

Université de Montréal

Voies de signalisation non-canoniques du récepteur V2 de la vasopressine

Par
Joris Zhou

Département de Biochimie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de M.Sc.
en Biochimie

Aout 2013

© Joris Zhou, 2013

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Voies de signalisation non-canoniques du récepteur V2 de la
vasopressine**

présenté par :

Joris Zhou

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Luis Rokeach, président-rapporteur

Michel Bouvier, directeur de recherche

Denis DeBlois, membre du jury

Résumé

Le récepteur V2 (V2R) de la vasopressine est un récepteur couplé aux protéines G (RCPG), jouant un rôle fondamental dans le maintien de l'homéostasie hydrosodique. À l'instar de nombreux RCPGs, il est capable d'interagir avec plusieurs types de protéines G hétérotrimériques et possède des voies de signalisation peu explorées aux mécanismes mal compris. Ces voies non canoniques font l'objet des travaux exposés dans ce mémoire. Il s'agit d'explorer les caractéristiques et mécanismes de la signalisation de V2R via G12, et de la voie d'activation d'ERK 1/2 par transactivation du récepteur de l'*insulin-like growth factor 1*, IGF1R.

Par des études de transfert d'énergie de résonance de bioluminescence (BRET), nous exposons la capacité de V2R à interagir avec la sous-unité G α 12 ainsi que la modulation de la conformation de l'hétérotrimère G12 par l'agoniste de V2R, l'arginine-vasopressine. Ces travaux dévoilent également la modulation de l'interaction entre G α 12 et son effecteur classique RhoA, suggérant un engagement de RhoA, ainsi que la potentialisation via G α 12 de la production d'AMP cyclique. À l'aide de diverses méthodes d'inhibition sélective, nos résultats précisent les mécanismes de la transactivation. Ils supportent notamment le rôle initiateur de l'activation de Src par V2R et l'absence d'implication des ligands connus d'IGF1R dans la transactivation. La métalloprotéase MMP 3 apparaît par ailleurs comme un bon candidat pour réguler la transactivation.

Ce projet met en lumière des modes de signalisation peu explorés de V2R, dont l'implication physiologique et physiopathologique pourrait s'avérer significative, au-delà d'un apport fondamental dans la compréhension de la signalisation des RCPGs.

Mots clés : voies de signalisation non-canoniques ; récepteur V2 de la vasopressine, V2R ; récepteur couplé aux protéines G, RCPG ; G α 12 ; adénosine monophosphate cyclique, AMPc ; transactivation ; ERK 1/2 ; *Insulin-like growth factor 1 receptor*, IGF1R ; métalloprotéase ; rein

Abstract

Vasopressin V2 receptor is a G protein coupled receptor (GPCR) responsible for the homeostatic regulation of water and sodium recapture from the urine to the bloodstream. Akin to numerous GPCRs, this receptor can interact with more than one heterotrimeric G protein subtype, and is still associated with some poorly explored signaling pathways with indefinite mechanisms. These non-canonical pathways are the focus of this project. This work aims at unveiling the characteristics and mechanisms underlying G12 mediated signaling by V2R and ERK 1/2 activation through the transactivation of the tyrosine kinase Insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R).

Using bioluminescence resonance energy transfer (BRET) experiments, we reveal V2R's ability to interact with the G α 12 subunit, as well as the modulation of G12 heterotrimer's conformation in response to V2R agonist arginine vasopressin (AVP). AVP-induced modulation of G α 12's interaction with its classical effector RhoA upon stimulation with AVP suggests the engagement of RhoA, and our data also reveals that G α 12 potentiates AVP-induced cAMP production. Using diverse selective inhibition strategies, our results further define the mechanism of transactivation. Our data support a starter position of AVP-induced Src activation and discard IGF1R known agonists as the potential autocrine/paracrine factor responsible for IGF1R activation. Furthermore, our results suggest that the metalloproteinase MMP 3 is a good candidate for IGF1R transactivation.

This project sheds light on lesser known signaling pathways involving V2R, which could reveal important on a physiological and pathophysiological scale, besides bringing a better understanding of the principles of GPCR signaling.

Key words: non-canonical signaling pathways; Vasopressin V2 receptor, V2R; G protein coupled receptor, GPCR; G α 12 ; cyclic AMP, cAMP; transactivation; ERK 1/2; Insulin-like growth factor 1 receptor, IGF1R; metalloproteinase; kidney

Table des matières

1. Introduction.....	1
1.1. Propos introductifs	1
1.2. Signalisation canonique des RCPGs.....	2
1.2.1. Description générale.....	2
1.2.2. Protéines G hétérotrimériques.....	3
1.2.3. β -arrestines et kinases des RCPGs (GRKs).....	6
1.3. Signalisation canonique de V2R.....	7
1.4. Signalisation non canonique des RCPG.....	9
1.4.1. Signalisation via multiples protéines G, et G-indépendante.....	9
1.4.2. Transactivation des récepteurs tyrosine kinases.....	10
1.4.3. Métalloprotéases.....	13
1.5. Signalisation non canonique de V2R.....	14
1.5.1. Signalisation via multiples protéines G.....	14
1.5.2. Transactivation de l'IGF1R par V2R.....	16
1.5.2.1. Historique.....	16
1.5.2.1.1. <i>Propos introductifs.....</i>	<i>16</i>
1.5.2.1.2. <i>Charest et Bouvier 2003 : implication de la β-</i>	
<i>arrestine.....</i>	<i>16</i>
1.5.2.1.3. <i>Charest et al. 2007 : étude des médiateurs de l'activation d'ERK</i>	
<i>et signes de transactivation.....</i>	<i>17</i>
1.5.2.1.4. <i>Oigny et al. 2012 : identification du RTK et séquence des</i>	
<i>événements de signalisation.....</i>	<i>18</i>
1.5.2.2. IGF1R.....	24
1.5.2.2.1. <i>Concepts classiques de signalisation.....</i>	<i>24</i>
1.5.2.2.2. <i>Signalisation par la β-arrestine 1.....</i>	<i>28</i>
1.6. Le BRET.....	31
2. Objectifs spécifiques.....	33
3. Matériel et méthodes.....	34
3.1. Matériel.....	34

3.2. Vecteurs d'expression.....	34
3.3. Culture cellulaire et transfection.....	35
3.4. BRET.....	35
3.5. Essai EPAC pour mesurer l'AMPc.....	37
3.6. Immunobuvardage.....	37
3.7. AlphaScreen.....	38
3.8. Analyse de données.....	38
4. Résultats.....	39
4.1. Couplage de Gα12 avec V2R.....	39
4.1.1. Étude de l'interaction entre V2R et Gα12.....	39
4.1.2. Étude de la modulation de l'hétérotrimère G12 par l'AVP.....	42
4.1.3. Étude de l'interaction de Gα12 avec RhoA et p115-RGS.....	45
4.1.4. Impact de Gα12 sur la synthèse d'AMPc.....	48
4.1.5. Évaluation du rôle de RhoA dans l'effet de Gα12 l'AMPc.....	51
4.2. Activation d'ERK 1/2 par transactivation d'IGF1R.....	55
4.2.1. Confirmation de l'implication d'IGF1R.....	55
4.2.2. Confirmation de l'implication d'une métalloprotéase.....	58
4.2.3. Étude de l'autophosphorylation d'IGF1R.....	60
4.2.4. Cinétique d'inhibition de la réponse ERK 1/2 par l'AG1024.....	63
4.2.5. Étude de compatibilité des cinétiques d'activation de Src et d'ERK.....	65
4.2.6. Étude des médiateurs potentiels de l'activation de Src.....	68
4.2.7. Recherche de la métalloprotéase impliquée.....	71
4.2.8. Recherche du facteur d'activation d'IGF1R.....	77
5. Discussion.....	79
5.1. Modulation du couplage de V2R avec Gas et Gα12.....	79
5.2. État d'activation de Gα12 en réponse à l'AVP.....	81
5.3. Régulation par Gα12 de la production d'AMPc.....	82
5.4. Les implications de la transactivation d'IGF1R par V2R.....	84
5.5. La recherche des inconnues.....	87
5.6. Implications physiologiques et physiopathologiques.....	90
6. Conclusion et perspectives.....	93

7. Bibliographie.....96

Liste des tableaux

Tableau I : Affinités relatives des ligands et récepteurs de la famille de l'insuline.....25

Liste des figures

Figure 1 : Principes généraux de régulation de l'activité d'une protéine G par un RCPG.....	5
Figure 2 : Régulation de l'exocytose des vésicules contenant l'AQP2 par V2R.....	8
Figure 3 : Modèle de transactivation du récepteur tyrosine kinase EGFR par un GPCR selon un mode inside-out ou triple passage membranaire.....	12
Figure 4 : Expériences de transfert de surnageant déterminant la séquence des évènements de transactivation.....	20
Figure 5 : Modèle proposé du mécanisme de transactivation d'IGF1R par V2R.....	23
Figure 6 : Représentation simplifiée des domaines fonctionnels d'IGF1R.....	26
Figure 7 : Représentation simplifiée de la signalisation par IGF1R.....	27
Figure 8 : Fonctions de la β -arrestine 1 en aval d'IGF1R.....	30
Figure 9 : Étude de l'interaction entre V2R et $G\alpha_{12}$	41
Figure 10 : Modulation de l'hétérotrimère G12 en réponse à l'AVP.....	44
Figure 11 : Étude de l'interaction de $G\alpha_{12}$ avec ses effecteurs en réponse à l'AVP.....	47
Figure 12 : Impact de $G\alpha_{12}$ sur la synthèse d'AMPC en aval de V2R.....	50
Figure 13 : Évaluation du rôle de RhoA dans l'effet de $G\alpha_{12}$ sur la production d'AMPC en réponse à l'AVP.....	53
Figure 14 : Confirmation de l'implication d'IGF1R dans l'activation d'ERK en réponse à l'AVP.....	57
Figure 15 : Confirmation de l'implication d'une métalloprotéase dans l'activation d'ERK via transactivation d'IGF1R par V2R.....	59
Figure 16 : Étude de l'autophosphorylation d'IGF1R en réponse à l'AVP.....	62
Figure 17 : Cinétique d'inhibition par l'AG1024 de la phosphorylation d'ERK 1/2 en réponse à l'AVP.....	64

Figure 18 : Étude de compatibilité des cinétiques d'activation de Src et d'ERK en réponse à l'AVP.....	67
Figure 19 : Étude des médiateurs potentiels de l'activation de Src induite par l'AVP.....	70
Figure 20 : Recherche de la métalloprotéase impliquée dans la transactivation d'IGF1R par V2R.....	75
Figure 21 : Recherche du facteur d'activation d'IGF1R entrant en jeu dans la transactivation de ce récepteur par V2R.....	78

Liste des abréviations

ADAM : *a disintegrin and metalloproteinase* (une désintégrine et métalloprotéase)

ADAMTS : ADAM avec motif thrombospondine

ADH : hormone antidiurétique

ADPKD : polykystose rénale autosomique dominante

AKAP-Lbc : *A-kinase anchoring protein Lbc* (protéine d'ancrage de la kinase A Lbc)

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

AP2 : *adaptor protein 2* (protéine adaptrice 2)

AQP2 : aquaporine 2

AS : AlphaScreen ou *Luminescent Oxygen Channeling Immunoassay*

ATP : adénosine triphosphate

AVP : arginine-vasopressine

BRET : transfert d'énergie de résonance de bioluminescence

CTX : *cholera toxine* (toxine cholérique)

dDAVP : desmopressine

EGF : *epidermal growth factor* (facteur de croissance épidermique)

EGFR : récepteur de l'*epidermal growth factor* (récepteur du facteur de croissance épidermique)

EPAC : *exchange protein activated by cAMP* (protéine d'échange activée par l'AMPc)

ERK : *extracellular signal-regulated kinases* (kinases régulées par un signal extracellulaire)

FP : protéine fluorescente

GAP : *GTPase activating protein* (protéine d'activation de l'activité GTPase)

GDP : guanosine diphosphate

GEF : *guanine nucleotide exchange factor* (facteur d'échange de nucléotide guanine)

GFP : green fluorescent protein (protéine fluorescente verte)

Grb2 : *growth factor receptor bound protein 2* (protéine liée à un récepteur de facteur de croissance 2)

GRK : *G protein coupled receptors kinases* (kinase des récepteurs couplés aux protéines G)

GTP : guanosine triphosphate

HB-EGF : *heparin binding EGF* (EGF liant l'héparine)

HEK293 : cellules embryonnaires de rein 293

HRP : *Horseradish peroxidase*

IGF : *insulin-like growth factor*

IGF1R : *insulin-like growth factor 1 receptor* (récepteur du facteur de croissance *insulin-like 1*)

IGF2R : *insulin-like growth factor 2 receptor* (récepteur de l'*insulin-like growth factor 2*)

IGFBP : *IGF binding protein* (protéine de liaison à l'IGF)

InsR : récepteur de l'insuline

InsRR : *insulin receptor-related receptor* (récepteur apparenté au récepteur de l'insuline)

IRS-1 : *insulin receptor substrate 1* (substrat 1 du récepteur de l'insuline)

LARG : *leukemia-associated Rho guanine nucleotide exchange factor* (facteur d'échange du nucléotide guanine de Rho associé à la leucémie)

MAPK : *mitogen-activated protein kinase* (protéine kinase activée par mitogène)

MDM2 : *mouse double minute 2 homolog*

MMP : *matrix metalloproteinase* (métalloprotéase de matrice)

PAFR : *platelet activation factor receptor* (récepteur du facteur d'activation des plaquettes)

PDGFR : *platelet derived growth factor receptor* (récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes)

p-ERK : forme phosphorylée active d'ERK

PI3K : *phosphoinositide 3 kinase* (kinase du phosphoinositide 3)

PIP2 : phosphatidyl inositol biphosphate

PIP3 : phosphatidyl inositol triphosphate

PKA : protéine kinase AMP cyclique dépendante

PKC : protéine kinase C

PLC β : phospholipase C β

pp2A : phosphoprotéine phosphatase 2A

pp5 : phosphoprotéine phosphatase 5

PPP : picropodophylline

PTEN : *phosphatase and tensin homolog* (homologue phosphatase et tensine)

PTP : protéine-tyrosine phosphatase

PTX : toxine pertussique

RCPG : récepteur couplé aux protéines G

RGS : *regulators of G protein signaling* (régulateurs de la signalisation des protéines G)

Rluc : *Renilla* luciférase

RTK : récepteur tyrosine kinase

Shc : *SH2 domain containing protein* (protéine contenant un domaine SH2)

siARN : petit acide ribonucléique interférent

SOS1 : *son of sevenless*

TXA2 : thromboxane A2

V2R : récepteur V2 de la vasopressine

VEGFR : *vasothelial endothelial growth factor receptor* (récepteur du facteur de croissance vasothélial et endothélial)

β 2AR : récepteur β 2 adrénergique

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier mon directeur de recherche, le Dr. Michel Bouvier, pour m'avoir accordé sa confiance, pour son enthousiasme, sa patience infinie, et sa délicatesse. Merci pour l'inspiration que vous suscitez si bien et pour avoir contribué à faire de moi un meilleur scientifique. Merci pour votre ouverture d'esprit et vos leçons d'optimisme. Je voudrais également remercier le Dr. Muriel Aubry pour ses mots réconfortants et son support moral dans les moments de doute.

Je remercie tous les membres du laboratoire avec qui j'ai eu le grand plaisir de collaborer et dont j'ai beaucoup appris. Un merci particulier à Billy Breton qui m'a mis le pied à l'étrier et m'a montré ce qu'est la productivité et la passion au travail, en plus d'avoir été un excellent mentor. Merci à mes nouveaux amis et collègues de laboratoire, Julie, Benjamin, Justine, Arthur, Brigitte, Wayne, Éric, Nick, Alex, Thomas et ceux que j'oublie de citer, pour leur bonne humeur communicative qui rend les journées plus légères, et pour tout le reste.

Merci enfin à mes parents, sans qui je ne serais rien, pour leur soutien permanent et leur affection inconditionnelle. Merci à Sara et Lydia de me supporter chaque jour à la maison et d'être là pour moi.

Finalement, je souhaite remercier les organismes m'ayant soutenu financièrement durant ma maîtrise : le FRSQ qui m'a octroyé une bourse de maîtrise de 2 ans, la faculté des études supérieures qui m'a accordé une bourse complémentaire d'excellence, et la Fondation J.A. DeSève qui m'a offert une bourse d'excellence.

1. Introduction

1.1. Propos introductifs

Les récepteurs à 7 segments transmembranaires, classiquement regroupés sous le terme de récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs), constituent une très vaste famille de récepteurs membranaires assurant la transduction d'une grande variété de signaux extracellulaires vers l'intérieur de la cellule, c'est-à-dire la conversion d'un signal extracellulaire en une réponse intracellulaire se traduisant en effet physiologique. La grande diversité de ces récepteurs et leur implication dans une multitude de processus physiologiques et pathologiques en font une cible privilégiée des médicaments actuels, représentant plus de 30% des traitements pharmacologiques (Siehler 2008), et justifient l'étude extensive de leurs rôles, structures, voies de signalisation, et des mécanismes moléculaires qui les sous-tendent. L'importance des recherches effectuées dans le domaine a récemment été consacrée par l'attribution du prix Nobel de chimie à Robert Lefkowitz et Brian Kobilka dont les travaux ont notamment permis le premier clonage d'un RCPG, ainsi que l'élucidation structurale du mécanisme d'activation d'une protéine G en aval du récepteur β 2-adrénérique (Southwood, Khalaf et al. 1975; Kobilka, Dixon et al. 1987; Rasmussen, DeVree et al. 2011).

Le récepteur V2R de la vasopressine appartient à cette superfamille des RCPGs. Exprimé au niveau des membranes basolatérales des cellules principales de l'épithélium des tubes collecteurs des reins (Tribollet, Barberis et al. 1988; Ostrowski, Lolait et al. 1992; Ostrowski, Young et al. 1993), il joue un rôle capital dans le maintien de l'homéostasie hydrosodique, en permettant notamment la recapture de l'eau à partir de l'urine vers le sang, exerçant donc un effet antidiurétique (Zingg 1996; Brown, Breton et al. 2009). L'activité de V2R nécessite la liaison au récepteur d'un peptide de 9 acides aminés, l'hormone arginine-vasopressine (AVP) ou hormone antidiurétique (ADH) qui est synthétisée dans l'hypothalamus puis stockée et sécrétée au niveau de l'hypophyse postérieure ou neurohypophyse (Vincent and Su 2008). Bien qu'il soit principalement

caractérisé pour son engagement d'évènements signalétiques dépendants de son couplage avec la protéine G hétérotrimérique Gs, ce récepteur régule d'autres voies de signalisation, non-canoniques, moins connues voire non décrites à ce jour qui font l'objet de ce mémoire. D'autres récepteurs de la même sous-famille, les récepteurs V1a et V1b de la vasopressine, sont également activés par l'AVP, mais seul V1a est exprimé au niveau des tubes collecteurs (Koshimizu, Nakamura et al. 2012). Afin de bien comprendre les mécanismes moléculaires régissant la fonction de V2R, il est important de décrire auparavant les principes de la transduction d'un signal extracellulaire par un RCPG, via une protéine G hétérotrimérique.

1.2. Signalisation canonique des RCPGs

1.2.1. Description générale

Les RCPGs sont des protéines à 7 passages transmembranaires dont l'extrémité N-terminale est extracellulaire, tandis que la portion C-terminale est intracellulaire (Audet and Bouvier 2012). De manière générale, le rôle d'un RCPG est de convertir un signal extracellulaire en une réponse intracellulaire, conduisant au final à un effet physiologique. À l'exception de la rhodopsine qui répond à un photon, le signal extracellulaire consiste en la liaison d'un ligand dont la nature varie en fonction du récepteur (hormone, acide aminé, neurotransmetteur, amine biogénique, peptide, lipide, nucléotide, ion...) (Kroeze, Sheffler et al. 2003). On qualifie d'agoniste un ligand qui mène à l'activation du RCPG et de voies de signalisation intracellulaires qu'il régule. La liaison de l'agoniste sur son récepteur induit l'activation d'une protéine G hétérotrimérique qui lui est couplée. Cette protéine G une fois activée module l'activité d'un effecteur ou plusieurs, dont la nature varie en fonction de la famille de la protéine G activée, pouvant mener à la production ou la libération de seconds messagers (Adénosine monophosphate cyclique –AMPC-, Ca^{2+} ...), et altérant in fine la cellule, par exemple en termes de morphologie, d'activité transcriptionnelle ou de sécrétion.

1.2.2. Protéines G hétérotrimériques

Les protéines G hétérotrimériques sont constituées de 3 sous-unités $G\alpha$, $G\beta$, et $G\gamma$. La sous-unité $G\alpha$ possède une activité catalytique d'hydrolyse du guanosine triphosphate (GTP) en guanosine diphosphate (GDP) qualifiée d'activité GTPase (Hepler and Gilman 1992; Cabrera-Vera, Vanhauwe et al. 2003). La nature du nucléotide lié à $G\alpha$ est l'une des clés du mécanisme d'activation de la protéine G. En effet, sous sa forme inactive, $G\alpha$ est associée au GDP. La liaison d'un agoniste sur un RCPG provoque un changement conformationnel du récepteur se répercutant sur la conformation de l'hétérotrimère, ayant pour effet la libération du GDP par $G\alpha$ et son remplacement par du GTP : $G\alpha$ est alors sous forme active et peut moduler ses effecteurs. L'hydrolyse du GTP en GDP via l'activité GTPasique de la protéine G inactive ensuite $G\alpha$ (Hepler and Gilman 1992; Cabrera-Vera, Vanhauwe et al. 2003).

Lorsqu'une protéine telle qu'un RCPG favorise le remplacement du GDP par du GTP, on parle d'activité *guanine nucleotide exchange factor* (GEF), tandis que les protéines favorisant l'hydrolyse du GTP en GDP ont une activité *GTPase activating protein* (GAP) (Siderovski and Willard 2005). Les protéines non réceptrices ayant une activité GEF sont qualifiées d'*Activators of G protein Signaling* (AGS), tandis que les protéines ayant une activité GAP sont appelées *regulators of G protein signaling* (RGS) (Cismowski, Takesono et al. 2001; Siderovski and Willard 2005). Un exemple de protéines non réceptrices pouvant jouer un rôle GAP ou GEF est P115-RhoGEF, un facteur d'échange de nucléotide guanine (GEF) des protéines de la famille Rho favorisant chez ces protéines G monomériques l'échange de GDP pour du GTP et donc leur activation (Siehler 2009). Ces RhoGEFs constituent l'intermédiaire entre l'activation des protéines G hétérotrimériques G12/13 par un RCPG et l'activation de RhoA. Elles ont une activité GAP (inactivant la protéine G en favorisant l'hydrolyse du GTP) envers $G\alpha_{12/13}$ et une activité GEF (activant la protéine G) envers RhoA. Leur activation via $G\alpha_{12/13}$ déclenche leur activité GEF régulant l'activité de RhoA. Une fois activée, $G\alpha_{12}$ est capable d'interagir avec les 4 RhoGEFs régulées par G12/13 et de provoquer leur translocation à la membrane, mais n'induit l'activité GEF que de LARG et Lbc-RhoGEF (Siehler 2009).

Il a longtemps été considéré que l'activation d'une protéine G induisait nécessairement la dissociation complète de $G\alpha$ du dimère $G\beta\gamma$ (les sous-unités $G\beta$ et $G\gamma$ étant étroitement associées, on désigne le dimère qu'elles constituent par $G\beta\gamma$), suivie de la modulation de leurs effecteurs respectifs (Gilman 1987; Bourne, Sanders et al. 1990; Cabrera-Vera, Vanhauwe et al. 2003). Il est désormais envisagé qu'il pourrait s'agir plutôt d'une dissociation fonctionnelle par un changement conformationnel de l'hétérotrimère entre $G\alpha$ et $G\beta\gamma$, un modèle d'abord esquissé par des études spectroscopiques en transfert d'énergie de résonance de bioluminescence (BRET) permettant de mesurer les interactions protéine-protéine (Gales, Van Durm et al. 2006; Hamdan, Percherancier et al. 2006; Breton, Sauvageau et al. 2010) puis confirmé avec une étonnante fidélité par l'élucidation de la structure activée du couple récepteur β 2-adrénergique/protéine Gs (Rasmussen, DeVree et al. 2011).

Il existe 4 classes de sous-unités $G\alpha$: $G\alpha_s$ (comprend $G\alpha_s$ et $G\alpha_{olf}$), $G\alpha_i$ (comprend $G\alpha_i$, $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$, $G\alpha_{t1}$, $G\alpha_{t2}$, $G\alpha_o$ A, $G\alpha_o$ B et $G\alpha_z$), $G\alpha_q$ (comprend $G\alpha_q$, $G\alpha_{14}$, $G\alpha_{15}$, $G\alpha_{16}$ et $G\alpha_{11}$) et $G\alpha_{12}$ (comprend $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$) (Milligan and Kostenis 2006). La protéine hétérotrimérique prend le nom de la classe de sous-unité $G\alpha$ qu'elle contient ; par exemple, l'hétérotrimère comprenant $G\alpha_s$ est appelé Gs.

La nature des effecteurs varie selon l'identité de la sous-unité $G\alpha$. Ainsi, $G\alpha_s$ sera notamment capable d'induire l'activation de l'adénylate cyclase, une enzyme catalysant la production d'AMPc à partir d'adénosine triphosphate (ATP) (Milligan and Kostenis 2006). Au contraire, $G\alpha_i$ inhibe l'adénylate cyclase et la production subséquente d'AMPc (Milligan and Kostenis 2006). $G\alpha_q$ active la phospholipase C_β (PLC_β), menant à l'activation de la protéine kinase C (PKC) et à la libération de Ca^{2+} dans le cytosol (Milligan and Kostenis 2006). Enfin, $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ sont capables d'activer la petite protéine G monomérique RhoA par l'intermédiaire de Rho GEFs telles que p115 rhoGEF pour $G\alpha_{13}$ ou *leukemia-associated Rho guanine nucleotide exchange factor* (LARG) pour $G\alpha_{12}$, ayant pour effet un remodelage du cytosquelette (Kelly, Casey et al. 2007).

Le dimère $\beta\gamma$ est constitué des sous-unités β et γ associées très étroitement bien que de manière non covalente (Hamm and Gilchrist 1996). Malgré l'existence de 5 isoformes de β et 13 isoformes de γ (Hamm and Gilchrist 1996; Huang, Shanker et al.

1999), il n'existe qu'un nombre limité de combinaisons retrouvées en dimère, dont la spécificité fonctionnelle reste encore mal connue bien qu'abordée par certaines études (Hamm and Gilchrist 1996; Jones, Siderovski et al. 2004; Poon, Chan et al. 2009). Le dimère $\beta\gamma$ est en effet connu pour participer activement à la signalisation cellulaire et on dénombre notamment parmi leurs effecteurs certains canaux ioniques, la $PLC\beta$, certaines adénylates cyclases, les *Mitogen-activated protein kinases* (MAPK) et la *phosphoinositide 3 kinase* (PI3K) (Hamm and Gilchrist 1996; Schwindinger and Robishaw 2001; Mirshahi, Mittal et al. 2002). Les principes généraux évoqués jusqu'à présent de la régulation de l'activité des protéines G sont représentés dans la figure 1 (Siderovski and Willard 2005).

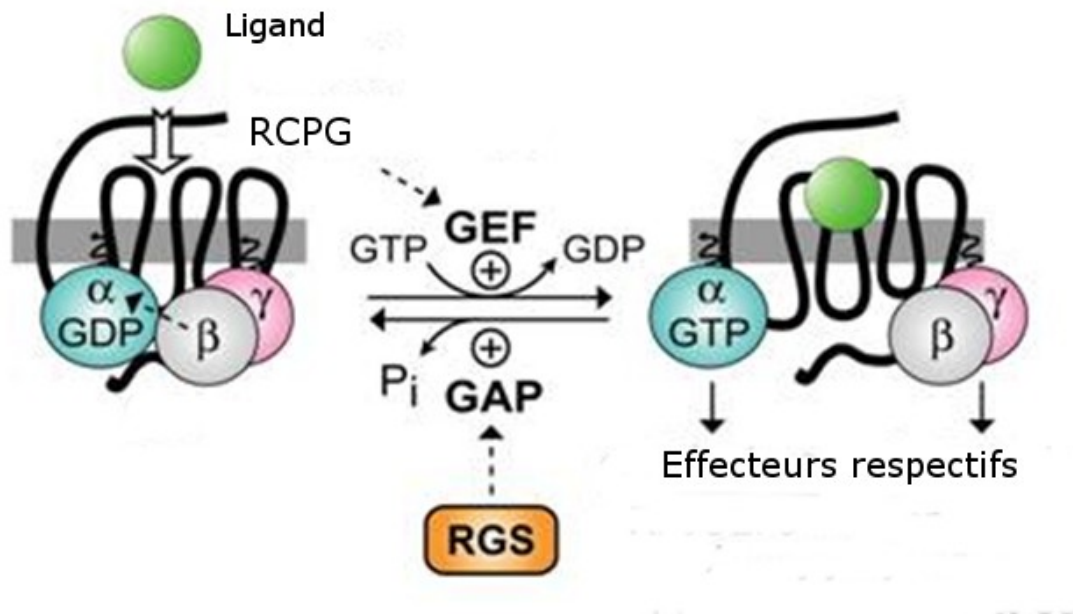


Figure 1. Principes généraux de régulation de l'activité d'une protéine G par un RCPG. En réponse à la liaison d'un ligand agoniste, le RCPG, par l'intermédiaire de son changement conformationnel, joue un rôle de GEF favorisant l'échange de GDP pour du GTP sur la sous unité $G\alpha$, ainsi que le changement conformationnel de l'hétérotrimère se traduisant en une dissociation fonctionnelle entre $G\alpha$ et $G\beta\gamma$. Les sous-unités ainsi activées modulent leurs effecteurs respectifs. La sous-unité $G\alpha$ se désactive par la suite via son activité GTPasique, favorisée par les RGS, menant à sa réassociation fonctionnelle avec $G\beta\gamma$ et une possible réactivation par le récepteur. D'après (Siderovski and Willard 2005).

1.2.3. β -arrestines et kinases des RCPGs (GRKs)

Après activation d'un RCPG, les sous-unités $G\alpha$ ayant interagi avec leurs effecteurs sont rapidement inactivées via leur activité GTPasique menant à l'hydrolyse du GTP pour du GDP, mais peuvent ensuite suivre un nouveau cycle d'activation par l'intermédiaire de leur association au récepteur lié à son agoniste et d'un regroupement fonctionnel avec $\beta\gamma$. Afin d'éviter une signalisation ininterrompue après stimulation d'un RCPG, deux types de protéines entrent en jeu dans la terminaison de la signalisation : les β -arrestines et les GRKs.

Les arrestines sont de grandes protéines qualifiées de protéines d'échafaudage en raison de leur capacité à s'associer avec divers partenaires, favorisant ainsi leur interaction (DeWire, Ahn et al. 2007). Il existe 4 types d'arrestine, dont les arrestines 1 et 2 retrouvées uniquement au niveau des yeux (arrestines visuelles) et les arrestines 3 et 4, respectivement β -arrestine 1 et β -arrestine 2, qui sont ubiquitaires dans les tissus non-rétiniens (DeWire, Ahn et al. 2007). Les GRKs (7 isoformes chez l'humain) sont des protéines sérine/thréonine kinases capables de phosphoryler les RCPGs au niveau de leurs boucles intracellulaires et de leur queue C-terminale (Ribas, Penela et al. 2007).

Rapidement après l'activation d'un RCPG, le récepteur est phosphorylé au niveau de ses boucles intracellulaires et de son extrémité C-terminale par des GRKs (et/ou dans certains cas, d'autres protéines kinases telles que la protéine kinase AMPc dépendante ou PKA, la PKC, ou encore la tyrosine kinase non réceptrice c-Src), favorisant le recrutement d'une β -arrestine prévenant l'association fonctionnelle du récepteur avec une protéine G (Kohout and Lefkowitz 2003). On parle de désensibilisation. La β -arrestine est également capable d'induire l'internalisation du récepteur dans des vésicules recouvertes de clathrine via le recrutement de l'*adaptor protein 2* (AP2) qui interagit avec la clathrine, mais aussi par interaction directe arrestine-clathrine, menant le récepteur vers la dégradation ou le recyclage à la membrane plasmique (Laporte, Oakley et al. 2000; DeWire, Ahn et al. 2007).

1.3. Signalisation canonique de V2R

Le récepteur V2R de la vasopressine est connu pour se coupler à G α s. La liaison de l'AVP sur V2R stabilise le récepteur dans une conformation active, ce qui provoque un changement conformationnel de l'hétérotrimère et l'échange de GDP pour du GTP au niveau de la sous-unité G α s, entraînant son activation. G α s active alors l'adénylate cyclase, ayant pour conséquence une production accrue d'AMPc responsable d'une activation de la PKA (Birnbaumer 2000; Brown, Breton et al. 2009). La phosphorylation par la PKA de la sérine 256 d'un canal aqueux situé à la membrane de vésicules intracellulaires, l'aquaporine 2 (AQP2), favorise l'exocytose de ces vésicules et ainsi la translocation des AQP2 à la membrane plasmique apicale des cellules principales des tubes collecteurs des reins (Christensen, Zelenina et al. 2000; Brown, Breton et al. 2009). Le passage de l'eau à travers AQP2 se fait alors des tubes collecteurs (qui acheminent l'urine en formation) vers les capillaires sanguins, constituant une recapture de l'eau de l'urine vers le sang.

Il est à noter que la phosphorylation par PKA des AQP2 n'est pas l'unique phénomène régulant la translocation des aquaporines à la membrane apicale. En effet, il a notamment été montré que l'exocytose des vésicules contenant AQP2 nécessite une dépolymérisation de l'actine proche de la membrane apicale, un phénomène qui dépendrait de l'inhibition de la petite protéine G monomérique RhoA, effecteur classique de G12/13 (Klussmann, Tamma et al. 2001; Brown, Breton et al. 2009), notamment via la PKA (Qiao, Huang et al. 2003; Tamma, Klussmann et al. 2003).

La vasopressine joue également un rôle antinatriurétique, limitant l'excrétion de sodium au niveau des cellules principales des tubes collecteurs rénaux par l'intermédiaire de V2R, grâce à la régulation positive des canaux sodiques épithéliaux ENaC vraisemblablement via l'augmentation des niveaux d'AMPc en réponse à l'activation de Gs (Bankir, Fernandes et al. 2005; Bankir, Bichet et al. 2010). Un résumé simplifié des voies de signalisation de V2R permettant l'exocytose d'AQP2 et l'effet antidiurétique par recapture de l'eau est présenté dans la figure 2.

