

2 n 11.3167.2

Université de Montréal

**Rôle de la protéine kinase C dans la désensibilisation hétérologue
des récepteurs β_1 - et β_2 -adrénergiques**

par
Julie Guimond

v.058
11512422

Département des Sciences Biomédicales
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc) en Sciences Biomédicales

Novembre 2003

© Julie Guimond, 2003



W

4

U58

2004

v.058

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Rôle de la protéine kinase C dans la désensibilisation hétérologue
des récepteurs β_1 - et β_2 -adrénergiques**

présenté par :
Julie Guimond

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président rapporteur : Madhu Anand-Srivastava

Directeur de recherche : Hansjörg Rindt

Codirecteur de recherche : Terence E. Hébert

Membre du jury : Audrey Claing

RÉSUMÉ

Il est aujourd'hui bien accepté que la fonction des récepteurs β -adrénergiques (β -ARs) est modulée par l'activité des récepteurs α_1 -adrénergiques (α_1 -ARs) via un processus que l'on nomme régulation croisée. Par contre, les mécanismes moléculaires précis responsables de cette régulation sont peu connus. Nous avons démontré dans un modèle de souris transgéniques que la surexpression des α_1 -ARs conduisait à une diminution de la capacité des β -ARs à stimuler l'adénylate cyclase (Lemire *et al.*, 1998 J Mol. Cell. Cardiol. 30 :1827-1839). De plus, cette diminution coïncide avec une augmentation des niveaux d'expression des PKC β , δ et ϵ . À cet égard, le but de la présente étude est de déterminer quels isoformes de la PKC sont impliqués dans la désensibilisation hétérologue des β_1 - et β_2 -ARs. Les résultats de notre recherche démontrent que suivant la transfection des isoformes α , β II, ϵ et ζ de la PKC dans des cellules de type HEK 293 qui surexpriment de façon stable le β_2 -AR, la capacité du β_2 -AR à stimuler l'adénylate cyclase est réduite de façon significative. De plus, des expériences similaires ont témoigné d'une réduction encore plus dramatique lorsque le β_1 -AR était co-transfecté avec les différents isoformes de la PKC. La désensibilisation médiée par la PKC a été abolie suivant la modification des sites de phosphorylation des PKA/PKC des deux types de récepteurs. Ainsi, les résultats de notre étude suggèrent que le β_1 -AR constituerait une cible préférentielle pour la PKC, et que la phosphorylation serait le mécanisme par lequel pourrait s'opérer la désensibilisation des β -ARs par la PKC.

Mots clés : récepteurs adrénergiques, RCPG, régulation croisée, PKC, désensibilisation hétérologue.

SUMMARY

The function of β AR is modulated by the activity status of α_1 -adrenergic receptors (α_1 AR) via molecular crosstalk and this becomes evident when measuring cardiac contractile responses to adrenergic stimulation. The molecular mechanism underlying this crosstalk is unknown. We have previously demonstrated that overexpression of α_{1B} AR in transgenic mice leads to a marked desensitization of β AR-mediated adenylyl cyclase stimulation which is correlated by increased levels of activated PKC β , δ and ϵ (Lemire *et al.*, 1998 J. Mol. Cell. Cardiol. 30:1827-1839). Therefore, we wished to determine which PKC isoforms play a role in heterologous β AR desensitization and also which isoforms of the β AR were the molecular target(s) for PKC. In experiments using constitutively activated PKC expression constructs transfected into HEK 293 cells also expressing the β_2 AR, we demonstrated that the different PKC subtypes lead to a decreased maximal cAMP accumulation following isoproterenol stimulation. However, a much more dramatic desensitization of adenylyl cyclase stimulation was observed in cells co-transfected with different PKC isoforms and β_1 AR. PKC-mediated desensitization was reduced by mutating consensus PKA/PKC sites in the third intracellular loop and/or the carboxy-terminal tail of either receptor. Our results demonstrate therefore that the β_1 AR is the most likely molecular target for PKC-mediated heterologous desensitization in the mammalian heart and that modulation of adrenergic receptor activity in any given cell type will depend on the complement of PKC isoforms present.

Key words : adrenergic receptors, GPCR, molecular crosstalk, PKC, heterologous desensitization.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	.iii
SUMMARY.....	.iv
TABLE DES MATIÈRES.....	.v
LISTE DES TABLEAUX.....	.viii
LISTE DES FIGURES.....	.ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	.x
REMERCIEMENTS.....	.xii
CHAPITRE 1. INTRODUCTION ET REVUE DE LITTÉRATURE.....	.1
1.1 La régulation de la fonction cardiaque par les messagers chimiques : les débuts de la signalisation.....	.2
1.2 Les récepteurs couplés aux protéines G.....	.4
1.2.1 Classification des RCPG.....	.5
1.2.2 Fonctionnement des RCPG.....	.6
1.2.3 Diversité des sous-unités des protéines G.....	.8
1.2.4 Les récepteurs adrénergiques.....	.10
1.2.4.1 Les récepteurs α -adrénergiques.....	.11
1.2.4.2 Les récepteurs α_1 -adrénergiques.....	.12
1.2.4.3 Les récepteurs α_2 -adrénergiques.....	.13
1.2.4.4 Les récepteurs β -adrénergiques.....	.13
1.2.4.5 Les récepteurs β_1 - et β_2 -adrénergiques : rôle prédominant dans les cardiomyocytes.....	.15

1.2.4.6	Double-couplage du récepteur β_2 -adrénergique.....	16
1.2.4.7	Récepteurs β -adrénergiques et insuffisance cardiaque.....	18
1.2.4.8	La désensibilisation des récepteurs β -adrénergiques : désensibilisation homologue.....	20
1.2.4.9	La désensibilisation des récepteurs β -adrénergiques : désensibilisation hétérologue.....	23
1.3	Régulation croisée : émergence d'un nouveau concept.....	24
1.3.1	Régulation croisée entre les α_1 -AR et les β -ARs.....	25
1.3.1.1	Les effets de la stimulation des α_1 -AR sur les β -ARs.....	26
1.3.1.2	Les conséquences de la surexpression des α_1 -AR sur les β -ARs.....	27
1.3.1.3	Les effets de la stimulation des α_1 -AR sur le métabolisme de l'AMPc.....	29
1.4	La protéine kinase C : structure et classification.....	31
1.4.1	La protéine kinase C : distribution tissulaire.....	34
1.4.2	La protéine kinase C : modes d'activation et de signalisation.....	36
1.5	Rôle de la PKC dans la désensibilisation hétérologue des récepteurs β -adrénergiques : premiers indices.....	37
1.5.1	Conséquences de la régulation croisée des α_1 -AR sur les β -ARs : La PKC est-elle impliquée?.....	39
1.6	Fondements de l'hypothèse de l'étude.....	40
1.6.1	Potentiel de désensibilisation des β_1 - et β_2 -ARs par la PKC.....	40
1.7	Volets de l'étude.....	41
1.7.1	Choix des isoformes de la PKC.....	41
1.7.2	Conséquences fonctionnelles de la surexpression des isoformes de la PKC sur les β -ARs.....	42
1.7.3	Interactions physiques entre la PKC et les β -ARs.....	43

1.7.4	Phosphorylation des récepteurs.....	43
CHAPITRE 2. ARTICLE : <i>Role of specific PKC isoforms in modulation of β_1- and β_2-adrenergic receptors</i>		
	Summary.....	44
	Introduction.....	46
	Experimental Procedures.....	48
	Results.....	51
	Discussion.....	57
	References.....	62
CHAPITRE 3. DISCUSSION GÉNÉRALE.....		
3.1.	Effet de la surexpression de certains isoformes de la PKC sur la modulation des β_1 - et β_2 -AR.....	80
3.2.	Potentiation des effets selon l'isoforme de la PKC.....	81
3.3.	Conséquences de l'activation de la PKC sur β ARK-1.....	82
3.4.	Activation des différents isoformes de la PKC sur la désensibilisation : phosphorylation, internalisation et régulation négative.....	85
3.5.	Potentiation des effets sur les β_1 - et les β_2 -AR : conséquence de la localisation cellulaire des récepteurs?.....	87
3.6.	Double-couplage du β_2 -AR : la PKC est-elle impliquée?.....	90
3.7.	Effet de la PKC sur l'hétérodimérisation des β_1 - et β_2 -AR.....	91
3.8.	Phosphorylation des β -ARs par la PKC.....	95
3.9.	En conclusion.....	96
RÉFÉRENCES.....		97
		100

