506.
- Shenoy, S. K., P. H. McDonald, et al. (2001). "Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin." Science **294**(5545): 1307-13.
- Shizgal, P., L. S. Sklar, et al. (1977). "Differential motor effects of intraventricular infusion of morphine and etonitazene." Pharmacol Biochem Behav **6**(1): 17-20.
- Shockley, M. S., N. T. Burford, et al. (1997). "Residues specifically involved in down-regulation but not internalization of the m1 muscarinic acetylcholine receptor." J Neurochem **68**(2): 601-9.
- Shug, S. A., D. Zech, et al. (1992). "Adverse effects of systemic opioid analgesics." Drug Safety **7**: 200-213.
- Sibley, D. R., F. J. Monsma, Jr., et al. (1993). "Molecular neurobiology of dopaminergic receptors." Int Rev Neurobiol **35**: 391-415.
- Sim-Selley, L. J. and B. R. Martin (2002). "Effect of chronic administration of R-(+)-[2,3-Dihydro-5-methyl-3-[(morpholinyl)methyl]pyrrolo[1,2,3-de]-1,4-benzoxazinyl]-(1-naphthalenyl)methanone mesylate (WIN55,212-2) or delta(9)-tetrahydrocannabinol on

- cannabinoid receptor adaptation in mice." *J Pharmacol Exp Ther* **303**(1): 36-44.
- Simonin, F., P. Karcher, et al. (2004). "Identification of a novel family of G protein-coupled receptor associated sorting proteins." *J Neurochem* **89**(3): 766-75.
- Sneddon, W. B., E. L. Barry, et al. (1998). "Regulation of renal parathyroid hormone receptor expression by 1, 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid." *Cell Physiol Biochem* **8**(5): 261-77.
- Sonnichsen, B., S. De Renzi, et al. (2000). "Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11." *J Cell Biol* **149**(4): 901-14.
- Sousa, F. C., P. B. Gomes, et al. (1999). "Early withdrawal from repeated cocaine administration upregulates muscarinic and dopaminergic D2-like receptors in rat neostriatum." *Pharmacol Biochem Behav* **62**(1): 15-20.
- Spanagel, R., G. Pendyala, et al. (2005). "The clock gene *Per2* influences the glutamatergic system and modulates alcohol consumption." *Nat Med* **11**(1): 35-42.
- Steeves, T. D., D. P. King, et al. (1999). "Molecular cloning and characterization of the human *CLOCK* gene: expression in the suprachiasmatic nuclei." *Genomics* **57**(2): 189-200.
- Stefanski, R., B. Ziolkowska, et al. (2007). "Active versus passive cocaine administration: differences in the neuroadaptive changes in the brain dopaminergic system." *Brain Res* **1157**: 1-10.
- Stewart, J. and A. Badiani (1993). "Tolerance and sensitization to the behavioral effects of drugs." *Behav Pharmacol* **4**(4): 289-312.
- Stoffel, R. H., 3rd, J. A. Pitcher, et al. (1997). "Targeting G protein-coupled receptor kinases to their receptor substrates." *J Membr Biol* **157**(1): 1-8.
- Stoffel, R. H., R. R. Randall, et al. (1994). "Palmitoylation of G protein-coupled receptor kinase, GRK6. Lipid modification diversity in the GRK family." *J Biol Chem* **269**(45): 27791-4.
- Su, Y., S. K. Raghuwanshi, et al. (2005). "Altered CXCR2 signaling in beta-arrestin-2-deficient mouse models." *J Immunol* **175**(8): 5396-402.
- Swanson, L. W. (1982). "The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat." *Brain Res Bull* **9**(1-6): 321-53.
- Swift, S., A. J. Leger, et al. (2006). "Role of the PAR1 receptor 8th helix in signaling: the 7-8-1 receptor activation mechanism." *J Biol Chem* **281**(7): 4109-16.
- Takai, Y., T. Sasaki, et al. (2001). "Small GTP-binding proteins." *Physiol Rev* **81**(1): 153-208.
- Takano, A., Y. Isojima, et al. (2004). "Identification of mPer1 phosphorylation sites responsible for the nuclear entry." *J Biol Chem* **279**(31): 32578-85.
- Tanowitz, M. and M. von Zastrow (2003). "A novel endocytic recycling signal that distinguishes the membrane trafficking of naturally occurring opioid receptors." *J Biol Chem* **278**(46): 45978-86.
- Tappe-Theodor, A., N. Agarwal, et al. (2007). "A molecular basis of analgesic tolerance to cannabinoids." *J Neurosci* **27**(15): 4165-77.