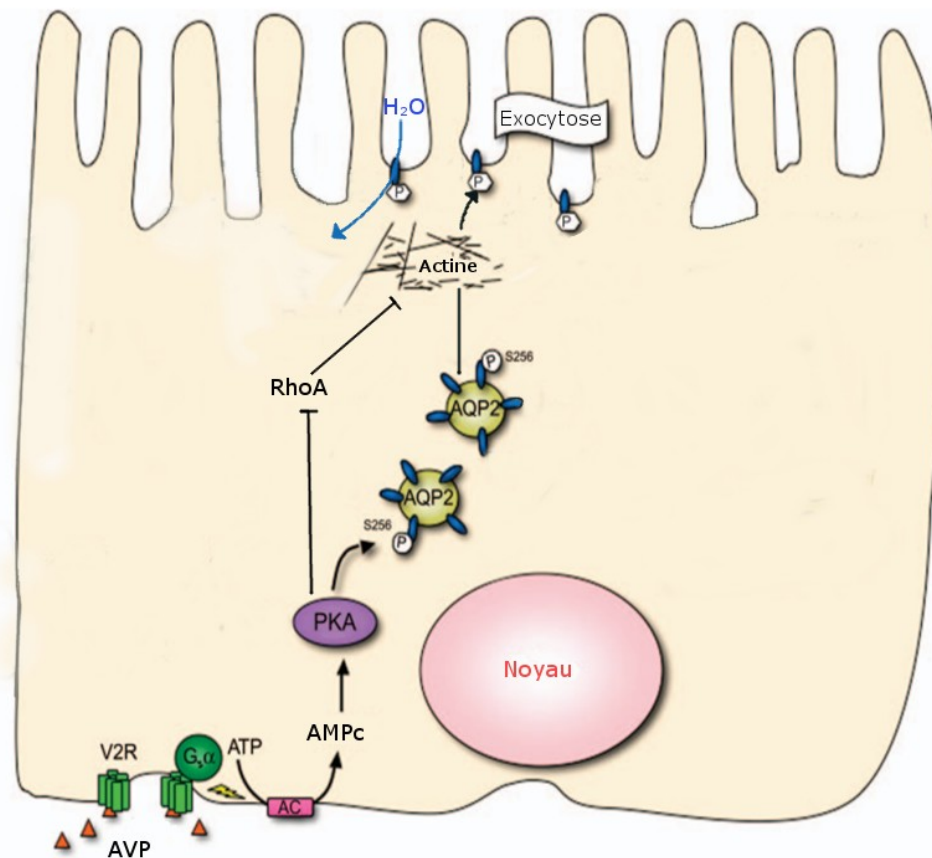


Figure 2. Régulation de l'exocytose des vésicules contenant l'AQP2 par V2R. La stimulation de V2R par l'AVP active G_{αs} induisant l'augmentation des taux d'AMPC via la régulation des adénylates cyclases (AC). La conséquence est l'activation de la PKA, dont la phosphorylation des AQP2 sur la sérine 256 favorise l'exocytose des vésicules qui les contiennent à la membrane apicale. La translocation membranaire des AQP2 nécessite également la dépolymérisation du réseau d'actine sous-membranaire par l'intermédiaire de l'inhibition de RhoA, notamment via la PKA. D'après (Brown, Breton et al. 2009).

1.4. Signalisation non canonique des RCPG

1.4.1. Signalisation via multiples protéines G, et G-indépendante

S'éloignant progressivement d'un modèle simple selon lequel un RCPG est couplé à un type donné de protéine G, un nombre croissant de travaux ont mis en évidence la possibilité pour un seul RCPG de signaler via plusieurs types de protéines G, impliquant divers états d'activation d'un même récepteur et/ou l'existence de plusieurs types de complexes récepteur-partenaires de signalisation.

Ainsi, le très étudié récepteur β 2-adrénérique (β 2AR), connu pour son couplage principal à G_s est également capable de signaler via G_i , à l'occasion d'une commutation de couplage qui s'opère en réponse à la phosphorylation du récepteur par la PKA après son activation (Daaka, Luttrell et al. 1997; Baillie, Sood et al. 2003). En plus de cette signalisation via G_i , il a également été caractérisé que le récepteur β 2-adrénérique pouvait se coupler à G_q et ainsi activer la PLC_β (Wenzel-Seifert and Seifert 2000). Une multitude d'autres récepteurs sont capables d'induire des voies de signalisation par l'intermédiaire de plusieurs protéines G. C'est notamment le cas du récepteur FP de la prostaglandine $F2\alpha$ qui peut signaler à la fois à travers G_q et G_{12} (Goupil, Tassy et al. 2010). D'autre part, il est également devenu clair que des modes de signalisation indépendants des protéines G existent en aval des RCPGs. Il a par exemple été mis en évidence que l'arrestine joue un rôle à part entière dans la signalisation des RCPGs, particulièrement dans la voie des MAPK dont les *extracellular signal-regulated kinases 1 et 2* (ERK 1/2), grâce à son rôle de protéine d'échafaudage permettant le rapprochement des partenaires de signalisation de cette voie (Lefkowitz and Shenoy 2005; DeWire, Ahn et al. 2007; Song, Coffa et al. 2009). C'est notamment le cas pour le récepteur β 2AR pour lequel les β -arrestines en plus d'activer ERK 1/2 (Shenoy, Drake et al. 2006), sont capables d'induire l'activation de RhoA (Ma, Zhao et al. 2012).

Cette complexification du modèle classique de signalisation des RCPGs, et l'exemple de l'évolution continue des connaissances du mode de signalisation d'un récepteur pourtant extensivement étudié tel que le β 2-adrénérique soulève des questions légitimes quant à la quantité de récepteurs dont le couplage avec d'autres types de

protéines G reste à mettre en lumière, et l'importance de ces voies non-canoniques dans les processus physiologiques et pathologiques auquel un récepteur donné est associé. La découverte et l'étude de ces voies de signalisation supplémentaires constitue donc un champ de recherche pertinent dans le domaine des RCPGs afin de continuer d'affiner les modèles actuels de signalisation des RCPGs et d'améliorer la sélectivité et la spécificité des approches thérapeutiques (donc potentiellement d'améliorer l'efficacité du traitement et de diminuer les effets indésirables).

1.4.2. Transactivation des récepteurs tyrosine kinases

Comme nous venons de l'évoquer, les RCPGs peuvent non seulement signaler au travers de plusieurs types de protéines G pour un seul récepteur, mais également moduler certaines voies de signalisation indépendantes des protéines G, notamment à travers les β -arrestines. Un phénomène particulier s'ajoute à cette signalisation non-canonique des RCPGs, lorsque l'activation d'un récepteur à 7 segments transmembranaires entraîne l'activation d'un récepteur tyrosine kinase (RTK) et la modulation des voies de signalisation en aval de ce récepteur : on parle alors de transactivation.

Un nombre croissant de phénomènes de transactivation a été mis en évidence depuis la première découverte de ce phénomène par Daub et al. en 1996 avec la transactivation du récepteur de l'*epidermal growth factor* (EGFR) en réponse à divers agonistes de RCPGs, dont la thrombine par l'intermédiaire d'un des récepteurs de la thrombine et l'endothéline via son récepteur ET-A (Daub, Weiss et al. 1996). Alors que plusieurs autres RCPGs pouvant transactiver l'EGFR ont été identifiées au fil des années, il a également été exposé que d'autres RTKs pouvaient être activés par l'entremise de la stimulation d'un RCPG, tels que le *Platelet derived growth factor receptor* (PDGFR) via l'angiotensine II et son récepteur AT1 (Mondorf, Geiger et al. 2000), le *Vascular endothelial growth factor receptor* (VEGFR) via la bradykinine et son récepteur B2 (Thuringer, Maulon et al. 2002), et l'*Insulin-like growth factor 1 receptor* (IGF1R) via la thrombine et l'un de ses récepteurs (Delafontaine, Anwar et al. 1996). Par ailleurs, des

études récentes ont également fait émerger la possibilité pour un RTK de réguler l'activité d'un RCPG (Delcourt, Bockaert et al. 2007)

L'un des modes de transactivation les mieux caractérisés consiste en la libération d'un ligand de RTK dans le milieu extracellulaire par clivage d'un pro-ligand par une métalloprotéase, mécanisme parfois qualifié d'*inside-out* (Kalmes, Daum et al. 2001; Werry, Sexton et al. 2005; Oligny-Longpre, Corbani et al. 2012) ou de signalisation à triple passage membranaire (Prenzel, Zwick et al. 1999; Wetzker and Bohmer 2003). Dans un tel cas, la liaison de l'agoniste sur son RCPG active un médiateur tel que la kinase *proto-oncogene tyrosine-protein kinase* Src, qui induit l'activation d'une métalloprotéase pouvant alors catalyser le clivage protéolytique d'un pro-ligand de RTK, libérant ainsi dans le milieu extracellulaire une forme active de l'agoniste qui active le récepteur tyrosine kinase et les voies de signalisation qu'il module. En plus des phénomènes de transactivation de RTK par un RCPG, ce mécanisme de transactivation *inside-out* a même été décrit entre deux RTKs avec la possibilité pour IGF1R de transactiver EGFR par l'intermédiaire de la libération d'*heparin binding EGF* (HB-EGF) (Roudabush, Pierce et al. 2000). La figure 3 illustre le phénomène de transactivation d'un RTK par un RCPG selon un mode *inside-out*.

D'autres modes de transactivation existent n'impliquant pas le relargage d'un ligand de RTK dans le milieu extracellulaire. Par exemple, l'activation d'un RCPG peut mener à l'activation de protéines tyrosine kinases cytosoliques telles que Src, dont la capacité à interagir avec un RTK et à le phosphoryler directement pour l'activer a été décrite pour l'EGFR (Biscardi, Maa et al. 1999) et évoquée pour l'IGF1R (Cheng and Du 2007). Par ailleurs, il a également été suggéré qu'un RCPG puisse réguler indirectement un RTK via l'inhibition de protéine-tyrosine phosphatases (PTP) impliquées dans le contrôle de l'activité des RTKs (Ostman and Bohmer 2001). L'inhibition des PTPs pourrait intervenir grâce à la génération d'espèces oxygénées réactives telles que le peroxyde d'hydrogène pouvant directement inhiber les PTPs par oxydation (Chen, Olashaw et al. 1995; Sundaresan, Yu et al. 1995).

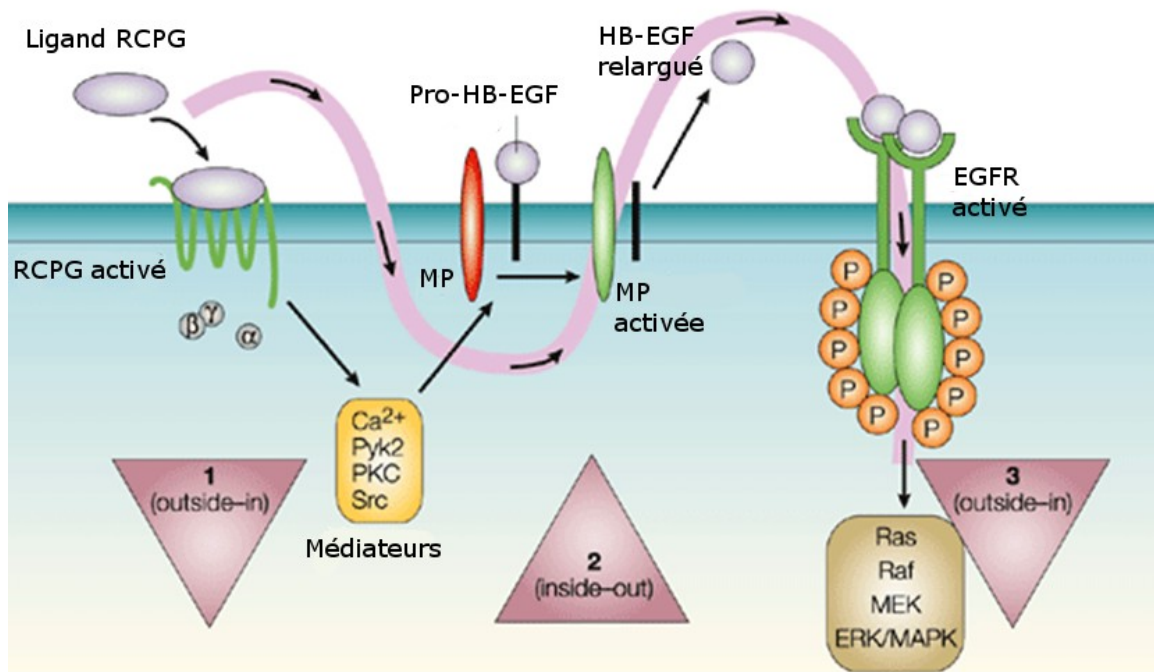


Figure 3. Modèle de transactivation du récepteur tyrosine kinase EGFR par un GPCR selon un mode inside-out ou triple passage membranaire. La stimulation d'un RCPG par son agoniste mène à l'activation d'une métalloprotéase membranaire de type ADAM (*a desintegrin and metalloproteinase*) qui clive un pro-ligand d'un analogue de l'*epidermal growth factor* (EGF). La liaison de l'agoniste ainsi libéré sur l'EGFR mène à son activation par autophosphorylation croisée et l'activation de la voie des MAPK, importante dans la mitose et la prolifération cellulaire. *Légende* : MP signifie métalloprotéase. D'après (Wetzker and Bohmer 2003).

1.4.3. Métalloprotéases

Nous venons d'évoquer que le mode *inside-out* de transactivation pouvait faire intervenir une métalloprotéase. Comme le nom l'indique, il s'agit d'enzymes nécessitant la présence d'ions métalliques de zinc ou de calcium pour exercer leur activité protéolytique. Leur capacité à digérer des éléments de la matrice extracellulaire, ainsi qu'à contribuer à la signalisation des RTKs en font des acteurs importants des processus néoplasiques de croissance et prolifération cellulaire, mais aussi de migration métastatique en plus de diverses pathologies non cancéreuses (Shiomi, Lemaitre et al. 2010). Il existe un grand nombre de métalloprotéases pouvant être divisées en trois classes : les métalloprotéases membranaires de type ADAM, les ADAMs avec motif thrombospondine (ADAMTS), et les métalloprotéases de matrice (MMPs). On retrouve chez l'humain 25 gènes codant pour des ADAMs dont 4 sont des pseudogènes et 8 ne sont pas protéolytiques (Edwards, Handsley et al. 2008). On retrouve également 19 ADAMTS et 23 MMPs (Porter, Clark et al. 2005; Nagase, Visse et al. 2006).

La majorité des travaux ayant illustré l'implication d'une métalloprotéase dans la transactivation d'un RTK par un RCPG identifient une métalloprotéase de type ADAM dont l'ancrage membranaire permet le clivage protéolytique d'un pro-ligand de la famille EGF (Wetzker and Bohmer 2003), bien que certaines études établissent également le rôle de MMPs dans des processus de transactivation (Lucchesi, Sabri et al. 2004; Nagareddy, Chow et al. 2009). Les mécanismes de contrôle de l'activation des métalloprotéases dans un tel contexte de transactivation restent mal compris (Wetzker and Bohmer 2003; Ra and Parks 2007; Snider and Meier 2007). Le clivage d'un pro-ligand à la surface de la cellule ou dans le milieu extracellulaire implique soit l'activation d'une métalloprotéase membranaire, soit l'excrétion d'une métalloprotéase soluble. Les métalloprotéases sont synthétisées sous forme de zymogènes, enzymes catalytiquement inactives, sécrétées ou ancrées à la surface de la cellule selon leur nature (Porter, Clark et al. 2005; Ra and Parks 2007; Edwards, Handsley et al. 2008). L'activation du zymogène implique la disruption de la structure de la pro-enzyme selon un phénomène qualifié de commutation cystéine ou *cysteine switch* selon lequel la modification conformationnelle de l'enzyme intervient

par clivage protéolytique d'un pro-domaine ou à la suite de modifications post-traductionnelles (Ra and Parks 2007; Edwards, Handsley et al. 2008).

Il a ainsi été suggéré que l'activation des ADAMs peut ainsi avoir lieu par l'intermédiaire de la phosphorylation de leur domaine cytoplasmique ou d'interactions protéine-protéine avec ce domaine (Ohtsu, Dempsey et al. 2006). D'autres études exposent également la régulation par phosphorylation de certaines MMPs comme MMP14 via Src (Nyalendo, Michaud et al. 2007) ou MMP2 via PKC (Sariahmetoglu, Crawford et al. 2007) dans leur activation. Malgré leur importance, l'identification des métalloprotéases impliquées dans chaque processus de transactivation reste difficile en raison du grand nombre de candidats et de la sélectivité généralement limitée des inhibiteurs existants, aussi bien naturels que synthétiques (Baker, Edwards et al. 2002; Fisher and Mobashery 2006; Dorman, Cseh et al. 2010), à quelques exceptions près notamment pour certaines ADAMs (Duffy, Mullooly et al. 2011).

1.5. Signalisation non canonique de V2R

1.5.1. Signalisation via multiples protéines G

Comme il en a été discuté plus haut, le récepteur V2R de la vasopressine est connu pour se coupler classiquement à Gs, induisant lors de son activation la production d'AMPc via l'activation d'adénylates cyclases, et ainsi l'activation de la PKA. En supplément de ce couplage bien caractérisé, certaines études avancent la possibilité d'un couplage de V2R avec Gq, menant à l'activation de la PLC et la libération de calcium dans le cytosol (Zhu, Gilbert et al. 1994; Ecelbarger, Chou et al. 1996).

Des résultats préliminaires obtenus dans le laboratoire du Dr. Bouvier par transfert d'énergie de résonance de bioluminescence (BRET) suggèrent la possibilité d'une interaction spécifique de V2R avec G α 12, un couplage jusqu'alors jamais décrit dans la littérature à notre connaissance. Une partie de ce projet s'intéresse à l'étude du couplage entre V2R et G α 12, et notamment aux possibles interactions croisées entre Gas et G α 12.

En effet, l'équipe du Dr. Sternweis a décrit un phénomène de régulation croisée entre les voies Gs et G12/G13 où l'activation d'un récepteur couplé G12/G13 après celle d'un récepteur couplé Gs mène à l'augmentation synergique de la production d'AMPc (Jiang, Collins et al. 2008; Jiang, Wang et al. 2013). Cette régulation conjuguée des taux d'AMPc dépendrait de la modulation de l'adénylate cyclase 7 (AC7) (Jiang, Collins et al. 2008). En plus de confirmer l'existence d'un couplage entre G α 12 et V2R, nous étudierons donc la possibilité de l'existence d'un phénomène similaire de régulation croisée entre Gs et G12 concernant la modulation de la production d'AMPc.

La possibilité d'un couplage de V2R avec G12 paraît particulièrement intéressante. D'abord sur le plan physiologique, étant donné l'implication de son effecteur classique RhoA (inhibition de son activité) dans la translocation d'AQP2 à la membrane apicale des cellules principales des tubes collecteurs des reins pour permettre la recapture de l'eau par les reins et la concentration de l'urine (Klussmann, Tamma et al. 2001; Brown, Breton et al. 2009). Ensuite sur le plan pathologique, notamment dans les cas de polykystose rénale autosomique dominante (ADPKD), une maladie monogénique incurable pouvant mener à l'insuffisance rénale terminale. Il a en effet été démontré que la production d'AMPc en réponse à l'activation de V2R joue un rôle important dans la prolifération anarchique du parenchyme rénal, et l'utilisation d'antagonistes de V2R, composés inhibant l'activité de V2R, semble relativement prometteuse dans la lutte contre cette prolifération responsable de la formation des kystes observés dans la maladie (Torres 2008; Torres, Chapman et al. 2012). Ainsi, l'implication potentielle de G12 en aval de V2R dans la production d'AMPc (régulation croisée entre G12 et Gs telle que décrite par l'équipe du Dr. Sternweis) que nous étudions dans ce projet, pourrait indiquer un rôle de G12 dans la pathogénèse de l'ADPKD et désigner G12 comme une nouvelle cible thérapeutique possible de l'ADPKD.

1.5.2. Transactivation du récepteur de l'IGF1R

1.5.2.1. Historique des études sur la transactivation d'IGF1R par V2R

1.5.2.1.1. Propos introductifs

Comme il a été décrit précédemment, un nombre croissant de RCPGs ont été démontrés comme capables d'activer un RTK en réponse à leur propre activation. Un tel phénomène de transactivation a été mis en évidence et de mieux en mieux caractérisé dans le laboratoire du Dr. Bouvier concernant le récepteur V2R et l'activation des MAPK ERK 1/2 en réponse à la stimulation du récepteur par l'AVP. La possibilité pour V2R d'activer ERK 1/2 a d'abord été découverte en 1998 par Thibonnier et al. (Thibonnier, Conarty et al. 1998). L'exploration des mécanismes moléculaires qui sous-tendent cette voie ERK en aval de V2R a ensuite fait l'objet de trois publications du laboratoire du Dr. Bouvier, dont la plus récente inclut certains des résultats de ce projet de maîtrise.

1.5.2.1.2. Charest et Bouvier 2003 : implication de la β -arrestine

En 2003, Charest et Bouvier ont d'abord démontré que l'expression de dominants négatifs de β -arrestine inhibe l'activation des MAPK ERK 1/2 en réponse à la stimulation de V2R par son agoniste AVP, la réponse ERK 1/2 étant par contre insensible à l'inhibition de l'internalisation de V2R par la concanavaleine A (Charest and Bouvier 2003). Les résultats présentés dans cet article laissaient également supposer que le recrutement des β -arrestines par V2R pouvait être important pour l'activation d'ERK 1/2. En effet, des mutants de V2R dont la palmitoylation (addition post traductionnelle d'un palmitate) est altérée ont une capacité très inférieure d'activation d'ERK 1/2 qui est corrélée avec un recrutement diminué de β -arrestine 2 pour ces variants de V2R. Cependant, des expériences ultérieures publiées en 2012 montrent qu'il ne s'agissait que de corrélations et que le recrutement de β -arrestine par V2R n'entre pas en jeu dans l'activation d'ERK 1/2 en réponse à l'AVP (Oligny-Longpre, Corbani et al. 2012). Il y est en effet mis en évidence qu'un variant de V2R dont la capacité à recruter les arrestines est altérée (V2R Ala6) conserve sa capacité à activer ERK 1/2.

1.5.2.1.3. Charest et al. 2007 : étude des médiateurs de l'activation d'ERK et signes de transactivation

En 2007, Charest et al. se sont intéressés à déterminer les médiateurs de l'activation d'ERK 1/2 en réponse à l'AVP (Charest, Oligny-Longpre et al. 2007). Le rôle potentiel de plusieurs types de $G\alpha$ a été méthodiquement éliminé. Ainsi, l'implication de $G\alpha_s$ a d'abord été écartée par l'utilisation d'un traitement long (16h) des cellules avec la cholera toxine (CTX), régulant négativement la quantité de $G\alpha_s$ (Milligan, Unson et al. 1989), en montrant qu'un tel traitement n'a aucun effet sur l'activation d'ERK 1/2 par V2R. De la même façon, $G\alpha_q$ n'a aucune fonction dans cette voie, puisque son inhibition par surexpression du domaine RGS de la *GPCR kinase 2* (GRK2) (Carman, Parent et al. 1999) n'affecte pas l'activation des MAPK en réponse à l'AVP. $G\alpha_i$ a également été mise de côté étant donné qu'un traitement des cellules avec la toxine pertussique (PTX), qui inhibe $G\alpha_i$ par ADP-ribosylation (Hsia, Moss et al. 1984), n'a aucun impact sur ERK 1/2 en aval de V2R.

En plus de ces trois $G\alpha$, toute implication de la PKA, des sous-unités $\beta\gamma$ de la protéine G, de la phospholipase C (PLC), de la protéine kinase C (PKC), et de la PI3K a été rejetée par une approche similaire démontrant l'absence d'effet sur l'activation d'ERK lorsque ces éléments sont sélectivement inhibés. Il est également intéressant de noter qu'à l'occasion d'une expérience contrôle visant à démontrer l'efficacité de l'inhibiteur de PI3K, il ressort que la stimulation par l'AVP n'induit pas l'activation de la kinase Akt (mesurée par sa phosphorylation). Cette particularité et ses implications dans la transactivation d'IGF1R par V2R seront discutées plus loin dans ce mémoire.

En utilisant un inhibiteur pharmacologique des kinases de la famille Src et un dominant négatif de c-Src, il a également été mis en évidence par Charest et al. que c-Src est indispensable à l'activation de la voie ERK en aval de V2R. L'activation de Src par V2R sera davantage étudiée dans quelques expériences présentées dans ce manuscrit.

C'est également dans cet article de Charest et al. qu'apparaissent les premiers indices forts d'une transactivation responsable de l'activation des MAPK en aval de V2R. En effet, la phosphorylation d'ERK 1/2 (qui marque leur activation) en réponse à l'AVP est inhibée lorsque les cellules sont traitées avec un inhibiteur à large spectre de

métalloprotéases, la phénanthroline, qui chélate le zinc nécessaire à leur site catalytique et donc à la protéolyse (Ashmun and Look 1990). Un mode de transactivation « inside-out » avec libération extracellulaire d'un ligand de RTK est par ailleurs suggéré par le fait que des cellules n'exprimant pas V2R et ne répondant pas à l'AVP peuvent activer ERK 1/2 lorsqu'on leur transfère le surnageant de cellules exprimant V2R ayant été stimulées par l'AVP. Les résultats de cette expérience impliquent en effet que les cellules exprimant V2R libèrent un élément dans le milieu extérieur en réponse à l'AVP, et que les cellules n'exprimant pas V2R répondent à cet élément désormais présent dans le surnageant des cellules stimulées par l'AVP (l'hypothèse privilégiée étant qu'il s'agit d'un agoniste de RTK). Si l'identité du RTK impliqué dans la probable transactivation n'a pu être déterminée, l'absence d'effet d'un inhibiteur sélectif de l'EGFR, un récepteur déjà décrit dans plusieurs cas de transactivation de RTK par un RCPG, a permis d'éliminer ce récepteur comme responsable de l'activation d'ERK en réponse à l'AVP.

1.5.2.1.4. Oligny et al. 2012 : identification du RTK et séquence des évènements de signalisation

C'est en 2012 qu'Oligny-Longpre et al. ont caractérisé plus en détail les cascades moléculaires de la transactivation du RTK par V2R avec l'identification d'IGF1R et la détermination de la séquence des évènements menant à l'activation d'ERK, notamment concernant le rôle des β -arrestines (Oligny-Longpre, Corbani et al. 2012).

En utilisant deux approches distinctes, à savoir l'inhibition sélective pharmacologique d'IGF1R par la tyrphostine AG1024 (Parrizas, Gazit et al. 1997) ou l'expression d'un dominant négatif d'IGF1R, la phosphorylation d'ERK 1/2 a été inhibée, caractérisant IGF1R comme étant le récepteur transactivé par V2R. Par ailleurs, la stimulation de V2R par l'AVP induit la phosphorylation de la tyrosine 1131 d'IGF1R, une des trois tyrosines modifiées lors de l'autophosphorylation d'IGF1R résultant de son activation par l'IGF1.

L'implication d'une métalloprotéase a également été confirmée à l'aide d'un autre inhibiteur à large spectre de métalloprotéases, le marimastat, un hydroxamate synthétique mimant la structure du collagène (Wojtowicz-Praga, Dickson et al. 1997). À l'instar de la phénanthroline, le marimastat inhibe l'activation d'ERK 1/2 subséquente à l'activation de V2R. En utilisant la même expérience de transfert de surnageant décrite ci-haut (Charest, Oligny-Longpre et al. 2007), il a été établi que la métalloprotéase intervient en amont de la libération du facteur activant IGF1R. En effet, le transfert de surnageant perd sa capacité à activer les cellules n'exprimant que l'IGF1R lorsque les cellules exprimant V2R sont prétraitées avec le marimastat. Cela démontre donc que la métalloprotéase impliquée dans la transactivation est nécessaire à la libération du facteur d'activation d'IGF1R. Une autre expérience de transfert de surnageant confirme d'ailleurs que l'IGF1R intervient en aval du relargage du facteur dans le milieu extracellulaire, impliquant que le récepteur du facteur relargué est bien l'IGF1R, puisque le traitement par l'inhibiteur pharmacologique d'IGF1R des cellules « sauvages » (dépourvues de V2R) qui reçoivent le surnageant inhibe l'activation d'ERK. Ces expériences sont présentées dans la figure 4 tirée du papier afin de faciliter leur compréhension (Oligny-Longpre, Corbani et al. 2012).

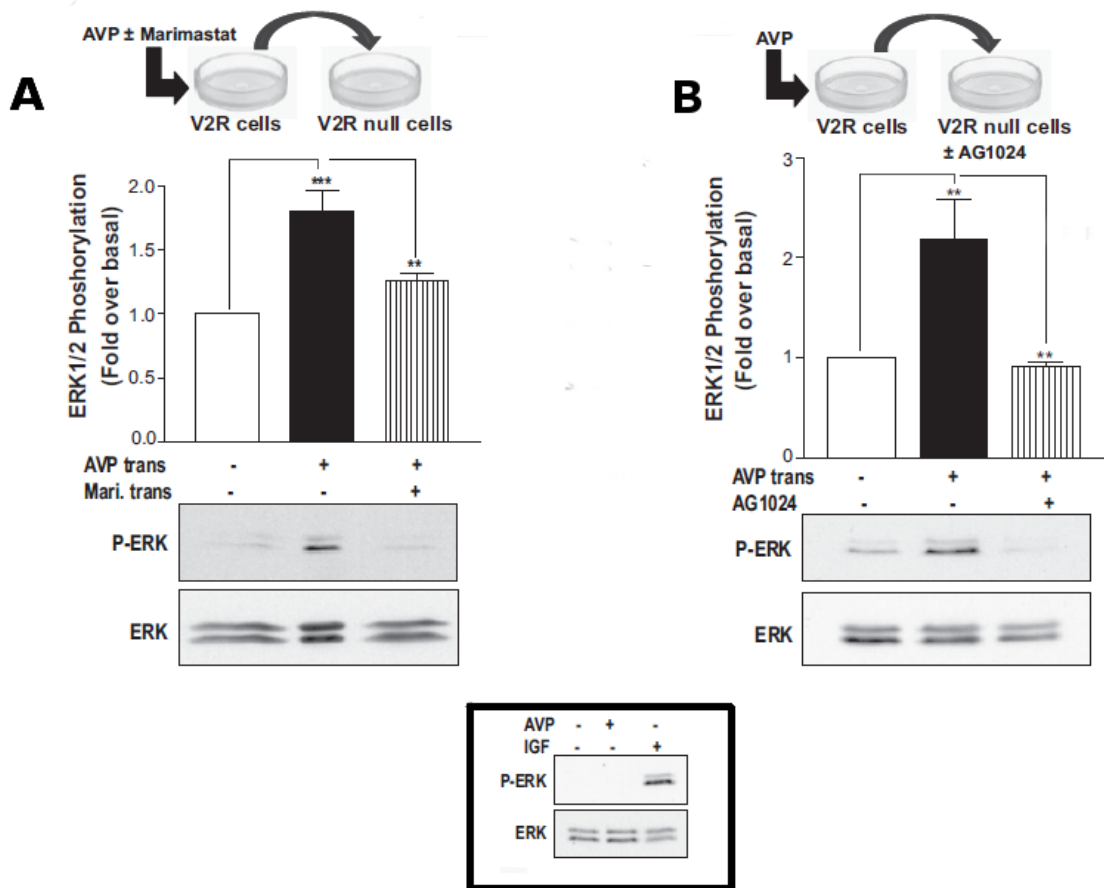


Figure 4. Expériences de transfert de surnageant déterminant la séquence des événements de transactivation (Oligny-Longpre, Corbani et al. 2012). En A : les cellules « donneuses » exprimant V2R ont été prétraitées avec le marimastat, puis l'AVP, et leur surnageant a été transféré sur des cellules « sauvages » n'exprimant pas V2R (mais exprimant IGF1R de façon endogène). Le marimastat inhibe l'activation d'ERK par les cellules ayant reçu le surnageant donc la métalloprotéase intervient avant l'activation d'IGF1R. En B : les cellules « donneuses » ont été traitées par l'AVP, et leur surnageant a été transféré sur des cellules « sauvages » prétraitées avec l'AG1024 inhibant sélectivement IGF1R. L'AG1024 inhibe l'activation d'ERK par les cellules « sauvages » donc un facteur relargué est responsable de l'activation d'IGF1R dans ces cellules. Encadré : les cellules « sauvages » ne répondent pas à l'AVP donc leur activation via transfert de surnageant n'est pas liée à la présence de l'hormone.

Il a également été montré que la protéine tyrosine kinase non réceptrice Src est impliquée en amont du relargage du facteur. En effet, Charest et al. avaient déjà caractérisé l'implication de Src dans l'activation d'ERK en réponse à V2R, comme décrit plus haut, à l'aide d'un inhibiteur pharmacologique des kinases de la famille Src, le PP2, ainsi que d'un dominant négatif de c-Src (Charest, Oligny-Longpre et al. 2007). Oligny et al. mettent en évidence l'activation de Src (marquée par sa phosphorylation sur la tyrosine 416) en réponse à l'AVP, ainsi que son insensibilité à l'inhibiteur à large spectre de métalloprotéases phénanthroline et à l'inhibiteur pharmacologique d'IGF1R, l'AG1024 (Oligny-Longpre, Corbani et al. 2012). Selon le même principe expérimental de transfert de surnageant décrit plus haut, il est également clairement exposé que Src intervient en amont du relargage du facteur activant IGF1R (Oligny-Longpre, Corbani et al. 2012). Certaines questions relatives à l'activation de Src par V2R ont été adressées dans le cadre de ce projet et sont présentées dans l'article d'Oligny-Longpre et al., dont certaines dans la section figures supplémentaires (Oligny-Longpre, Corbani et al. 2012), et seront présentées et discutées dans les parties résultat et discussion de ce mémoire.

L'importance des β -arrestines mise en évidence auparavant par Charest et Bouvier en 2003 est confirmée par Oligny-Longpre et al. en utilisant le même dominant négatif de β -arrestine (délétion des acides-aminés 319-418) inhibant l'activation d'ERK par l'AVP. Cependant, alors que Charest et Bouvier suggéraient que ces données reflétaient l'importance du recrutement de l'arrestine à V2R dans l'activation de la voie MAPK (Charest and Bouvier 2003), Oligny-Longpre et al. démontrent que c'est en réalité en aval du RTK IGF1R que la β -arrestine entre en jeu dans cette voie et pas avant. En effet, toujours par des techniques de transfert de surnageant, il est mis en évidence que l'inhibition des arrestines (par dominant négatif ou par petits ARNs interférents anti- β -arrestines) dans les cellules exprimant V2R n'empêche pas la libération dans le milieu extracellulaire d'un facteur capable d'activer la voie ERK dans les cellules « sauvages » n'exprimant pas V2R. Cela montre que la β -arrestine n'intervient pas en amont de la libération du facteur dans le milieu extracellulaire et donc pas avant l'activation d'IGF1R. Par contre, l'inhibition des β -arrestines dans les cellules « sauvages »

exprimant seulement IGF1R inhibe l'activation d'ERK, montrant l'importance des β -arrestines en aval d'IGF1R.

Bien qu'étonnant au premier abord, un tel mécanisme s'explique facilement si l'on considère le mode d'activation d'ERK en aval d'un RTK tel qu'IGF1R, qui sera décrit dans le prochain chapitre. Il est d'ailleurs à noter qu'un tel mécanisme ne constitue probablement pas une exception puisqu'il est également démontré dans cet article selon le même procédé expérimental de transfert de surnageant que PAFR (*platelet activation factor receptor*), un autre RCPG connu pour transactiver un RTK (EGFR) (Marques, Dy et al. 2002), implique également les β -arrestines en aval du RTK et non du RCPG (Oligny-Longpre, Corbani et al. 2012). Par des expériences de co-immunoprécipitation, il est également mis en évidence que la β -arrestine 1 (mais pas la β -arrestine 2) est recrutée à l'IGF1R en réponse à l'AVP, un recrutement par ailleurs induit lors de la stimulation d'IGF1R par l'IGF1. L'absence de rôle du recrutement des arrestines au RCPG dans l'activation d'ERK en réponse à l'AVP est par ailleurs confirmé par le fait qu'un mutant de V2R dont la capacité à être phosphorylé et donc à recruter les arrestines est diminuée possède une capacité équivalente, voire même supérieure (2 min après stimulation), à activer ERK en réponse à l'AVP. Comme il sera exposé dans le prochain chapitre consacré à ce récepteur, le recrutement de la β -arrestine 1 est requis pour l'activation d'ERK 1/2 en réponse à l'IGF1 (Girrita, Shenoy et al. 2007). Le recrutement de la β -arrestine 1 à l'IGF1R en réponse à l'AVP est donc consistant avec le fait que l'activation des MAPK en aval de V2R passe par la transactivation d'IGF1R. Afin de faciliter la visualisation de cette voie de transactivation d'IGF1R par V2R, la figure 5 expose une représentation schématique du modèle suggéré par les résultats de l'article.