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.	Effets physiologiques causés par l'altération de l'expression du gène du récepteur α_1 -AR chez la souris.....	29
Tableau 2.	Caractérisation des isoformes de la PKC détectés dans le ventricule gauche humain par immunobuvardage de type Western.....	35
ARTICLE :	<i>Role of specific protein kinase C isoforms in modulation of β_1- and β_2-adrenergic receptors</i>	
Table 1.	<i>Efficacy of adenylyl cyclase stimulation by β_1AR or β_2AR co-transfected with various CA-PKC isoforms.....</i>	<i>74</i>

LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Diversité des messagers qui activent les RCPG.....	4
Figure 2.	Classification des RCPG.....	5
Figure 3.	Diversité des sous-unités de la protéine G et leurs effecteurs.....	8
Figure 4.	Différentes voies de signalisations activées par les β_1 - et β_2 -ARs.....	17
Figure 5.	Activation et désensibilisation des récepteurs β -adrénergiques dans le cœur.....	20
Figure 6.	Classification des différents isoformes de la PKC.....	32
Figure 7.	Modèle d'interaction de la PKC avec les protéines d'ancrage RICKs et RACKs.....	84
Figure 8.	Mécanismes d'activation des voies MAPK par les RCPG.....	93
ARTICLE :	<i>Role of specific protein kinase C isoforms in modulation of β_1- and β_2-adrenergic receptors</i>	
<i>Figure 1.</i>	<i>Effect of PMA on adenylyl cyclase stimulation by β-ARs.....</i>	<i>67</i>
<i>Figure 2.</i>	<i>Effect of CA-PKC on adenylyl cyclase activity stimulation by β_2-AR.....</i>	<i>68</i>
<i>Figure 3.</i>	<i>Effect of CA-PKC on adenylyl cyclase activity stimulation by β_1-AR.....</i>	<i>70</i>
<i>Figure 4.</i>	<i>Effects of mutating β_1-AR and β_2-AR phosphorylation sites on CA-PKC effect.....</i>	<i>72</i>
<i>Figure 5.</i>	<i>Recruitment of CA-PKC isoforms to β_1-AR and β_2-AR.....</i>	<i>73</i>

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AC	Adénylate cyclase
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
α -AR	Récepteur α -adrénergique
β -AR	Récepteur β -adrénergique
β ARK	<i>β-adrenergic receptor kinase</i>
BRET	<i>Bioluminescence Resonance Energy Transfer</i>
CA	<i>Constitutively active</i>
CYP	Cyanopindolol
DAG	Diacyl glycérol
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
ERK 1/2	<i>Extracellular signal-Regulated Kinase 1 and 2</i>
FRET	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
G _{s/i}	Protéine G stimulatrice / inhibitrice
GDP/GTP	Guanosine bi / tri phosphate
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i>
GRK	<i>G protein coupled receptor kinase</i>
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphate
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>

PC	Phosphatidylcholine
PDE	Phosphodiesterase
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PI	<i>Phosphatidylinositol</i>
PKA	<i>Protein kinase cAMP-dependant</i>
PKC	Protéine Kinase C
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acétate
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
PS	<i>Phosphatidylserine</i>
PTX	Toxine pertussique
RCPG	Récepteurs couplés aux protéines G
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
WT	<i>Wildtype</i>
YFP	<i>Yellow Fluorescent Protein</i>

REMERCIEMENTS

Je voudrais commencer par remercier mes directeurs de recherche, les Drs. Hans Rindt et Terry Hébert. D'abord Hans, qui, par sa générosité, m'a permis de découvrir un domaine qui m'était peu familier. La confiance qu'il a témoigné à mon égard ainsi que ses nombreux encouragements m'ont grandement aidé dans mon cheminement et ont contribué à ma réussite. Les longues heures passées dans son bureau à discuter et à chercher le pourquoi et le comment de nombreux articles m'ont très certainement éclairées et ont contribué à l'ouverture de mon esprit alors peu scientifique. Puis, la générosité de Terry qui, après le départ de Hans, a gentiment accepté de me prendre sous son aile afin de me permettre de compléter ma maîtrise a été pour moi très bénéfique. La porte de son bureau, toujours ouverte, témoignait de sa grande disponibilité pour des questions de toutes sortes (et croyez-moi, il y en a eu!). Enfin, ses directives éclairées et ses nombreux encouragements m'ont permis de mener à terme ce projet.

Merci également à mes collègues, Karine Nadeau, Marie-Josée Benoît, Marc-Antoine Gillis et Maya Mamarbassi. Ils ont tous, à divers degrés, contribué à l'aboutissement de ce travail. Karine, avec sa bonne humeur et son enthousiasme peu commun est la personne idéale pour vous remonter le moral lorsque vous en avez besoin! Marie-Josée, avec sa générosité et son savoir, est toujours disponible pour vous rendre service ou pour répondre à une (ou plusieurs!) question(s). Le support technique et informatique de Marc-Antoine, ainsi que sa grande disponibilité m'ont également été d'un grand secours, et ce, jusqu'à la toute fin de ma rédaction... Puis Maya, sans qui

ce projet n'aurait peut-être pas été ce qu'il est, restera selon moi, un modèle de générosité et de connaissances innombrables.

Je m'en voudrais de ne pas souligner la contribution de Nathalie Éthier, Catherine Lavoie et Phan Trieu. Ces trois 'Terry's Angels' qui ont su m'épauler et m'éclairer ont témoigné d'une grande disponibilité à mon égard. L'atmosphère détendue et agréable qui habite le laboratoire est sans aucun doute attribuable à leur présence et je les remercie également pour cela. Il y a aussi Marie-Andrée Lupien et Véronique Trépanier-Boulay que j'ai bien aimé côtoyer, et qui sont devenues au fil du temps, plus que de simples collègues de travail. Je voudrais également remercier le Dr. Bruce Allen, Benoît Boivin et Dominique Chevalier pour leur assistance technique et leurs avis scientifiques très appréciés.

Évidemment, je tiens à remercier mon précieux entourage. Ma mère, toujours soucieuse de mon bien-être, me porte une oreille tellement attentive, qu'elle arrive à déceler mes angoisses avant même que je lui en glisse un mot. Son soutien et ses mots d'encouragement constants m'ont sans aucun doute aidé à me rendre jusqu'au bout. Il y a aussi ma sœur, avec qui je partage une grande complicité et qui est non seulement une confidente hors pair, mais également une super maman. Et enfin, il y a mon chum, qui connaît tout de mes petits bobos et qui arrive toujours à me faire réaliser que je peux y arriver. Sa patience, sa tolérance et son calme ont toujours réussi à réduire mes inquiétudes et à me redonner confiance.