- Taylor, D. A. and W. W. Fleming (2001). "Unifying perspectives of the mechanisms underlying the development of tolerance and physical dependence to opioids." *J Pharmacol Exp Ther* **297**(1): 11-18.
- Tetsuka, M., Y. Saito, et al. (2004). "The basic residues in the membrane-proximal C-terminal tail of the rat melanin-concentrating hormone receptor 1 are required for receptor function." *Endocrinology* **145**(8): 3712-23.
- Thomas, M. J. and R. C. Malenka (2003). "Synaptic plasticity in the mesolimbic dopamine

- system." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **358**(1432): 815-9.
- Thompson, D., M. Pusch, et al. (2007). "Changes in G protein-coupled receptor sorting protein affinity regulate postendocytic targeting of G protein-coupled receptors." J Biol Chem **282**(40): 29178-85.
- Toh, K. L., C. R. Jones, et al. (2001). "An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome." Science **291**(5506): 1040-3.
- Touhara, K., J. Inglese, et al. (1994). "Binding of G protein beta gamma-subunits to pleckstrin homology domains." J Biol Chem **269**(14): 10217-20.
- Touitou, Y. and E. Haus (1994). "Aging of the human endocrine and neuroendocrine time structure." Ann N Y Acad Sci **719**: 378-97.
- Travnickova-Bendova, Z., N. Cermakian, et al. (2002). "Bimodal regulation of mPeriod promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(11): 7728-33.
- Trejo, J. and S. R. Coughlin (1999). "The cytoplasmic tails of protease-activated receptor-1 and substance P receptor specify sorting to lysosomes versus recycling." J Biol Chem **274**(4): 2216-24.
- Trischler, M., W. Stoorvogel, et al. (1999). "Biochemical analysis of distinct Rab5- and Rab11-positive endosomes along the transferrin pathway." J Cell Sci **112** (Pt 24): 4773-83.
- Tulipano, G., R. Stumm, et al. (2004). "Differential beta-arrestin trafficking and endosomal sorting of somatostatin receptor subtypes." J Biol Chem **279**(20): 21374-82.
- Ungerer, M., M. Bohm, et al. (1993). "Altered expression of beta-adrenergic receptor kinase and beta 1-adrenergic receptors in the failing human heart." Circulation **87**(2): 454-63.
- Ungerer, M., G. Parruti, et al. (1994). "Expression of beta-arrestins and beta-adrenergic receptor kinases in the failing human heart." Circ Res **74**(2): 206-13.
- Ushijima, I., M. A. Carino, et al. (1995). "Involvement of D1 and D2 dopamine systems in the behavioral effects of cocaine in rats." Pharmacol Biochem Behav **52**(4): 737-41.
- Vargas, G. A. and M. Von Zastrow (2004). "Identification of a novel endocytic recycling signal in the D1 dopamine receptor." J Biol Chem **279**(36): 37461-9.
- Vielhaber, E., E. Eide, et al. (2000). "Nuclear entry of the circadian regulator mPER1 is controlled by mammalian casein kinase I epsilon." Mol Cell Biol **20**(13): 4888-99.
- Vives, E., P. Brodin, et al. (1997). "A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus." J Biol Chem **272**(25): 16010-7.
- Vogler, O., G. S. Bogatkewitsch, et al. (1998). "Receptor subtype-specific regulation of muscarinic acetylcholine receptor sequestration by dynamin. Distinct sequestration of m2 receptors." J Biol Chem **273**(20): 12155-12160.
- Vogler, O., B. Nolte, et al. (1999). "Regulation of muscarinic acetylcholine receptor sequestration and function by beta-arrestin." J Biol Chem **274**(18): 12333-8.
- Volkow, N. D., J. S. Fowler, et al. (1993). "Decreased dopamine D2 receptor availability is associated with reduced frontal metabolism in cocaine abusers." Synapse **14**(2): 169-77.
- Volpicelli, L. A. and A. I. Levey (2004). "Muscarinic acetylcholine receptor subtypes in cerebral cortex and hippocampus." Prog Brain Res **145**: 59-66.
- Walker, J. M. and A. G. Hohmann (2005). "Cannabinoid mechanisms of pain suppression." Handb Exp Pharmacol **168**: 509-54.
- Wang, B., A. Bisello, et al. (2007). "NHERF1 regulates parathyroid hormone receptor membrane retention without affecting recycling." J Biol Chem **282**(50): 36214-22.
- Wang, H. Y. and C. C. Malbon (2004). "Wnt-frizzled signaling to G-protein-coupled effectors." Cell Mol Life Sci **61**(1): 69-75.

- Wang, Y., Y. Zhou, et al. (2002). "Down-regulation of protease-activated receptor-1 is regulated by sorting nexin 1." Mol Biol Cell **13**(6): 1965-76.