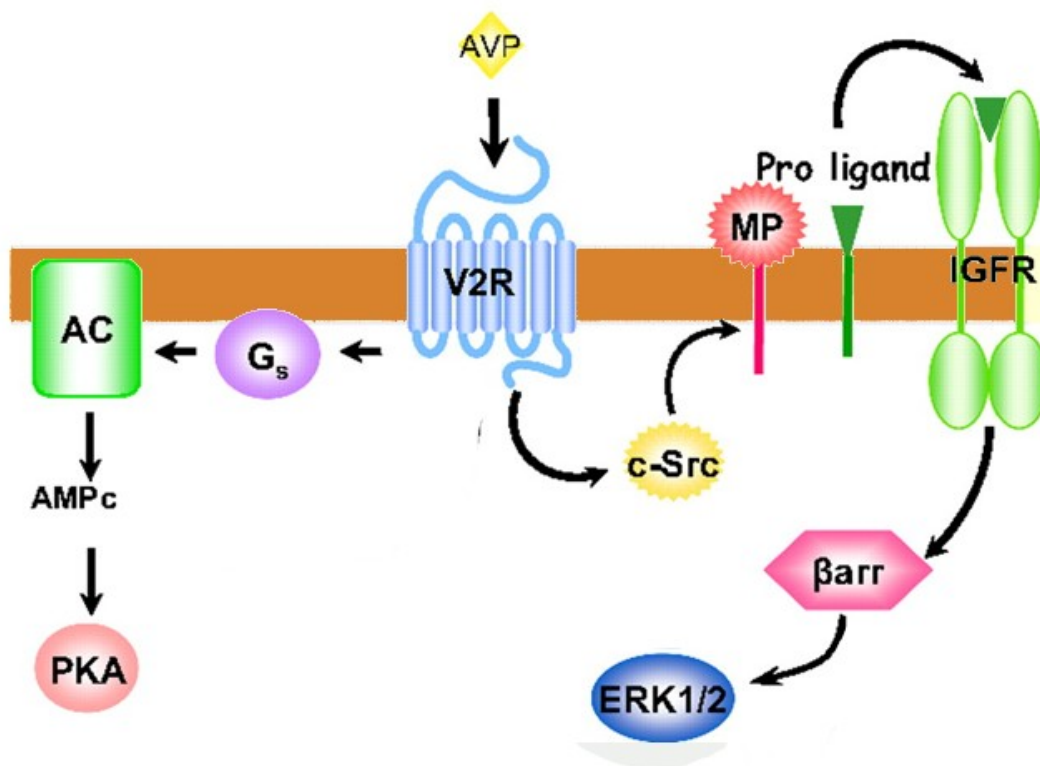


Figure 5. Modèle proposé du mécanisme de transactivation d'IGF1R par V2R. La stimulation de V2R par l'AVP induit la phosphorylation de c-Src qui permet l'activation d'une métalloprotéase. La protéase activée libère par protéolyse un agoniste d'IGF1R qui active le RTK, menant à l'activation d'ERK par l'intermédiaire de la β -arrestine. D'après (Oligny-Longpre, Corbani et al. 2012).

Les expériences de chacun de ces trois papiers ayant établi les fondements de la voie de transactivation d'IGF1R par V2R ont été réalisées sur des cellules humaines embryonnaires de rein (HEK293) pour la quasi-totalité d'entre elles. Cependant, certaines études réalisées in-vivo sur des rats confirment la pertinence physiologique de ce mode de transactivation. En effet, Oligny-Longpre et al. sont capables d'inhiber dans les reins de rat la phosphorylation d'ERK 1/2 en réponse à un analogue synthétique de l'AVP, la desmopressine (dDAVP), lorsque les rats sont perfusés par du marimastat ou de l'AG1024, confirmant l'implication respectivement d'une métalloprotéase et d'IGF1R (Oligny-Longpre, Corbani et al. 2012).

1.5.2.2. IGF1R

1.5.2.2.1. Principes classiques de signalisation

Le récepteur de l'*insulin-like growth factor 1*, IGF1R, fait partie de la grande famille des récepteurs tyrosine kinases. Il existe chez l'humain 58 RTKs classés en 20 familles selon la séquence de leur domaine kinase (Robinson, Wu et al. 2000). L'IGF1R fait partie de la famille des récepteurs à l'insuline comprenant également le récepteur de l'insuline InsR avec lequel il partage 70 % d'homologie de séquence peptidique (Ullrich, Gray et al. 1986), ainsi que l'*insulin receptor-related receptor* InsRR.

Il peut répondre à trois agonistes naturels : l'IGF1, et l'IGF2 qui sont synthétisés par la quasi-totalité des types cellulaires (Dupont, Pierre et al. 2003), et l'insuline synthétisée au niveau des îlots β du pancréas. Son affinité pour IGF1 et IGF2 peut être sensiblement équivalente ou inférieure pour l'IGF2 selon le type cellulaire (Li, Pourpak et al. 2009), tandis que l'insuline se lie avec une affinité nettement moindre (Morrione, Valentinis et al. 1997). Par ailleurs, le ligand IGF1 peut également se lier au récepteur de l'insuline avec une affinité inférieure à l'insuline et inférieure à son affinité de liaison avec IGF1R. L'IGF1 peut également se fixer sur l'*insulin-like growth factor 2 receptor* (IGF2R) avec une faible affinité, mais ce récepteur n'agirait que pour réguler négativement la signalisation induite par IGF2 et IGF1, n'ayant aucune activité catalytique contrairement aux RTKs (il ne servirait à priori qu'à séquestrer les ligands et favoriser leur dégradation après internalisation du récepteur lié). Certaines études semblent néanmoins suggérer une activité signalétique d'IGF2R en réponse à l'IGF2 (El-Shewy, Lee et al. 2007). Les combinaisons d'interactions possibles ligands-récepteurs et leurs affinités relatives sont résumées dans le tableau I.

La disponibilité de ces ligands dans le milieu extracellulaire est conditionnée par les *IGF binding proteins* (IGFBPs) dont l'affinité pour IGF1 et IGF2 peut entrer en jeu non seulement en entravant leur capacité à interagir avec un récepteur, mais aussi en constituant un réservoir mobilisable de ces ligands (Dupont, Pierre et al. 2003). Pouvant s'associer avec la matrice extracellulaire, aussi bien qu'avec la membrane plasmique, les

IGFBPs peuvent également constituer le substrat de métalloprotéases régulant par leur activité protéolytique la disponibilité des IGFs (Fowlkes, Thraikill et al. 1995).

Peptide	Récepteur
Insuline	récepteur de l'insuline –IR- (haute affinité) ; récepteur de l'IGF1 –IGF1R- (faible affinité)
IGF1	IGF1R (haute affinité) ; IR (affinité plus faible) ; IGF2R (affinité la plus faible)
IGF2	IGF2R (haute affinité) ; IGF1R (affinité plus faible) ; IR (affinité la plus faible)

Tableau I. Affinités relatives des ligands et récepteurs de la famille de l'insuline.
D'après (Fernandez and Torres-Aleman 2012)

L'IGF1R est exprimé de façon ubiquitaire et se retrouve donc également au niveau des cellules des tubes collecteurs des reins, où V2R est physiologiquement exprimé (Riedemann and Macaulay 2006; Pavlov, Ilatovskaya et al. 2013). Le récepteur est constitué de deux paires de sous-unités α et β associées entre-elles par des ponts disulfures, les domaines catalytiques permettant son activité kinase se trouvant sur la portion intracellulaire de ses sous-unités β . Le récepteur fonctionne donc en hétérotétramère composé de deux sous-unités α extracellulaires associées à deux sous-unités β transmembranaires, telle que représenté dans la figure 6 (Baserga, Hongo et al. 1997), bien qu'il puisse également être considéré comme un homodimère $(\alpha\beta)_2$ (Ward, Lawrence et al. 2007).

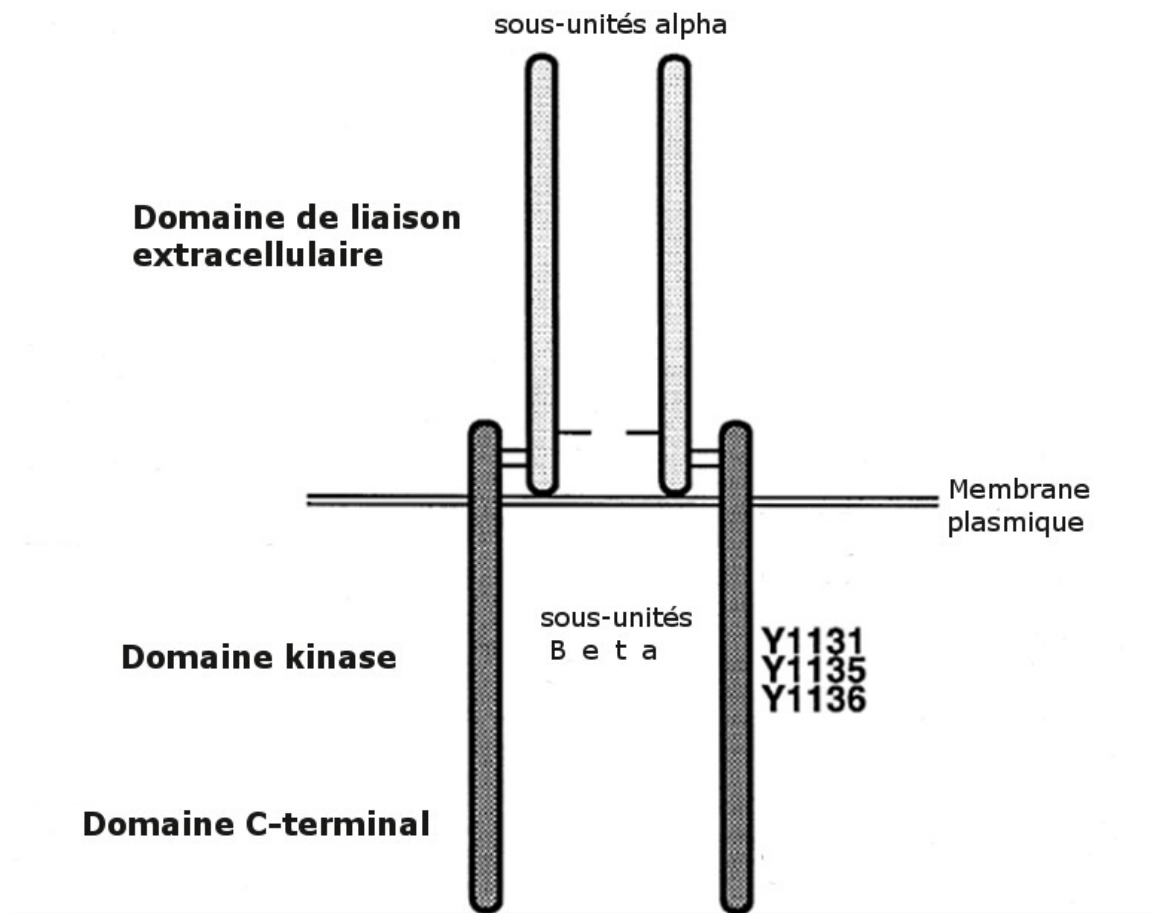


Figure 6. Représentation simplifiée des domaines fonctionnels d'IGF1R. D'après (Baserga, Hongo et al. 1997)

Alors que la majorité des RTKs n'oligomérisent que sous l'effet de la liaison de leurs ligands respectifs, L'IGF1R se trouve déjà sous forme oligomérique à l'état basal (Ward, Lawrence et al. 2007). L'activation d'IGF1R par IGF1 ou IGF2 conduit à son autophosphorylation croisée, séquentiellement sur les tyrosines 1131, 1135 et 1136 situées sur la partie intracellulaire des sous-unités β , permettant de libérer l'activité kinase du récepteur (Ullrich and Schlessinger 1990; Kato, Faria et al. 1994). En réponse à son activation, IGF1R recrute divers effecteurs notamment sur certaines de ses tyrosines désormais phosphorylées, menant d'une part à l'activation de PI3K et de la sérine-thréonine kinase Akt via le recrutement d'*Insulin receptor substrate 1* (IRS-1), et de l'autre à l'activation des MAPK ERK 1/2 via le recrutement de *SH2 domain containing protein* (Shc), comme l'illustre la figure 7 (Pollak, Schernhammer et al. 2004).

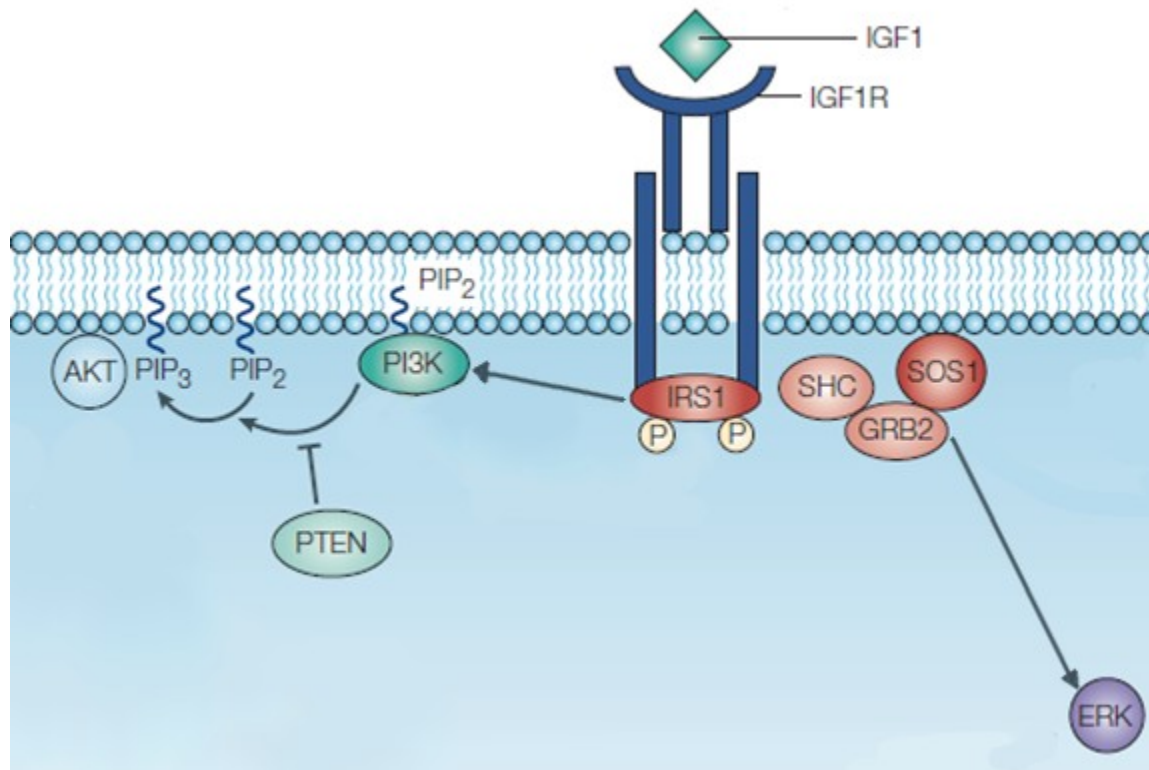


Figure 7. Représentation simplifiée de la signalisation par IGF1R. La stimulation du récepteur par l'IGF1 mène au recrutement d'IRS-1 et de Shc. Le recrutement et la phosphorylation d'IRS-1 par le récepteur favorisent l'activation de la PI3K, qui induit l'activation d'Akt via la phosphorylation du phosphatidyl inositol biphosphate (PIP2) en phosphatidyl inositol triphosphate (PIP3). Cette action est contrecarrée par l'action de *phosphatase and tensin homolog* (PTEN), qui déphosphoryle PIP3. D'autre part, le recrutement et la phosphorylation de Shc favorise son interaction avec ses partenaires *growth factor receptor bound protein 2* (Grb2) et *son of sevenless homolog 1* (SOS1) et l'activation subséquente d'ERK. Il est à noter que certains travaux suggèrent que la voie Shc aurait dans certains cas plutôt lieu en aval d'EGFR après transactivation par IGF1R (Roudabush, Pierce et al. 2000). Schéma dérivé de (Pollak, Schernhammer et al. 2004).

1.5.2.2.2. Signalisation par la β -arrestine 1

Plus récemment, il a été mis en évidence que la β -arrestine 1 joue un rôle fondamental dans l'activation de la voie ERK 1/2 en aval d'IGF1R. En effet, la stimulation du récepteur par l'IGF1 induit le recrutement de la β -arrestine 1 à IGF1R et l'inhibition de l'expression de cette arrestine annule presque totalement l'activation d'ERK en réponse à l'IGF1 (Girnita, Shenoy et al. 2007). Cette fonction de l'arrestine reposerait en particulier sur des phénomènes d'ubiquitination de la β -arrestine 1 par l'E3 ubiquitine ligase *Mouse double minute 2 homolog* MDM2, permettant le trafic de la β -arrestine 1 dans les endosomes et l'activation de la signalisation ERK (Girnita, Shenoy et al. 2007). Il est intéressant de noter que MDM2, recrutée au récepteur via le rôle d'adaptateur de la β -arrestine 1 est également responsable de l'ubiquitination d'IGF1R menant à sa dégradation par le protéasome (Girnita, Shenoy et al. 2005; Girnita, Shenoy et al. 2007; Vasilcanu, Vasilcanu et al. 2008), et qui pourrait être également nécessaire à l'activation d'ERK (Sehat, Andersson et al. 2007; Vasilcanu, Vasilcanu et al. 2008). Deux autres E3 ubiquitine ligases pouvant agir sur IGF1R, c-Cbl et Nedd4 ont également été identifiées, Nedd4 ne favorisant pas la dégradation par le protéasome d'IGF1R (Sehat, Andersson et al. 2008; Yang and Kumar 2010).

Malgré certaines conclusions tirées par les auteurs dans ces papiers, il faut remarquer que bien que l'activation d'ERK par IGF1R est clairement dépendante de MDM2, il est difficile d'affirmer si elle repose sur la capacité de cette enzyme à ubiquitiner l'arrestine (et ainsi favoriser sa localisation dans les endosomes), sur l'ubiquitination d'IGF1R, ou les deux. En effet, au-delà de corrélations, il n'existe pour l'instant aucune preuve directe que l'inhibition sélective de l'ubiquitination de l'arrestine ou d'IGF1R (et non simplement l'inhibition globale de MDM2) prévient l'activation d'ERK. Par exemple Sehat et al. montrent qu'un mutant à la partie C-terminale tronquée d'IGF1R ne pouvant plus être ubiquitiné perd sa capacité à activer ERK alors que la voie Akt reste intacte et en déduisent que l'ubiquitination du récepteur est nécessaire à l'activation d'ERK (Sehat, Andersson et al. 2007). Cependant, il est possible que la troncation du récepteur empêche le recrutement de la β -arrestine 1, et par conséquent l'activation d'ERK qui en dépend, en plus de prévenir l'ubiquitination du récepteur par MDM2 qui nécessite l'entremise de l'arrestine.

Par ailleurs, le même groupe de recherche a démontré que l'activation d'ERK en aval d'IGF1R, contrairement à celle d'Akt, peut exister indépendamment de l'activité kinase du récepteur (Girnita, Shenoy et al. 2007; Vasilcanu, Vasilcanu et al. 2008; Zheng, Shen et al. 2012). La β -arrestine 1 contribue d'ailleurs également à l'activation d'ERK via l'IGF1R sans affecter la voie Akt, en permettant l'internalisation d'IGF1R après y avoir été recrutée, l'internalisation du récepteur étant nécessaire à l'activation de la voie ERK via Shc sans impact sur la voie Akt passant par IRS-1 (Chow, Condorelli et al. 1998; Lin, Daaka et al. 1998; Vasilcanu, Vasilcanu et al. 2008). L'hypothèse d'une implication de l'ubiquitination d'IGF1R dans la régulation de l'internalisation de ce récepteur par la β -arrestine 1 a été évoquée sans toutefois avoir été confirmée au delà d'une cohérence des données expérimentales avec un tel modèle (Girnita, Girnita et al. 2003). Une capacité d'IGF1R à signaler indépendamment de son activité catalytique (et donc de son autophosphorylation) a également été rapportée dans des cellules embryonnaires de souris pour la voie Akt, caractérisant la possibilité d'activer Akt par une voie dépendante de la β -arrestine 1 malgré l'inhibition de l'activité catalytique d'IGF1R et l'absence de phosphorylation d'IRS-1 (Povsic, Kohout et al. 2003). Un schéma représentatif des fonctions de la β -arrestine 1 en aval d'IGF1R est présenté dans la figure 8.

Les récepteurs tyrosines kinases jouent un rôle important dans la prolifération, la croissance, et la transformation cellulaire sous l'effet de leur stimulation par les facteurs de croissance. Il en est ainsi de l'activation d'IGF1R par IGF1 et IGF2, expliquant son implication dans la pathogénèse de maladies impliquant une prolifération anarchique tels que certains cancers (Baserga, Hongo et al. 1997; Baserga 2000; Pollak, Schernhammer et al. 2004; Li, Pourpak et al. 2009) en plus de son rôle physiologique notamment dans la croissance chez l'être humain (Gourmelen, Le Bouc et al. 1984). Bien que l'activation de la voie des MAPK ERK 1/2 par IGF1R soit souvent considérée comme mitogénique, l'implication de la voie ERK et/ou Akt dans la prolifération dépend néanmoins du type cellulaire (Dupont, Pierre et al. 2003). L'activation d'ERK 1/2 par V2R via l'IGF1R pourrait d'ailleurs expliquer un potentiel pro-mitogénique du récepteur V2R observé in vivo dans le rein de rats (Alonso, Galibert et al. 2009).

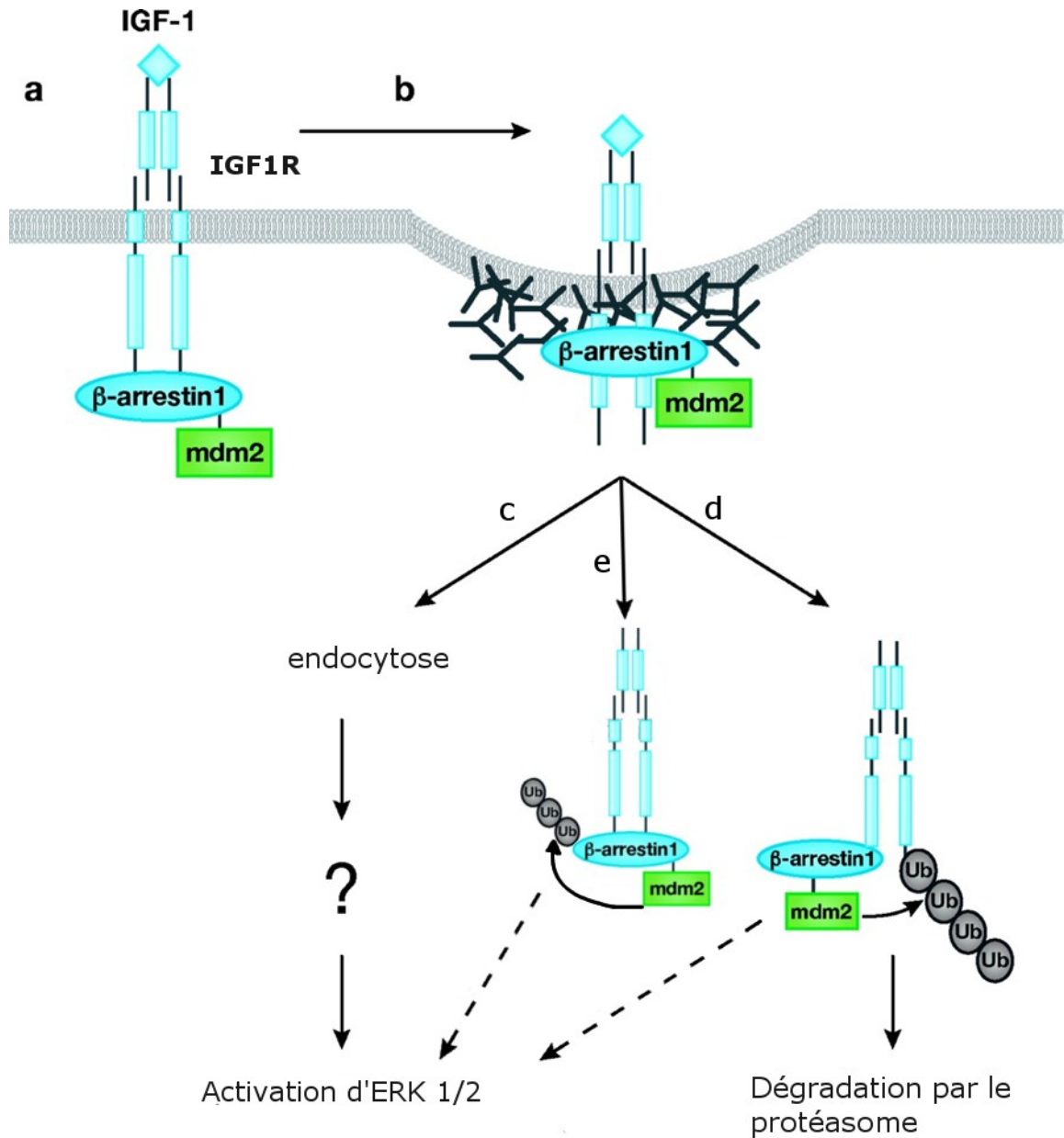


Figure 8. Fonctions de la β -arrestine 1 en aval d'IGF1R. La stimulation d'IGF1R par l'IGF1 induit le recrutement de la β -arrestine 1 et de MDM2 (a), conduisant à la formation de puits de clathrine (b) et à l'internalisation du récepteur qui est requise pour l'activation d'ERK 1/2 (c). L'ubiquitination du récepteur par MDM2 favorise sa dégradation par le protéasome (d). Les mécanismes d'activation d'ERK 1/2 une fois IGF1R internalisé restent indéterminés (c), mais on sait que l'activité de E3 ubiquitine ligase de MDM2 joue un rôle important, possiblement par ubiquitination de l'arrestine (e) et/ou du récepteur (d). Schéma dérivé d'après (Hupfeld and Olefsky 2007).

1.6. Le BRET

Une partie des résultats présentés dans ce mémoire repose sur des études de transfert d'énergie de résonance de bioluminescence (BRET). Afin de faciliter la compréhension de ces données, exposons un court rappel des principes du BRET. Le BRET est une méthode spectroscopique d'étude des interactions protéine-protéine permettant de mesurer en temps réel en cellules vivantes l'existence d'une proximité spatiale de moins de 10 nm entre deux protéines fusionnées respectivement à une enzyme dérivée de la *Renilla* luciférase (Rluc) et à une protéine fluorescente de type green fluorescent protein (GFP) (Xu, Piston et al. 1999). Lorsque la Rluc et la protéine fluorescente (FP) sont fusionnées à la même protéine, il est également possible de mesurer un BRET intramoléculaire pour détecter des changements conformationnels. Lors d'un essai de BRET, le substrat de la Rluc, la coelentérazine, est introduit dans le milieu et son oxydation par l'enzyme génère l'émission de lumière, un phénomène appelé bioluminescence (Inouye and Shimomura 1997). Si cette réaction survient à moins de 10 nm d'un fluorophore accepteur dont la gamme de longueurs d'ondes d'excitation est compatible avec l'émission de lumière par la Rluc, un transfert non radiatif d'énergie a lieu et conduit à l'émission de lumière à la longueur d'onde d'émission de la FP (différente de celle de la Rluc) : c'est que l'on appelle le BRET (Xu, Piston et al. 1999; Angers, Salahpour et al. 2000; Boute, Jockers et al. 2002). Le ratio BRET est calculé en rapportant la valeur de fluorescence résultant du transfert d'énergie de la Rluc vers la FP, sur la luminescence.

Il est désormais possible de fusionner les protéines que l'on souhaite étudier par BRET à la RlucII, une version mutée de Rluc ayant un meilleur rendement quantique lors de l'oxydation de son substrat spécifique DeepBlueC (Loening, Fenn et al. 2006), et à la GFP10 dont les mutations par rapport à la GFP native lui confèrent une longueur d'onde d'excitation à 400 nm se superposant parfaitement avec l'émission de la RlucII (Mercier, Salahpour et al. 2002). Lorsque l'on transfecte une quantité fixe de plasmide exprimant une protéine fusionnée à la RlucII et une concentration croissante d'accepteur (c'est-à-dire de plasmides exprimant une protéine fusionnée à la GFP10), une courbe de titration

de BRET est générée. Dans ce type de courbe, la saturation du BRET selon une fonction hyperbolique lorsque la fluorescence totale non liée au BRET (donc la quantité de GFP) augmente par rapport à la valeur fixe de luminescence témoigne de la spécificité des interactions entre les protéines marquées, une interaction non-spécifique liée à des collisions aléatoires se traduisant par une augmentation linéaire (Mercier, Salahpour et al. 2002).

Pour un couple donné de protéines recombinantes donneuses (fusionnée RlucII) et acceptrice (fusionnée GFP10) la valeur maximale du BRET (BRET max) peut être le reflet de la quantité de dimères existant au moment de la mesure. Cependant, il est important de considérer qu'un changement du BRET max peut également résulter d'un changement conformationnel au sein du dimère modifiant la distance entre les domaines RlucII et GFP10. Une valeur informative pour l'interprétation de ces données présentées sur des courbes de titration de BRET est le BRET₅₀: valeur du ratio fluorescence/luminescence correspondant à la moitié du BRET max. Le BRET₅₀ peut être considéré comme une mesure de l'affinité relative entre les deux partenaires de BRET (Mercier, Salahpour et al. 2002; Gales, Van Durm et al. 2006). Une diminution du BRET₅₀ en réponse à l'AVP signifie qu'une quantité inférieure d'accepteur fusionné GFP10 est suffisante pour obtenir la moitié du BRET max et donc que l'affinité entre le donneur et l'accepteur est plus grande en présence d'AVP, et inversement. Si cette affinité relative ne change pas ou peu en réponse à l'agoniste, on peut en déduire que la variation du BRET max reflète un changement conformationnel plutôt qu'une modulation du nombre de dimères.

2. Objectifs spécifiques

Les objectifs spécifiques de ce projet peuvent être classés en deux grands axes :

- La signalisation de V2R par l'intermédiaire de $G\alpha_{12}$:
 - Mettre en évidence un couplage avec $G\alpha_{12}$
 - Étudier la modulation de l'activité de $G\alpha_{12}$ et de ses effecteurs
 - Déterminer l'impact de $G\alpha_{12}$ sur la production d'AMPc en réponse à l'AVP
- La transactivation d'IGF1R par V2R :
 - Confirmer l'intégrité des éléments clés déjà connus de la voie dans nos cellules
 - Estimer l'importance de la voie dans l'activation d'ERK en réponse à l'AVP
 - Étudier le mode d'activation de Src par V2R
 - Identifier la métalloprotéase impliquée
 - Identifier le facteur autocrine/paracrine d'activation d'IGF1R

3. Matériel et méthodes

3.1. Matériel

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), PBS dépourvu de calcium et de magnésium (Dulbecco's phosphate buffer saline), sérum fœtal de bœuf, glutamine, G418, pénicilline, et streptomycine proviennent de Wisent inc. La coelentérazine DeepBlueC ainsi que les plaques 96 puits à fond blanc opaque, les substrats de HRP pour la chimiluminescence (ECL), et le kit AlphaScreen® pour p-ERK proviennent de Perkin-Elmer Life Sciences inc. Les plaques de culture 6 puits viennent de BD biosciences. AVP, ARP101 et phénanthroline proviennent de Sigma chemical inc. AG1024, IGF1, IGF2, MMP-9 inhibitor I, MMP-3 inhibitor II et CTX viennent de Calbiochem inc. Le marimastat provient de Tocris Bioscience inc. Les anticorps reconnaissant ERK 1/2 sous forme phosphorylée et sous forme totale, et les anticorps reconnaissant IGF1R β viennent de Santa Cruz Biotechnology inc. Les anticorps reconnaissant IGF1R phosphorylé sur Y-1131 ou Y-1135/1136, c-Src phosphorylé sur Y-416, β -arrestines 1/2 et actine β viennent de Cell Signaling Technology inc. Les anticorps anti-Src total (GD11), neutralisant anti-IGF1, et neutralisant anti-IGF2 proviennent de Upstate Biotechnology/Millipore inc. Les anticorps conjugués HRP anti-souris et anti-lapin viennent de GE Healthcare. L'exoenzyme C3 transférase modifiée pour traverser les membranes cellulaires (Cell permeable rho inhibitor) provient de Cytoskeleton inc.

3.2. Vecteurs d'expression

Toutes les constructions utilisées pour les expériences présentées dans ce rapport étaient présentes dans le laboratoire du Dr. Bouvier antérieurement au début de ce projet. Les séquences complètes des ADN complémentaires d'intérêt avaient été sous-clonées dans le vecteur d'expression pcDNA3.1 (Invitrogen inc., Carlsbad, CA, USA). Dans le cas de V2R-RlucII, la séquence codant pour la *Rénilla* luciférase II (RlucII) est présente en 3' du cadre de lecture (C-terminal de la protéine) de la séquence complète (sauf codon stop) codant pour le récepteur V2R. Dans le cas des constructions GFP10-G α et RlucII-G α , la

séquence du rapporteur (GFP10 ou RlucII) est située en 5' du cadre de lecture (N-terminal de la protéine) de la séquence codant pour la sous-unité $G\alpha$.

3.3. Culture cellulaire et transfection

Pour les expériences relatives à la voie $G\alpha_{12}$, les cellules humaines embryonnaires de rein 293 (HEK293) ont été maintenues dans du DMEM complété avec 10% (v/v) de sérum fœtal de bœuf, 2 mM de glutamine, 100 unités/mL de pénicilline et 100 μ g/mL de streptomycine à 37°C dans une atmosphère humidifiée composée de 95% d'air et 5% de CO_2 . Les transfections transitoires ont été effectuées en utilisant le polyéthylèneimine (PEI) 25 kD linéaire comme agent de transfection (Polysciences inc., Warrington, PA, USA). Dans tous les cas, la quantité de plasmides à transférer a été maintenue constante en complétant avec la quantité appropriée d'ADN de sperme de saumon (SSD, Invitrogen inc., Carlsbad, CA, USA). Toutes les expériences ont été effectuées 48 heures après transfection.

Pour les expériences relatives à la transactivation, les HEK293 exprimant stablement V2R (lignée déjà disponible dans le laboratoire au commencement du projet) ont été maintenues dans du DMEM 10% FBS contenant 200 μ g/mL de G418 à l'exception des 48h précédant une expérience où le milieu a été remplacé par du DMEM 10% FBS sans G418. Les SiARNs contre β -arrestines 1 et 2 proviennent de Qiagen inc. et ont été transfectés à une concentration finale de 100 pM (50 pM pour β -arrestine 1 et 50 pM pour β -arrestine 2) à l'aide de la Lipofectamine 2000 selon le protocole du fabricant.

3.4. BRET

Pour chacune des expériences de BRET, la durée de stimulation offrant la meilleure fenêtre dynamique (la plus grande amplitude de variation avant et après stimulation) a été choisie. Les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS, détachées et resuspendues dans du PBS. Les cellules ont ensuite été distribuées dans des plaques 96 puits à fond blanc (Perkin Elmer inc., Canada) à raison de 100 000 cellules par puits. Les cellules

stimulées ont été incubées à température ambiante avec 10^{-7} M d'AVP pendant 10 minutes pour les expériences de titration et 15 minutes pour les expériences avec le biosenseur EPAC BRET. Pour les expériences de type dose réponse, les cellules ont reçu une dose variable d'AVP pour l'expérience concernant V2R, ou de thromboxane A2 (TXA2) pour l'expérience concernant le récepteur TP α . Dans tous les cas, l'incubation avec l'agoniste ou le véhicule a duré 10 min. La DeepBlueC (substrat de RlucII permettant l'émission de lumière après oxydation par l'enzyme) a été ajoutée à une concentration finale de 5 μ M. Les lectures ont été effectuées 2 min après ajout de DeepBlueC en utilisant le Mithras LB 940 ® (Berthold technologies, France) qui lit simultanément la lumière émise par la RlucII (400 nm) et la GFP10 (510 nm). L'appareil fournit également la valeur du signal BRET, qui correspond au ratio de la lumière émise par la GFP10 sur la lumière liée à l'oxydation de la DeepBlueC par RlucII. Les valeurs ont été corrigées en soustrayant le signal de fond de BRET (signal détecté dans les conditions où les cellules expriment seulement les constructions RlucII.) pour obtenir le BRET net.