CHAPITRE 1. INTRODUCTION ET REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 La régulation de la fonction cardiaque par les messagers chimiques– les débuts de la signalisation

La découverte de l'existence de neurotransmetteurs a permis d'élucider le mécanisme par lequel la fonction cardiaque pouvait être régulée. En effet, c'est en 1894 que Oliver et Shafer (1) ont découvert qu'un médiateur chimique dérivé de la glande médullosurrénale exerçait des effets chronotropiques positifs sur des cœurs de chats. Une décennie plus tard, ce sont les études de Elliot qui ont démontré que la stimulation du nerf sympathique semblait mimer les effets préalablement observés par ce même médiateur chimique, suggérant qu'un lien pouvait exister entre la stimulation du système nerveux et la libération de substances chimiques pouvant agir sur l'organisme. Ce n'est qu'en 1921 que les expériences de Loewi (2) ont permis de prouver de façon concluante qu'un médiateur chimique était en effet impliqué dans la régulation nerveuse du cœur. Cette substance chimique, alors appelée "vagusstoff" était libérée suivant la stimulation du nerf vague et causait une diminution de la fréquence cardiaque de cœurs de grenouilles. Menant ses études pendant plusieurs années, Loewi en est venu à la conclusion que le "vagusstoff" était en fait l'acétylcholine. Dans les années 30, Cannon et Rosenblueth (1) ont démontré qu'une stimulation sympathique menait elle aussi à la libération d'un médiateur, mais que cette substance avait des effets cardioaccélérateurs. Peu de temps après la deuxième guerre mondiale, von Euler découvrit que cette substance était en fait la noradrénaline et qu'elle constituait le neurotransmetteur principal du système nerveux sympathique. Depuis ce temps, de nombreux neurotransmetteurs et messagers extracellulaires incluant de petites molécules ont été découverts, tels que la dopamine, l'histamine et

la sérotonine, ainsi que des peptides comme l'angiotensine II et la vasopressine, pour ne nommer que ceux-ci.

La découverte de Loewi selon laquelle la stimulation d'un nerf pouvait mener à la libération d'un transmetteur chimique allait pousser les recherches vers une nouvelle voie dans laquelle il devenait essentiel d'identifier le mécanisme cellulaire qui permettait à cette substance chimique de modifier la fonction cellulaire. L'élucidation du processus selon lequel la cellule reconnaît une certaine substance demeurait alors très complexe. En effet, des différences dans la réponse à l'adrénaline et à la noradrénaline selon les types de tissus suggéraient la présence de facteurs autres que les neurotransmetteurs dans la modification de la réponse cellulaire. C'est Ahlquist (3) qui a postulé l'idée que les réponses spécifiques aux signaux chimiques étaient déterminées non seulement par la structure même des neurotransmetteurs, mais par la nature des récepteurs qui reconnaissent ces structures spécifiques. En démontrant comment la norépinéphrine pouvait causer une contraction dans certains muscles lisses et une relaxation dans d'autres, il a proposé l'existence de deux types de récepteurs qui pouvaient lier les catécholamines. Les récepteurs α , qui médient la contraction, et les récepteurs β qui permettent la relaxation. La justesse de cette hypothèse ne fait plus aucun doute aujourd'hui, puisqu'on dénombre l'existence de 6 sous-types de récepteurs α -adrénergiques, alors qu'on en dénombre au moins 3 pour les récepteurs β -adrénergiques.

1.2 Les récepteurs couplés aux protéines G

Les récepteurs couplés aux protéines G forment la plus grande famille de récepteurs membranaires. En effet, quelques 800 RCPG ont été dénombrés jusqu'à aujourd'hui chez l'humain (4), et la diversité de leurs actions biologiques est tout aussi surprenante. Tel que présenté dans la figure 1, les membres de cette superfamille comprennent entre autres des récepteurs pour diverses hormones, neurotransmetteurs et chemokines, de même que des récepteurs sensoriels, notamment gustatifs et visuels (5). Puisqu'ils régulent plusieurs processus physiologiques importants, les RCPG constituent un secteur d'étude prédominant des sciences biomédicales et sont également un des domaines de recherche les plus actifs de l'industrie pharmaceutique.

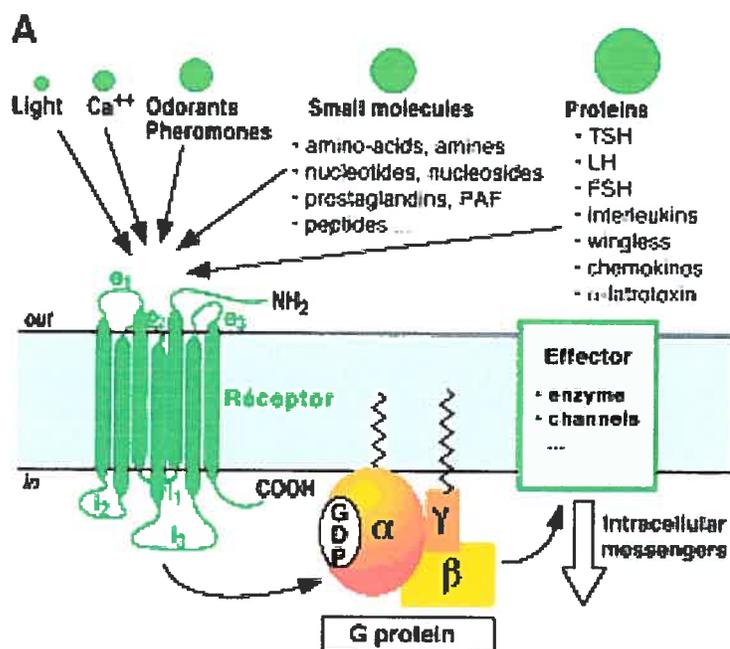


Figure 1. Diversité des messagers qui activent les RCPG

Figure tirée de Bockaert, J. et Pin, J-P. (1999) (5)

1.2.1 Classification des RCPG

Une des particularités des RCPG est qu'ils possèdent tous une structure composée de 7 hélices α - transmembranaires, une extrémité N-terminal extracellulaire et un segment C-terminal cytosolique (4). Malgré cette particularité, les RCPG sont divisés en 3 grandes familles, et cette division tient du fait qu'il existe 25% d'homologie au niveau de la séquence des membres d'une même famille (5). À ce propos, la figure 2 présente de façon schématique les 3 familles qui regroupent les RCPG ainsi que les différentes substances biologiques qui les activent. Les sites de liaison (orange) de même que les résidus conservés entre les membres d'une même famille (bleu) sont

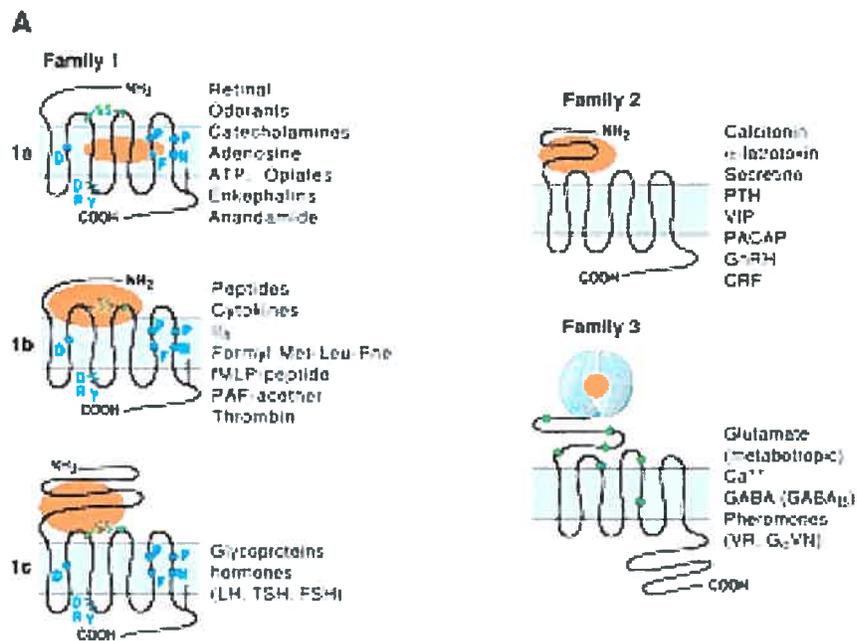


Figure 2. Classification des RCPG

Figure tirée de Bockaert, J. et Pin, J-P. (1999) (5)

également illustrés. La famille 1 qui est de loin la plus grande, compte les récepteurs à la lumière (rhodopsine), les récepteurs adrénérgiques et la plupart des autres RCPG, incluant la grande famille des récepteurs olfactifs. Certaines différences au niveau de domaine du N-terminal ont toutefois nécessité une classification plus approfondie des GPCR faisant partie de cette famille. Malgré cela, une cystéine palmytilée à l'extrémité C-terminale de même que plusieurs résidus conservés dans les hélices transmembranaires sont des particularités propres aux récepteurs faisant partie de ce groupe. La famille 2, beaucoup plus petite, compte environ 25 récepteurs, et ce sont principalement les récepteurs de la famille de l'hormone peptide gastrointestinale dont les ligands principaux sont le glucagon, la sécrétine, le peptide intestinal vasoactif (VIP) et la calcitonine, pour ne nommer que ceux-ci. Ce qui distingue les récepteurs de cette famille est la présence d'une large extrémité N-terminal. La famille 3, elle aussi relativement petite, regroupe entre autres les récepteurs gustatifs, le récepteur GABA_B et le *calcium-sensing receptor*. Tous les membres de la famille 3 possèdent également une large extrémité N-terminal qui serait responsable de la liaison au ligand et qui aurait une importance cruciale dans son activation. Étant donné le nombre impressionnant de RCPG, il n'est pas surprenant de constater la diversité des réponses physiologiques qui émanent de leur activation, allant de la croissance cellulaire à la neurotransmission, pour n'en nommer que quelques uns.