- Waugh, M. G., R. A. Challiss, et al. (1999). "Agonist-induced desensitization and phosphorylation of m1-muscarinic receptors." Biochem J **338** (Pt 1): 175-83.
- Weeks, J. R. (1962). "Experimental morphine addiction: method for automatic intravenous injections in unrestrained rats." Science **138**: 143-4.
- Weinman, E. J., R. A. Hall, et al. (2006). "The association of NHERF adaptor proteins with G protein-coupled receptors and receptor tyrosine kinases." Annu Rev Physiol **68**: 491-505.
- Welsh, D. K., D. E. Logothetis, et al. (1995). "Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms." Neuron **14**(4): 697-706.
- Wente, W., T. Stroth, et al. (2005). "Interactions with PDZ domain proteins PIST/GOPC and PDZK1 regulate intracellular sorting of the somatostatin receptor subtype 5." J Biol Chem **280**(37): 32419-25.
- Werbonat, Y., N. Kleutges, et al. (2000). "Essential role of dynamin in internalization of M2 muscarinic acetylcholine and angiotensin AT1A receptors." J Biol Chem **275**(29): 21969-74.
- Wheeler, D., W. B. Sneddon, et al. (2007). "NHERF-1 and the cytoskeleton regulate the traffic and membrane dynamics of G protein-coupled receptors." J Biol Chem **282**(34): 25076-87.
- Whistler, J. L., J. Enquist, et al. (2002). "Modulation of postendocytic sorting of G protein-coupled receptors." Science **297**(5581): 615-20.
- Winklbauer, R., A. Medina, et al. (2001). "Frizzled-7 signalling controls tissue separation during *Xenopus* gastrulation." Nature **413**(6858): 856-60.
- Winstel, R., S. Freund, et al. (1996). "Protein kinase cross-talk: membrane targeting of the beta-adrenergic receptor kinase by protein kinase C." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(5): 2105-9.
- Winter, E. E. and C. P. Ponting (2005). "Mammalian BEX, WEX and GASP genes: coding and non-coding chimaerism sustained by gene conversion events." BMC Evol Biol **5**: 54.
- Wolf, M. E. (2002). "Addiction: making the connection between behavioral changes and neuronal plasticity in specific pathways." Mol Interv **2**(3): 146-57.
- Wolfe, B. L., A. Marchese, et al. (2007). "Ubiquitination differentially regulates clathrin-dependent internalization of protease-activated receptor-1." J Cell Biol **177**(5): 905-16.
- Woolverton, W. L. and K. M. Johnson (1992). "Neurobiology of cocaine abuse." Trends Pharmacol Sci **13**(5): 193-200.
- Wu, G., J. G. Krupnick, et al. (1997). "Interaction of arrestins with intracellular domains of muscarinic and alpha2-adrenergic receptors." J Biol Chem **272**(28): 17836-42.
- Xia, Z., J. A. Gray, et al. (2003). "A direct interaction of PSD-95 with 5-HT2A serotonin receptors regulates receptor trafficking and signal transduction." J Biol Chem **278**(24): 21901-8.
- Xu, J., M. Paquet, et al. (2001). "beta 1-adrenergic receptor association with the synaptic scaffolding protein membrane-associated guanylate kinase inverted-2 (MAGI-2). Differential regulation of receptor internalization by MAGI-2 and PSD-95." J Biol Chem **276**(44): 41310-7.
- Xu, M., Y. Guo, et al. (2000). "Behavioral responses to cocaine and amphetamine administration in mice lacking the dopamine D1 receptor." Brain Res **852**(1): 198-207.
- Xu, M., X. T. Hu, et al. (1994). "Elimination of cocaine-induced hyperactivity and dopamine-

- mediated neurophysiological effects in dopamine D1 receptor mutant mice." Cell **79**(6): 945-55.
- Yamashiro, D. J., B. Tycko, et al. (1984). "Segregation of transferrin to a mildly acidic (pH 6.5) para-Golgi compartment in the recycling pathway." Cell **37**(3): 789-800.
- Yi, X., R. Bouley, et al. (2007). "Alix (AIP1) is a vasopressin receptor (V2R)-interacting protein that increases lysosomal degradation of the V2R." Am J Physiol Renal Physiol **292**(5): F1303-13.
- Yildiz, O., M. Doi, et al. (2005). "Crystal structure and interactions of the PAS repeat region of the Drosophila clock protein PERIOD." Mol Cell **17**(1): 69-82.
- Zamah, A. M., M. Delahunty, et al. (2002). "Protein kinase A-mediated phosphorylation of the beta 2-adrenergic receptor regulates its coupling to Gs and Gi. Demonstration in a reconstituted system." J Biol Chem **277**(34): 31249-56.