Pour les courbes de titration de BRET, les cellules ont été transfectées avec un niveau constant de constructions fusionnées RlucII et une quantité croissante de constructions fusionnées GFP10. La fluorescence non liée au BRET à 510 nm a été mesurée sur l'appareil Fluorocount ® (Packard biosciences, USA) avant l'ajout de DeepBlueC. Les valeurs de fluorescence ont été corrigées en soustrayant la valeur obtenue pour les cellules n'exprimant pas de constructions GFP10. Après ajout de DeepBlueC, la fluorescence et la luminescence ont été mesurées au Mithras LB 940 ® comme décrit précédemment. Les valeurs de BRET ont ensuite été exprimées en fonction du ratio fluorescence non liée au BRET/luminescence, ce ratio correspondant à l'expression relative des protéines « acceptrices » sur les protéines « donneuses » de BRET. Les données ont ensuite été analysées par régression non linéaire avec le logiciel GraphPad Prism 4 (régression de type « liaison sur un site, hyperbole »). La valeur de BRET₅₀ donnée dans les figures de titration correspond à la valeur du ratio fluorescence/luminescence pour laquelle la valeur du BRET est égale à la moitié de la valeur maximale et est calculée par le logiciel GraphPad Prism 4 lors de la régression non linéaire. Pour les expériences de type dose-réponse, les données ont également été

analysées par régression non-linéaire avec GraphPad Prism 4 (régression de type « dose-réponse sigmoïdale »). Les valeurs d'EC₅₀ correspondent à la dose d'agoniste pour laquelle la moitié de la variation de BRET maximale est obtenue et sont calculées par le logiciel GraphPad Prism 4 lors de la régression non linéaire.

3.5. Essai EPAC pour mesurer l'AMPC

Dans le cas des expériences de mesure d'AMPC avec le biosenseur BRET EPAC, les cellules ont été transfectées 48 h avant le BRET avec les constructions exprimant le biosenseur en plus des constructions exprimant V2R sauvage et les sous-unités G α surexprimées. Il s'agit ensuite d'une simple expérience de BRET comme décrit précédemment. Le BRET net est calculé en soustrayant le signal de fond de BRET comme précédemment décrit.

Dans le cas où l'exoenzyme C3 transférase a été utilisée pour bloquer la voie rhoA, les cellules ont été incubées 2h avant l'expérience de BRET avec 1 μ g/mL de C3.

3.6. Immunobuvardage

Pour chacune des expériences d'immunobuvardage, la durée de stimulation offrant la meilleure fenêtre dynamique a été choisie. Les cellules ont été cultivées en plaques 6 puits et rendues quiescentes par sevrage (milieu dépourvu de sérum) durant 16h. Les cellules ont ensuite été incubées avec ou sans inhibiteurs pour le temps indiqué dans la partie résultats puis stimulées par un agoniste à la dose et pour la durée indiquées dans la partie résultats. La phosphorylation d'ERK 1/2 a été détectée par immunobuvardage à l'aide d'un anticorps primaire monoclonal de souris reconnaissant p-ERK et d'un anticorps secondaire anti-souris conjugué à la *Horseradish peroxidase* (HRP) pour permettre la détection de chimiluminescence à l'aide du LAS4000[®] de GE Healthcare Life Sciences inc. et la mesure de l'immunoréactivité à partir des images numériques via le logiciel ImageJ[®]. Après quantification des bandes par densitométrie, les membranes de nitrocellulose sur lesquelles ont été effectués les transferts ont été dépouillées

(*stripped*) de leurs anticorps, puis ré-incubées avec des anticorps polyclonaux de lapin anti-ERK détectant la totalité des protéines ERK indépendamment de leur état de phosphorylation. La phosphorylation d'ERK a été normalisée en rapportant pour chaque condition la quantité de p-ERK sur la quantité d'ERK total et les résultats sous forme de graphique ont été exprimés en pourcentage d'activation maximal ou en facteur d'activation par rapport au basal. La phosphorylation de Src et d'IGF1R a été étudiée, présentée et normalisée de la même façon en utilisant respectivement l'anticorps primaire de lapin polyclonal anti-p-Src reconnaissant la forme phosphorylée sur la tyrosine 416 et son anticorps secondaire anti-lapin conjugué à la HRP, suivi de l'anticorps de souris monoclonal anti-Src (GD11) après dépouillement de la membrane. La méthode est identique pour la phosphorylation d'IGF1R avec l'anticorps anti-phosphotyrosine 1131 (ou 1135-1136) d'IGF1R et son anticorps secondaire suivi de l'anticorps anti-IGF1R β après dépouillement de la membrane. La détection des β -arrestines a été réalisée à l'aide d'anticorps monoclonal de lapin reconnaissant β -arrestines 1 et 2, suivi d'un anticorps anti-lapin conjugué à la HRP. La détection de l'actine β a été réalisée à l'aide d'un anticorps polyclonal de lapin anti- β actine, suivi d'un anticorps anti lapin conjugué HRP.

3.7. AlphaScreen

Les cellules ont été cultivées en plaque 96 puits et rendues quiescentes par sevrage de 16h. Les cellules ont ensuite été incubées avec ou sans inhibiteurs pour le temps indiqué dans la partie résultats puis stimulées par un agoniste à la dose et pour la durée indiquées dans la partie résultats. La phosphorylation d'ERK 1/2 a été détectée à l'aide du kit d'AlphaScreen® selon le protocole du fabricant.

3.8. Analyse de données

Les courbes de régression et analyses statistiques ont été réalisées sur le logiciel GraphPad Prism 4®.

4. Résultats

Chacune des figures présentées dans la partie « résultats » de ce mémoire est tirée de données expérimentales originales de ce mémoire. Au début de ce projet, le papier d'Oligny et al. présenté dans l'introduction de ce mémoire (Oligny-Longpre, Corbani et al. 2012) était en préparation et certaines des expériences que j'ai réalisées dans le cadre de ce mémoire étaient requises pour la complétion de l'article. Étant donné que cet article constitue la base du travail effectué sur la transactivation d'IGF1R dans ce mémoire, les conclusions du papier indépendantes de mon travail ont été discutées en introduction tandis que les résultats originaux obtenus dans le cadre de ce mémoire sont présentés dans la section suivante. Les résultats qui suivent sont donc tous des résultats originaux sans exception et ceux qui ont été inclus dans l'article d'Oligny et al. sont sous-titrés par la mention « Publié (Oligny-Longpre, Corbani et al. 2012) » sous la figure (figure 18 A et figures 19 A et B).

4.1. Couplage de $G\alpha_{12}$ avec V2R

4.1.1. Étude de l'interaction entre V2R et $G\alpha_{12}$

Certains résultats préliminaires (non publiés) obtenus dans le laboratoire par Billy Breton (à l'époque étudiant au doctorat) suggéraient la possibilité pour V2R d'interagir avec la sous-unité $G\alpha_{12}$. Afin de confirmer la spécificité de cette interaction entre V2R et $G\alpha_{12}$, une approche par transfert d'énergie de résonance de bioluminescence (BRET) a été utilisée. Afin d'étudier l'interaction entre V2R et les $G\alpha$, les cellules humaines embryonnaires de rein 293 (HEK293) ont été transfectées de manière à exprimer transitoirement la protéine recombinante de V2R fusionné en C-terminal avec la RlucII (V2R-RlucII) et la sous-unité $G\alpha$ fusionnée en N-terminal avec GFP10 (GFP10- $G\alpha$). Une quantité fixe de plasmide exprimant V2R-RlucII et une concentration croissante d'accepteur, c'est-à-dire de plasmides exprimant soit GFP10-Gas, soit GFP10- $G\alpha_{12}$ ont été transfectées de manière à générer une courbe de titration de BRET.

L'augmentation hyperbolique du BRET jusqu'à saturation lorsque la quantité de GFP10-G α augmente par rapport à V2R-RlucII, observée aussi bien pour GFP10-G α 12 que pour GFP10-G α s, démontre la capacité pour V2R-RlucII d'interagir de façon spécifique non seulement comme il était attendu avec GFP10-G α s (figure 9B) mais aussi avec GFP10-G α 12 (figure 9A). La sélectivité de ces interactions est confirmée par la modulation du BRET par l'AVP. En effet, la valeur du ratio BRET est affectée après 10 minutes de stimulation par l'AVP avec une augmentation du BRET max lorsque V2R est stimulé dans le cas de G α 12, et une diminution dans le cas de G α s. Une augmentation du BRET max en réponse à l'AVP ne témoigne pas nécessairement d'un plus grand nombre de dimères V2R-RlucII/GFP10-G α 12, et une diminution de BRET max ne représente pas forcément une dissociation des dimères V2R-RlucII/GFP10-G α s. Dans le cas de GFP10-G α 12, le BRET₅₀ diminue en réponse à l'AVP suggérant une augmentation de l'affinité du récepteur pour GFP10-G α 12 en réponse à l'AVP (figure 9A). L'augmentation du BRET max en réponse à l'AVP semble ainsi témoigner d'une augmentation du couplage entre V2R-RlucII et GFP10-G α 12 après 10 minutes de stimulation par l'AVP. Le BRET₅₀ diminue au contraire pour GFP10-G α s indiquant plutôt une diminution de l'affinité de V2R-RlucII et GFP10-G α s en réponse à l'AVP (figure 9B), la diminution du BRET max témoignant ainsi possiblement d'une diminution du couplage entre V2R-RlucII et GFP10-G α s après 10 minutes de stimulation par l'AVP.

Figure 9

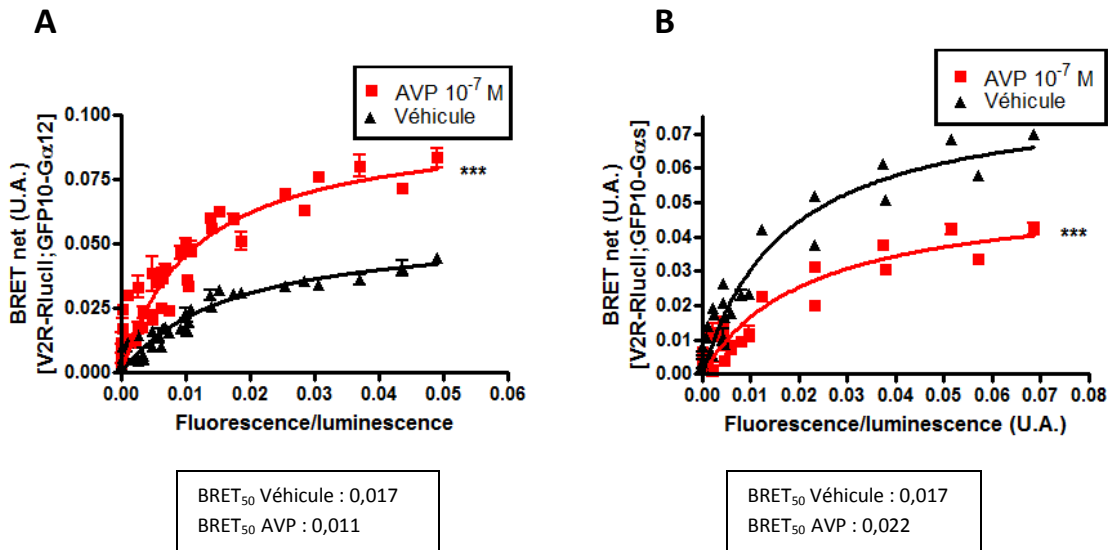


Figure 9. Étude de l'interaction entre V2R et Gα12. Les cellules HEK293 ont été transfectées 48h avant les expériences de BRET qui ont été réalisées comme décrit dans la section matériel et méthodes. La fluorescence indépendante du BRET, émise à 510 nm a été mesurée avec un Fluorocount® (Packard Biosciences, USA) après transfert des cellules dans la plaque 96 puits et avant ajout de DeepBlueC. **A**, les cellules HEK293 ont été transfectées avec les plasmides codant pour V2R-RlucII et en concentration croissante GFP10-Gα12, et stimulées pendant 10 minutes avec 10⁻⁷ M d'AVP ou le véhicule. **B**, les cellules HEK293 ont été transfectées avec les plasmides codant pour V2R-RlucII et en concentration croissante GFP10-Gαs et stimulées pendant 10 minutes avec 10⁻⁷ M d'AVP ou le véhicule. Les données de 3 expériences indépendantes ont été rassemblées pour A et 2 expériences pour B. Chaque expérience indépendante a été réalisée en triplicata. Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard de la moyenne (SEM). Les valeurs de BRET₅₀ ont été obtenues par l'analyse des données en régression non-linéaire du logiciel GraphPad Prism 4®. Les analyses statistiques ont été effectuées sur le logiciel GraphPad Prism® et correspondent à un test t de Student non apparié comparant la régression non-linéaire des deux courbes. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001.

4.1.2. Étude de la modulation de l'hétérotrimère G12 par l'AVP

Comme il a été décrit dans l'introduction, l'activation d'une protéine G hétérotrimérique implique, si ce n'est une dissociation, un réarrangement conformationnel entre la sous-unité $G\alpha$ et le dimère $G\beta\gamma$. Afin de comprendre si l'interaction entre V2R et $G\alpha_{12}$ se traduit en une régulation de l'activité de G12 par l'AVP, la modulation de l'interaction entre RlucII- $G\alpha_{12}$ et GFP10- $G\gamma_1$ par des doses croissantes d'AVP a été mesurée par BRET. À titre de contrôle, cette même interaction a été mesurée en réponse au thromboxane A2 (TXA2) dont le récepteur $TP\alpha$ est connu pour se coupler à G12/13 et les activer (Offermanns, Laugwitz et al. 1994), et l'interaction entre RlucII- $G\alpha_s$ et GFP10- $G\gamma_1$ a été mesurée en réponse à l'AVP.

Les cellules HEK293 ont été transfectées de manière à exprimer transitoirement le récepteur V2R sauvage, RlucII- $G\alpha$ (12 ou s) et GFP10- $G\gamma_1$ pour les dose-réponses d'AVP, ou le récepteur $TP\alpha$ sauvage, RlucII- $G\alpha_{12}$ et GFP10- $G\gamma_1$ pour la dose-réponse de TXA2. En réponse à l'AVP, le BRET entre RlucII- $G\alpha_{12}$ et GFP10- $G\gamma_1$ augmente avec la dose de ligand, témoignant d'une modulation de la conformation entre $G\alpha_{12}$ et $G\gamma$ au sein de l'hétérotrimère G12 (figure 10A). Il n'est pas possible de déduire de ces informations s'il s'agit d'une activation ou d'une inhibition de G12. Néanmoins, la diminution du BRET entre RlucII- $G\alpha_{12}$ et GFP10- $G\gamma_1$ en réponse au TXA2 dans les cellules exprimant $TP\alpha$ pourrait indiquer qu'il s'agirait plutôt d'une inhibition (figure 10C). En effet, si G12 était activée en aval de V2R, on pourrait s'attendre à ce que le changement conformationnel soit similaire à celui qui survient en aval de $TP\alpha$ dont on connaît la capacité d'activer G12. On ne peut cependant pas exclure que les complexes protéiques en aval de V2R et $TP\alpha$ soient différents et contribuent à des changements conformationnels différents de l'hétérotrimère, se traduisant dans un cas par une augmentation de BRET et dans l'autre par une diminution, qui correspondraient tous deux à une activation.

La courbe dose-réponse pour le TXA2 permet également de confirmer la fonctionnalité de la sous-unité $G\alpha_{12}$ marquée en N-terminal. En effet, l'acheminement à la membrane des $G\alpha$ nécessite dans certains cas des modifications lipidiques au niveau de

leur N-terminus. C'est notamment le cas des G α 12 qui y sont palmitoylées et de G α i,o,z dont le N-terminus doit être clivé pour permettre leur myristoylation (ces dernières ne permettent donc pas un marquage N-terminal qui compromettrait le clivage de la méthionine terminale) (Evanko, Thiyagarajan et al. 2000). La modulation de l'hétérotrimère comprenant RlucII-G α 12 en réponse au TXA2 démontre que la sous-unité a été correctement acheminée à la membrane puisqu'elle interagit avec le récepteur TP α qui module son activité.

Pour Gs (RlucII-G α s et GFP10-G γ 1), l'AVP induit globalement une diminution du BRET en fonction de la dose, mais on remarque cependant que la courbe est biphasique avec d'abord une petite augmentation du BRET pour de faibles concentrations d'AVP, suivie d'une diminution plus importante pour de plus fortes doses (figure 10B). Ce phénomène est intrigant et pourrait notamment s'expliquer par un glissement du couplage de V2R avec Gs vers un couplage avec G12 pour de plus fortes concentrations d'AVP. On effet, on peut constater que l'EC₅₀ (dose nécessaire pour l'obtention de la moitié de l'amplitude de la variation de BRET et donc de la moitié de l'effet observé) de la phase descendante de la courbe de Gs est du même ordre de grandeur que celui de la courbe de G12 pour l'AVP. Cela pourrait indiquer que la phase descendante de Gs correspondrait non pas à son activation par V2R, mais plutôt à un changement conformationnel ou une dissociation entre G α s et G $\beta\gamma$ liée à son remplacement dans le complexe V2R par G12. Un élément en faveur de cette hypothèse est que l'EC₅₀ d'activation des adénylates cyclases en réponse à l'AVP (qui dépend de Gs), est de l'ordre de 10⁻¹⁰ M (Oakley, Laporte et al. 1999), ce qui est nettement inférieur à l'EC₅₀ de la phase descendante (19,7 nM) mais semble compatible avec celui de la phase ascendante (entre 10⁻¹⁰ et 10⁻¹¹ M) qui correspondrait alors au changement conformationnel relatif à l'activation de Gs en réponse à l'AVP.

Figure 10

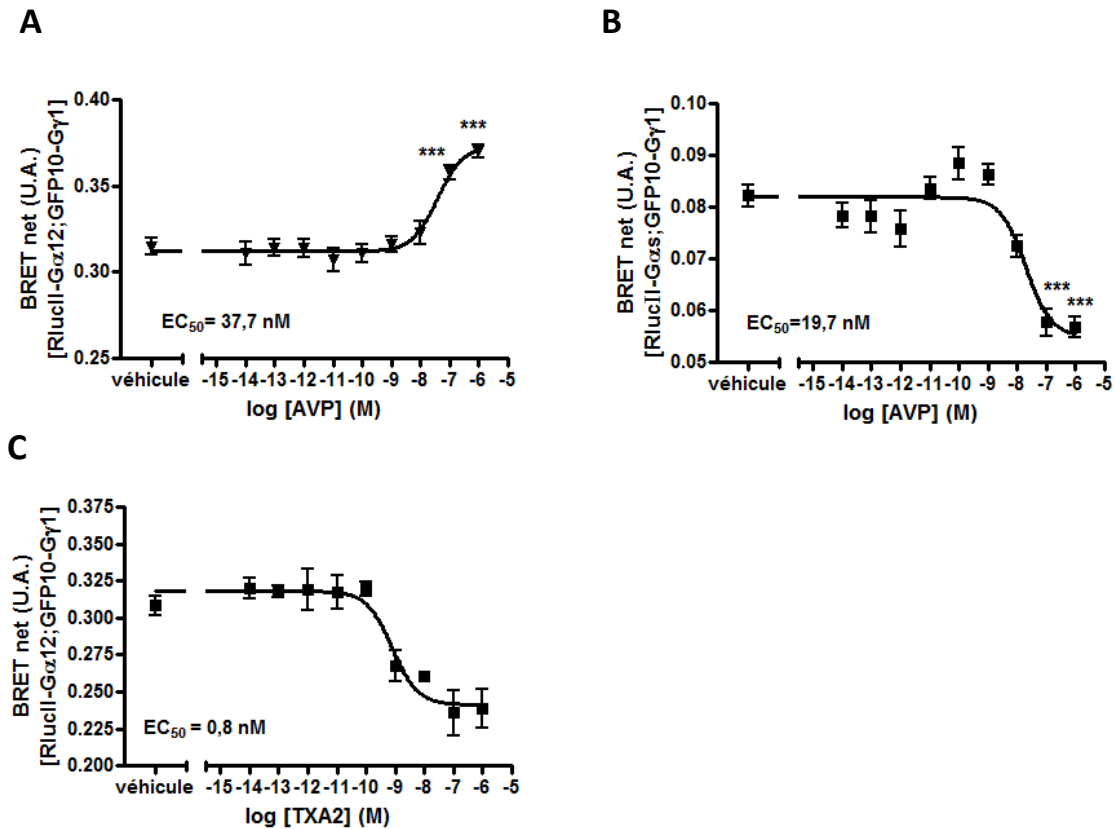


Figure 10. Modulation de l'hétérotrimère G12 en réponse à l'AVP. Les cellules HEK293 ont été transfectées 48h avant les expériences de BRET qui ont été réalisées comme décrit dans la section matériel et méthodes. **A**, les cellules HEK293 ont été transfectées avec les plasmides codant pour V2R, RlucII-Gα12 et GFP10-Gγ1 et stimulées pendant 10 minutes par des doses croissantes d'AVP. **B**, les cellules HEK293 ont été transfectées avec les plasmides codant pour V2R, RlucII-Gαs et GFP10-Gγ1 et stimulées pendant 10 minutes par des doses croissantes d'AVP. **C**, les cellules HEK293 ont été transfectées avec les plasmides codant pour TPα, RlucII-Gα12 et GFP10-Gγ1 et stimulées pendant 10 minutes par des doses croissantes de TXA2. Les données de 3 expériences indépendantes ont été rassemblées pour A et B et une expérience pour C. Chaque expérience indépendante a été réalisée en triplicata. Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard de la moyenne (SEM). Les valeurs d'EC₅₀ ont été obtenues par l'analyse des données en régression non-linéaire du logiciel GraphPad Prism 4 ®. Les analyses statistiques en A et B ont été effectuées sur le logiciel GraphPad Prism ® et correspondent à une analyse de variance à un facteur (*one-way ANOVA*) suivie d'une procédure de Bonferroni (*post hoc test*). *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001.

4.1.3. Étude de l'interaction de Gα12 avec RhoA et p115-RGS

Nous savons que V2R peut interagir spécifiquement avec Gα12 et que son activation par l'AVP engendre une modulation de la conformation de l'hétérotrimère G12, consistante avec une altération de son activité. Afin de déterminer si cet effet de V2R sur G12 se répercute au niveau de l'interaction de Gα12 avec ses effecteurs, l'impact de l'AVP sur l'interaction entre Gα12 et son effecteur le mieux caractérisé, la petite protéine G monomérique RhoA a d'abord été étudié par BRET.

Les cellules HEK293 ont été transfectées avec des plasmides codant pour V2R, RlucII-Gα12 et GFP10-RhoA ou TPα, RlucII-Gα12 et GFP10-RhoA à titre de comparaison avec un système connu pour activer Gα12, et stimulées pendant 10 minutes avec 10^{-7} M d'AVP ou 10^{-7} M de TXA2. En l'absence de stimulation, RlucII-Gα12 et GFP10-RhoA interagissent de façon basale comme en témoigne la présence d'un BRET basal, légèrement plus élevé lorsque TPα est exprimé que dans le cas de V2R (figures 11A et 11B), caractérisant soit une interaction plus importante en présence de TPα, soit une différente configuration du dimère Gα12-RhoA. Sans surprise, la stimulation par du TXA2 des cellules exprimant TPα affecte l'interaction entre RlucII-Gα12 et GFP10-RhoA, ce qui se traduit par une diminution du BRET par rapport au niveau basal reflétant soit une dissociation de Gα12 et RhoA, soit une modification conformationnelle de leur association (figure 11B). De façon intéressante, l'interaction entre RlucII-Gα12 et GFP10-RhoA est également modulée par l'AVP dans les cellules exprimant V2R. En effet, la stimulation des cellules par l'AVP induit cette fois une augmentation du BRET, soulignant donc soit une association accrue entre les deux partenaires, soit une modification conformationnelle de leur dimère qui serait différente de celle engendrée par le TPα (figure 11A). Ces résultats démontrent donc la capacité de V2R à engager RhoA par l'intermédiaire de Gα12, bien que d'une façon différente de TPα.

Afin de pousser la comparaison avec TPα, l'interaction entre Gα12 et le domaine RGS de p115-RhoGEF a été explorée. Pour cela, les cellules HEK293 ont été transfectées avec des plasmides codant pour V2R, RlucII-Gα12 et GFP10-p115-RGS (ne contenant pas le domaine GEF), ou TPα, RlucII-Gα12 et GFP10-p115-RGS, puis stimulées pendant 10 minutes avec 10^{-7} M d'AVP ou 10^{-7} M de TXA2. Encore une fois, le BRET mesurant

l'interaction entre donneur et accepteur est modulé de façon inverse entre V2R et TP α . En effet, l'AVP induit une diminution du BRET (figure 11C) tandis que le TXA2 entraîne une augmentation du ratio BRET (figure 11D) témoignant à nouveau d'un engagement différent de G α 12 en aval de V2R par rapport à TP α , et suggérant possiblement une inhibition par V2R plutôt qu'une activation.

Il est à noter que la quantité d'expérience ayant permis de générer ces résultats (figures 11 A-D) ne permet pas d'en tirer une valeur statistique. L'interprétation de ces résultats suffit donc seulement à relever une tendance, à défaut d'une conclusion statistiquement significative.

Figure 11

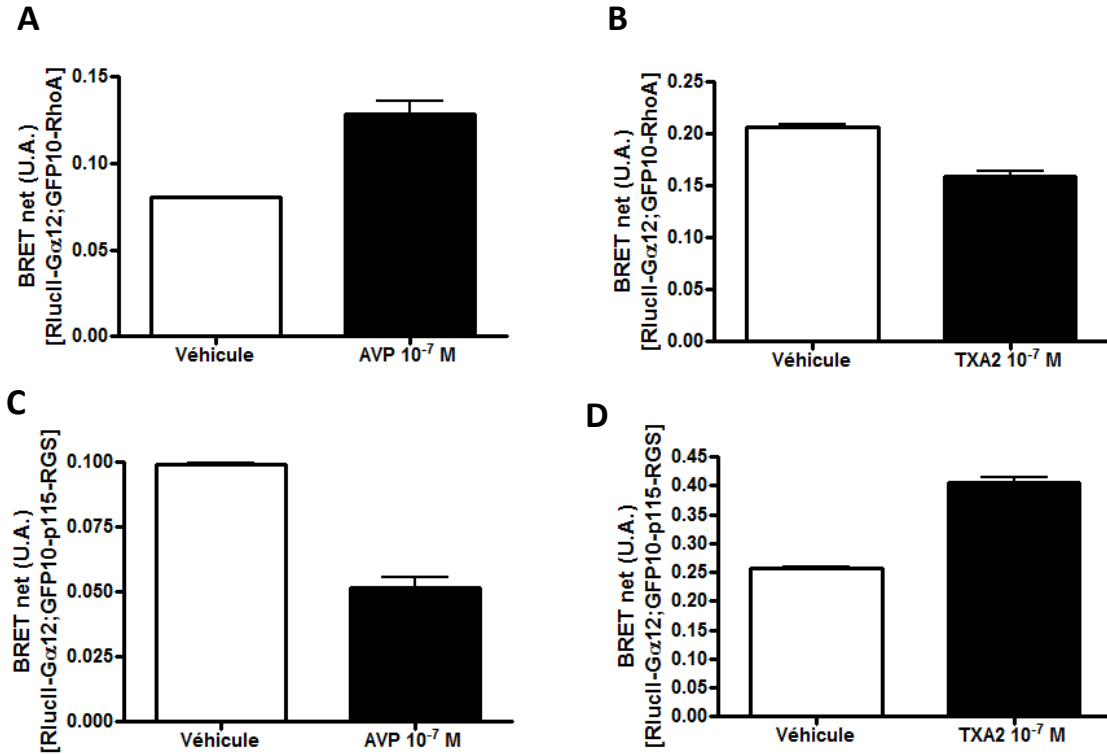


Figure 11. Étude de l'interaction de $G\alpha_{12}$ avec ses effecteurs en réponse à l'AVP. Les cellules HEK293 ont été transfectées 48h avant les expériences de BRET qui ont été réalisées comme décrit dans la section matériel et méthodes. **A**, les cellules HEK293 ont été transfectées avec des plasmides codant pour V2R, RlucII- $G\alpha_{12}$ et GFP10-RhoA et stimulées pendant 10 minutes par 10^{-7} M d'AVP. **B**, les cellules HEK293 ont été transfectées avec des plasmides codant pour TP α , RlucII- $G\alpha_{12}$ et GFP10-RhoA et stimulées pendant 10 minutes par 10^{-7} M de TXA2. **C**, les cellules HEK293 ont été transfectées avec des plasmides codant pour V2R, RlucII- $G\alpha_{12}$ et GFP10-p115-RGS et stimulées pendant 10 minutes par 10^{-7} M d'AVP. **D**, les cellules HEK293 ont été transfectées avec des plasmides codant pour TP α , RlucII- $G\alpha_{12}$ et GFP10-p115-RGS et stimulées pendant 10 minutes par 10^{-7} M de TXA2. Les données présentées sont le résultat d'une expérience réalisée en triplicata. Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard de la moyenne (SEM).

4.1.4. Impact de $G\alpha_{12}$ sur la synthèse d'AMPc

Les résultats précédents démontrent la capacité de V2R à se coupler de manière effective aussi bien à la sous-unité $G_{\alpha s}$ qu'à la sous-unité $G\alpha_{12}$. La possibilité d'une régulation croisée entre les voies $G_{\alpha s}$ et $G\alpha_{12}$ a été exposée en 2008 par l'équipe du Dr. Sternweis caractérisant une potentialisation synergique de la production d'AMPc dépendant de $G_{\alpha s}$, selon un mécanisme impliquant $G\alpha_{12/13}$ (Jiang, Collins et al. 2008). Dans ces travaux, il est démontré que la stimulation d'un RCPG couplé $G_{12/13}$ à la suite de celle d'un récepteur couplé G_s permet d'augmenter la production d'AMPc résultant de l'activation de G_s . L'activation d'un récepteur couplé $G_{12/13}$ ne suffit cependant pas à elle-seule et la modulation de la production d'AMPc n'intervient que si G_s a été préalablement activée. Cette régulation synergique de l'AMPc intervient dans leurs cellules par l'intermédiaire de l'adénylate cyclase 7 (Jiang, Collins et al. 2008; Jiang, Wang et al. 2013).

Le récepteur V2R étant couplé à la fois à $G_{\alpha s}$ et $G\alpha_{12}$, existe-il un phénomène similaire de régulation croisée de la production d'AMPc dans nos cellules, contrôlé par le seul récepteur V2R en réponse à l'AVP ? Afin d'étudier cette question, une approche utilisant un biosenseur BRET unimoléculaire permettant de mesurer les variations des taux intracellulaires d'AMPc a été utilisée pour évaluer l'impact de la surexpression de $G\alpha_{12}$ dans la production d'AMPc en réponse à l'AVP. Le biosenseur BRET *exchange protein activated by cAMP* (EPAC) consiste en la fusion d'une forme inactive de la protéine EPAC1, une protéine liant l'AMPc, avec deux rapporteurs fusionnés qui sont d'une part la *RlucII*, et d'autre part la GFP10, dérivé d'un biosenseur fusionné à l'origine avec une version différente de luciférase et de FP (Jiang, Collins et al. 2007; Breton, Sauvageau et al. 2010). La liaison de l'AMPc sur le biosenseur induit un changement conformationnel responsable de l'éloignement des rapporteurs *RlucII* et GFP10 se traduisant en une diminution du BRET lorsque la concentration intracellulaire d'AMPc augmente (Breton, Sauvageau et al. 2010).

Les cellules HEK293 ont été transfectées avec des plasmides codant pour le biosenseur BRET EPAC, V2R, et le cas échéant une sous-unité $G\alpha$ non marquée ($G\alpha_{12}$ ou $G_{\alpha s}$), puis stimulées pendant 15 minutes par 10^{-7} M d'AVP. Alors que la

surexpression des sous-unités $G\alpha$ n'a aucun impact sur le niveau basal d'AMPc, la diminution de BRET et donc l'augmentation des taux d'AMPc en réponse à l'AVP est potentialisée lorsque $G\alpha 12$ est surexprimée alors que la surexpression de $G\alpha s$ n'a étonnamment aucun impact (figure 12). Ces résultats suggèrent donc qu'existe en aval de V2R un mode d'activation synergique de la production d'AMPc impliquant $G\alpha 12$ en plus de $G\alpha s$. Ce système semble donc consistant avec le modèle décrit par l'équipe du Dr. Sternweis en 2008 (Jiang, Collins et al. 2008), bien qu'il impliquerait cette fois un isoforme d'adénylate cyclase qui ne serait pas l'adénylate cyclase 7 puisqu'elle ne semble pas exprimée dans nos cellules (d'après une analyse de micropuce à ADN réalisée préalablement dans le laboratoire). L'absence d'effet de la surexpression de $G\alpha s$ s'explique quant-à elle probablement par le fait que la voie d'activation des adénylates cyclases par l'intermédiaire de $G\alpha s$ seul en aval de V2R est déjà saturée par le niveau d'expression endogène de $G\alpha s$.

Figure 12

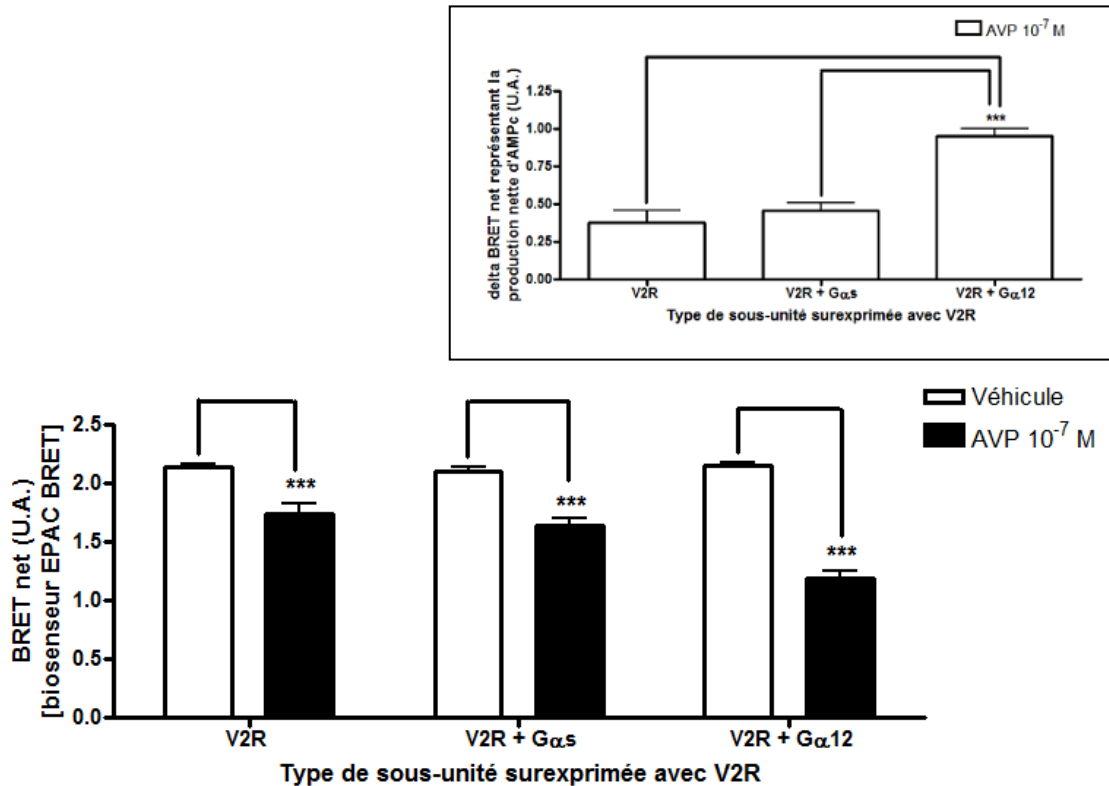


Figure 12. Impact de $G\alpha_{12}$ sur la synthèse d'AMPc en aval de V2R. Les cellules HEK293 ont été transfectées 48h avant l'expérience de BRET avec des plasmides exprimant respectivement le biosenseur EPAC BRET, le récepteur V2R et le cas échéant la sous-unité $G_{\alpha s}$ ou $G\alpha_{12}$ surexprimée, puis stimulées pendant 15 minutes par 10^{-7} M d'AVP. *En encadré* sont présentées les mêmes données expérimentales en delta BRET (valeur de BRET sans stimulation moins valeur de BRET après stimulation), offrant une représentation visuelle plus évidente de la production d'AMPc. Cette figure représente les données de 8 expériences indépendantes, chacune réalisée en triplicata. Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard de la moyenne (SEM). Les analyses statistiques ont été effectuées sur le logiciel GraphPad Prism® et correspondent à une analyse de variance à un facteur (*one-way ANOVA*) suivie d'une procédure de Bonferroni (*post hoc test*). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

4.1.5. Évaluation du rôle de RhoA dans l'effet de Gα12 sur l'AMPC

Nos résultats suggèrent l'engagement de la voie RhoA en aval de V2R, bien qu'il reste indéterminé s'il s'agit d'une activation ou d'une inhibition. Nous nous sommes donc intéressés à étudier l'implication de RhoA dans la potentialisation de la production d'AMPC dépendant de Gα12 en réponse à l'AVP. Pour cela, le même biosenseur BRET EPAC a été utilisé et RhoA a été inhibée selon deux méthodes distinctes.