1.2.2. Fonctionnement des RCPG

C'est dans les années 1970 que les études de Rodbell et Gilman ont permis de découvrir l'existence d'une protéine intermédiaire, ou transducteur, qui permettait la

communication entre un récepteur et un effecteur (6). Ce transducteur, comme Gilman l'a par la suite démontré, était en fait la protéine hétérotrimérique G_s (7). Subséquemment, l'existence de plusieurs isoformes de la protéine G ont été découverts, démontrant par le fait même la complexité et la spécificité peu commune qui caractérisent la signalisation des RCPG. Les protéines G sont des protéines hétérotrimériques composées de trois sous-unités, soit l'unité α (G_α), et le complexe $\beta\gamma$ ($G_{\beta\gamma}$). Dans une cellule non stimulée dont les récepteurs sont libres, les molécules G_α sont occupées par le GDP. L'activation d'un récepteur par son agoniste provoque un changement de conformation au niveau de certains domaines critiques des sept hélices transmembranaires. Cette réaction entraîne par la suite une modification dans la conformation des domaines intra-cellulaires du récepteur (8) et permet ainsi l'association spécifique du récepteur à une variété de protéines G. La liaison d'un agoniste provoque également un changement conformationnel de la protéine G, qui voit sa sous-unité α dissociée, au moins partiellement, du complexe $\beta\gamma$ (9), de telle sorte que le GDP lié est remplacé par le GTP. La sous unité G_α de même que le complexe $G_{\beta\gamma}$ peuvent par la suite activer différents effecteurs, comme des enzymes produisant des seconds messagers tels l'adénylate cyclase, et des canaux ioniques responsables du passage d'ions tels le potassium et le calcium (10). L'hydrolyse du GTP en GDP de même que la grande affinité du complexe $G_{\beta\gamma}$ pour la sous-unité G_α favorise la réassociation des trois sous-unités pour former à nouveau la protéine G hétérotrimérique et permettre ainsi un autre cycle d'activation.

1.2.3. Diversité des sous-unités des protéines G

La signalisation cellulaire qui régit les RCPG est très complexe et cette complexité tient du fait qu'il existe non seulement un nombre impressionnant de RCPG, mais aussi une grande diversité des sous-unités des protéines G. Jusqu'à présent, 23 sous-unités G_α qui proviennent de 17 gènes différents ont été dénombrées et classées en 4 catégories, soit $G_{\alpha_{i/o}}$, G_{α_s} , $G_{\alpha_{q/11}}$, et $G_{\alpha_{12/13}}$ (11). En ce qui concerne les sous-unités β et γ , on dénombre respectivement 6 et 13 espèces moléculaires différentes (12,13) et il semble que les nombreux effecteurs membranaires et intracellulaires qui y sont reliés sont tout aussi diversifiés, ce qui ajoute à la complexité et à la diversité du processus de signalisation relié aux RCPG. À cet effet, la figure 3 illustre bien la

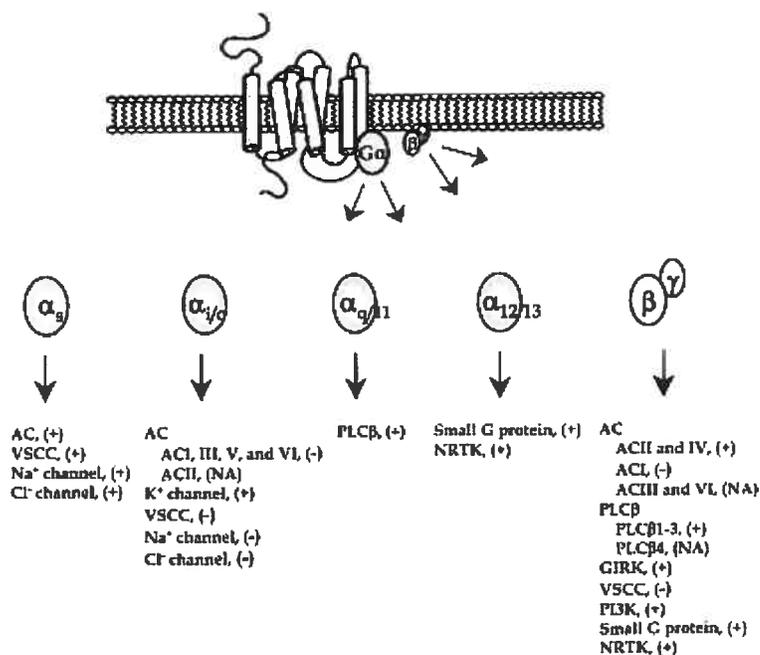


Figure 3. Diversité des sous-unités de la protéine G et leurs effecteurs.

Figure tirée de Hur, E-M. et Kim, K-T. (2002) (14)

diversité des sous-unités de protéines G ainsi que leurs différents effecteurs. En raison de la présente étude, notre attention sera portée principalement sur les récepteurs β_1 - et β_2 -adrénergiques et impliquera donc par le fait même les sous-unités $G\alpha_s$ et $G\alpha_i$, mais quelques précisions concernant les 4 groupes de sous-unités $G\alpha$ valent la peine d'être mentionnées. En effet, c'est en se basant sur les similarités qui existent au niveau des acides aminés que les sous-unités $G\alpha$ ont été classées dans les catégories mentionnées précédemment (14). Même si cette classification est plutôt arbitraire, il n'en demeure pas moins qu'il existe un mécanisme général qui régit les membres d'un même sous-groupe. En effet, la stimulation des sous-unité $G\alpha_s$ active entre autres l'adénylate cyclase et des canaux sodiques, alors que l'effet de l'activation des sous-unité $G\alpha_i$ inhibe ces deux effecteurs. En ce qui concerne les sous-unités $G\alpha_{q/11}$, leur stimulation active la PLC β , tandis que les sous-unités $G\alpha_{12/13}$ sont impliquées dans la régulation de petites protéines GTP.