- Zeigler, S., J. Lipton, et al. (1991). "Continuous cocaine administration produces persisting changes in brain neurochemistry and behavior." Brain Res **552**(1): 27-35.
- Zhang, J., L. S. Barak, et al. (1999). "Cellular trafficking of G protein-coupled receptor/beta-arrestin endocytic complexes." J Biol Chem **274**(16): 10999-1006.
- Zhang, J., L. S. Barak, et al. (1997). "A central role for beta-arrestins and clathrin-coated vesicle-mediated endocytosis in beta2-adrenergic receptor resensitization. Differential regulation of receptor resensitization in two distinct cell types." J Biol Chem **272**(43): 27005-14.
- Zhang, J., S. G. F. Ferguson, et al. (1996). "Dynamin and b-arrestin reveal distinct mechanisms for G protein-coupled receptor internalization." J. Biol. Chem. **271**(31): 18302-18305.
- Zhang, W., M. Yamada, et al. (2002). "Multiple muscarinic acetylcholine receptor subtypes modulate striatal dopamine release, as studied with M1-M5 muscarinic receptor knock-out mice." J Neurosci **22**(15): 6347-52.
- Zheng, B., U. Albrecht, et al. (2001). "Nonredundant roles of the mPer1 and mPer2 genes in the mammalian circadian clock." Cell **105**(5): 683-94.
- Zheng, B., D. W. Larkin, et al. (1999). "The mPer2 gene encodes a functional component of the mammalian circadian clock." Nature **400**(6740): 169-73.
- Zhong, M., A. M. Navratil, et al. (2004). "Residues in the hydrophilic face of putative helix 8 of oxytocin receptor are important for receptor function." Biochemistry **43**(12): 3490-8.
- Zimmermann, T., J. Rietdorf, et al. (2003). "Spectral imaging and its applications in live cell microscopy." FEBS Lett **546**(1): 87-92.
- Zocchi, A. and A. Pert (1994). "Alterations in striatal acetylcholine overflow by cocaine, morphine, and MK-801: relationship to locomotor output." Psychopharmacology (Berl) **115**(3): 297-304.

Résumé

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) constituent une vaste famille de protéines située à la surface de la cellule et assurent la communication entre les cellules de notre organisme. Ce sont des cibles thérapeutiques privilégiées, mais leur stimulation prolongée conduit à des adaptations, en particulier le développement de la tolérance. La tolérance, qui peut se définir comme une baisse de l'efficacité d'un composé au cours du temps, est bien connue des cliniciens dans le cas de traitements prolongés de nombreuses pathologies avec des médicaments ayant pour cibles les RCPG. La compréhension des mécanismes impliqués dans ces phénomènes adaptatifs constitue ainsi un défi majeur qui pourrait conduire au développement de nouveau traitement visant à limiter la tolérance. C'est dans ce contexte que nous avons récemment identifié une nouvelle famille de protéines interagissant avec les RCPG. Cette famille, appelée GASP, aurait une fonction importante dans la dégradation des RCPG, phénomène considéré comme un élément clé du développement de la tolérance *in vivo*. Durant ma thèse, je me suis intéressé aux régions des GASP et des RCPG cruciales pour l'interaction de ces deux types de protéines, identifiant ainsi un nouveau motif d'interaction protéine-protéine et développant un petit peptide capable d'inhiber cette interaction. Je me suis également intéressé à l'interaction de GASP-1 et -2 avec le récepteur muscarinique M₁ à l'acétylcholine, et ses conséquences sur la dégradation de ce récepteur, montrant ainsi pour la première fois l'implication des GASP dans la régulation du trafic intracellulaire des RCPG à recyclage rapide. Finalement, j'ai exploré le rôle physiologique de GASP-1 à l'aide d'un modèle animal déficient en cette protéine. Dans un premier temps, les mécanismes adaptatifs, comportementaux et biochimiques, liés à la consommation de cocaïne ont été étudiés, montrant une diminution de l'effet hyperlocomoteur de la cocaïne chez les animaux mutants. Ces animaux présentent également une difficulté à acquérir un comportement d'autoadministration de la cocaïne qui s'accompagne d'une baisse de la densité en récepteurs dopaminergiques et muscariniques dans le striatum. Dans un deuxième temps, la régulation des rythmes circadiens a été étudiée et bien qu'aucune différence en terme de régulation du rythme de veille-éveil n'ait été décelée entre les animaux sauvages et mutants, une interaction entre les GASP et les protéines horloges Period conduisant à la modification de leur profil de localisation subcellulaire a pu être mise en évidence.