Une enzyme capable d'inhiber RhoA a d'abord été testée : l'enzyme C3 transférase modifiée de manière à pénétrer à travers les membranes cellulaires à partir de l'exoenzyme C3 transférase de *Clostridium Botulinium*, qui inhibe RhoA, B et C par ADP-ribosylation d'une asparagine du domaine de liaison aux effecteurs des protéines de la famille Rho (Han, Arvai et al. 2001). Les cellules HEK293 ont été transfectées avec les plasmides codant pour le biosenseur BRET EPAC, V2R, et Gas ou Gα12, traitées ou non pendant les 2 heures précédant l'expérience de BRET avec 1 µg/mL de C3, puis stimulées pendant 15 minutes par 10⁻⁷ M d'AVP. Le traitement des cellules avec C3 n'affecte pas la production d'AMPC en réponse à l'AVP, les valeurs de BRET obtenues restant similaires en présence comme en absence de C3, que la sous-unité sous-exprimée soit Gas ou Gα12 (figure 13A). Ces résultats suggèrent l'absence d'implication de RhoA dans la voie Gα12 modulant la production d'AMPC en aval de V2R. Cependant, l'efficacité de l'enzyme C3 utilisée n'ayant pas été vérifiée, une approche complémentaire a été employée pour écarter un rôle de RhoA dans la production d'AMPC déclenchée par l'AVP.

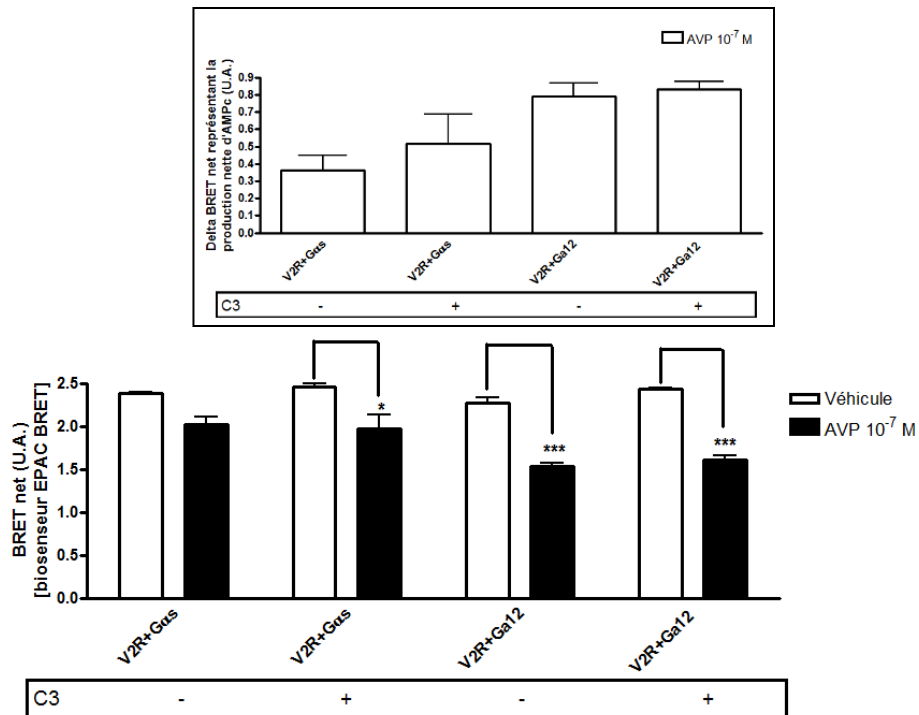
Ainsi, une version de p115-RhoGEF, dépourvue de son domaine GEF activant RhoA mais possédant son domaine RGS interagissant avec Gα12 (p115-RGS), a été utilisée. P115-RGS peut interagir avec Gα12/13 et inhiber par compétition toute interaction avec leurs effecteurs endogènes dont les autres RhoGEFs incluant LARG et Lbc-RhoGEF qui sont les deux GEFs activables par Gα12 et la tyrosine kinase PYK2, en plus de favoriser par son activité GAP liée à son domaine RGS l'activité GTPasique de Gα12/13 et ainsi d'inhiber leur activité (Kozasa, Jiang et al. 1998; Shi, Sinnarajah et al. 2000; Booden, Siderovski et al. 2002; Holinstat, Mehta et al. 2003). Les HEK293 ont été transfectées de façon à exprimer transitoirement V2R, seul ou avec Gas ou Gα12

surexprimées, en présence ou en absence de p115-RGS ou, à titre de contrôle, du domaine RGS de GRK2 (GRK2-RGS) qui inhibe sélectivement $G\alpha_q$ (Carman, Parent et al. 1999). La surexpression de p115-RGS n'a aucun effet sur la production d'AMPc en réponse à l'AVP et n'empêche pas la potentialisation de l'accumulation d'AMPc par $G\alpha_{12}$ (figure 13B). Ce résultat confirme donc l'absence d'implication de RhoA dans la production d'AMPc en aval de V2R et dans l'effet potentialisateur de $G\alpha_{12}$. Par ailleurs, étant donné l'activité GAP de p115-RGS lui permettant d'inactiver $G\alpha_{12}$, ces données suggèrent étonnamment que l'effet de $G\alpha_{12}$ sur la production d'AMPc est indépendant de son état d'activation.

Une expérience BRET de contrôle a également été réalisée afin de vérifier l'inhibition de l'interaction entre RlucII- $G\alpha_{12}$ et GFP10-p115-RGS (une partie de cette expérience était présentée dans la figure 11C) par compétition lorsque p115-RGS est surexprimé (figure 13C). L'inhibition presque complète du BRET (marquant l'interaction entre RlucII- $G\alpha_{12}$ et GFP10-p115-RGS) résultant de la surexpression de p115-RGS indique que p115-RGS est fonctionnel pour inhiber l'interaction de $G\alpha_{12}$ avec les RhoGEFs qui interagissent avec le même domaine.

Figure 13

A



B

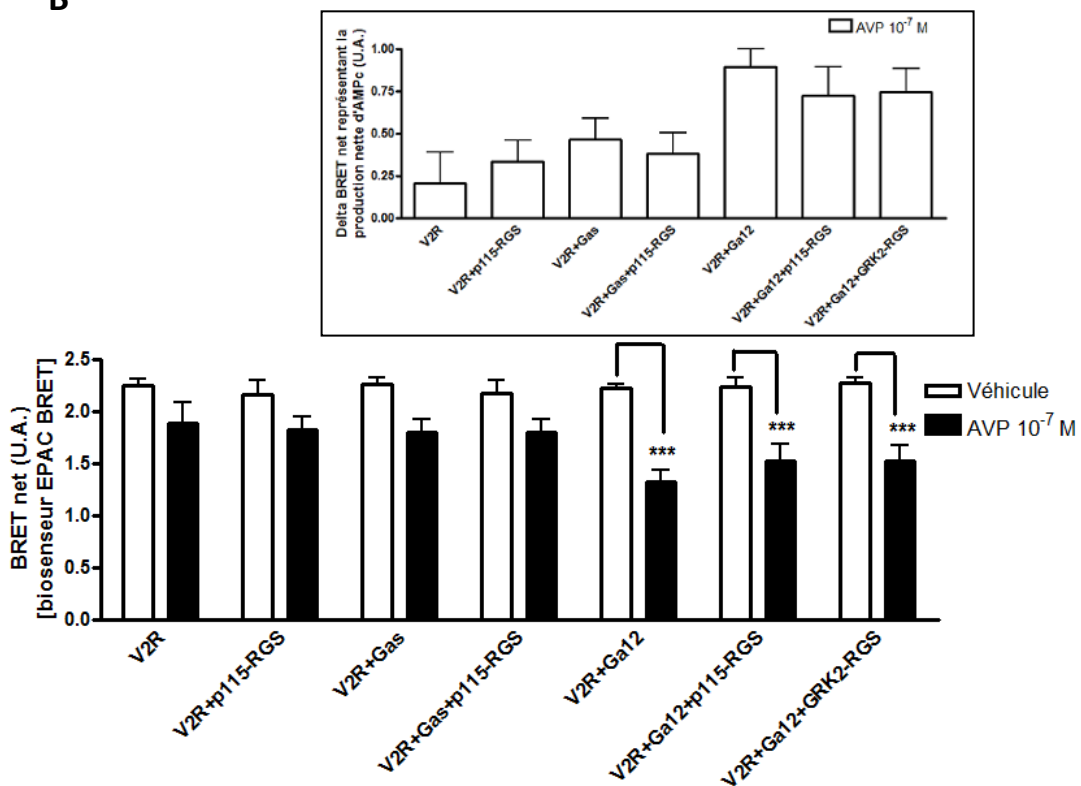


Figure 13

C

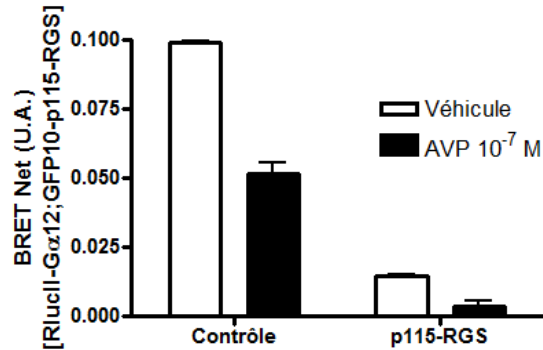


Figure 13. Évaluation du rôle de RhoA dans l'effet de Gα12 sur la production d'AMPc en réponse à l'AVP. Les cellules HEK293 ont été transfectées 48h avant l'expérience de BRET. **A**, les cellules HEK 293 ont été transfectées avec des plasmides exprimant V2R, le biosenseur BRET EPAC, et *Gas* ou *Gα12*, traitées ou non pendant les 2 heures précédant l'expérience de BRET avec 1 µg/mL de C3, puis stimulées pendant 15 minutes par 10⁻⁷ M d'AVP. *En encadré* sont présentées les mêmes données expérimentales en delta BRET (valeur de BRET sans stimulation moins valeur de BRET après stimulation), offrant une représentation visuelle plus évidente de la production d'AMPc. **B**, les HEK 293 ont été transfectées de manière à exprimer transitoirement V2R, seul ou avec *Gas* ou *Gα12* surexprimées, et le biosenseur BRET EPAC, en présence ou en absence de p115-RGS ou à titre de contrôle, du domaine RGS de GRK2 (GRK2-RGS). *En encadré* sont présentées les mêmes données expérimentales en delta BRET (valeur de BRET sans stimulation moins valeur de BRET après stimulation), offrant une représentation visuelle plus évidente de la production d'AMPc. **C**, les HEK 293 ont été transfectées avec des plasmides exprimant V2R, RluclI-Gα12, GFP10-p115-RGS et le cas échéant p115-RGS. Les figures A, B et C présentent respectivement les données de 2, 3 et 1 expérience(s) indépendante(s), chacune réalisée en triplicata. Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard de la moyenne (SEM). Les analyses statistiques en A et B ont été effectuées sur le logiciel GraphPad Prism ® et correspondent à une analyse de variance à un facteur (*one-way ANOVA*) suivie d'une procédure de Bonferroni (*post hoc test*). *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001.

4.2. Activation d'ERK 1/2 par transactivation d'IGF1R

4.2.1. Confirmation de l'implication d'IGF1R

Comme nous l'avons exposé en détail dans l'introduction, Oligny et al. ont caractérisé de façon précise un système de transactivation d'IGF1R par V2R menant à l'activation des MAPK ERK 1/2 (Oligny-Longpre, Corbani et al. 2012) approfondissant les travaux menés auparavant par Pascale Charest dans le laboratoire (Charest and Bouvier 2003; Charest, Oligny-Longpre et al. 2007). Puisque ce projet vise à une compréhension plus poussée de ce phénomène, il était d'abord important de vérifier l'intégrité de la lignée cellulaire utilisée (et issue de la même lignée stable de cellules exprimant V2R qu'utilisée dans l'article) en reproduisant certains des résultats clés désormais publiés.

L'un des résultats majeurs de ce papier est l'identification d'IGF1R comme étant le récepteur tyrosine kinase transactivé par V2R. Pour cela, deux approches avaient été employées consistant en l'inhibition sélective d'IGF1R soit par une approche pharmacologique avec la tyrphostine AG1024, soit par une approche génétique avec surexpression d'un dominant négatif d'IGF1R (Oligny-Longpre, Corbani et al. 2012). Afin de confirmer que ce mode de transactivation est conservé dans les cellules utilisées pour cette partie du projet, l'effet de l'AG1024 sur l'activation d'ERK en réponse à l'AVP dans des cellules HEK293 exprimant de façon stable le récepteur V2R a été étudié. Après un sevrage de 16h, les cellules ont été traitées ou non par 5 μ M d'AG1024 pendant 20 minutes, suivi de 5 minutes de stimulation par 1 μ M d'AVP, puis l'activation d'ERK 1/2 a été évaluée de façon semi-quantitative par immunoblot, à l'aide d'anticorps reconnaissant la forme phosphorylée (activée) d'ERK 1/2 (p-ERK). Comme il a été publié, on retrouve une inhibition significative de la voie ERK en réponse à l'AVP par l'AG1024, confirmant IGF1R comme étant le RTK transactivé par V2R menant à l'activation des MAPK (figure 14). Tel que souligné dans l'article, bien que sélectif pour IGF1R, l'AG1024 est également capable d'inhiber dans une certaine mesure le récepteur

de l'insuline (InsR) (Parrizas, Gazit et al. 1997), mais l'absence d'activation d'ERK en réponse à l'insuline (non publié) dans nos cellules, combinée à l'inhibition effective de la réponse ERK AVP-dépendante par le dominant négatif d'IGF1R sont en défaveur d'une implication d'InsR (Oligny-Longpre, Corbani et al. 2012).

Figure 14

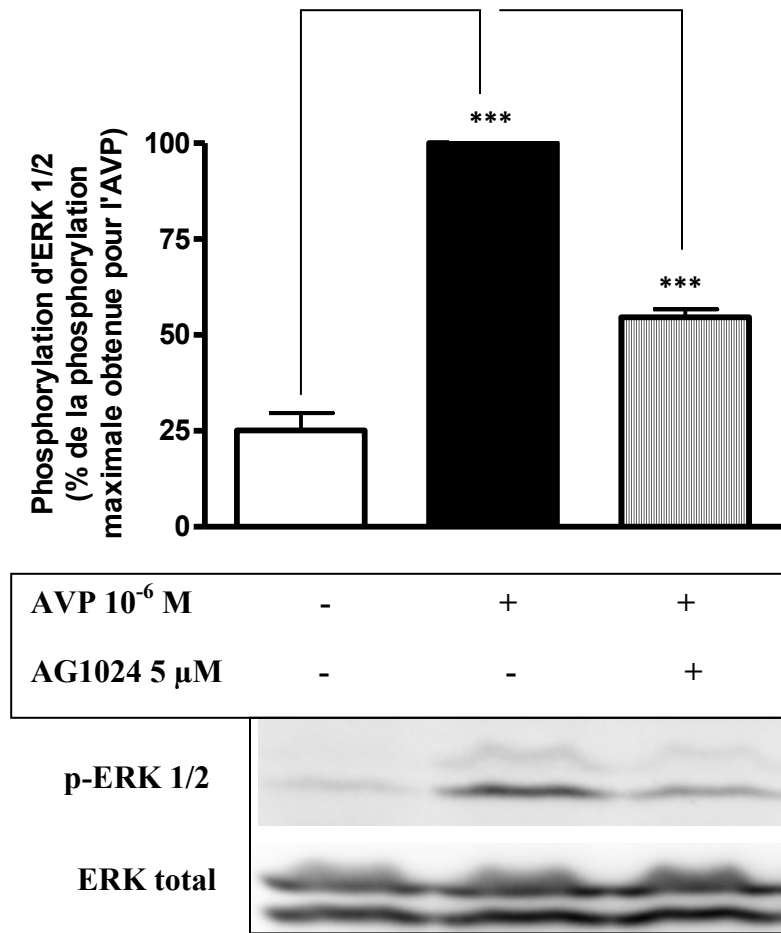


Figure 14. Confirmation de l'implication d'IGF1R dans l'activation d'ERK en réponse à l'AVP. Des cellules HEK293 exprimant V2R de façon stable ont été sevrées durant 16h puis traitées ou non par 5 μM d'AG1024 pendant 20 minutes, suivi de 5 minutes de stimulation par 1 μM d'AVP. L'activation d'ERK 1/2 évaluée de façon semi-quantitative par immunoblot, à l'aide d'anticorps reconnaissant la forme phosphorylée (activée) d'ERK 1/2, les niveaux d'expression d'ERK étant contrôlés par des anticorps reconnaissant la totalité des protéines ERK indépendamment de leur état d'activation. Les résultats présentés sont représentatifs de trois expériences indépendantes. Les données quantitatives représentées dans le graphique ont été obtenues à partir de l'analyse densitométrique des bandes d'immunoblot, les barres d'erreur représentant l'erreur standard de la moyenne (SEM). Les analyses statistiques ont été effectuées sur le logiciel GraphPad Prism® et correspondent à une analyse de variance à un facteur (*one-way ANOVA*) suivie d'une procédure de Bonferroni (*post hoc test*). *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001.

4.2.2. Confirmation de l'implication d'une métalloprotéase

La mise en jeu d'une métalloprotéase dans le processus de transactivation et l'activation d'ERK en aval de V2R a été mise en lumière par Oligny et al. (Oligny-Longpre, Corbani et al. 2012) via l'utilisation d'inhibiteurs à large spectre (non sélectifs) de métalloprotéases : la phénanthroline qui chélate les ions métalliques divalents (Ashmun and Look 1990), et le marimastat, qui mime la structure du collagène (Wojtowicz-Praga, Dickson et al. 1997).

Afin de s'assurer de l'intégrité du mode de transactivation dans nos cellules, les HEK293 exprimant V2R de façon stable ont été sevrées durant 16h, puis traitées durant 30 minutes avec 10 μ M de marimastat (figure 15A) ou 30 minutes avec 500 μ M de phénanthroline (figure 15B), avant d'être stimulées 5 minutes par 1 μ M d'AVP. L'activation d'ERK a été mesurée de façon semi-quantitative par immunoblot utilisant des anticorps reconnaissant p-ERK. Comme il était attendu, l'activation d'ERK est inhibée par le marimastat et la phénanthroline, l'inhibition par le marimastat étant néanmoins relativement faible en comparaison avec les résultats publiés (Oligny-Longpre, Corbani et al. 2012), tandis que l'inhibition par la phénanthroline est totale, conformément aux résultats présentés par Charest et al. (Charest, Oligny-Longpre et al. 2007). L'efficacité modérée du marimastat dans ce contexte pourrait éventuellement s'expliquer par une altération du composé (mauvaise conservation ou défaut de préparation). Ces résultats confirment l'implication d'une métalloprotéase dans l'activation d'ERK en aval de V2R dans nos cellules.

Figure 15

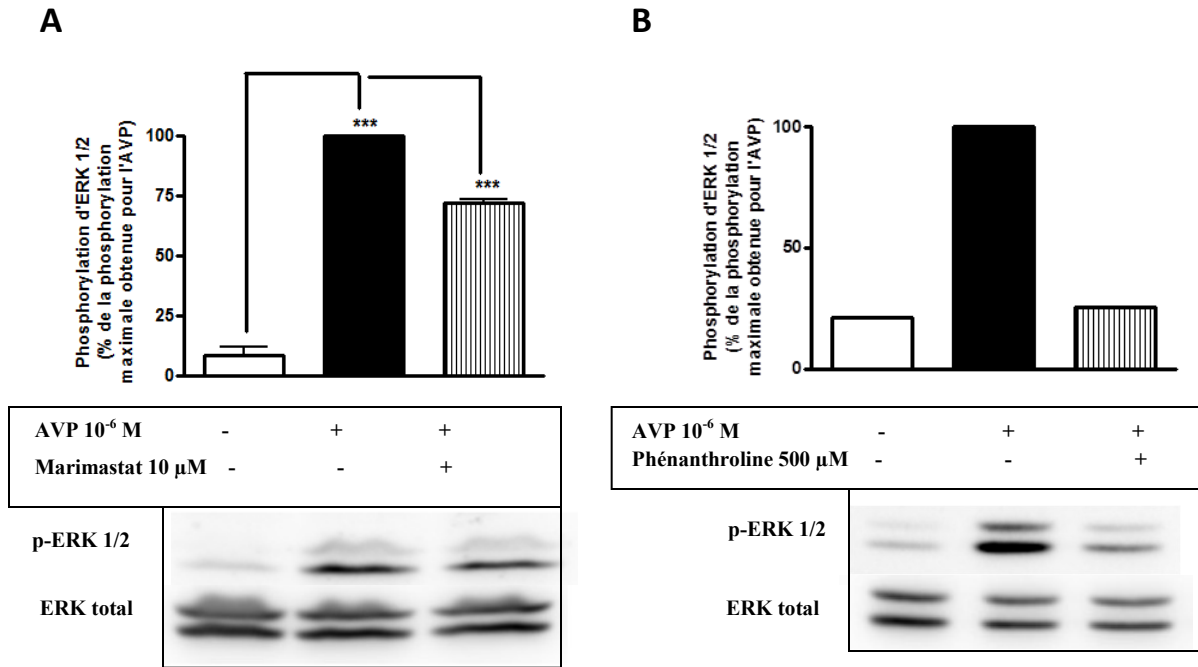


Figure 15. Confirmation de l'implication d'une métalloprotéase dans l'activation d'ERK via transactivation d'IGF1R par V2R. **A**, les HEK293 exprimant V2R de façon stable ont été sevrées durant 16h, puis traitées durant 30 minutes avec 10 μM de marimastat avant d'être stimulées 5 minutes par 1 μM d'AVP. **B**, les HEK293 exprimant V2R de façon stable ont été sevrées durant 16h, puis traitées durant 30 minutes avec 500 μM de phénanthroline avant d'être stimulées 5 minutes par 1 μM d'AVP. Pour A et B, l'activation d'ERK a été mesurée de façon semi-quantitative par immunoblot utilisant des anticorps reconnaissant p-ERK, les niveaux d'expression d'ERK étant contrôlés par des anticorps reconnaissant la totalité des protéines ERK indépendamment de leur état d'activation. Les résultats présentés sont représentatifs de trois expériences indépendantes pour A et une expérience pour B. Les données quantitatives représentées dans le graphique ont été obtenues à partir de l'analyse densitométrique des bandes d'immunoblot, les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la moyenne (SEM). Les analyses statistiques en A ont été effectuées sur le logiciel GraphPad Prism ® et correspondent à une analyse de variance à un facteur (*one-way ANOVA*) suivie d'une procédure de Bonferroni (*post hoc test*). *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001.

4.2.3. Étude de l'autophosphorylation d'IGF1R

Le récepteur V2R de la vasopressine transactive IGF1R menant à l'activation d'ERK 1/2. L'activation d'un RTK se traduit par l'autophosphorylation croisée de résidus tyrosines présents sur ses domaines cytoplasmiques (dans le cas d'IGF1R les tyrosines 1131, 1135 et 1136) favorisant un changement conformationnel et le recrutement de divers effecteurs sur des domaines spécifiques du récepteur (Ullrich and Schlessinger 1990; Kato, Faria et al. 1994). La phosphorylation de la tyrosine 1131 en réponse à l'AVP a bien été observée en réponse à l'AVP (Oligny-Longpre, Corbani et al. 2012).

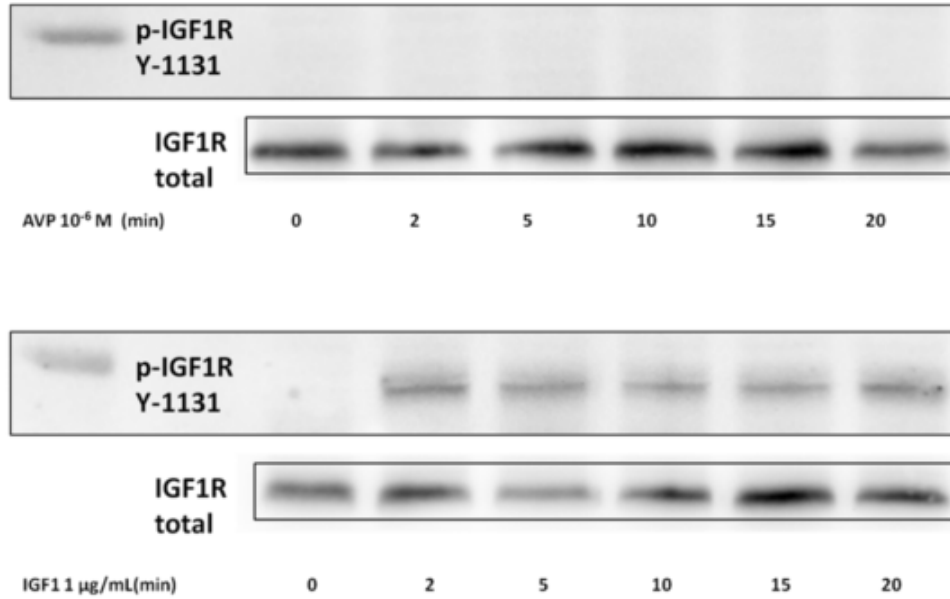
Afin de vérifier définitivement l'intégrité du modèle décrit dans l'article d'Oligny-Longpre et al., les cellules HEK293 exprimant stablement V2R ont été sevrées durant 16h puis stimulées par 1 μ M d'AVP ou 1 μ g/mL d'IGF1 à titre de contrôle durant 0 à 20 minutes. La phosphorylation sur la tyrosine 1131 a ensuite été détectée par immunobuvardage à l'aide d'anticorps phosphospécifiques de cette tyrosine d'IGF1R. Alors que la phosphorylation est claire en réponse à l'IGF1, elle n'est pas observée en réponse à l'AVP (figure 16A). De la même façon une très nette phosphorylation des tyrosines 1135/1136 est induite par 1 μ g/mL d'IGF1 et inhibée partiellement par un prétraitement de 20 minutes des cellules par 5 μ M d'AG1024, mais n'est pas détectable en réponse à l'AVP (figure 16B).

L'absence de phosphorylation observable d'IGF1R en réponse à l'AVP dans nos cellules ne remet pas en question l'implication d'IGF1R, étant donné l'inhibition d'ERK par AG1024 présentée dans la figure 14. Elle pourrait notamment s'expliquer par une dérivation des cellules issues de la lignée V2R stable, ayant mené à des niveaux relatifs d'expression d'IGF1R et de V2R différents des cellules utilisées pour la majorité des expériences du papier d'Oligny-Longpre et al., et ne permettant pas de détecter avec la même sensibilité la phosphorylation d'IGF1R en réponse à l'AVP. Il n'est pas formellement exclu que la phosphorylation AVP-dépendante n'aie plus lieu dans nos cellules, mais une telle hypothèse semble difficilement conciliable avec l'efficacité d'inhibition sur la voie ERK de la tyrphostine AG1024, étant donné que la tyrphostine agit en inhibant l'activité kinase du récepteur (Levitzki and Mishani 2006) qui semble donc requise pour l'activation d'ERK consécutive à la stimulation de V2R ; à moins que

l'effet de l'AG1024 sur ERK s'explique par une action supplémentaire non-identifiée du composé sur IGF1R, ou par l'inhibition de l'activité tyrosine kinase du récepteur envers d'autres substrats si cette activité peut être obtenue sans passer par l'autophosphorylation.

Figure 16

A



B

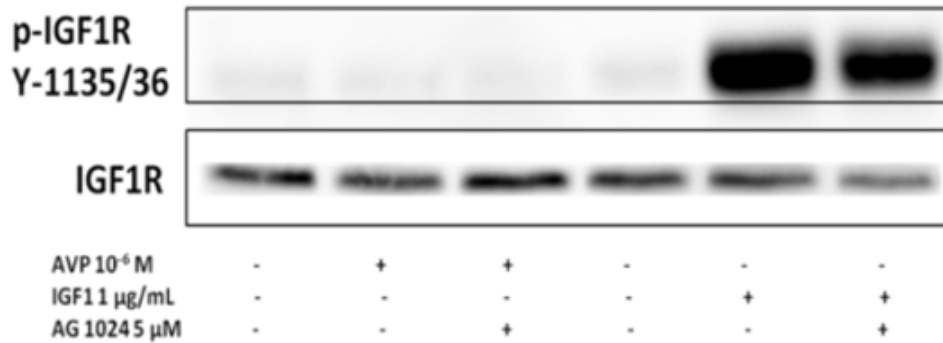


Figure 16. Étude de l'autophosphorylation d'IGF1R en réponse à l'AVP. **A**, les HEK293 exprimant V2R de façon stable ont été sevrées durant 16h, puis stimulées pendant 0 à 20 minutes par 1 µM d'AVP ou 1µg/mL d'IGF1. La phosphorylation de la tyrosine 1131 a été détectée par immunoblot à l'aide d'anticorps phosphospécifiques la reconnaissant, les niveaux d'expression d'IGF1R étant contrôlés par des anticorps reconnaissant la sous-unité β indépendamment de son état de phosphorylation. **B**, les cellules HEK293 exprimant V2R de façon stable ont été sevrées durant 16h, prétraitées ou non pendant 20 minutes avec 5 µM d'AG1024, puis stimulées pendant 5 minutes par 1 µM d'AVP ou 1 µg/mL d'IGF1. La phosphorylation des tyrosines 1135/1136 a été détectée par immunoblot à l'aide d'anticorps phosphospécifiques les reconnaissant, les niveaux d'expression d'IGF1R étant contrôlés par des anticorps reconnaissant la sa sous-unité β indépendamment de son état de phosphorylation. Les résultats présentés sont représentatifs de deux expériences indépendantes pour A et une expérience pour B.

4.2.4. Cinétique d'inhibition de la réponse ERK 1/2 par l'AG1024

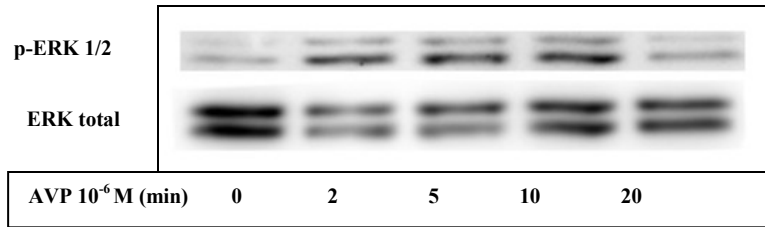
La forte amplitude de l'inhibition par l'AG1024 de la voie ERK en réponse à l'AVP telle qu'exposée dans la figure 14 et dans l'article d'Oligny-Longpre et al. (Oligny-Longpre, Corbani et al. 2012) suggère que la très grande majorité de l'activation d'ERK en aval de V2R résulte de la transactivation d'IGF1R. Cependant, ces expériences ont été réalisées après 5 minutes de stimulation par l'AVP, n'excluant pas qu'à des temps plus courts de stimulation, d'autres mécanismes entrent en jeu. Ainsi, bien qu'un rôle de *G α s*, *i* et *q* ait été écarté (Charest, Oligny-Longpre et al. 2007), il est pertinent de vérifier si l'inhibition par l'AG1024 est aussi efficace peu de temps après la stimulation, notamment considérant qu'une étude contradictoire a décrit un mode d'activation double des MAPKs en aval de V2R impliquant *G α s* à des temps précoces de stimulation et les β -arrestines pour une stimulation prolongée (Ren, Reiter et al. 2005).

Afin de tester cette hypothèse, les HEK293 exprimant V2R de manière stable ont été privées de sérum durant 16h puis prétraitées ou non avec 5 μ M d'AG10124 et stimulées ensuite de 0 à 20 minutes par 1 μ M d'AVP. La phosphorylation d'ERK 1/2 a été détectée par immunoblot à l'aide d'anticorps anti-p-ERK. Les résultats présentés dans la figure 17 montrent que la forte inhibition par l'AG1024 de la phosphorylation d'ERK 1/2 en réponse à l'AVP s'exerce avec une amplitude sensiblement comparable tout au long de la stimulation, rejetant l'hypothèse d'un mode d'activation d'ERK indépendant de la transactivation qui serait prépondérant à des temps courts de stimulation. L'activation d'ERK en réponse à l'AVP semble donc bien liée très majoritairement à la transactivation d'IGF1R par V2R, quelle que soit la durée d'exposition à l'AVP.

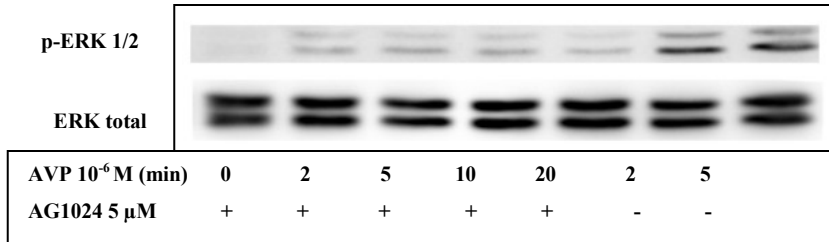
Il est à noter que cette expérience a été réalisée en nombre insuffisant pour en tirer une valeur statistique et que ces données sont suggestives mais non conclusives.

Figure 17

A



B



C

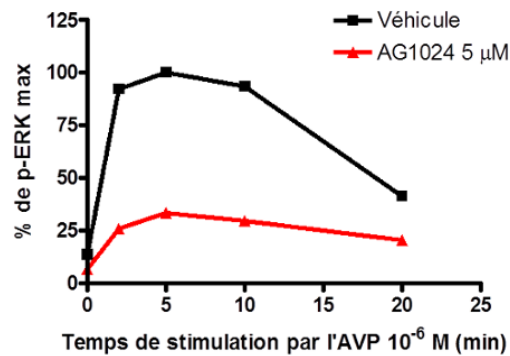


Figure 17. Cinétique d'inhibition par l'AG1024 de la phosphorylation d'ERK 1/2 en réponse à l'AVP. **A**, les HEK293 exprimant stablement V2R ont été sevrées durant 16h et stimulées ensuite de 0 à 20 minutes par 1 μM d'AVP. La phosphorylation d'ERK 1/2 a été détectée par immunoblot à l'aide d'anticorps anti-p-ERK, les niveaux d'expression d'ERK étant contrôlés par des anticorps reconnaissant la totalité des protéines ERK indépendamment de leur état d'activation. **B**, les HEK293 exprimant stablement V2R ont été sevrées durant 16h, puis prétraitées avec 5 μM d'AG1024 et stimulées ensuite de 0 à 20 minutes par 1 μM d'AVP. La phosphorylation d'ERK 1/2 a été détectée par immunoblot à l'aide d'anticorps anti-p-ERK, les niveaux d'expression d'ERK étant contrôlés par des anticorps reconnaissant la totalité des protéines ERK indépendamment de leur état d'activation. Des échantillons provenant des cellules stimulées à 2 et 5 minutes en l'absence de prétraitement à l'AG1024 ont été chargés sur le même gel de manière à fournir une référence pour la quantification relative de l'activation d'ERK avec ou sans AG1024. **C**, les immunoblots ont été quantifiés par densitométrie et représentés sous forme de graphique. Ces résultats sont représentatifs d'une expérience.