En plus de comporter un nombre impressionnant de RCPG et de sous-unités de protéines G, la signalisation qui régit ces récepteurs fait face à un nouveau concept. En effet, le modèle classique selon lequel la signalisation des RCPG était basée sur une collision aléatoire entre les protéines présentes au niveau de la membrane plasmique a désormais été remplacé par un modèle qui prône l'importance de microdomaines cellulaires dans la spécificité de cette signalisation (15). En effet, la découverte que des structures telles les caveolae et les radeaux lipidiques pourraient contenir une variété de molécules de signalisation incluant des RCPG, des protéines G hétérotrimériques de même que des effecteurs comme l'adénylate cyclase

(16,17,18,19), implique qu'un modèle encore plus complexe existe. Toutefois, la signification de cette association entre les molécules de signalisation et les microdomaines demeure encore obscure. En outre, deux théories opposées émergent de ce modèle. La première étant que les caveolae serviraient de structure d'échafaudage, ce qui permettrait de façon plus directe le recrutement des composantes de signalisation et favoriserait un couplage rapide et efficace entre les récepteurs et plusieurs systèmes d'effecteurs (16,17). La seconde propose que les caveolae 'retiendraient' les molécules de signalisation dans leur état inactif d'où elles en ressortiraient une fois activées, pour relayer le message par la suite. En effet, Rybin et ses collègues (20) ont démontré que le démantèlement de la structure des caveolae par la cyclodextrine avait pour effet d'augmenter l'accumulation d'AMPC suivant la stimulation des récepteurs β_2 -adrénergiques. À la lumière de ces données, il est prudent de dire qu'en dépit des récentes découvertes qui ont permis de démontrer que la théorie des collisions aléatoires n'était pas juste, il n'en demeure pas moins que les mécanismes précis qui caractérisent la spécificité de la signalisation cellulaire des RCPG sont loins d'être élucidés. Dans les prochaines sections qui seront consacrées à la description des caractéristiques des récepteurs adrénérgiques, une attention particulière sera portée aux sous-groupes β_1 - et β_2 -adrénergiques, puisqu'ils sont l'objet de la présente étude.

1.2.4. Les récepteurs adrénérgiques

Tel que mentionné précédemment, les récepteurs adrénérgiques ont une structure composée de sept passages transmembranaires, et font partie de la famille des

récepteurs qui sont couplés aux protéines G. Habituellement, les récepteurs sont désignés en fonction de la substance endogène qui les active, et ils participent au rôle physiologique de cette substance. Les récepteurs adrénérgiques ne font pas exception à cette règle, puisqu'ils constituent le site d'action de deux catécholamines, soit l'adrénaline et la noradrénaline, qui agissent en tant qu'agonistes. Ces deux substances, libérées par la glande médullosurrénale et les terminaisons du système nerveux central modifient plusieurs actions physiologiques, particulièrement au niveau du système cardiovasculaire, mais aussi au niveau des muscles lisses et des cellules adipeuses (21).

1.2.4.1. Les récepteurs α -adrénérgiques

Après que les travaux d'Ahlquist de 1948 aient démontré l'existence de deux types de récepteurs adrénérgiques, soient α -AR et β -AR, c'est en 1974 qu'une classification plus approfondie des récepteurs α -adrénérgiques, en fonction de leur localisation anatomique, fut présentée. En effet, les études de Langer suggéraient alors deux sous-types de récepteurs α -adrénérgiques. Les récepteurs α_1 -AR, dont la localisation post-synaptique médiaient une réponse au niveau de l'organe effecteur, et les récepteurs α_2 -AR, qui par leur présence au niveau pré-synaptique, régulaient la libération de noradrénaline (22). Toutefois, cette classification est rapidement devenue inappropriée, puisqu'il a par la suite été démontré que les récepteurs α_2 -AR, impliqués dans l'inhibition de la glycolyse et de la lipolyse, n'appartenaient pas à la classe de récepteurs dits pré-synaptiques (23). De plus, la découverte de la présence de récepteurs α_2 -AR tant au niveau pré-synaptique que post-synaptique (24) mettait

désormais en doute l'hypothèse alors postulée par Langer. Plusieurs autres chercheurs ont par la suite tenté de proposer une caractérisation plus fonctionnelle de ces récepteurs, comme Betherseln et Pettinger (25) et Drew et Whiting, (26), mais ce sont les progrès de l'industrie pharmaceutique, qui, avec le développement de drogues de plus en plus spécifiques ont permis de caractériser les récepteurs α -adrénergiques en fonction du degré d'affinité pharmacologique de chacun (24).

1.2.4.2. Les récepteurs α_1 -adrénergiques

Nous savons aujourd'hui que trois différents sous-types des récepteurs α_1 -AR ont été clonés et identifiés pharmacologiquement, soit les α_{1A} , α_{1B} et α_{1D} (27,28). La présence de ces récepteurs a également été détectée dans le cœur humain, tant au niveau de la protéine même, qu'au niveau de l'ARNm et il semble que ce serait le sous-type α_{1A} qui y serait le plus abondant (29,30,31,32). Au niveau physiologique les α_1 -AR sont impliqués entre autres dans la régulation de la contractilité cardiaque (33,34) et dans la mobilisation du glucose hépatique (22), mais leur principale fonction réside dans le contrôle du tonus vasculaire (24). Ils sont couplés à une protéine G_q et activent la phospholipase C qui scinde de phosphatidyl-inositol en diacyl glycérol (DAG) et en inositol triphosphate (IP_3). Ces deux molécules servent alors de seconds messagers : le DAG active la protéine kinase C, tandis que l' IP_3 agit sur les canaux calciques du réticulum sarcoplasmique qui libère des ions calcium dans le cytoplasme (35).

1.2.4.3. Les récepteurs α_2 -adrénergiques

En ce qui concerne les α_2 -AR, ceux-ci sont couplés à une protéine G_i , ce qui a pour effet d'inhiber le système de l'adénylate cyclase et donc empêcher la production d'AMPc. Leur importance au niveau physiologique concerne entre autres la relaxation de certains muscles lisses, ainsi que la régulation des fonctions cognitives du système nerveux central (36,37). Ils sont également impliqués dans l'activation de la phospholipase A_2 , ainsi que des canaux calciques et potassiques (38). On dénombre également trois sous-types de récepteurs α_2 -adrénergiques, soit les α_{2A} , α_{2B} et α_{2C} , et leur présence au niveau du cœur humain a aussi été démontrée au niveau de l'ARNm, à l'aide d'essais quantitatifs de ribonucléase (39).

1.2.4.4. Les récepteurs β -adrénergiques

C'est dans la lancée des travaux de Rodbell, qui découvrit l'existence d'une protéine intermédiaire, que les récepteurs β -adrénergiques sont devenus en quelque sorte le prototype visant à déterminer le fonctionnement des RCPG. En effet, la disponibilité d'agonistes et d'antagonistes des β -ARs fournissait d'excellents nouveaux matériaux pour le développement de ligands radio-marqués ou encore de matrices de chromatographie d'affinité qui allaient permettre d'étudier le récepteur comme une entité biochimique propre (6). C'est au début des années 1980 avec la purification du récepteur β_2 -adrénergique à partir d'érythrocytes amphibiens (40), puis du β_1 -AR des érythrocytes aviaires (41) qu'il a été possible de séparer 'physiquement' le récepteur de la partie catalytique de l'adénylate cyclase. Subséquemment, la reconstitution des β_1 -AR et β_2 -AR, d'une protéine G_s purifiée (42,43) et de la partie catalytique de

l'adénylate cyclase (44,45) allait prouver l'existence d'un système *in vitro* fonctionnel et ainsi valider le modèle alors proposé par Rodbell quinze ans plus tôt : un système à trois composantes, soit un récepteur, un transducteur et un effecteur.

Le développement des techniques de clonage ainsi que la découverte de profils pharmacologiques spécifiques ont permis de déterminer l'existence de trois sous-types de récepteurs β -adrénergiques : β_1 -AR, β_2 -AR et β_3 -AR. En raison de la présente étude, nous aborderons plus spécifiquement les caractéristiques des β_1 -ARs et β_2 -ARs dans les cardiomyocytes, mais quelques précisions concernant le β_3 -AR valent la peine d'être mentionnées. En effet, la structure moléculaire ainsi que le gène même du β_3 -AR diffèrent de ses deux acolytes : chez l'humain, le gène du récepteur β_3 -adrénergique possède des introns, alors que les β_1 -AR et β_2 -AR n'en ont pas (46,47). De plus, le récepteur β_3 -adrénergique ne possède pas les sites de phosphorylation de la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA), et de la GRK2 qui sont situés au niveau du segment C-terminal cytosolique des β_1 -AR et β_2 -AR (48,49,50). Aussi, contrairement aux β_1 -ARs et β_2 -ARs, nous savons que le récepteur β_3 -adrénergique est prédominant dans les adipocytes où il est impliqué principalement dans la lipolyse (21). Toutefois, des études récentes suggèrent que le récepteur β_3 -adrénergique pourrait également jouer un rôle dans le contrôle physiologique des contractilités cardiaque et vasculaire (51) puisque sa présence a été détectée au niveau de l'ARNm de cœurs humains explantés. Toutefois, contrairement aux effets classiques connus des β_1 -ARs et β_2 -ARs, c'est à dire une inotropie et une chronotropie positives, il semble que la stimulation des β_3 -ARs mènerait à une

réponse inotropique négative (52). Cet effet spécifique serait attribuable d'une part à un couplage à la protéine G_i et d'autre part à une augmentation de la production d'oxide nitrique et de GMPc intracellulaire (53,54).

1.2.4.5. Les récepteurs β_1 - et β_2 -adrénergiques : rôle prédominant dans les cardiomyocytes

Bien que leur présence ait été détectée un peu partout dans l'organisme, entre autres au niveau des vaisseaux sanguins et des muscles squelettiques, c'est au niveau des cardiomyocytes que l'on associe souvent le rôle des récepteurs β_1 - et β_2 -adrénergiques. En effet, la présence de ces deux types de récepteurs au niveau du cœur est bien documentée (55,56,57) et il ne fait plus aucun doute aujourd'hui que les β_1 -AR et β_2 -AR co-existent dans les cardiomyocytes pour y modifier les réponse inotropiques et chronotropiques positives. Toutefois, leur présence respective n'est pas homogène puisqu'il semble que les récepteurs β_1 -adrénergiques représenteraient à eux seuls 75%-80% de la totalité des récepteurs β -adrénergiques dans le cœur (5,58).

En ce qui concerne le mécanisme de signalisation qui régit les récepteurs β -adrénergiques, ce dernier est bien connu. En effet, après l'activation du récepteur par son agoniste, il s'en suit d'un couplage du récepteur à la protéine G_s qui active l'enzyme adénylate cyclase. L'activation de cet enzyme a pour effet d'augmenter la quantité d'AMPc intracellulaire qui agit en tant que second messenger pour activer la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA). Cette dernière va phosphoryler la troponine I, impliquée dans le couplage excitation-contraction, et les canaux

calciques de type-L, qui vont favoriser l'augmentation du taux de calcium intracellulaire. Ces deux phénomènes seront impliqués dans la contraction des myofilaments. De plus, la PKA est également impliquée dans la réponse lusitropique du cœur, c'est-à-dire la relaxation du muscle cardiaque, puisqu'elle phosphoryle la phospholamban. Cette dernière est une protéine pentamérique composée de cinq sous-unités identiques et est située au niveau de la membrane du réticulum sarcoplasmique. Lorsque phosphorylée, elle favorise la reprise du calcium intracellulaire à l'intérieur du réticulum, puisqu'elle se dissocie de la pompe Ca^{2+} ATPase (SERCA), ce qui a pour effet de favoriser la relaxation.

1.2.4.6. Double couplage du récepteur β_2 -adrénergique

Il a longtemps été accepté qu'un récepteur ne pouvait se coupler qu'à une seule classe de protéine G hétérotrimérique *in vitro*, générant ainsi une signalisation sélective et spécifique (59). Toutefois, des études faites sur des cellules intactes, des membranes cellulaires ou des protéines purifiées ont démontré que le récepteur β_2 -adrénergique pouvait également interagir avec la protéine G_i (60,61,62), conférant ainsi à la signalisation cellulaire une nouvelle avenue. La figure 4 de la page suivante démontre bien les voies de signalisation distinctes résultant des différents couplages des β_1 - et β_2 -ARs.

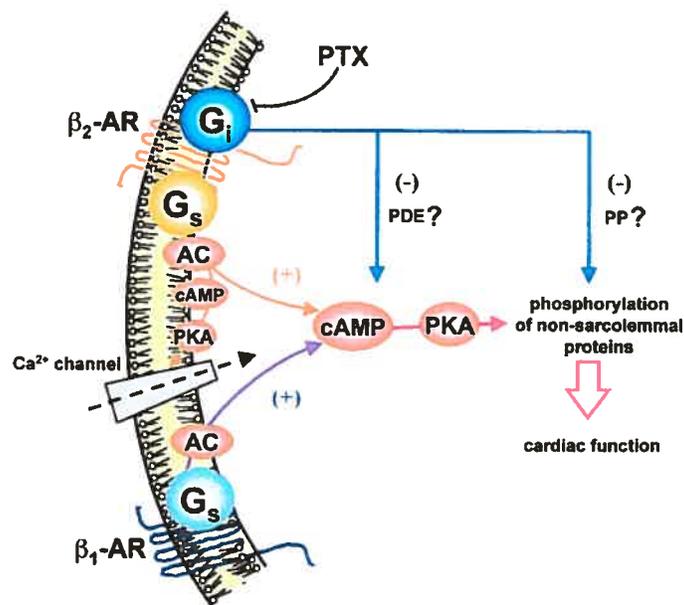


Figure 4. Différentes voies de signalisations activées par les β_1 - et β_2 -ARs

Figure tirée de Xiao et al. (1999) (60)

Les premiers indices révélant des différences substantielles entre les β_1 -AR et β_2 -AR démontraient en effet que la stimulation du β_1 -AR favorisait la relaxation contractile en modulant l'activité de la phospholamban, alors que le β_2 -AR ne générerait pas cet effet. Il semble aujourd'hui que ce double couplage du β_2 -AR empêche la phosphorylation de la phospholamban puisqu'il limiterait en quelque sorte la signalisation du β_2 -AR au niveau des effecteurs membranaires comme les canaux calciques de type-L. En limitant la signalisation au niveau de ces effecteurs, la phospholamban ne peut donc pas favoriser la reprise du calcium intracellulaire à l'intérieur du réticulum et favoriser la relaxation. Cette hypothèse semble en effet

véridique, puisqu'il a été démontré que suivant le traitement à la toxine pertussique, qui inhibe l'action de la protéine G_i , l'effet du β_2 -AR est identique à celui du β_1 -AR (63).

1.2.4.7. Récepteurs β -adrénergiques et insuffisance cardiaque

L'insuffisance cardiaque chez l'humain est caractérisée par une diminution du taux de noradrénaline tissulaire et par une augmentation de ce même taux au niveau plasmatique (64). Cette caractéristique traduit bien l'activation chronique du système nerveux sympathique (SNS) qui tente de maintenir l'homéostasie circulatoire malgré les dommages subits au niveau cardiaque. Toutefois, en dépit de cette adaptation, les patients qui souffrent d'insuffisance cardiaque démontrent souvent les signes d'une diminution de la réponse inotropique cardiaque, qui se traduit en une faiblesse de l'action de pompage du myocarde et en une perfusion tissulaire inadéquate. De plus, cette adaptation du SNS peut avoir une multitude d'effets néfastes qui peuvent soit initier ou accélérer les pathologies cardiovasculaires. En outre, une stimulation adrénergique prolongée peut causer des changements au niveaux métabolique et électrophysiologique du myocarde qui peuvent engendrer des épisodes de tachyarrhythmies (65). Aussi, une stimulation adrénergique maintenue peut provoquer non seulement une désensibilisation, mais une régulation négative des récepteurs β -adrénergiques. Plusieurs études ont par ailleurs rapporté une diminution du niveau d'expression des récepteurs β_1 -adrénergiques au niveau de l'ARNm (66,67) qui coïnciderait avec l'atténuation de la réponse aux agonistes généralement observée chez les patients qui souffrent d'insuffisance cardiaque. Les récepteurs β_2 -

adrénergiques, quant à eux, ne subissent pas le même sort. Ils sont désensibilisés, c'est-à-dire que la réponse aux agonistes est atténuée, mais ils semblent être épargnés par la régulation négative. En effet, plusieurs études rapportent que la densité de récepteurs β_2 -adrénergiques n'est pas altérée dans des cas d'insuffisance cardiaque, comme c'est le cas pour les β_1 -AR (68,69).