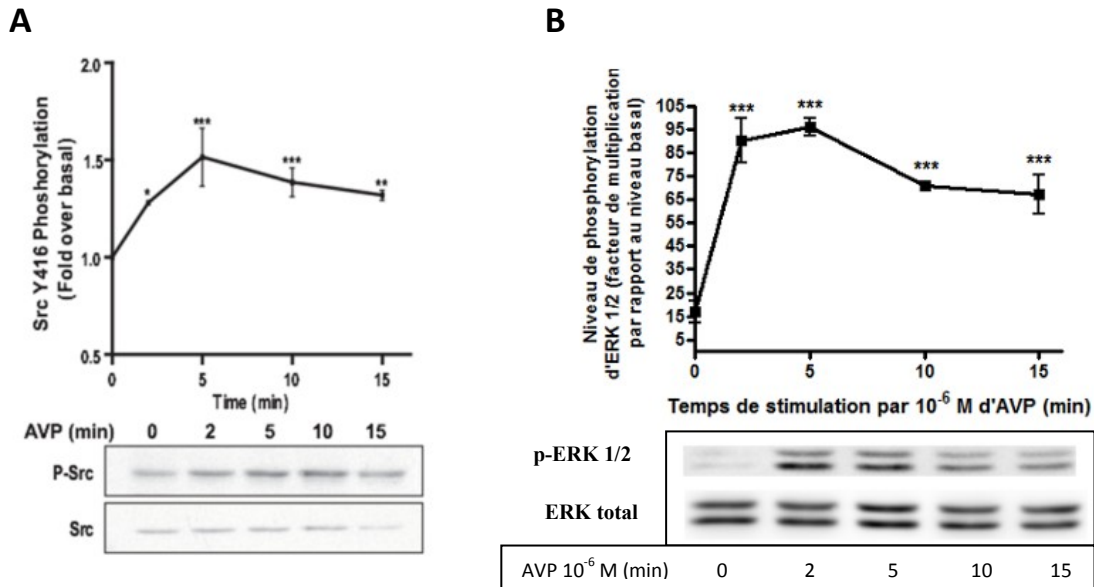
4.2.5. Étude de compatibilité des cinétiques d'activation de Src et d'ERK

Charest et al. ont identifié l'importance de c-Src dans l'activation de la voie ERK 1/2 par V2R (Charest, Oligny-Longpre et al. 2007). Par la suite, Oligny-Longpre et al. ont montré que Src intervenait uniquement en amont du relargage extracellulaire du facteur d'activation d'IGF1R par des expériences de transfert de surnageant et que son activation par V2R ne requiert pas l'intervention de la métalloprotéase (Oligny-Longpre, Corbani et al. 2012). Le mode d'activation de Src en aval de V2R reste cependant indéfini et soulève des questions, considérant que l'activation d'ERK a été démontrée comme indépendante de G α s, i et q (Charest, Oligny-Longpre et al. 2007), et que la β -arrestine ne serait importante qu'en aval d'IGF1R. Montrer que l'inhibition de Src prévient l'activation d'ERK en réponse à l'AVP ne revient pas à dire que l'activation de Src par V2R lui-même est nécessaire à la transactivation, mais plutôt que Src sous forme active est requis. Oligny et al. montrent que Src est bien activé en réponse à l'AVP. Il reste à s'assurer que cette activation est cohérente avec un modèle où c'est l'activation de Src via V2R qui supporte la transactivation. Ce sont les expériences réalisées en ce sens dans le cadre de ce projet et figurant dans ce papier qui vont maintenant être présentées.

Pour que l'activation d'ERK puisse dépendre de l'activation préalable de Src par V2R, il est indispensable que cette activation survienne avec une vitesse comparable à la phosphorylation d'ERK en réponse à l'AVP et donc qu'une augmentation de l'activité de Src soit décelable dès les premières minutes où ERK est activé. La cinétique d'activation de Src en aval de V2R a donc été comparée à celle d'ERK. Pour cela, les cellules HEK293 exprimant V2R de façon stable ont été sevrées pendant 16h, puis stimulées de 0 à 15 minutes par 1 μ M d'AVP. L'activation de Src a été détectée par immunoblot à l'aide d'anticorps phosphospécifiques reconnaissant la forme active, phosphorylée sur la tyrosine 416, de Src (figure 18A) et l'activation d'ERK par des anticorps reconnaissant p-ERK (figure 18B). Les résultats obtenus montrent que Src, est activé par l'AVP dès 2 minutes après stimulation avec un pic d'activation à 5 minutes, une cinétique compatible avec celle de l'activation d'ERK dont le pic d'activation se trouve entre 2 et 5 minutes. Ces cinétiques ne remettent donc pas en question le modèle selon lequel l'activation de Src par V2R induit la transactivation. Par ailleurs, l'augmentation plus brutale des

niveaux de phosphorylation d'ERK témoignent possiblement d'un phénomène d'amplification de la réponse au fil de la transactivation.

Figure 18



Publié (Oligny-Longpre, Corbani et al. 2012)

Figure 18. Étude de compatibilité des cinétiques d'activation de Src et d'ERK en réponse à l'AVP. Les cellules HEK293 exprimant V2R de façon stable ont été sevrées pendant 16h, puis stimulées de 0 à 15 minutes par $1 \mu\text{M}$ d'AVP. **A (publié)**, l'activation de Src a été détectée par immunoblot à l'aide d'anticorps phosphospécifiques reconnaissant la forme active, phosphorylée sur la tyrosine 416, de Src, les niveaux d'expression de Src étant contrôlés par des anticorps reconnaissant la totalité des protéines Src indépendamment de leur état d'activation. **B**, l'activation d'ERK a été détectée par immunoblot à l'aide d'anticorps phosphospécifiques reconnaissant p-ERK 1/2, les niveaux d'expression d'ERK étant contrôlés par des anticorps reconnaissant la totalité des protéines ERK indépendamment de leur état d'activation. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes et les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la moyenne (SEM). Les analyses statistiques ont été effectuées sur le logiciel GraphPad Prism® et correspondent à une analyse de variance à un facteur (*one-way ANOVA*) suivie d'une procédure de Bonferroni (*post hoc test*). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

4.2.6. Étude des médiateurs potentiels de l'activation de Src

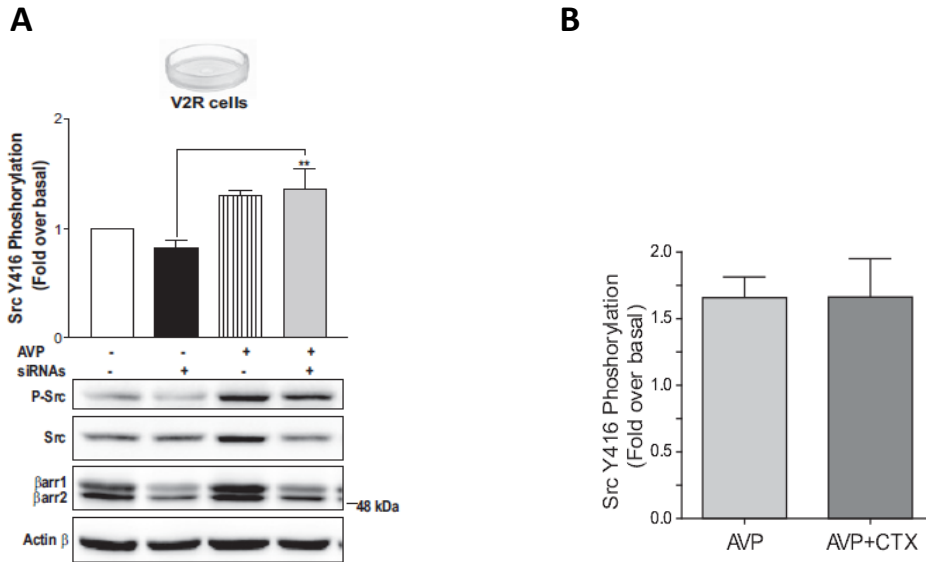
Charest et al. ont montré que l'activation d'ERK en aval de V2R est indépendante de G α s, i et q et dépendante des β -arrestines (Charest, Oligny-Longpre et al. 2007). Les arrestines sont connues pour recruter Src aux RCPGs (Luttrell, Ferguson et al. 1999) régulant ainsi certaines voies de signalisation dépendant de Src (Miller, Maudsley et al. 2000). Src peut par ailleurs être directement activée par G α s (Ma and Huang 2002). Il est donc légitime de penser que la régulation de Src par V2R puisse faire intervenir les Arrestines ou G α s, ce qui serait cependant contradictoire avec le fait que l'activation d'ERK est indépendante de G α s et ne fait intervenir l'arrestine qu'en aval d'IGF1R. L'implication de G α s ou de la β -arrestine dans l'activation de Src induite par l'AVP ne serait donc pas compatible avec le modèle selon lequel l'activation de Src par V2R est requise pour activer la voie ERK.

Afin d'évaluer l'implication des β -arrestines dans l'activation de Src en réponse à l'AVP, les cellules HEK293 exprimant stablement V2R ont été transfectées ou non 48 heures avant l'expérience avec de petits acides ribonucléiques interférents (siARNs) inhibant l'expression des β -arrestines 1 et 2, puis sevrées pendant 16h avant d'être stimulées 5 minutes par 1 μ M d'AVP. Les niveaux de phosphorylation et donc d'activation de Src ont été détectés par immunoblot à l'aide d'anticorps phosphospécifiques reconnaissant la forme active de Src phosphorylée sur la tyrosine 416. L'inhibition des β -arrestines 1 et 2 n'affecte pas l'activation de Src induite par l'AVP, écartant une implication des β -arrestines dans l'activation de Src en aval de V2R (figure 19A).

Pour étudier le rôle de G α s dans l'activation de Src, l'inhibition de G α s par un traitement chronique des cellules avec la *cholera toxin* (CTX) a été employée. En effet, alors qu'un traitement court par la CTX induit l'activation de G α s par ADP-ribosylation induisant l'inhibition de l'activité GTPasique de G α s, un traitement prolongé est couramment utilisé pour induire la régulation négative de G α s par amplification massive de sa dégradation (Shah 1997). Les cellules HEK293 exprimant V2R de façon stable ont donc été traitées ou non avec 300 ng/mL de CTX pour 16h, ainsi que sevrées durant la même période, puis stimulées pendant 5 minutes par 1 μ M d'AVP. Les niveaux de

phosphorylation de Src ont été détectés par immunoblot à l'aide d'anticorps phosphospécifiques reconnaissant la forme active phosphorylée sur la tyrosine 416 de Src. L'inhibition de G α s par la CTX n'a aucun impact sur l'activation de Src en réponse à l'AVP (figure 19B). Ces résultats suggèrent donc que l'activation de Src consécutive à la stimulation de V2R par l'AVP est indépendante des β -arrestines et de G α s, ce qui est cohérent avec le modèle selon lequel l'activation de Src par V2R est requise pour activer la voie ERK 1/2 en aval de V2R.

Figure 19



Publié (Oligny-Longpre, Corbani et al. 2012)

Publié (Oligny-Longpre, Corbani et al. 2012)

Figure 19. Étude des médiateurs potentiels de l'activation de Src induite par l'AVP. A (Publié), les cellules HEK293 exprimant stablement V2R ont été transfectées ou non avec des SiARNs inhibant l'expression des β -arrestines 1/2 48 heures avant l'expérience, et sevrées pendant 16h avant d'être stimulées 5 minutes par 1 μ M d'AVP. Les niveaux de phosphorylation de Src ont été détectés par immunoblot à l'aide d'anticorps phosphospécifiques reconnaissant la forme active de Src phosphorylée sur la tyrosine 416, les niveaux d'expression de Src étant contrôlés par des anticorps reconnaissant la totalité des protéines Src indépendamment de leur état d'activation. La qualité d'inhibition de l'expression des β -arrestines a été contrôlée à l'aide d'anticorps sélectifs contre β -arrestine 1 et 2, et la détection de la quantité d'actine β par des anticorps anti-actine β a été employée à titre de contrôle quantitatif. **B (Publié)**, les cellules HEK293 exprimant V2R de façon stable ont été traitées ou non avec 300 ng/mL de CTX pour 16h, ainsi que sevrées durant la même période, puis stimulées pendant 5 minutes par 1 μ M d'AVP. Les niveaux de phosphorylation de Src ont été détectés par immunoblot à l'aide d'anticorps phosphospécifiques reconnaissant la forme active phosphorylée sur la tyrosine 416 de Src, les niveaux d'expression de Src étant contrôlés par des anticorps reconnaissant la totalité des protéines Src indépendamment de leur état d'activation. Pour A et B, les résultats ont été générés sous forme de graphique à partir de l'analyse densitométrique des bandes protéiques. Les résultats présentés combinent les données de trois expériences indépendantes et les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la moyenne (SEM). Les analyses statistiques ont été effectuées sur le logiciel GraphPad Prism [®] et correspondent à une analyse de variance à un facteur (*one-way ANOVA*) suivie d'une procédure de Bonferroni (*post hoc test*) en A et un test t de Student en B. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001.

4.2.7. Recherche de la métalloprotéase impliquée

La transactivation d'IGF1R par V2R implique une métalloprotéase non identifiée. Il existe chez l'humain 13 métalloprotéases de type ADAM ayant une activité protéolytique, 19 ADAMTS et 23 MMPs. Parmi ces familles de métalloprotéases, seules celles de type ADAM et MMP ont été caractérisées dans des phénomènes de transactivation d'un RTK par un RCPG impliquant le relargage extracellulaire d'un ligand, alors que les ADAMTS ne semblent importantes que pour le remodelage de la matrice extracellulaire et des protéoglycanes de type agrécane et certaines fonctions hématologiques (Porter, Clark et al. 2005). Par conséquent, 36 métalloprotéases différentes peuvent être raisonnablement considérées comme des candidates potentielles dans la transactivation d'IGF1R par V2R.

Lorsque l'on prend en considération l'identité des métalloprotéases qui semblent exprimées dans nos cellules (d'après une micropuce d'ADN réalisée préalablement dans notre laboratoire), leur capacité documentée à cliver certaines IGFBPs (qui stockent IGF 1 et IGF 2 dans le milieu extracellulaire et à la membrane plasmique, et régulent leur disponibilité) et à interagir avec Src, les MMPs 2, 3, 9 et 11 et les ADAMs 9, 10, 15 et 17 apparaissent comme les meilleurs candidats. En effet, toutes ces MMPs et ADAM 9 peuvent cliver certaines IGFBPs (Vu and Werb 2000; Gibson, Aplin et al. 2001; Mohan, Thompson et al. 2002; Rorive, Berton et al. 2008). Par ailleurs ADAM 9, 10 et 15 peuvent interagir avec Src au niveau de leur queue cytoplasmique (Seals and Courtneidge 2003) et Src peut induire la phosphorylation d'ADAM 17 via PKC (Lemjabbar-Alaoui, Sidhu et al. 2011), ainsi que réguler la sécrétion de MMP 9 (Cortes-Reynosa, Robledo et al. 2008).

Afin d'étudier l'implication de ces candidats, une approche par inhibiteurs plus ou moins sélectifs de métalloprotéases a été choisie, permettant de tester MMP 2, 3 et 9 (certains inhibiteurs sélectifs existent pour ADAM10 et 17 mais sont plus difficilement accessibles). Pour mesurer l'activation d'ERK, une méthode alternative à l'immunoblot a été employée : l'AlphaScreen® (AS) où *Luminescent Oxygen Channeling Immunoassay* (Ullman, Kirakossian et al. 1994) présentant l'avantage d'expérimenter dans de plus petits volumes (donc d'économiser des composés tels que les inhibiteurs) et d'être plus

sensible et quantitatif qu'un immunoblot. L'AS est un essai dans lequel la proximité spatiale entre 2 anticorps marqués respectivement par une bille acceptrice et une bille donneuse, autorise l'émission de lumière entre 520 et 620 nm de longueur d'onde par la bille acceptrice lorsque la bille donneuse est excitée à 680 nm (Ullman, Kirakossian et al. 1994). Pour l'activation d'ERK, l'anticorps associé à la bille acceptrice reconnaît l'épitope phosphorylé marquant l'activation d'ERK tandis que l'anticorps associé à la bille donneuse reconnaît un autre épitope d'ERK (Eglen, Reisine et al. 2008). La phosphorylation d'ERK entraîne ainsi la formation d'un complexe où p-ERK est pris en sandwich entre les deux anticorps marqués, rapprochant suffisamment les deux billes pour permettre l'émission de lumière par la bille acceptrice via une réaction de chimiluminescence entre les réactifs présents sur la bille acceptrice et l'oxygène dans un état singulet (généralisé par la bille donneuse excitée) (Ullman, Kirakossian et al. 1994; Eglen, Reisine et al. 2008). Ainsi, plus l'émission entre 520 et 620 nm est forte, plus le niveau de phosphorylation d'ERK 1/2 est élevé.

Les cellules HEK293 exprimant V2R de manière stable ont été sevrées durant 16h, puis incubées 30 minutes en présence de soit 10 μ M de marimastat, 20 μ M de l'inhibiteur sélectif de MMP 2 ARP101, 15 μ M de l'inhibiteur MMP3-inhibitor-II qui contrairement à ce que son nom indique est assez peu sélectif (Bertram, Boeuf et al. 2009), 100 nM de l'inhibiteur sélectif de MMP 9 MMP9-inhibitor-I, ou de leur véhicule (qui est commun à l'exception de l'inhibiteur de MMP 9). L'activation d'ERK a ensuite été mesurée par AS. Seul le marimastat inhibe significativement l'activation d'ERK en réponse à L'AVP, l'inhibition par MMP3-inhibitor-II étant statistiquement non significative, l'inhibition de MMP 9 étant sans effet, et celle de MMP 2 potentialisant étonnamment l'activation d'ERK dépendant de V2R (figures 20 A et B).

En plus d'être intrigant, l'effet potentialisateur de l'inhibition sélective de MMP 2 soulève deux questions. Cet effet est-il spécifique de la voie d'activation d'ERK en aval de V2R ? Cela semble être le cas puisque la potentialisation n'est observée qu'après stimulation par l'AVP alors que l'activation basale d'ERK n'est pas affectée par l'inhibition de MMP 2 (figure 20A). Ensuite, marimastat et MMP3-inhibitor-II pouvant tous deux inhiber MMP 2, l'inhibition d'ERK découlant de l'inhibition de la

métalloprotéase impliquée dans la transactivation par le marimastat (statistiquement significative) et MMP3-inhibitor-II (statistiquement non significative) est-elle partiellement masquée par l'inhibition concomitante de MMP 2, et donc un effet potentialisateur simultané ? Pour tenter de répondre à ces questions, marimastat et MMP3-inhibitor-II ont chacun été combinés avec l'inhibiteur sélectif de MMP 2 pour déterminer si l'effet potentialisateur de ARP101 peut être inhibé lorsqu'on l'associe avec l'un des deux autres inhibiteurs. Lorsque les inhibiteurs sont combinés, la potentialisation de l'activation d'ERK en réponse à l'AVP liée à ARP101 est presque totalement abolie (figures 20 C et D). Ce résultat confirme que les effets des 3 inhibiteurs sont liés à la même voie de signalisation. Il suggère également que l'inhibition par marimastat et MMP3-inhibitor-II de la voie ERK induite par l'AVP pourrait être nettement plus forte si elle n'était pas associée à l'effet potentialisateur de l'inhibition de MMP 2 (comme en témoigne la très nette inhibition de l'effet d'ARP101 par les deux autres inhibiteurs). En effet, cette stratégie de combinaison revient presque à annuler l'effet lié à MMP 2 : l'inhibition de MMP 2 étant déjà quasi-maximale sous l'effet d'ARP101, l'effet observé lorsque l'un des deux autres inhibiteurs est ajouté reflète très majoritairement l'effet indépendant de l'inhibition de MMP 2, qui se traduit en une inhibition plus forte de l'activation d'ERK. En d'autres termes, l'activation d'ERK par l'AVP est réduite à 30 % (10 fois le niveau basal de p-ERK) de celle obtenue sous l'effet d'ARP101 (30 fois le niveau basal de p-ERK) lorsque les inhibiteurs sont combinés (figure 20D) et donc que l'effet lié à MMP 2 est majoritairement masqué ; alors que l'activation d'ERK n'est réduite qu'à approximativement 50 % lorsque l'effet des inhibiteurs marimastat et MMP 3-inhibitor-II seuls (5 à 7 fois le niveau basal de p-ERK) est comparé au niveau d'activation d'ERK résultant de l'AVP seul (10 fois le niveau basal d'ERK)(figure 20B).

Ces résultats impliquent donc que la métalloprotéase favorisant la transactivation et inhibée par MMP3-inhibitor-II n'est ni MMP 2, ni MMP 9. La constante d'inhibition (K_i) de diverses MMPs identifiées comme étant inhibées par MMP3-inhibitor-II est documentée (Bertram, Boeuf et al. 2009). Par conséquent, il est possible de comparer l' EC_{50} de l'inhibition de la phosphorylation d'ERK par MMP3-inhibitor-II avec les valeurs de K_i connues, de manière à réduire davantage le nombre de candidats potentiels. Afin, de limiter au maximum dans la courbe dose-réponse l'effet de l'inhibition

concomitante de MMP 2 qui pourrait gêner la détermination de l' EC_{50} d'inhibition d'ERK, les cellules ont été incubées pendant 30 minutes avec une combinaison d'inhibiteurs, consistant en une dose constante (20 μ M) d'ARP101 combinée avec une dose croissante de MMP3-inhibitor-II, de manière à ce que l'effet lié à MMP 2 soit déjà à peu près maximal, quelle que soit la dose de l'autre inhibiteur. Les cellules ont ensuite été stimulées 5 minutes par 1 μ M d'AVP puis l'activation d'ERK mesurée par AS. La courbe dose-réponse obtenue dévoile un EC_{50} d'environ 115 nM (figure 20E), correspondant bien au K_i de seulement MMP 3 (130 nM) et MMP 1 (120 nM) (Bertram, Boeuf et al. 2009), cette dernière ne semblant pas exprimée dans nos cellules. Ces résultats désignent donc MMP 3 comme un bon candidat pour la transactivation d'IG1R par V2R, bien qu'il ne soit pas exclu que la liste des métalloprotéases inhibées par MMP3-inhibitor-II, et donc la liste des K_i , ne soit pas exhaustive.

Figure 20

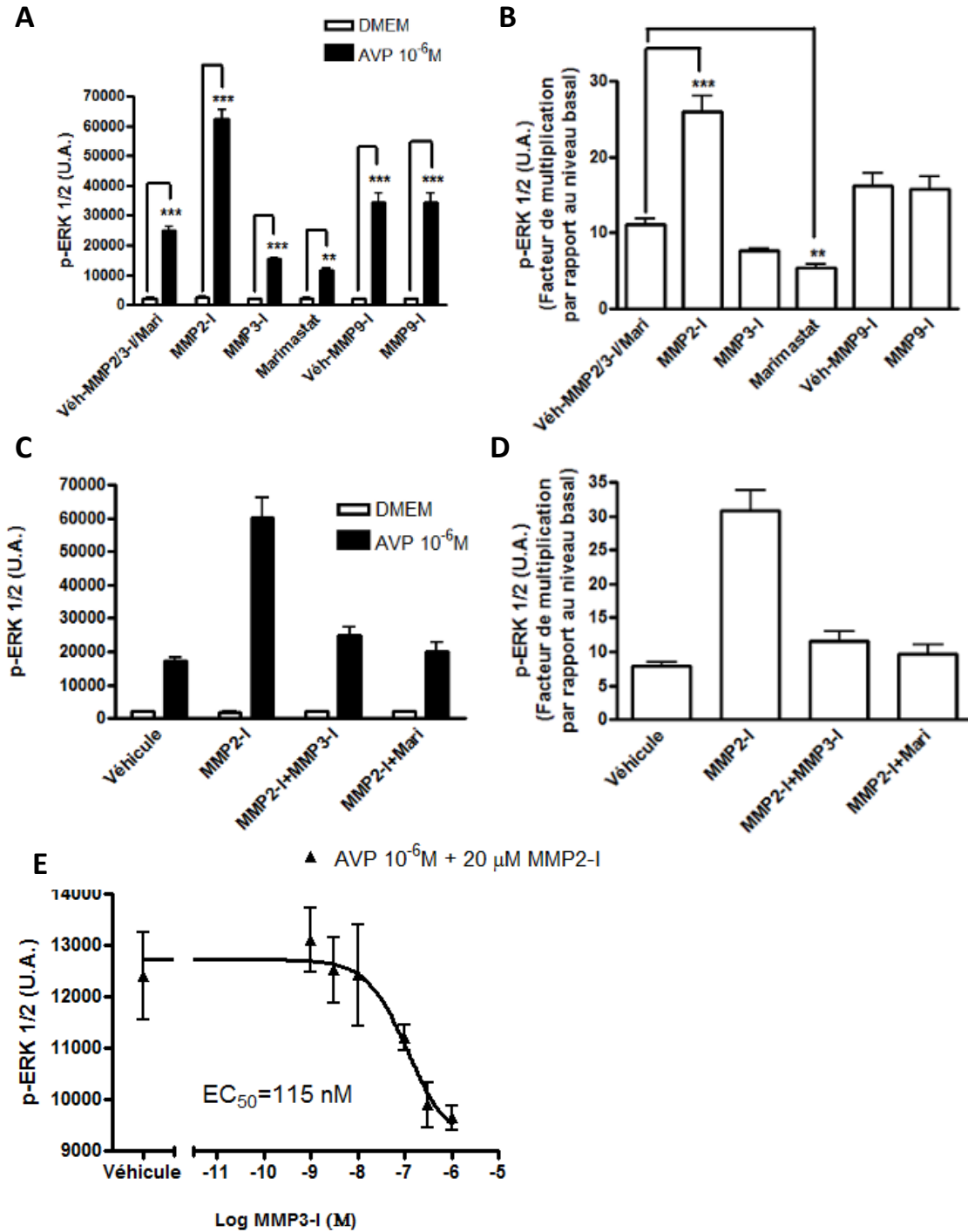


Figure 20. Recherche de la métalloprotéase impliquée dans la transactivation d'IGF1R par V2R. Les cellules HEK293 exprimant V2R de manière stable ont été sevrées durant 16h, incubées avec divers inhibiteurs de métalloprotéases pendant 30 minutes, puis stimulées 5 minutes par 1 μM d'AVP. La

phosphorylation d'ERK 1/2 a ensuite été mesurée par AlphaScreen®. **A**, après sevrage, les cellules ont été incubées 30 minutes en présence de soit 10 µM de marimastat (Mari), 20 µM de l'inhibiteur sélectif de MMP 2 ARP101 (MMP2-I), 15 µM de l'inhibiteur MMP3-inhibitor-II (MMP3-I), 100 nM de l'inhibiteur sélectif de MMP 9 MMP9-inhibitor-I (MMP9-I), ou de leur véhicule (qui est commun à l'exception de l'inhibiteur de MMP 9). **B**, les données présentées en A sont ici représentées de manière à ce que le niveau de phosphorylation d'ERK soit exprimé en facteur d'activation par rapport au basal. **C**, après sevrage, les cellules ont été incubées 30 minutes en présence de soit 20 µM de MMP2-I, une combinaison de 20 µM de MMP2-I avec 15 µM de MMP3-I, une combinaison de 20 µM de MMP2-I avec 10 µM de marimastat, ou leur véhicule. **D**, les données présentées en C sont ici représentées de manière à ce que le niveau de phosphorylation d'ERK soit exprimé en facteur d'activation par rapport au basal. **E**, après sevrage, les cellules ont été incubées 30 minutes en présence de 20 µM de MMP2-I en combinaison avec une dose croissante de MMP3-I. Ces résultats sont représentatifs de quatre expériences indépendantes en A et B, et d'une expérience pour B, C et D. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la moyenne (SEM). Les analyses statistiques en A et B ont été effectuées sur le logiciel GraphPad Prism ® et correspondent à une analyse de variance à un facteur (*one-way ANOVA*) suivie d'une procédure de Bonferroni (*post hoc test*). *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001.

4.2.8. Recherche du facteur d'activation d'IGF1R

La transactivation d'IGF1R par V2R implique la libération dans le milieu extracellulaire d'un facteur capable d'activer le récepteur tyrosine kinase (Oligny-Longpre, Corbani et al. 2012). Trois ligands, l'IGF1, l'IGF2 et l'insuline, sont capables d'activer IGF1R. Cependant le traitement par l'insuline des cellules HEK293 exprimant V2R de façon stable n'induit pas l'activation d'ERK (Oligny-Longpre, Corbani et al. 2012), et l'insuline étant de plus synthétisée par des cellules spécialisées au niveau du pancréas, IGF1 et IGF2 semblent être les seuls candidats parmi les ligands apparentés à IGF1R.

Afin d'évaluer l'implication d'IGF1 et 2 dans l'activation d'ERK en aval de V2R, les cellules HEK293 exprimant V2R de façon stable ont été prétraitées avec 10 µg/mL d'anticorps neutralisant anti-IGF1 ou anti-IGF2 (prévenant la liaison du facteur de croissance sur son récepteur), ou de leur véhicule, puis stimulées 5 minutes par 1 µM d'AVP ou 200 ng/mL d'IGF1 ou d'IGF2 pour contrôler l'efficacité des anticorps. Les niveaux de phosphorylation d'ERK 1/2 induits par l'AVP ont ensuite été mesurés par AS. Alors que les deux anticorps inhibent de façon significative leurs cibles respectives et donc l'activation d'ERK en réponse à l'IGF1/2, ils n'ont aucun effet significatif sur l'activation d'ERK induite par l'AVP (figure 21A). Ni IGF1, ni IGF2 ne semblent donc impliqués dans la transactivation d'IGF1R par V2R. Cependant, la possibilité d'une mobilisation conjointe d'IGF1 et IGF2 dans le milieu extracellulaire en réponse à l'AVP et donc d'un effet redondant des deux ligands pourrait encore expliquer l'absence d'inhibition substantielle de la phosphorylation d'ERK 1/2 en réponse à l'AVP par ces anticorps utilisés séparément. Afin d'évaluer cette hypothèse, les cellules ont été prétraitées avec une combinaison des deux anticorps à 10 µg/mL, puis stimulées 5 minutes par 1 µM d'AVP ou 200 ng/mL d'une combinaison IGF1/IGF2 pour contrôler l'efficacité des anticorps. Encore une fois, les anticorps neutralisants inhibent clairement l'activation d'ERK en réponse aux IGFs combinés mais n'ont aucun effet significatif sur l'activation d'ERK résultant de la stimulation par l'AVP (figure 21B). Ces résultats permettent donc d'exclure IGF1 et IGF2 comme étant le facteur responsable de l'activation d'IGF1R lorsque ce dernier est transactivé par V2R.

Figure 21

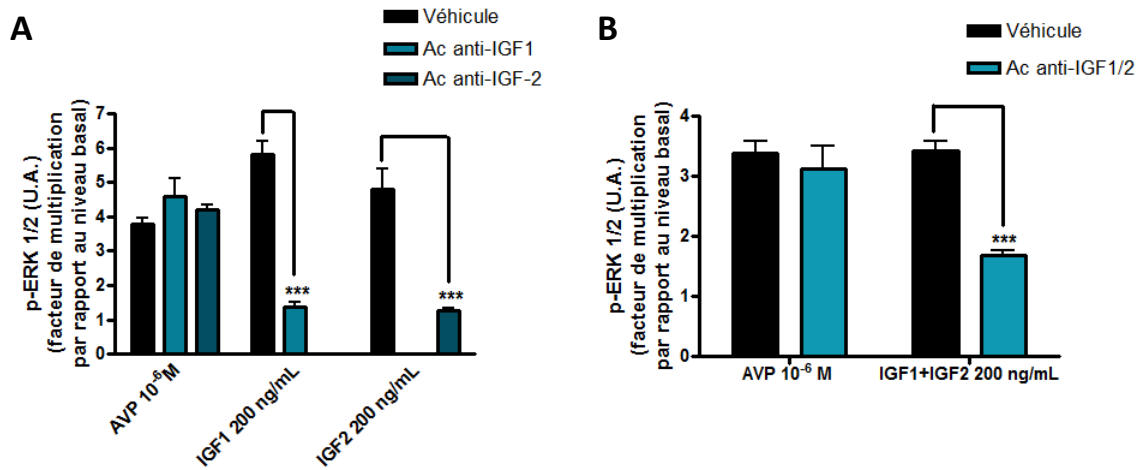


Figure 21. Recherche du facteur d'activation d'IGF1R entrant en jeu dans la transactivation de ce récepteur par V2R. **A**, les cellules HEK293 exprimant V2R de façon stable ont été prétraitées avec 10 µg/mL d'anticorps neutralisant anti-IGF1 ou anti-IGF2 (prévenant la liaison du facteur de croissance sur son récepteur), ou de leur véhicule, puis stimulées 5 minutes par 1 µM d'AVP ou 200 ng/mL d'IGF1 ou d'IGF2 pour contrôler l'efficacité des anticorps. Les niveaux de phosphorylation d'ERK 1/2 induits par l'AVP ont ensuite été mesurés par AlphaScreen®. **B**, les cellules HEK293 exprimant V2R de façon stable ont été prétraitées avec 10 µg/mL d'une combinaison des anticorps neutralisant anti-IGF1 et anti-IGF2 ou de leur véhicule, puis stimulées 5 minutes par 1 µM d'AVP ou 200 ng/mL d'une combinaison IGF1/IGF2 pour contrôler l'efficacité des anticorps. Les niveaux de phosphorylation d'ERK 1/2 induits par l'AVP ont ensuite été mesurés par AlphaScreen®. Les résultats présentés sont représentatifs de deux expériences indépendantes en A et combinent 3 expériences indépendantes en B. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la moyenne (SEM). Les analyses statistiques ont été effectuées sur le logiciel GraphPad Prism® et correspondent à une analyse de variance à un facteur (*one-way ANOVA*) suivie d'une procédure de Bonferroni (*post hoc test*). *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001.

5. Discussion

Affiner notre compréhension des modes de signalisation des RCPGs et des mécanismes et interactions moléculaires qui les sous-tendent représente un pan important de la recherche fondamentale et nourrit l'évolution et l'amélioration constante des approches thérapeutiques de la médecine moderne. Cet objectif nécessite la modification récurrente des paradigmes établis dans le domaine des récepteurs à sept segments transmembranaires, et l'incorporation continue de nouvelles données expérimentales pour élaborer de meilleurs modèles, plus représentatifs d'une réalité biologique plus complexe et plus riche qu'elle ne paraît dans les paradigmes établis. C'est dans cette optique que nous nous sommes intéressés à explorer les modes de signalisation non-canoniques du récepteur V2R de la vasopressine, qui malgré son implication dans des processus physiologiques et pathologiques importants, recèle encore certains aspects signalétiques intrigants et peu explorés dont l'intégration aux rôles physiologiques et physiopathologiques de V2R reste à définir. À l'occasion de ce projet, nous avons donc dévoilé la possibilité d'un nouveau couplage pour V2R avec la protéine G12 et son implication potentielle dans la production d'AMPC à l'aide d'une technique d'étude des interactions protéine-protéine, le BRET, et caractérisé davantage les mécanismes de la transactivation d'IGF1R par V2R régulant l'activation des MAPK ERK1/2.

5.1. Modulation du couplage de V2R avec *Gas* et *Gα12*

La capacité pour V2R d'interagir spécifiquement avec la sous-unité $G\alpha_{12}$ a d'abord été mise en évidence par les travaux présentés dans la figure 9. Alors que la saturation des courbes de titration révèle le caractère spécifique des interactions que le récepteur établit aussi bien avec *Gas* que $G\alpha_{12}$, il est également montré que ces interactions sont modulées par l'AVP avec une diminution du BRET entre V2R-RlucII et GFP10-*Gas* contre une augmentation entre V2R-RlucII et GFP10- $G\alpha_{12}$. L'idée d'une régulation opposée de ces deux sous-unités par V2R est renforcée par le fait que les valeurs de $BRET_{50}$ permettant d'évaluer l'affinité relative des interacteurs sont en faveur d'une diminution de l'affinité de V2R pour *Gas* après 10 minutes de stimulation, tandis

que son affinité pour $G\alpha_{12}$ serait augmentée. Ces travaux suggèrent qu'après un certain temps d'exposition de V2R à son agoniste, son couplage préférentiel pour $G_{\alpha s}$ pourrait être commuté vers un couplage avec $G\alpha_{12}$, faisant écho à d'autres études mettant en lumière le remplacement de G_s par G_i en aval du récepteur β_2 -adrénergique, dont la transition est régulée par la phosphorylation du récepteur par la PKA (Daaka, Luttrell et al. 1997). Un tel mode de régulation n'est pas inenvisageable pour V2R étant donné que ce récepteur peut être phosphorylé par la PKA *in vitro* (Wu, Birnbaumer et al. 2008).