Les résultats des études cités ci-dessus démontrent clairement que l'insuffisance cardiaque peut moduler de façon dramatique l'activité des récepteurs β_1 - et β_2 -adrénergiques. Mais comme nous savons que récepteurs, protéines G et effecteurs forment une unité fonctionnelle importante, il nous semble logique d'ajouter cette petite parenthèse afin de mentionner que l'insuffisance cardiaque peut également causer des altérations au niveau fonctionnel de tous les membres de ce complexe. En effet, il a été démontré qu'une activation adrénergique prolongée pouvait causer une augmentation des niveaux d'expression de la protéine $G\alpha_{12}$ alors que les niveaux d'expression de la protéine G_s ne semblent pas affectés (70). De plus, il semble également que l'insuffisance cardiaque provoque une réduction des niveaux d'expression de l'adénylate cyclase chez l'humain (71). Ainsi, il est nécessaire de dire que les données présentées ci-dessus mènent à une hypothèse selon laquelle l'activation sympathique jouerait un rôle central dans la progression de l'insuffisance cardiaque et que des interférences pharmacologiques avec ce système pourraient avoir des conséquences hémodynamiques bénéfiques. En outre, comprendre le mécanisme de la désensibilisation et les différentes protéines et molécules qui y sont

impliqués pourrait accroître les possibilités cliniques dans le traitement de l'insuffisance cardiaque.

1.2.4.8. La désensibilisation des récepteurs β -adrénergiques – désensibilisation homologue

De façon générale, la désensibilisation d'un récepteur se caractérise par une diminution de la réponse de celui-ci. On fait référence à une désensibilisation homologue lorsque la réponse cellulaire à un agoniste donné est atténuée en raison de l'exposition à ce même agoniste (71). Tel que présenté dans la figure 5, ce type de désensibilisation peut survenir à la suite d'une exposition aiguë ou chronique du récepteur à son agoniste, et peut engendrer la phosphorylation du récepteur

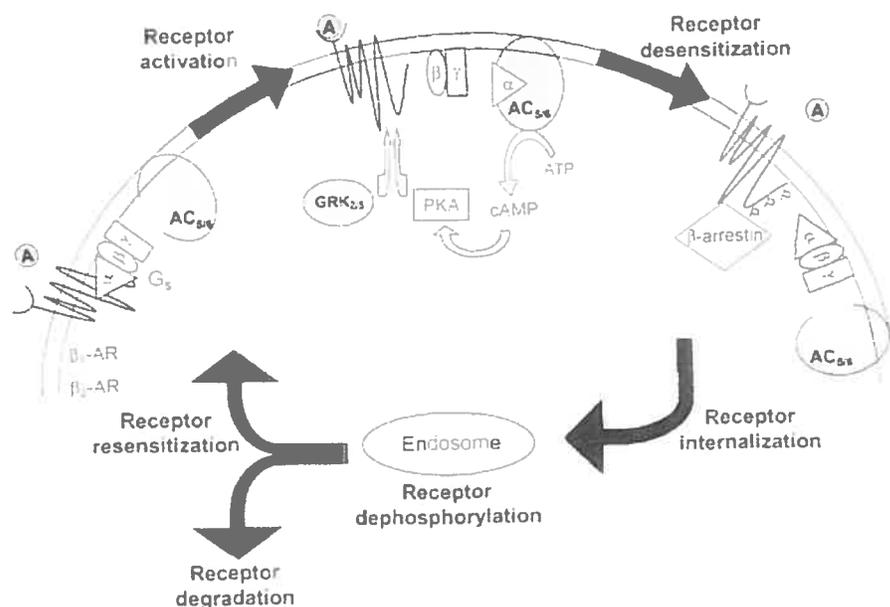


Figure 5. Activation et désensibilisation des récepteurs β -adrénergiques dans le cœur
 Figure tirée de Post, S.R., Hammond, H.K., et Insel, P.A. (1999) (70)

(exposition aiguë), ou l'internalisation et la régulation négative (exposition chronique). Ce phénomène a fait l'objet de nombreuses études, particulièrement sur le récepteur β_2 -adrénergique, mais les mécanismes de désensibilisation peuvent également affecter d'autres RCPG (64). Les différents événements qui mènent à cette désensibilisation sont aujourd'hui bien connus : suivant la liaison de l'agoniste au récepteur, ce dernier est phosphorylé au niveau des domaines intracellulaires par des protéines kinases, et cette phosphorylation est initiée seulement après les quelques minutes, voire même les quelques secondes qui suivent la stimulation. Deux types de kinases impliquées dans ce processus de phosphorylation ont été identifiées : la famille des *G-protein-coupled receptor kinase* (GRKs), qui compte six membres, dont *β -adrenergic receptor kinase 1*, (β ARK1 ou GRK2) et la protéine kinase dépendante de l'AMPc, (PKA) (71). La phosphorylation par les GRKs permet la liaison d'une molécule de β -arrestine au récepteur, et ceci cause l'arrêt de toute interaction entre le récepteur et la protéine G. La phosphorylation du récepteur entraîne également son déplacement au niveau de compartiments internes de la cellule où il pourra être déphosphorylé par des phosphatases localisées dans des vésicules intracellulaires et être ainsi recyclé à la membrane plasmique (71). Puisque la PKA peut phosphoryler les récepteurs β -adrénergiques en absence d'agoniste, on dit qu'elle est impliquée, de même que la PKC, dans la désensibilisation hétérologue des récepteurs qui sera expliqué plus loin.

Des mécanismes autres que la phosphorylation contribuent également à l'atténuation de la réponse des récepteurs suivant la stimulation par l'agoniste. En outre,

l'internalisation aussi appelée séquestration, de même que la régulation négative peuvent survenir lorsque la stimulation persiste pendant plusieurs heures. En effet, l'internalisation implique que les récepteurs phosphorylés par β ARK1 seront non seulement couplés à la β -arrestine, mais seront dirigés dans des vésicules de clathrines. La β -arrestine médie cette action en interagissant d'une part directement avec le récepteur phosphorylé, et d'autre part en recrutant deux composantes de l'appareil des vésicules de clathrines, soit la chaîne lourde de clathrine même, et la sous-unité β 2-adaptine de la protéine AP-2 (72). Cette action combinée cible les récepteurs à l'intérieur des vésicules de clathrines alors localisées à la surface de la cellule. Par la suite, ces vésicules quitteront la surface cellulaire en raison de l'action de la dynamine GTPase, impliquée dans le processus d'internalisation, et seront dirigées vers des endosomes où les récepteurs seront déphosphorylés et recyclés à la membrane. Plusieurs travaux ont par ailleurs émis la possibilité que certains récepteurs pouvaient également être séquestrés dans les cavéolae, qui constituent des invaginations membranaires riches en cholestérol et en cavéolines (73,74,75). À cet effet, Claing et ses collègues (74) ont publié des données intéressantes dans lesquelles ils proposent que les récepteurs VIP1 et ET_B emprunteraient des voies autres que l'internalisation via les vésicules de clathrines. En effet, il semblerait que la séquestration de ces récepteurs se fasse à l'intérieur des structures caeveolaires, puisque la mutation de la dynamine, dont la localisation a été détectée dans ces mêmes structures, module le patron d'internalisation de ces récepteurs. Toutefois, le mécanisme par lequel les récepteurs y seraient dirigés demeure encore obscur.

Finalement, la régulation négative implique non seulement une dégradation des récepteurs mais également une diminution de leur synthèse. En effet, les récepteurs phosphorylés seront dirigés vers des lysosomes, dans lesquels ils seront dégradés. Ce processus survient à la suite d'une stimulation prolongée et dans des conditions pathologiques, comme dans le cas de l'insuffisance cardiaque. Une perte définitive du nombre de récepteurs à la membrane est une caractéristique de ce phénomène, comme l'ont déjà démontré plusieurs études (76,77). De plus, une diminution de l'expression des récepteurs β_1 -AR au niveau de la protéine de même que de l'ARNm a également été observée dans des cardiomyocytes, suivant une stimulation à l'isoproterenol pendant 72 heures (77).