Bien que le contrôle de la transition d'un couplage majoritaire de $G_{\alpha s}$ vers $G\alpha_{12}$ reste obscur, il est envisageable que la dose d'AVP puisse également l'influencer. La valeur des EC_{50} des courbes dose-réponse mesurant l'interaction entre les $G\alpha$ et $G\gamma_1$ en réponse à l'AVP présentées dans la figure 10 incite à la réflexion sur ce sujet. En effet, comme il a été évoqué dans la partie résultats, la courbe de modulation de l'hétérotrimère G_s en fonction de la dose d'AVP possède un aspect biphasique, avec une phase ascendante du BRET dont l' EC_{50} entre 10^{-10} et 10^{-11} M semble compatible avec l' EC_{50} d'activation des adénylates cyclases par V2R (Oakley, Laporte et al. 1999), tandis que celui de la phase descendante est du même ordre que l' EC_{50} de la modulation de l'hétérotrimère G_{12} présenté dans la même figure. Certains travaux préliminaires réalisés par d'autres membres du laboratoire (Marc-Olivier Boily, stagiaire d'été au baccalauréat et Éric Carpentier, chercheur post-doctoral), étudiant indirectement l'activation de RhoA à l'aide d'un essai utilisant un gène rapporteur sous contrôle d'un promoteur dont l'activité dépend de RhoA (Fromm, Coso et al. 1997; Siehler 2009), pourraient être cohérents avec une transition de couplage en fonction de la dose d'AVP. En effet, les résultats suggèrent la capacité de V2R d'inhiber RhoA en réponse à 10^{-10} M d'AVP, mais au contraire d'induire son activation en réponse à 10^{-6} M. Étant donné la capacité que possède la PKA d'inhiber RhoA (Qiao, Huang et al. 2003), notamment en conséquence de l'activation de $G_{\alpha s}$ en réponse à l'AVP (Tamma, Klusmann et al. 2003), l'inhibition de RhoA observée en réponse à de faibles concentrations d'AVP pourrait refléter l'effet du couplage $G_{\alpha s}$ et l'action de la PKA. Pour de plus fortes concentrations d'AVP, l'activation de RhoA pourrait être liée au couplage $G\alpha_{12}$, à condition que $G\alpha_{12}$ soit activée en réponse à l'AVP.

5.2. État d'activation de $G\alpha_{12}$ en réponse à l'AVP

L'une des questions importantes que soulèvent nos travaux est l'effet de V2R sur l'état d'activation de $G\alpha_{12}$. En effet, si les résultats présentés exposent de façon claire la possibilité pour V2R d'interagir avec $G\alpha_{12}$ et la modulation de ces interactions par l'AVP, il reste néanmoins impossible de conclure quant à une activation ou une inhibition de $G\alpha_{12}$ sous le contrôle de V2R. Cependant, les données obtenues par nos études de BRET semblent plutôt en faveur d'une inhibition, c'est-à-dire du blocage de l'activité constitutive de $G\alpha_{12}$ existant à l'état basal, avant stimulation par l'AVP.

En effet, les expériences de BRET présentées dans la figure 10, permettant de suivre la modulation des hétérotrimères G12 et Gs en fonction de la dose d'agoniste, témoignent d'un effet contraire du récepteur $TP\alpha$ sur l'hétérotrimère G12 en réponse au thromboxane A2 (diminution du BRET avec l'augmentation de la dose d'agoniste) par rapport à V2R (augmentation du BRET avec la dose d'AVP). L'obtention d'une modulation opposée de l'interaction entre RlucII- $G\alpha_{12}$ et GFP10-G γ 1 en réponse à la stimulation d'un récepteur dont on sait qu'il active G12 ($TP\alpha$) en comparaison avec V2R suggère un effet contraire sur l'état d'activation de la protéine G, et donc une inhibition de G12 induite par l'AVP.

Par ailleurs, l'étude des interactions entre $G\alpha_{12}$ et ses partenaires et effecteurs présentée dans la figure 11 est également consistante avec cette interprétation. Ainsi, le BRET entre RlucII- $G\alpha_{12}$ et GFP10-RhoA diminue sous le contrôle de $TP\alpha$, alors qu'il augmente en aval de V2R. De la même façon, Le BRET entre RlucII- $G\alpha_{12}$ et GFP10-p115-RGS augmente en réponse au TXA2 lorsque $TP\alpha$ est exprimé, alors qu'il diminue en réponse à l'AVP dans les cellules exprimant V2R. Cet effet contraire des agonistes, selon qu'on stimule un récepteur activant G12 ou le récepteur V2R de la vasopressine, aussi bien sur l'interaction entre $G\alpha_{12}$ et G γ 1, qu'entre $G\alpha_{12}$ et ses effecteurs, semble en faveur d'une inhibition de $G\alpha_{12}$ plutôt que de son activation. Une absence d'activation de $G\alpha_{12}$ en réponse à la stimulation de V2R semble d'ailleurs confirmée par certains résultats préliminaires obtenus dans le laboratoire à l'aide d'un biosenseur BRET en développement, basé sur le recrutement de GRKs au dimère $\beta\gamma$ lorsqu'une $G\alpha$ est activée. Cependant, il reste impossible de conclure définitivement quant-à l'effet activateur ou

inhibiteur de V2R sur $G\alpha_{12}$ en absence d'un mode d'évaluation direct de son activation, tel qu'un essai de liaison au $[35S]GTP\gamma S$ (Harrison and Traynor 2003; Siehler 2009).

5.3. Régulation par $G\alpha_{12}$ de la production d'AMPc

En l'absence probable d'une activation de G_{12} en réponse à l'AVP, d'autres questions sont soulevées notamment concernant l'impact de $G\alpha_{12}$ sur la production d'AMPc en réponse à l'AVP. Nous avons vu que les données présentées dans la figure 12 étaient consistantes avec les observations de Jiang et al. (Jiang, Collins et al. 2008) montrant une régulation synergique de la production d'AMPc $G_{\alpha s}$ -dépendante par $G\alpha_{12}$. En effet, alors que ces auteurs caractérisaient la possibilité pour un récepteur couplé $G_{12/13}$ d'augmenter la production d'AMPc liée à l'activation préalable d'un récepteur couplé G_s , nous avons montré que sous l'influence d'un même récepteur capable d'interagir avec $G_{\alpha s}$ et $G\alpha_{12}$, un effet similaire de potentialisation de l'AMPc pouvait être obtenu. L'AVP induit en effet une augmentation encore plus forte d'AMPc dans nos cellules lorsque $G\alpha_{12}$ est surexprimée (figure 12).

Jiang et al. (Jiang, Collins et al. 2008) ont mis en évidence que la synergie entre G_s et $G_{12/13}$ dans leurs cellules est dépendante d'une modulation de l'activité d'une adénylate cyclase bien spécifique, l'adénylate cyclase 7 (AC7). Bien que cet effet nécessite l'activité de $G_{12/13}$ puisqu'il peut être inhibé par l'expression de p115-RGS (qui bloque l'interaction de $G_{12/13}$ avec ses effecteurs et inhibe l'activation de $G\alpha_{12/13}$ par son activité GAP), il semble lié à une voie différente de celle menant à l'activation de RhoA (Jiang, Collins et al. 2008). En effet, les auteurs montrent que l'expression d'un variant constitutivement actif de $G\alpha_{12}$ ou $G\alpha_{13}$ activant constitutivement RhoA inhibe la production d'AMPc impliquant $G_{12/13}$ (Jiang, Collins et al. 2008).

Bien que nous retrouvions une absence d'implication de RhoA tel que présenté dans la figure 13, la similarité de leur démonstration avec nos résultats n'est que partielle. En effet, nous avons montré que le traitement de nos cellules avec une version de l'exoenzyme C3 transférase (inhibiteur de RhoA) traversant les membranes cellulaires n'avait aucun impact sur la production d'AMPc induite par l'AVP et sa potentialisation

par $G\alpha_{12}$ (figure 13A). Étant donné l'absence de contrôle de l'efficacité de C3 dans nos cellules, nous avons également testé la surexpression de p115-RGS, qui non seulement bloque l'interaction de $G\alpha_{12}$ avec ses effecteurs, dont les RhoGEFs LARG et Lbc-RhoGEF, mais également inhibe l'activation de la $G\alpha$ via son activité GAP (Kozasa, Jiang et al. 1998; Shi, Sinnarajah et al. 2000; Booden, Siderovski et al. 2002; Holinstat, Mehta et al. 2003). L'absence d'effet de p115-RGS sur les taux d'AMPc en réponse à l'AVP indique non seulement l'absence d'implication de RhoA, mais également un effet indépendant de l'activité de $G\alpha_{12/13}$, ce qui n'est pas le cas pour l'équipe du Dr. Sternweis (Jiang, Collins et al. 2008). Par ailleurs, l'AC7 si déterminante dans leurs travaux ne semble pas exprimée dans nos cellules (d'après une analyse de micropuce à ADN réalisée préalablement dans le laboratoire).

Le mode d'action par lequel $G\alpha_{12}$ module la production d'AMPc en aval de V2R reste donc incertain dans nos cellules, bien que certaines hypothèses puissent être évoquées. Certains résultats préliminaires de BRET (non présentés) suggèrent la possibilité pour $G\alpha_s$ et $G\alpha_{12}$ d'interagir spécifiquement entre elles et cette interaction semble modulée par l'AVP. Cette interaction et sa modulation pourraient contribuer à réguler allostériquement l'effet de $G\alpha_s$ sur la production d'AMPc, sans dépendre de l'état d'activation de $G\alpha_{12}$. Cependant, l'absence d'outils moléculaires permettant de bloquer sélectivement l'interaction $G\alpha_s$ - $G\alpha_{12}$ empêche pour l'instant d'explorer sérieusement cette piste. Par ailleurs, $G\alpha_{12}$ peut induire l'activation des phosphoprotéines phosphatases pp5 (Yamaguchi, Katoh et al. 2002) et pp2A (Zhu, Tate et al. 2007), capables de réguler les niveaux d'AMPc non seulement par interaction avec les adénylates cyclases (Crossthwaite, Ciruela et al. 2006), mais aussi par inhibition des phosphodiesterases (Resjo, Oknianska et al. 1999; Dodge-Kafka, Bauman et al. 2010) qui sont des enzymes hydrolysant l'AMPc en AMP. Ainsi, l'inhibition d'une de ces phosphoprotéines phosphatases par $G\alpha_{12}$ pourrait expliquer la potentialisation de la production d'AMPc par inhibition de sa dégradation. Cependant, l'activation de pp5 semble dépendante de l'activité de $G\alpha_{12}$ (Yamaguchi, Katoh et al. 2002) et la nécessité pour $G\alpha_{12}$ d'être sous forme active pour réguler pp2A reste débattue (Zhu, Tate et al. 2007) ; ce qui doit être pris en considération étant donné que l'effet de $G\alpha_{12}$ dans nos cellules semble indépendant de son activité.

L'absence apparente de convergence entre les voies d'activation de RhoA et de modulation de la production d'AMPC en aval de $G\alpha_{12}$ paraît logique à la lumière des modes de régulations de l'une des deux RhoGEFs capables d'être activées par $G\alpha_{12}$, à savoir la très grosse protéine d'ancrage *A-kinase anchoring protein Lbc* (AKAP-Lbc ou Lbc RhoGEF). En effet, en plus de permettre l'activation de RhoA en jouant son rôle de GEF en réponse à l'activation de $G\alpha_{12}$, cette protéine permet également de la coordonner avec la voie AMPc dépendante de Gas puisque son interaction avec la PKA et sa phosphorylation subséquente inhibent son activité RhoGEF via le recrutement de la protéine 14-3-3 (Dodge-Kafka, Langeberg et al. 2006). Il existe donc un antagonisme entre les voies AMPc et RhoA, cohérent avec l'absence d'implication d'une activation de $G\alpha_{12}$ dans la potentialisation de la production d'AMPC que cette sous-unité induit. Les mécanismes par lesquels $G\alpha_{12}$ module la production d'AMPC restent donc pour l'instant indéfinis, mais semblent bien distincts de l'activation de $G\alpha_{12}$ et de sa voie de signalisation classique menant à l'activation de RhoA

5.4. Les implications de la transactivation d'IGF1R par V2R

Puisque nos résultats semblent en défaveur d'une activation de $G\alpha_{12}$ en réponse à l'AVP, comment expliquer les résultats préliminaires suggérant une activation de RhoA pour de fortes doses d'AVP ? Comme nous l'avons évoqué dans l'introduction, V2R est également capable de signaler via $G\alpha_q$ (Zhu, Gilbert et al. 1994; Ecelbarger, Chou et al. 1996). Or, $G\alpha_q$ est capable d'activer RhoA par l'intermédiaire de p63RhoGEF (Lutz, Freichel-Blomquist et al. 2005) et possiblement LARG (Booden, Siderovski et al. 2002) qui est aussi l'une des deux RhoGEFs activables par $G\alpha_{12}$ et semble exprimée dans nos cellules (d'après une analyse de micropuce à ADN réalisée préalablement dans le laboratoire). Mais nous savons également que V2R est capable de transactiver le récepteur tyrosine kinase IGF1R menant à l'activation des MAPK ERK 1/2 tel que publié (Oligny-Longpre, Corbani et al. 2012) et confirmé dans la figure 14. Étonnamment, le récepteur IGF1R est capable d'activer LARG par l'intermédiaire d'une interaction directe avec la RhoGEF, induisant l'activation de RhoA en réponse à un agoniste, une voie dans laquelle le rôle de l'autophosphorylation du récepteur reste incertain (Taya, Inagaki et al.

2001). L'activation de RhoA pour de fortes doses d'AVP pourrait donc être liée à la transactivation d'IGF1R par V2R.

Alors que l'implication d'IGF1R et d'une métalloprotéase dans nos cellules dans l'activation d'ERK en aval de V2R a pu être confirmée par blocage de la phosphorylation d'ERK aussi bien par l'inhibiteur sélectif d'IGF1R (AG1024) que par les inhibiteurs à large spectre de métalloprotéases (marimastat et phénanthroline) tel que montré dans les figures 14 et 15, il n'a pas été possible de reproduire l'induction de l'autophosphorylation d'IGF1R par l'AVP (figure 16) tel que publié (Oligny-Longpre, Corbani et al. 2012). Bien que ces résultats soient vraisemblablement la conséquence d'une modification des rapports d'expression entre V2R et IGF1R par rapport aux cellules d'origine utilisées pour les expériences similaires du papier (Oligny-Longpre, Corbani et al. 2012), il n'est pas exclu que le récepteur ne soit plus phosphorylé en réponse à l'AVP dans nos cellules.

L'absence d'autophosphorylation n'est en effet pas incompatible avec l'activation d'ERK dépendant d'IGF1R. Ainsi, comme il a été exposé dans l'introduction, l'activation de la voie ERK en aval d'IGF1R requiert le recrutement de la β -arrestine 1 au récepteur, permettant son internalisation, ainsi que, via le rôle de protéine d'échafaudage de l'arrestine, l'association de l'E3 ubiquitine ligase MDM2 responsable de l'ubiquitination du récepteur et de l'arrestine (Girnita, Shenoy et al. 2007; Vasilcanu, Vasilcanu et al. 2008). Or, cette signalisation par l'entremise de la β -arrestine 1 menant à l'activation d'ERK peut être induite via l'IGF1R sans passer par son autophosphorylation. Cela a notamment été montré en réponse à la picropodophylline (PPP) qui inhibe l'activité tyrosine kinase d'IGF1R mais active ERK via le recrutement de la β -arrestine 1 et de MDM2 au récepteur (Vasilcanu, Vasilcanu et al. 2008). Un phénomène similaire a été décrit en réponse à la fixation d'un anticorps anti-IGF1R n'induisant pas la phosphorylation du récepteur, mais responsable de l'activation d'ERK via le recrutement de la β -arrestine 1 (Zheng, Shen et al. 2012). Étant donné que dans ces deux cas la voie Akt classiquement activée par IGF1R n'est pas activée, l'activation de la voie ERK sans passer par la phosphorylation d'IGF1R dans nos cellules serait par ailleurs cohérent avec l'absence d'activation d'Akt constatée par Charest et al. (Charest, Oligny-Longpre et al. 2007). Le recrutement de la β -arrestine 1 à l'IGF1R constaté en réponse à l'AVP par Oligny-Longpre et al. (Oligny-Longpre, Corbani et al. 2012) semble donc un marqueur

plus constant de l'activation de la voie ERK en aval d'IGF1R que l'autophosphorylation du récepteur que nous ne retrouvons pas dans les travaux réalisés pour ce projet. Cela pourrait s'expliquer par un manque de sensibilité de la détection de l'autophosphorylation ou par la possibilité d'activer ERK via IGF1R sans passer par son autophosphorylation (tel que discuté ci-dessus). Par ailleurs, bien que l'AG1024 soit considéré sélectif contre l'IGF1R avec un effet moindre sur le récepteur de l'insuline, il ne peut être formellement exclu que l'inhibition d'ERK par l'AG1024 dans nos cellules ne reflète pas l'inhibition d'IGF1R. Pour écarter cette possibilité il serait pertinent d'étudier l'inhibition d'ERK par la surexpression d'un dominant négatif d'IGF1R tel que présenté dans le papier (Oligny-Longpre, Corbani et al. 2012). En complément, il pourrait être intéressant d'étudier l'ubiquitination d'IGF1R en réponse à l'AVP, puisque cette modification est associée avec le recrutement de la β -arrestine 1 et de MDM2, inhérents à la voie ERK contrôlée par ce récepteur.

Comme nous venons de le rappeler, la voie Akt n'est pas activée en réponse à l'AVP alors qu'elle constitue avec la voie ERK l'une de deux voies classiques activées en réponse à l'IGF1 (Charest, Oligny-Longpre et al. 2007). Mise à part l'explication liée à une activation biaisée d'IGF1R telle que décrite ci-haut faisant intervenir seulement le recrutement de la β -arrestine 1 - mais non consistante avec la phosphorylation d'IGF1R observée par Oligny et al. (Oligny-Longpre, Corbani et al. 2012) -, il est également possible d'invoquer un mécanisme impliquant la régulation négative simultanée d'Akt par une autre voie. Par exemple, l'activation de $G\alpha_{12}$ peut induire via RhoA l'activation de *phosphatase and tensin homologue* PTEN menant à l'inhibition de la voie Akt (Li, Dong et al. 2005). Ainsi l'activation potentielle de $G\alpha_{12}$ en réponse à l'AVP pourrait expliquer l'absence de phosphorylation d'Akt, mais comme nous en avons discuté plus haut, il reste indéterminé si V2R induit l'activation ou l'inhibition de $G\alpha_{12}$. À l'opposé, l'activation de $G\alpha_{12}$ pourrait induire dans une certaine mesure (non observé in-vivo contrairement à $G\alpha_{13}$) l'activation de PI3K et Akt indépendamment de RhoA, via la tyrosine kinase PYK2 (Shi, Sinnarajah et al. 2000; Shi and Kehrl 2001), auquel cas l'inhibition potentielle de $G\alpha_{12}$ en réponse à l'AVP pourrait expliquer l'absence de phosphorylation d'Akt. Une implication de la modulation de $G\alpha_{12}$ par V2R dans l'absence de phosphorylation d'Akt requiert cependant que la chronologie de modulation

de $G\alpha_{12}$ et ERK en aval de V2R soit compatible avec une telle séquence. Étant donné que les expériences de BRET (dont les expériences relatives à $G\alpha_{12}$) présentées dans ce mémoire ont été réalisées pour 10 à 15 minutes de stimulation contre 5 minutes pour l'activation de voies en aval d'IGF1R (ce qui inclurait Akt), il serait intéressant de vérifier que la modulation de $G\alpha_{12}$ a lieu au moins aussi tôt que celle des voies en aval d'IGF1R. Comme précisé dans la section « matériel et méthodes », le choix des durées de stimulation des expériences présentées dans ce mémoire a privilégié les durées offrant la meilleure fenêtre dynamique entre les conditions « stimulé » et « non-stimulé ».

Par ailleurs, les GRKs peuvent réguler les voies ERK et Akt en aval d'IGF1R. En effet, alors que GRK 5 et 6 seraient requises pour l'activation d'ERK et d'Akt en réponse à l'IGF1, GRK2 favoriserait l'activation d'Akt mais inhiberait la voie ERK (Zheng, Worrall et al. 2012). Toute voie conduisant à l'inhibition de GRK2 pourrait donc induire une augmentation de l'activité d'ERK tout en inhibant Akt, un phénomène qui pourrait s'amplifier de lui-même selon une boucle de régulation positive étant donné la capacité d'ERK à inhiber GRK2 par phosphorylation (Pitcher, Tesmer et al. 1999). Cette régulation par les GRKs est d'autant plus pertinente au phénomène de transactivation d'IGF1R par V2R, qu'un autre groupe avait identifié l'implication de GRK 5 et 6 dans l'activation d'ERK en réponse cette fois à l'AVP, ainsi que le caractère inhibiteur de GRK2 dans l'activation d'ERK en aval de V2R (Ren, Reiter et al. 2005) : des observations très probablement liées à la conservation du mode de régulation d'IGF1R par les GRKs, lorsque le récepteur est activé par transactivation. Ces mêmes auteurs suggéraient d'ailleurs que l'activation d'ERK dans les premières minutes de stimulation de V2R dépendait largement de la signalisation par $G\alpha_s$ (Ren, Reiter et al. 2005). Cependant, les résultats que nous avons présentés dans la figure 17, étudiant la force d'inhibition de l'AG1024 sur l'activation d'ERK en fonction du temps de stimulation par l'AVP, démontrent qu'au moins la grande majorité de l'activation d'ERK est directement liée à la transactivation quel que soit le temps d'activation.

5.5. La recherche des inconnues

Si Oligny-Longpre et al. ont caractérisé avec précision les séquences moléculaires menant de l'activation de V2R à la phosphorylation d'ERK 1/2 via l'IGF1R (Oligny-

Longpre, Corbani et al. 2012), plusieurs éléments n'en demeurent pas moins mystérieux. Ainsi, il est clair que l'activité de Src est requise en amont d'IGF1R avant même le relargage du facteur d'activation autocrine/paracrine du RTK. Bien que nous ayons montré la compatibilité de la cinétique d'activation de Src par l'AVP avec celle de la phosphorylation d'ERK 1/2 (figure 18), le mode d'activation de Src en aval de V2R soulève certaines questions. En effet, il est bien caractérisé que l'activité de Src peut être régulée par la β -arrestine favorisant son recrutement aux RCPGs (Luttrell, Ferguson et al. 1999; Miller, Maudsley et al. 2000), mais aussi être directement activée par Gas (Ma and Huang 2002). Cependant ces deux modes d'activation ne sont pas cohérents avec l'indépendance de Gas démontrée par Charest et al. pour l'activation d'ERK induite par l'AVP (Charest, Oligny-Longpre et al. 2007) et avec l'implication de la β -arrestine uniquement en aval d'IGF1R et donc en aval de Src par Oligny et al. (Oligny-Longpre, Corbani et al. 2012). Afin de vérifier la viabilité du modèle selon lequel l'initiation du phénomène de transactivation s'effectue par l'activation de Src par V2R, l'implication des β -arrestines et de Gas dans l'activation de Src en réponse à l'AVP ont été testées et écartées (figure 19). Le mécanisme d'activation de Src en aval de V2R reste donc une inconnue à identifier, et le fait que $G\alpha_{12}$ peut activer Src (Meyer, Hunt et al. 2003) pourrait constituer une piste intéressante. Plus simplement, l'activation de Src pourrait découler d'une interaction directe avec certains domaines du récepteur V2R lui-même tel qu'il a été décrit pour le récepteur β_3 -adrénergique (Cao, Luttrell et al. 2000).

Une autre inconnue concerne l'identité de la métalloprotéase impliquée dans la transactivation. Une identification qui s'avère difficile étant donné la quantité de métalloprotéases existantes et le nombre limité d'outils permettant leur élimination sélective à disposition. Nous avons néanmoins pu éliminer l'implication de MMP 9 et dévoilé MMP 3 comme un bon candidat potentiel (figure 20). Étant donné les limites de la très grande majorité des inhibiteurs de métalloprotéases en termes de sélectivité, la confirmation de l'identité de la métalloprotéase nécessitera vraisemblablement une approche génétique par petits ARNs interférents pour inhiber complètement et sélectivement une métalloprotéase donnée, la priorité étant donnée à MMP 3. Un élément intéressant qui s'est dégagé de cette étude est le rôle inhibiteur de MMP 2 sur l'activation d'ERK en réponse à l'AVP (figure 20). Un tel effet implique probablement le fait que

MMP 2 dégrade l'un des composants de la voie de transactivation. Étant donné la localisation membranaire ou extracellulaire des métalloprotéases, il serait tentant de penser qu'il s'agirait donc soit de l'un des récepteurs, soit du facteur relargué pour activer IGF1R, soit de la métalloprotéase permettant le relargage du ligand. Cependant, MMP 2 présente la particularité de pouvoir être adressée au cytosol et y exercer ses fonctions protéolytiques, élargissant le spectre des possibilités (Ali, Chow et al. 2012). Il est à noter que bien que l'on parle généralement d'une seule métalloprotéase tout au long de ce mémoire à des fins de simplicité d'écriture, rien n'exclut que plus d'une métalloprotéase soit impliquée pour permettre l'activation d'ERK induite par l'AVP.

La dernière inconnue concerne l'identité du facteur relargué permettant l'activation d'IGF1R. Alors que les seuls ligands connus d'IGF1R sont IGF1, IGF2 et insuline, l'implication de l'insuline a été éliminée en raison de l'absence d'activation d'ERK dans nos cellules en réponse à l'insuline (Oligny-Longpre, Corbani et al. 2012), tandis que l'IGF1 et l'IGF2 ont été écartés en l'absence d'effet de leurs anticorps neutralisants sur l'activation d'ERK par l'AVP (figure 21). À moins d'une action directe de la métalloprotéase sur l'IGF1R dont le clivage d'un domaine extracellulaire induirait l'activation, à l'instar des récepteurs de type *proteinase activated receptors* (PAR) de la famille des RCPGs (Macfarlane, Seatter et al. 2001), ces résultats impliquent que l'activation d'IGF1R intervient par l'intermédiaire d'un ligand encore non identifié d'IG1R. Une telle conclusion n'étonne que modérément si l'on considère le caractère relativement atypique de la signalisation induite par l'IGF1R lorsqu'elle résulte de la transactivation par V2R, par rapport à la signalisation en réponse à l'IGF1/2. En effet, en plus de l'absence d'activation d'Akt (qui certes peut s'expliquer par des voies d'inhibition concomitantes tel que discuté plus haut), Charest et al. ont montré que l'activation d'ERK par l'IGF1R en réponse à l'AVP est insensible à l'inhibition de Gi par la toxine pertussique (PTX), ainsi qu'à l'inhibition du dimère $\beta\gamma$ (Charest, Oligny-Longpre et al. 2007). Il a pourtant été mis en évidence que l'activation d'ERK en aval d'IGF1R en réponse aux IGFs requiert le dimère $\beta\gamma$ issu de l'hétérotrimère Gi, et est par conséquent sensible aussi bien à la PTX, qu'à l'inhibition de $\beta\gamma$ (Luttrell, van Biesen et al. 1995). Bien que cette différence signalétique pourrait s'expliquer par des niveaux d'expression particulièrement élevés d'IGF1R causant la perte de la sensibilité à la PTX

(Luttrell, van Biesen et al. 1995) dans nos cellules, la signalisation en aval d'IGF1R dépendant de V2R diverge possiblement de celle qu'induisent ses agonistes classiques. L'idée qu'il existe d'autres ligands capables d'activer l'IGF1R d'une manière différente n'est d'ailleurs pas si subversive, comme le montre la découverte récente de la possibilité pour le peptide Il-37 de la cathélicidine humaine (qui ne semble pas exprimée dans nos cellules) d'agir comme un agoniste sur l'IGF1R, et d'activer la voie ERK sans activer Akt (Girmita, Zheng et al. 2012). Afin d'identifier ce ligand, une approche protéomique sera probablement nécessaire pour pouvoir caractériser le facteur relargué se retrouvant enrichi dans le milieu extracellulaire après stimulation par l'AVP.

5.6. Implications physiologiques et physiopathologiques

Les nouvelles connaissances obtenues sur ces voies de signalisation non canoniques de V2R peuvent s'inscrire dans les fonctions physiologiques et l'implication en physiopathologie de V2R. Sur le plan physiologique, l'inhibition de RhoA est requise pour dépolymériser l'actine afin de permettre la translocation de l'AQP2 à la membrane plasmique apicale des cellules principales des tubes collecteurs des reins (Klussmann, Tamma et al. 2001; Brown, Breton et al. 2009). Bien qu'elle puisse être obtenue par le biais de la PKA (Qiao, Huang et al. 2003; Dodge-Kafka, Langeberg et al. 2006), cette inhibition de RhoA pourrait également être obtenue par l'inhibition de $G\alpha_{12}$ par V2R. Cependant, encore une fois, le fait qu'il s'agisse d'une inhibition ou d'une activation n'est pour l'instant pas déterminé.

Sur le plan physiopathologique, le couplage de V2R à $G\alpha_{12}$ et la transactivation d'IGF1R pourraient contribuer à la formation des kystes dans la polykystose rénale autosomique dominante (ADPKD), maladie monogénique congénitale incurable dont la croissance anarchique de kystes rénaux mène à l'insuffisance rénale terminale (Wilson 2004). L'une des principales pistes thérapeutiques explorées pour lutter contre la prolifération des kystes consiste en l'inhibition de la signalisation induite par V2R à l'aide d'antagonistes de ce récepteur (Torres 2008; Torres, Chapman et al. 2012). Mis à part le potentiel démontré pour V2R de favoriser la prolifération cellulaire *in vivo* (Alonso, Galibert et al. 2009), l'efficacité relative de cette stratégie s'explique

vraisemblablement par deux éléments interconnectés dans les cellules affectées : le rôle de l'AMPC dans la prolifération et la croissance cellulaire des cellules kystiques, et celui de la voie ERK. En effet, dans les cellules possédant la mutation d'une des polycystines (à l'origine de la maladie), les taux réduits de calcium qui en résultent seraient responsables de l'augmentation de la prévalence de l'isoforme de 95 kD de B-Raf par rapport à l'isoforme de 62 kD, et ce ratio permettrait dans ce cas particulier un rôle activateur de l'AMPC sur la voie ERK via B-Raf, alors qu'une inhibition est au contraire observée lorsque l'abondance relative est inversée (Torres 2005). Par ailleurs, la voie ERK est anormalement activée dans les cellules kystiques et son blocage inhibe la croissance des kystes rénaux (Omori, Hida et al. 2006).

Par conséquent, l'effet potentialisateur de $G\alpha_{12}$ sur la production d'AMPC que nous avons observé en réponse à l'AVP pourrait contribuer à la croissance des kystes de l'ADPKD. $G\alpha_{12}$ pourrait ainsi représenter une cible thérapeutique alternative contre la croissance kystique. Inhiber sélectivement l'action de $G\alpha_{12}$ en aval de V2R sur la production d'AMPC en réponse à l'AVP présenterait l'avantage de ne pas bloquer excessivement la production d'AMPC tel qu'il pourrait en résulter d'un traitement par un antagoniste de V2R (avec en conséquence un effet délétère sur la fonction antidiurétique). Cependant, une telle approche nécessite non seulement la confirmation de la pertinence physiologique du rôle de $G\alpha_{12}$ dans cette voie (essais dans des cellules primaires de rein, évaluation de l'effet de l'inhibition de $G\alpha_{12}$ endogène sur la voie AMPC en réponse à l'AVP), mais également une meilleure compréhension du mécanisme par lequel cette modulation intervient.

Par ailleurs, étant donné l'importance de la voie ERK dans la prolifération des kystes et le rôle majeur de la transactivation d'IGF1R par V2R dans cette voie, l'identification de la métalloprotéase impliquée et/ou du facteur relargué activant l'IGF1R pourrait également permettre une approche thérapeutique plus ciblée visant à inhiber sélectivement la voie ERK en aval de V2R, sans affecter la signalisation responsable de la translocation des AQP2s, indispensable à l'homéostasie hydrosodique. Une approche centrée sur la transactivation paraît d'autant plus pertinente que certains travaux ont montré que l'IGF1R était la source d'un effet mitogénique considérablement

accru dans les cellules kystiques par rapport aux cellules normales, un effet impliquant l'activation d'ERK (Parker, Newby et al. 2007).

6. Conclusion et perspectives

Les travaux réalisés dans le cadre de ce projet de maîtrise ont permis d'explorer deux voies de signalisation non-canoniques du récepteur V2R de la vasopressine. Nous avons démontré la possibilité pour V2R d'interagir avec la sous-unité $G\alpha_{12}$ et la modulation de cette interaction par l'AVP. Par ailleurs, la modulation de la conformation de l'hétérotrimère G12 en réponse à l'AVP suggère une modulation de son activité. L'impact contraire de la stimulation du récepteur $TP\alpha$ connu pour activer $G\alpha_{12}$ sur les mesures par BRET de l'interaction de $G\alpha_{12}$ avec ses partenaires RhoA et p115-RGS, ainsi que sur l'interaction entre $G\alpha_{12}$ et $G\gamma_1$ laisse supposer qu'il s'agirait plutôt d'une inhibition de l'activité basale constitutive de $G\alpha_{12}$. Afin de pouvoir conclure sur ce plan, il serait important de réaliser une évaluation directe de la modulation de l'activité de $G\alpha_{12}$ par V2R, par des techniques telles qu'un essai de liaison au $[35S]GTP\gamma S$. À titre complémentaire, vérifier l'impact de l'AVP sur la voie RhoA pourrait aussi s'avérer intéressant. Le rôle dévoilé de $G\alpha_{12}$ dans l'amplification de la production d'AMPC dépendant de $G\alpha_s$ en aval de V2R fait écho aux travaux de l'équipe du Dr Sternweis démontrant un effet synergique similaire entre $G\alpha_s$ et $G\alpha_{12}$ (Jiang, Collins et al. 2008). Cette expérience ayant impliqué la surexpression de $G\alpha_{12}$, il serait judicieux de vérifier la pertinence physiologique de cet effet, notamment en vérifiant l'impact de l'inhibition de niveaux endogènes de $G\alpha_{12}$ sur la production d'AMPC en réponse à l'AVP.

Après avoir confirmé la conservation des principales caractéristiques du mode de transactivation d'IGF1R par V2R dans nos cellules, à l'exception de l'autophosphorylation du récepteur en réponse à l'AVP, le caractère nettement prédominant du mode d'activation d'ERK par transactivation quel que soit la durée de stimulation a été établi. La validité du modèle selon lequel l'élément initiateur de cette voie serait l'activation de Src par V2R a également été renforcée, bien que la façon dont Src est activé par V2R reste à déterminer. Étant donné l'implication potentielle de $G\alpha_{12}$ dans ce cadre, tester l'effet de l'inhibition de son expression par siARNs pourrait se révéler utile, une hypothétique interaction directe de Src avec le récepteur se révélant plus difficile à tester et nécessitant des méthodes de détection d'interactions directes telles que

le GST pull-down (Cao, Luttrell et al. 2000). Enfin, si la métalloprotéase et le facteur d'activation d'IGF1R impliqués dans la transactivation n'ont pu être identifiés, les travaux réalisés ont néanmoins permis d'écarter un rôle activateur de MMP 2 et MMP 9, et de désigner MMP 3 comme un candidat intéressant, en plus d'exclure un relargage d'IGF1 et/ou IGF2 comme cause de l'activation d'IGF1R. Ces résultats exposent la nécessité d'employer une approche plus sélective telle que l'inhibition de l'expression par siARN pour déterminer l'identité de la métalloprotéase en testant prioritairement MMP 3, et justifient une approche protéomique future pour isoler le facteur activant l'IGF1R. Sachant que le transfert de surnageant de cellules stimulées par l'AVP et exprimant V2R sur les cellules n'exprimant qu'IGF1R induit l'activation d'ERK en raison de la présence dans le surnageant du facteur activant l'IGF1R, il peut être utile au préalable de s'assurer qu'il ne s'agit pas simplement du clivage direct d'IGF1R par une métalloprotéase (comparable au mode d'activation des récepteurs PAR) en vérifiant que le traitement des cellules dépourvues de V2R par marimastat ou phénanthroline avant le transfert n'inhibe pas l'activation d'ERK. Par ailleurs, l'étonnante contribution inhibitrice de MMP 2 à la voie d'activation d'ERK par V2R mérite d'être explorée pour mieux comprendre les mécanismes déterminant la modulation des MAPKs par transactivation induite par V2R.

À plus long terme, il sera important de valider la pertinence physiologique de ces travaux, notamment en testant l'hypothèse d'un couplage avec $G\alpha_{12}$ dans des cellules épithéliales primaires de rein, et par des méthodes alternatives au BRET de manière à confirmer sur des protéines endogènes les événements observés. Étant donné la variabilité des niveaux d'expression des interacteurs et de leurs effets en fonction du type cellulaire, il sera également nécessaire de confirmer l'identité de la métalloprotéase et du facteur d'activation dans des cellules primaires de tube contourné rénal ou chez l'animal. Toutefois, la confirmation chez le rat du mode de transactivation impliquant une métalloprotéase et IGF1R (Oligny-Longpre, Corbani et al. 2012) témoigne d'une certaine fiabilité de l'étude du mécanisme dans les HEK293.

Ce projet expose donc de nouvelles avenues concernant la signalisation dépendante de V2R, sous la forme de deux voies non-canoniques qui pourraient

converger vers une implication commune dans des processus pathologiques tels que la polykystose rénale autosomique dominante. Bien que beaucoup de travail reste à effectuer, ces travaux mettent en lumière la richesse et la complexité des modes de signalisation pouvant être associés à un même RCPG, et l'importance de continuer à explorer de possibles nouvelles voies en aval des récepteurs à sept segments transmembranaires, y compris les plus étudiés.

7. Bibliographie

- Ali, M. A., A. K. Chow, et al. (2012). "Mechanisms of cytosolic targeting of matrix metalloproteinase-2." J Cell Physiol 227(10): 3397-3404.
- Alonso, G., E. Galibert, et al. (2009). "Sustained elevated levels of circulating vasopressin selectively stimulate the proliferation of kidney tubular cells via the activation of V2 receptors." Endocrinology 150(1): 239-250.
- Angers, S., A. Salahpour, et al. (2000). "Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET)." Proc Natl Acad Sci U S A 97(7): 3684-3689.
- Ashmun, R. A. and A. T. Look (1990). "Metalloprotease activity of CD13/aminopeptidase N on the surface of human myeloid cells." Blood 75(2): 462-469.
- Audet, M. and M. Bouvier (2012). "Restructuring G-protein- coupled receptor activation." Cell 151(1): 14-23.
- Baillie, G. S., A. Sood, et al. (2003). "beta-Arrestin-mediated PDE4 cAMP phosphodiesterase recruitment regulates beta-adrenoceptor switching from Gs to Gi." Proc Natl Acad Sci U S A 100(3): 940-945.
- Baker, A. H., D. R. Edwards, et al. (2002). "Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities." J Cell Sci 115(Pt 19): 3719-3727.
- Bankir, L., D. G. Bichet, et al. (2010). "Vasopressin V2 receptors, ENaC, and sodium reabsorption: a risk factor for hypertension?" Am J Physiol Renal Physiol 299(5): F917-928.
- Bankir, L., S. Fernandes, et al. (2005). "Vasopressin-V2 receptor stimulation reduces sodium excretion in healthy humans." J Am Soc Nephrol 16(7): 1920-1928.
- Baserga, R. (2000). "The contradictions of the insulin-like growth factor 1 receptor." Oncogene 19(49): 5574-5581.
- Baserga, R., A. Hongo, et al. (1997). "The IGF-I receptor in cell growth, transformation and apoptosis." Biochim Biophys Acta 1332(3): F105-126.
- Bertram, H., S. Boeuf, et al. (2009). "Matrix metalloprotease inhibitors suppress initiation and progression of chondrogenic differentiation of mesenchymal stromal cells in vitro." Stem Cells Dev 18(6): 881-892.
- Birnbaumer, M. (2000). "Vasopressin receptors." Trends Endocrinol Metab 11(10): 406-410.
- Biscardi, J. S., M. C. Maa, et al. (1999). "c-Src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on Tyr845 and Tyr1101 is associated with modulation of receptor function." J Biol Chem 274(12): 8335-8343.
- Booden, M. A., D. P. Siderovski, et al. (2002). "Leukemia-associated Rho guanine nucleotide exchange factor promotes G alpha q-coupled activation of RhoA." Mol Cell Biol 22(12): 4053-4061.
- Bourne, H. R., D. A. Sanders, et al. (1990). "The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions." Nature 348(6297): 125-132.
- Boute, N., R. Jockers, et al. (2002). "The use of resonance energy transfer in high-throughput screening: BRET versus FRET." Trends Pharmacol Sci 23(8): 351-354.

- Breton, B., E. Sauvageau, et al. (2010). "Multiplexing of multicolor bioluminescence resonance energy transfer." *Biophys J* 99(12): 4037-4046.
- Brown, D., S. Breton, et al. (2009). "Sensing, signaling and sorting events in kidney epithelial cell physiology." *Traffic* 10(3): 275-284.
- Cabrera-Vera, T. M., J. Vanhauwe, et al. (2003). "Insights into G protein structure, function, and regulation." *Endocr Rev* 24(6): 765-781.
- Cao, W., L. M. Luttrell, et al. (2000). "Direct binding of activated c-Src to the beta 3-adrenergic receptor is required for MAP kinase activation." *J Biol Chem* 275(49): 38131-38134.
- Carman, C. V., J. L. Parent, et al. (1999). "Selective regulation of Galpha(q/11) by an RGS domain in the G protein-coupled receptor kinase, GRK2." *J Biol Chem* 274(48): 34483-34492.
- Charest, P. G. and M. Bouvier (2003). "Palmitoylation of the V2 vasopressin receptor carboxyl tail enhances beta-arrestin recruitment leading to efficient receptor endocytosis and ERK1/2 activation." *J Biol Chem* 278(42): 41541-41551.
- Charest, P. G., G. Oligny-Longpre, et al. (2007). "The V2 vasopressin receptor stimulates ERK1/2 activity independently of heterotrimeric G protein signalling." *Cell Signal* 19(1): 32-41.
- Chen, Q., N. Olashaw, et al. (1995). "Participation of reactive oxygen species in the lysophosphatidic acid-stimulated mitogen-activated protein kinase activation pathway." *J Biol Chem* 270(48): 28499-28502.
- Cheng, J. and J. Du (2007). "Mechanical stretch simulates proliferation of venous smooth muscle cells through activation of the insulin-like growth factor-1 receptor." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27(8): 1744-1751.
- Chow, J. C., G. Condorelli, et al. (1998). "Insulin-like growth factor-I receptor internalization regulates signaling via the Shc/mitogen-activated protein kinase pathway, but not the insulin receptor substrate-1 pathway." *J Biol Chem* 273(8): 4672-4680.
- Christensen, B. M., M. Zelenina, et al. (2000). "Localization and regulation of PKA-phosphorylated AQP2 in response to V(2)-receptor agonist/antagonist treatment." *Am J Physiol Renal Physiol* 278(1): F29-42.
- Cismowski, M. J., A. Takesono, et al. (2001). "Receptor-independent activators of heterotrimeric G-proteins." *Life Sci* 68(19-20): 2301-2308.
- Cortes-Reynosa, P., T. Robledo, et al. (2008). "Src kinase regulates metalloproteinase-9 secretion induced by type IV collagen in MCF-7 human breast cancer cells." *Matrix Biol* 27(3): 220-231.
- Crossthwaite, A. J., A. Ciruela, et al. (2006). "A direct interaction between the N terminus of adenylyl cyclase AC8 and the catalytic subunit of protein phosphatase 2A." *Mol Pharmacol* 69(2): 608-617.
- 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.
- Daub, H., F. U. Weiss, et al. (1996). "Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors." *Nature* 379(6565): 557-560.
- Delafontaine, P., A. Anwar, et al. (1996). "G-protein coupled and tyrosine kinase receptors: evidence that activation of the insulin-like growth factor I receptor is required for thrombin-induced mitogenesis of rat aortic smooth muscle cells." *J Clin Invest* 97(1): 139-145.
- Delcourt, N., J. Bockaert, et al. (2007). "GPCR-jacking: from a new route in RTK signalling to a new concept in GPCR activation." *Trends Pharmacol Sci* 28(12): 602-607.

- DeWire, S. M., S. Ahn, et al. (2007). "Beta-arrestins and cell signaling." Annu Rev Physiol 69: 483-510.
- Dodge-Kafka, K. L., A. Bauman, et al. (2010). "cAMP-stimulated protein phosphatase 2A activity associated with muscle A kinase-anchoring protein (mAKAP) signaling complexes inhibits the phosphorylation and activity of the cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D3." J Biol Chem 285(15): 11078-11086.
- Dodge-Kafka, K. L., L. Langeberg, et al. (2006). "Compartmentation of cyclic nucleotide signaling in the heart: the role of A-kinase anchoring proteins." Circ Res 98(8): 993-1001.
- Dorman, G., S. Cseh, et al. (2010). "Matrix metalloproteinase inhibitors: a critical appraisal of design principles and proposed therapeutic utility." Drugs 70(8): 949-964.
- Duffy, M. J., M. Mullooly, et al. (2011). "The ADAMs family of proteases: new biomarkers and therapeutic targets for cancer?" Clin Proteomics 8(1): 9.
- Dupont, J., A. Pierre, et al. (2003). "The insulin-like growth factor axis in cell cycle progression." Horm Metab Res 35(11-12): 740-750.
- Ecelbarger, C. A., C. L. Chou, et al. (1996). "Evidence for dual signaling pathways for V2 vasopressin receptor in rat inner medullary collecting duct." Am J Physiol 270(4 Pt 2): F623-633.
- Edwards, D. R., M. M. Handsley, et al. (2008). "The ADAM metalloproteinases." Mol Aspects Med 29(5): 258-289.
- Eglen, R. M., T. Reisine, et al. (2008). "The use of AlphaScreen technology in HTS: current status." Curr Chem Genomics 1: 2-10.
- El-Shewy, H. M., M. H. Lee, et al. (2007). "The insulin-like growth factor type 1 and insulin-like growth factor type 2/mannose-6-phosphate receptors independently regulate ERK1/2 activity in HEK293 cells." J Biol Chem 282(36): 26150-26157.
- Evanko, D. S., M. M. Thiyagarajan, et al. (2000). "Interaction with Gbetagamma is required for membrane targeting and palmitoylation of Galpha(s) and Galpha(q)." J Biol Chem 275(2): 1327-1336.
- Fernandez, A. M. and I. Torres-Aleman (2012). "The many faces of insulin-like peptide signalling in the brain." Nat Rev Neurosci 13(4): 225-239.
- Fisher, J. F. and S. Mobashery (2006). "Recent advances in MMP inhibitor design." Cancer Metastasis Rev 25(1): 115-136.
- Fowlkes, J. L., K. M. Thrailkill, et al. (1995). "Matrix metalloproteinases as insulin-like growth factor binding protein-degrading proteinases." Prog Growth Factor Res 6(2-4): 255-263.
- Fromm, C., O. A. Coso, et al. (1997). "The small GTP-binding protein Rho links G protein-coupled receptors and Galpha12 to the serum response element and to cellular transformation." Proc Natl Acad Sci U S A 94(19): 10098-10103.
- Gales, C., J. J. Van Durm, et al. (2006). "Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes." Nat Struct Mol Biol 13(9): 778-786.
- Gibson, J. M., J. D. Aplin, et al. (2001). "Regulation of IGF bioavailability in pregnancy." Mol Hum Reprod 7(1): 79-87.
- Gilman, A. G. (1987). "G proteins: transducers of receptor-generated signals." Annu Rev Biochem 56: 615-649.
- Girnit, A., H. Zheng, et al. (2012). "Identification of the cathelicidin peptide LL-37 as agonist for the type I insulin-like growth factor receptor." Oncogene 31(3): 352-365.

- Girnita, L., A. Girnita, et al. (2003). "Mdm2-dependent ubiquitination and degradation of the insulin-like growth factor 1 receptor." Proc Natl Acad Sci U S A 100(14): 8247-8252.
- Girnita, L., S. K. Shenoy, et al. (2005). "{beta}-Arrestin is crucial for ubiquitination and down-regulation of the insulin-like growth factor-1 receptor by acting as adaptor for the MDM2 E3 ligase." J Biol Chem 280(26): 24412-24419.
- Girnita, L., S. K. Shenoy, et al. (2007). "Beta-arrestin and Mdm2 mediate IGF-1 receptor-stimulated ERK activation and cell cycle progression." J Biol Chem 282(15): 11329-11338.
- Goupil, E., D. Tassy, et al. (2010). "A novel biased allosteric compound inhibitor of parturition selectively impedes the prostaglandin F2alpha-mediated Rho/ROCK signaling pathway." J Biol Chem 285(33): 25624-25636.
- Gourmelen, M., Y. Le Bouc, et al. (1984). "Serum levels of insulin-like growth factor (IGF) and IGF binding protein in constitutionally tall children and adolescents." J Clin Endocrinol Metab 59(6): 1197-1203.
- Hamdan, F. F., Y. Percherancier, et al. (2006). "Monitoring protein-protein interactions in living cells by bioluminescence resonance energy transfer (BRET)." Curr Protoc Neurosci Chapter 5: Unit 5 23.
- Hamm, H. E. and A. Gilchrist (1996). "Heterotrimeric G proteins." Curr Opin Cell Biol 8(2): 189-196.
- Han, S., A. S. Arvai, et al. (2001). "Crystal structure and novel recognition motif of rho ADP-ribosylating C3 exoenzyme from Clostridium botulinum: structural insights for recognition specificity and catalysis." J Mol Biol 305(1): 95-107.
- Harrison, C. and J. R. Traynor (2003). "The [35S]GTPgammaS binding assay: approaches and applications in pharmacology." Life Sci 74(4): 489-508.
- Hepler, J. R. and A. G. Gilman (1992). "G proteins." Trends Biochem Sci 17(10): 383-387.
- Holinstat, M., D. Mehta, et al. (2003). "Protein kinase Calpha-induced p115RhoGEF phosphorylation signals endothelial cytoskeletal rearrangement." J Biol Chem 278(31): 28793-28798.
- Hsia, J. A., J. Moss, et al. (1984). "ADP-ribosylation of adenylate cyclase by pertussis toxin. Effects on inhibitory agonist binding." J Biol Chem 259(2): 1086-1090.
- Huang, L., Y. G. Shanker, et al. (1999). "Ggamma13 colocalizes with gustducin in taste receptor cells and mediates IP3 responses to bitter denatonium." Nat Neurosci 2(12): 1055-1062.
- Hupfeld, C. J. and J. M. Olefsky (2007). "Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by GRKs and beta-arrestins." Annu Rev Physiol 69: 561-577.
- Inouye, S. and O. Shimomura (1997). "The use of Renilla luciferase, Oplophorus luciferase, and apoaequorin as bioluminescent reporter protein in the presence of coelenterazine analogues as substrate." Biochem Biophys Res Commun 233(2): 349-353.
- Jiang, L. I., J. Collins, et al. (2008). "Regulation of cAMP responses by the G12/13 pathway converges on adenylyl cyclase VII." J Biol Chem 283(34): 23429-23439.
- Jiang, L. I., J. Collins, et al. (2007). "Use of a cAMP BRET sensor to characterize a novel regulation of cAMP by the sphingosine 1-phosphate/G13 pathway." J Biol Chem 282(14): 10576-10584.
- Jiang, L. I., J. E. Wang, et al. (2013). "Regions on adenylyl cyclase VII required for selective regulation by the G13 pathway." Mol Pharmacol 83(3): 587-593.
- Jones, M. B., D. P. Siderovski, et al. (2004). "The G betagamma dimer as a novel source of selectivity in G-protein signaling: GGL-ing at convention." Mol Interv 4(4): 200-214.

- Kalmes, A., G. Daum, et al. (2001). "EGFR transactivation in the regulation of SMC function." Ann N Y Acad Sci 947: 42-54; discussion 54-45.
- Kato, H., T. N. Faria, et al. (1994). "Essential role of tyrosine residues 1131, 1135, and 1136 of the insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor in IGF-I action." Mol Endocrinol 8(1): 40-50.
- Kelly, P., P. J. Casey, et al. (2007). "Biologic functions of the G12 subfamily of heterotrimeric G proteins: growth, migration, and metastasis." Biochemistry 46(23): 6677-6687.
- Klussmann, E., G. Tamma, et al. (2001). "An inhibitory role of Rho in the vasopressin-mediated translocation of aquaporin-2 into cell membranes of renal principal cells." J Biol Chem 276(23): 20451-20457.
- Kobilka, B. K., R. A. Dixon, et al. (1987). "cDNA for the human beta 2-adrenergic receptor: a protein with multiple membrane-spanning domains and encoded by a gene whose chromosomal location is shared with that of the receptor for platelet-derived growth factor." Proc Natl Acad Sci U S A 84(1): 46-50.
- Kohout, T. A. and R. J. Lefkowitz (2003). "Regulation of G protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization." Mol Pharmacol 63(1): 9-18.
- Koshimizu, T. A., K. Nakamura, et al. (2012). "Vasopressin V1a and V1b receptors: from molecules to physiological systems." Physiol Rev 92(4): 1813-1864.
- Kozasa, T., X. Jiang, et al. (1998). "p115 RhoGEF, a GTPase activating protein for G α 12 and G α 13." Science 280(5372): 2109-2111.
- Kroeze, W. K., D. J. Sheffler, et al. (2003). "G-protein-coupled receptors at a glance." J Cell Sci 116(Pt 24): 4867-4869.
- 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(30): 23120-23126.
- Lefkowitz, R. J. and S. K. Shenoy (2005). "Transduction of receptor signals by beta-arrestins." Science 308(5721): 512-517.
- Lemjabbar-Alaoui, H., S. S. Sidhu, et al. (2011). "TACE/ADAM-17 phosphorylation by PKC-epsilon mediates premalignant changes in tobacco smoke-exposed lung cells." PLoS One 6(3): e17489.
- Levitzki, A. and E. Mishani (2006). "Tyrosine kinase inhibitors." Annu Rev Biochem 75: 93-109.
- Li, R., A. Pourpak, et al. (2009). "Inhibition of the insulin-like growth factor-1 receptor (IGF1R) tyrosine kinase as a novel cancer therapy approach." J Med Chem 52(16): 4981-5004.
- Li, Z., X. Dong, et al. (2005). "Regulation of PTEN by Rho small GTPases." Nat Cell Biol 7(4): 399-404.
- 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): 31640-31643.
- Loening, A. M., T. D. Fenn, et al. (2006). "Consensus guided mutagenesis of Renilla luciferase yields enhanced stability and light output." Protein Eng Des Sel 19(9): 391-400.
- Lucchesi, P. A., A. Sabri, et al. (2004). "Involvement of metalloproteinases 2/9 in epidermal growth factor receptor transactivation in pressure-induced myogenic tone in mouse mesenteric resistance arteries." Circulation 110(23): 3587-3593.
- Luttrell, L. M., S. S. Ferguson, et al. (1999). "Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes." Science 283(5402): 655-661.

- Luttrell, L. M., T. van Biesen, et al. (1995). "G beta gamma subunits mediate mitogen-activated protein kinase activation by the tyrosine kinase insulin-like growth factor 1 receptor." J Biol Chem 270(28): 16495-16498.
- Lutz, S., A. Freichel-Blomquist, et al. (2005). "The guanine nucleotide exchange factor p63RhoGEF, a specific link between Gq/11-coupled receptor signaling and RhoA." J Biol Chem 280(12): 11134-11139.
- Ma, X., Y. Zhao, et al. (2012). "Acute activation of beta2-adrenergic receptor regulates focal adhesions through betaArrestin2- and p115RhoGEF protein-mediated activation of RhoA." J Biol Chem 287(23): 18925-18936.
- Ma, Y. C. and X. Y. Huang (2002). "Novel regulation and function of Src tyrosine kinase." Cell Mol Life Sci 59(3): 456-462.
- Macfarlane, S. R., M. J. Seatter, et al. (2001). "Proteinase-activated receptors." Pharmacol Rev 53(2): 245-282.
- Marques, S. A., L. C. Dy, et al. (2002). "The platelet-activating factor receptor activates the extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and induces proliferation of epidermal cells through an epidermal growth factor-receptor-dependent pathway." J Pharmacol Exp Ther 300(3): 1026-1035.
- Mercier, J. F., A. Salahpour, et al. (2002). "Quantitative assessment of beta 1- and beta 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer." J Biol Chem 277(47): 44925-44931.
- Meyer, T. N., J. Hunt, et al. (2003). "Galpha12 regulates epithelial cell junctions through Src tyrosine kinases." Am J Physiol Cell Physiol 285(5): C1281-1293.
- Miller, W. E., S. Maudsley, et al. (2000). "beta-arrestin1 interacts with the catalytic domain of the tyrosine kinase c-SRC. Role of beta-arrestin1-dependent targeting of c-SRC in receptor endocytosis." J Biol Chem 275(15): 11312-11319.
- Milligan, G. and E. Kostenis (2006). "Heterotrimeric G-proteins: a short history." Br J Pharmacol 147 Suppl 1: S46-55.
- Milligan, G., C. G. Unson, et al. (1989). "Cholera toxin treatment produces down-regulation of the alpha-subunit of the stimulatory guanine-nucleotide-binding protein (Gs)." Biochem J 262(2): 643-649.
- Mirshahi, T., V. Mittal, et al. (2002). "Distinct sites on G protein beta gamma subunits regulate different effector functions." J Biol Chem 277(39): 36345-36350.
- Mohan, S., G. R. Thompson, et al. (2002). "ADAM-9 is an insulin-like growth factor binding protein-5 protease produced and secreted by human osteoblasts." Biochemistry 41(51): 15394-15403.
- Mondorf, U. F., H. Geiger, et al. (2000). "Involvement of the platelet-derived growth factor receptor in angiotensin II-induced activation of extracellular regulated kinases 1 and 2 in human mesangial cells." FEBS Lett 472(1): 129-132.
- Morrione, A., B. Valentinis, et al. (1997). "Insulin-like growth factor II stimulates cell proliferation through the insulin receptor." Proc Natl Acad Sci U S A 94(8): 3777-3782.
- Nagareddy, P. R., F. L. Chow, et al. (2009). "Maintenance of adrenergic vascular tone by MMP transactivation of the EGFR requires PI3K and mitochondrial ATP synthesis." Cardiovasc Res 84(3): 368-377.
- Nagase, H., R. Visse, et al. (2006). "Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs." Cardiovasc Res 69(3): 562-573.
- Nyalendo, C., M. Michaud, et al. (2007). "Src-dependent phosphorylation of membrane type I matrix metalloproteinase on cytoplasmic tyrosine 573: role in endothelial and tumor cell migration." J Biol Chem 282(21): 15690-15699.

- 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): 32248-32257.
- Offermanns, S., K. L. Laugwitz, et al. (1994). "G proteins of the G12 family are activated via thromboxane A2 and thrombin receptors in human platelets." Proc Natl Acad Sci U S A 91(2): 504-508.
- Ohtsu, H., P. J. Dempsey, et al. (2006). "ADAMs as mediators of EGF receptor transactivation by G protein-coupled receptors." Am J Physiol Cell Physiol 291(1): C1-10.
- Oligny-Longpre, G., M. Corbani, et al. (2012). "Engagement of beta-arrestin by transactivated insulin-like growth factor receptor is needed for V2 vasopressin receptor-stimulated ERK1/2 activation." Proc Natl Acad Sci U S A 109(17): E1028-1037.
- Omori, S., M. Hida, et al. (2006). "Extracellular signal-regulated kinase inhibition slows disease progression in mice with polycystic kidney disease." J Am Soc Nephrol 17(6): 1604-1614.
- Ostman, A. and F. D. Bohmer (2001). "Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatases." Trends Cell Biol 11(6): 258-266.
- Ostrowski, N. L., S. J. Lolait, et al. (1992). "Distribution of V1a and V2 vasopressin receptor messenger ribonucleic acids in rat liver, kidney, pituitary and brain." Endocrinology 131(1): 533-535.
- Ostrowski, N. L., W. S. Young, 3rd, et al. (1993). "Expression of vasopressin V1a and V2 receptor messenger ribonucleic acid in the liver and kidney of embryonic, developing, and adult rats." Endocrinology 133(4): 1849-1859.
- Parker, E., L. J. Newby, et al. (2007). "Hyperproliferation of PKD1 cystic cells is induced by insulin-like growth factor-1 activation of the Ras/Raf signalling system." Kidney Int 72(2): 157-165.
- Parrizas, M., A. Gazit, et al. (1997). "Specific inhibition of insulin-like growth factor-1 and insulin receptor tyrosine kinase activity and biological function by tyrphostins." Endocrinology 138(4): 1427-1433.
- Pavlov, T. S., D. V. Ilatovskaya, et al. (2013). "Regulation of ENaC in mice lacking renal insulin receptors in the collecting duct." FASEB J 27(7): 2723-2732.
- 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): 34531-34534.
- Pollak, M. N., E. S. Schernhammer, et al. (2004). "Insulin-like growth factors and neoplasia." Nat Rev Cancer 4(7): 505-518.
- Poon, L. S., A. S. Chan, et al. (2009). "Gbeta3 forms distinct dimers with specific Ggamma subunits and preferentially activates the beta3 isoform of phospholipase C." Cell Signal 21(5): 737-744.
- Porter, S., I. M. Clark, et al. (2005). "The ADAMTS metalloproteinases." Biochem J 386(Pt 1): 15-27.
- Povsic, T. J., T. A. Kohout, et al. (2003). "Beta-arrestin1 mediates insulin-like growth factor 1 (IGF-1) activation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and anti-apoptosis." J Biol Chem 278(51): 51334-51339.
- Prenzel, N., E. Zwick, et al. (1999). "EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF." Nature 402(6764): 884-888.
- Qiao, J., F. Huang, et al. (2003). "PKA inhibits RhoA activation: a protection mechanism against endothelial barrier dysfunction." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 284(6): L972-980.

- Ra, H. J. and W. C. Parks (2007). "Control of matrix metalloproteinase catalytic activity." Matrix Biol 26(8): 587-596.
- Rasmussen, S. G., B. T. DeVree, et al. (2011). "Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor-Gs protein complex." Nature 477(7366): 549-555.
- Ren, X. R., E. Reiter, et al. (2005). "Different G protein-coupled receptor kinases govern G protein and beta-arrestin-mediated signaling of V2 vasopressin receptor." Proc Natl Acad Sci U S A 102(5): 1448-1453.
- Resjo, S., A. Oknianska, et al. (1999). "Phosphorylation and activation of phosphodiesterase type 3B (PDE3B) in adipocytes in response to serine/threonine phosphatase inhibitors: deactivation of PDE3B in vitro by protein phosphatase type 2A." Biochem J 341 (Pt 3): 839-845.
- Ribas, C., P. Penela, et al. (2007). "The G protein-coupled receptor kinase (GRK) interactome: role of GRKs in GPCR regulation and signaling." Biochim Biophys Acta 1768(4): 913-922.
- Riedemann, J. and V. M. Macaulay (2006). "IGF1R signalling and its inhibition." Endocr Relat Cancer 13 Suppl 1: S33-43.
- Robinson, D. R., Y. M. Wu, et al. (2000). "The protein tyrosine kinase family of the human genome." Oncogene 19(49): 5548-5557.
- Rorive, S., A. Berton, et al. (2008). "Matrix metalloproteinase-9 interplays with the IGFBP2-IGFII complex to promote cell growth and motility in astrocytomas." Glia 56(15): 1679-1690.
- Roudabush, F. L., K. L. Pierce, et al. (2000). "Transactivation of the EGF receptor mediates IGF-1-stimulated shc phosphorylation and ERK1/2 activation in COS-7 cells." J Biol Chem 275(29): 22583-22589.
- Sariahmetoglu, M., B. D. Crawford, et al. (2007). "Regulation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) activity by phosphorylation." FASEB J 21(10): 2486-2495.
- Schwindinger, W. F. and J. D. Robishaw (2001). "Heterotrimeric G-protein betagamma-dimers in growth and differentiation." Oncogene 20(13): 1653-1660.
- Seals, D. F. and S. A. Courtneidge (2003). "The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions." Genes Dev 17(1): 7-30.
- Sehat, B., S. Andersson, et al. (2008). "Identification of c-Cbl as a new ligase for insulin-like growth factor-I receptor with distinct roles from Mdm2 in receptor ubiquitination and endocytosis." Cancer Res 68(14): 5669-5677.
- Sehat, B., S. Andersson, et al. (2007). "Role of ubiquitination in IGF-1 receptor signaling and degradation." PLoS One 2(4): e340.
- Shah, B. H. (1997). "Enhanced degradation of stimulatory G-protein (Gs alpha) by cholera toxin is mediated by ADP-ribosylation of Gs alpha protein but not by increased cyclic AMP levels." Adv Exp Med Biol 419: 93-97.
- 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): 1261-1273.
- Shi, C. S. and J. H. Kehrl (2001). "PYK2 links G(q)alpha and G(13)alpha signaling to NF-kappa B activation." J Biol Chem 276(34): 31845-31850.
- Shi, C. S., S. Sinnarajah, et al. (2000). "G13alpha-mediated PYK2 activation. PYK2 is a mediator of G13alpha -induced serum response element-dependent transcription." J Biol Chem 275(32): 24470-24476.
- Shiomi, T., V. Lemaitre, et al. (2010). "Matrix metalloproteinases, a disintegrin and metalloproteinases, and a disintegrin and metalloproteinases with thrombospondin motifs in non-neoplastic diseases." Pathol Int 60(7): 477-496.

- Siderovski, D. P. and F. S. Willard (2005). "The GAPs, GEFs, and GDIs of heterotrimeric G-protein alpha subunits." Int J Biol Sci 1(2): 51-66.
- Siehler, S. (2008). "Cell-based assays in GPCR drug discovery." Biotechnol J 3(4): 471-483.
- Siehler, S. (2009). "Regulation of RhoGEF proteins by G12/13-coupled receptors." Br J Pharmacol 158(1): 41-49.
- Snider, A. C. and K. E. Meier (2007). "Receptor transactivation cascades. Focus on "Effects of alpha1D-adrenergic receptors on shedding of biologically active EGF in freshly isolated lacrimal gland epithelial cells". " Am J Physiol Cell Physiol 292(1): C1-3.
- Song, X., S. Coffa, et al. (2009). "How does arrestin assemble MAPKs into a signaling complex?" J Biol Chem 284(1): 685-695.
- Southwood, T. R., S. Khalaf, et al. (1975). "The micro-organisms of tsetse flies." Acta Trop 32(3): 259-266.
- Sundaresan, M., Z. X. Yu, et al. (1995). "Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction." Science 270(5234): 296-299.
- Tamma, G., E. Klussmann, et al. (2003). "cAMP-induced AQP2 translocation is associated with RhoA inhibition through RhoA phosphorylation and interaction with RhoGDI." J Cell Sci 116(Pt 8): 1519-1525.
- Taya, S., N. Inagaki, et al. (2001). "Direct interaction of insulin-like growth factor-1 receptor with leukemia-associated RhoGEF." J Cell Biol 155(5): 809-820.
- Thibonnier, M., D. M. Conarty, et al. (1998). "Molecular pharmacology of human vasopressin receptors." Adv Exp Med Biol 449: 251-276.
- Thuringer, D., L. Maulon, et al. (2002). "Rapid transactivation of the vascular endothelial growth factor receptor KDR/Flk-1 by the bradykinin B2 receptor contributes to endothelial nitric-oxide synthase activation in cardiac capillary endothelial cells." J Biol Chem 277(3): 2028-2032.
- Torres, V. E. (2005). "Vasopressin antagonists in polycystic kidney disease." Kidney Int 68(5): 2405-2418.
- Torres, V. E. (2008). "Vasopressin antagonists in polycystic kidney disease." Semin Nephrol 28(3): 306-317.
- Torres, V. E., A. B. Chapman, et al. (2012). "Tolvaptan in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease." N Engl J Med 367(25): 2407-2418.
- Tribollet, E., C. Barberis, et al. (1988). "Autoradiographic localization of vasopressin and oxytocin binding sites in rat kidney." Kidney Int 33(5): 959-965.
- Ullman, E. F., H. Kirakossian, et al. (1994). "Luminescent oxygen channeling immunoassay: measurement of particle binding kinetics by chemiluminescence." Proc Natl Acad Sci U S A 91(12): 5426-5430.
- Ullrich, A., A. Gray, et al. (1986). "Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity." EMBO J 5(10): 2503-2512.
- Ullrich, A. and J. Schlessinger (1990). "Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity." Cell 61(2): 203-212.
- Vasilcanu, R., D. Vasilcanu, et al. (2008). "Insulin-like growth factor type-I receptor-dependent phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 but not Akt (protein kinase B) can be induced by picropodophyllin." Mol Pharmacol 73(3): 930-939.
- Vincent, J. L. and F. Su (2008). "Physiology and pathophysiology of the vasopressinergic system." Best Pract Res Clin Anaesthesiol 22(2): 243-252.
- Vu, T. H. and Z. Werb (2000). "Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology." Genes Dev 14(17): 2123-2133.

- Ward, C. W., M. C. Lawrence, et al. (2007). "The insulin and EGF receptor structures: new insights into ligand-induced receptor activation." Trends Biochem Sci 32(3): 129-137.
- Wenzel-Seifert, K. and R. Seifert (2000). "Molecular analysis of beta(2)-adrenoceptor coupling to G(s)-, G(i)-, and G(q)-proteins." Mol Pharmacol 58(5): 954-966.
- Werry, T. D., P. M. Sexton, et al. (2005). ""Ins and outs" of seven-transmembrane receptor signalling to ERK." Trends Endocrinol Metab 16(1): 26-33.
- Wetzker, R. and F. D. Bohmer (2003). "Transactivation joins multiple tracks to the ERK/MAPK cascade." Nat Rev Mol Cell Biol 4(8): 651-657.
- Wilson, P. D. (2004). "Polycystic kidney disease." N Engl J Med 350(2): 151-164.
- Wojtowicz-Praga, S. M., R. B. Dickson, et al. (1997). "Matrix metalloproteinase inhibitors." Invest New Drugs 15(1): 61-75.
- Wu, S., M. Birnbaumer, et al. (2008). "Phosphorylation analysis of G protein-coupled receptor by mass spectrometry: identification of a phosphorylation site in V2 vasopressin receptor." Anal Chem 80(15): 6034-6037.
- Xu, Y., D. W. Piston, et al. (1999). "A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: application to interacting circadian clock proteins." Proc Natl Acad Sci U S A 96(1): 151-156.
- Yamaguchi, Y., H. Katoh, et al. (2002). "Galpha(12) and Galpha(13) interact with Ser/Thr protein phosphatase type 5 and stimulate its phosphatase activity." Curr Biol 12(15): 1353-1358.
- Yang, B. and S. Kumar (2010). "Nedd4 and Nedd4-2: closely related ubiquitin-protein ligases with distinct physiological functions." Cell Death Differ 17(1): 68-77.
- Zheng, H., H. Shen, et al. (2012). "beta-Arrestin-biased agonism as the central mechanism of action for insulin-like growth factor 1 receptor-targeting antibodies in Ewing's sarcoma." Proc Natl Acad Sci U S A 109(50): 20620-20625.
- Zheng, H., C. Worrall, et al. (2012). "Selective recruitment of G protein-coupled receptor kinases (GRKs) controls signaling of the insulin-like growth factor 1 receptor." Proc Natl Acad Sci U S A 109(18): 7055-7060.
- Zhu, D., R. I. Tate, et al. (2007). "Domains necessary for Galpha12 binding and stimulation of protein phosphatase-2A (PP2A): Is Galpha12 a novel regulatory subunit of PP2A?" Mol Pharmacol 71(5): 1268-1276.
- Zhu, X., S. Gilbert, et al. (1994). "Dual signaling potential is common among Gs-coupled receptors and dependent on receptor density." Mol Pharmacol 46(3): 460-469.
- Zingg, H. H. (1996). "Vasopressin and oxytocin receptors." Baillieres Clin Endocrinol Metab 10(1): 75-96.