1.2.4.9. La désensibilisation des récepteurs β -adrénergiques – désensibilisation hétérologue

La désensibilisation hétérologue diffère de la désensibilisation homologue car le récepteur qui voit sa réponse atténuée n'est pas préalablement stimulé par son agoniste. Les principales protéines impliquées dans ce genre de désensibilisation sont la protéine kinase dépendante de l'AMPc, (PKA) et la protéine kinase C (71). Leur mécanisme d'action consiste en une phosphorylation du récepteur qui aura comme conséquence d'empêcher le couplage subséquent de ce même récepteur à la protéine G. Le terme hétérologue fait référence au fait que l'activation d'une kinase par un type de récepteur peut causer la phosphorylation et donc la désensibilisation d'un autre type de récepteur. Ceci implique donc deux systèmes hétérologues. En fait, une réaction qui augmente la quantité d'AMPc ou de diacyl glycérol, dans le cas de la

PKC, peut causer la désensibilisation de n'importe quel RCPG, du moment que celui-ci possède les sites de phosphorylations appropriés pour la PKA ou la PKC (78). La découverte de ces communications entre divers systèmes a fait émerger un nouveau champ d'études de la signalisation cellulaire : la régulation croisée (*receptor crosstalk*) sera le sujet de la prochaine section.

1.3. Régulation croisée : émergence d'un nouveau concept

Jusqu'à tout récemment, la signalisation cellulaire était décrite comme une séquence linéaire d'interactions comprenant un signal capable d'activer un récepteur, un effecteur qui génère des seconds messagers et une réponse cellulaire. C'est au début des années 1980 que les premiers travaux suggérant que certaines interactions étaient possibles entre les différentes voies de signalisations sont apparus dans la communauté scientifique, non pas sans scepticisme (79). Aujourd'hui, un grand nombre d'évidences ont démontré que la stimulation d'un RCPG peut non seulement influencer les événements directement attribués à ce récepteur, mais peut également moduler de façon parallèle des réponses qui concernent également d'autres RCPG. Ce phénomène de régulation croisée fait l'objet de nombreuses recherches dans le domaine scientifique et certains de ces travaux ont par ailleurs permis d'élucider de façon plus précise les mécanismes de signalisation responsables de la régulation physiologique du système cardiovasculaire. En effet, il y a au moins trois cascades de signalisation bien connues qui sont responsables de la modulation de la fonction cardiaque : les récepteurs β_1 -adrénergiques, impliqués dans le contrôle de l'appareil contractile du cœur, le système rénine-angiotensine-aldostérone qui contrôle la

pression sanguine, et les peptides natriurétiques qui contribuent à la régulation du volume circulatoire (80). Ces trois systèmes fonctionnent en parallèle avec entre autres les récepteurs α_1 -adrénergiques, les récepteurs à l'adénosine, à l'endothéline et aux opioïdes pour moduler la fonction cardiaque dans un processus de régulation croisée (81). Par exemple, il a été démontré dans des fibroblastes de rats que l'activation des récepteurs à l'endothéline ET-1 pouvait induire une phosphorylation des récepteurs α_1 -adrénergiques, possiblement via la PKC et la voie de signalisation des MAPK (81). De plus, d'autres travaux ont démontré que la stimulation des récepteurs α_1 -AR et β_1 -AR pouvait induire la transcription du peptide natriurétique auriculaire (ANP) dans des cardiomyocytes de rats néonataux (82), alors que la stimulation des récepteurs à l'angiotensine AT1R par l'angiotensine II menait à une diminution des α_{1A} -AR au niveau de l'ARNm (83). Ces mécanismes de régulation croisée impliquent d'une part les récepteurs adrénérgiques et d'autres récepteurs non-adrénérgiques et leurs conséquences varient, allant d'une altération fonctionnelle, à une modification transcriptionnelle des gènes. La prochaine section portera sur le mécanisme de régulation croisée qui implique précisément les récepteurs α_1 -ARs et β -ARs, puisqu'il est l'objet de la présente étude.

1.3.1. Régulation croisée entre les α_1 -ARs et les β -ARs

L'existence de plusieurs groupes de récepteurs qui participent à la régulation de la contractilité du cœur permet d'apprécier la complexité et la diversité des mécanismes qui régulent sa fonction. Sommes toutes, il est maintenant impossible de considérer que la modulation de la fonction cardiaque résulte d'un mécanisme de signalisation

unique. Les évidences qui démontrent que le cœur est en effet sujet à diverses influences suggèrent que ce dernier possède une machinerie inhérente qui lui permet d'intégrer les communications provenant des diverses cascades de signalisation et de fonctionner comme une entité propre. De plus, les mécanismes réactionnels observés dans des cas pathologiques démontrent qu'il y aurait en effet un mécanisme de désensibilisation hétérologue ou de régulation croisée qui impliquerait les α_1 -ARs et les β -ARs. En effet, nous avons vu précédemment que l'insuffisance cardiaque est caractérisée par une réduction de la réponse inotropique positive du cœur qui correspond à une diminution du nombre de récepteurs β_1 -AR (66,67). En outre, dans des préparations ventriculaires de cœurs explantés, plusieurs études ont permis de constater une diminution des niveaux d'expression des β_1 -ARs chez les patients souffrant d'insuffisance cardiaque (84,85,86) en plus d'une augmentation des niveaux d'expression des récepteurs α_1 -ARs dans ces mêmes conditions pathologiques (87,88). Ces modifications ont d'abord été interprétées comme étant une réponse compensatoire, en ce sens que les α_1 -ARs joueraient un rôle de réserve inotropique afin de compenser pour la baisse des niveaux d'expression des β_1 -ARs. Toutefois plusieurs évidences ont clairement illustré que tel n'était pas le cas et les prochaines sections illustreront de façon détaillée les conséquences de l'activation des α_1 -ARs sur les récepteurs β -adrénergiques.

1.3.1.1. Les effets de la stimulation des α_1 -AR sur les récepteurs β -adrénergiques

Plusieurs groupes de chercheurs se sont intéressés au phénomène de régulation croisée qui implique les récepteurs α_1 - et β -adrénergiques. En outre, Boutidjir et ses

collègues (89) ont démontré que la stimulation des α_1 -ARs avait un effet négatif sur la capacité des récepteurs β -ARs à stimuler les canaux Ca^{2+} . En effet, ces résultats obtenus dans des myocytes ventriculaires de rats adultes ont démontré que la stimulation des α_1 -ARs exerçait un effet inhibiteur sur la stimulation des canaux calciques de type-L par les β -ARs. De plus, dans un modèle de cœurs isolés de rats, il a été démontré que la présence d'agonistes des récepteurs α_1 -adrénergiques inhibait l'activité des récepteurs β -adrénergiques (90). Par ailleurs, certains travaux ont également permis de démontrer que la stimulation des α_1 -ARs avait un effet négatif sur la vitesse de raccourcissement maximale des myocytes ventriculaires de rats (91). Il semble donc que la stimulation des récepteurs α_1 -adrénergiques n'aurait pas l'effet bénéfique escompté, mais viendrait plutôt altérer de façon négative la capacité fonctionnelle des récepteurs β -adrénergiques.

1.3.1.2. Les conséquences de la surexpression des α_1 -AR sur les β -ARs

Les progrès dans le domaine de la génétique ayant permis de générer des modèles d'animaux transgéniques ont favorisé une nouvelle lancée de travaux permettant d'étudier de façon précise les effets de diverses altérations génétiques. Avec ces nouvelles techniques, Akhter et ses collègues (92) ont utilisé un modèle de souris transgéniques qui surexpriment le α_{1B} -AR. Les résultats rapportés témoignent que la surexpression des α_{1B} -ARs a engendré une modification fonctionnelle des β -ARs. En effet, les mesures de contractilité du ventricule gauche en réponse à l'isoprotérénol étaient diminuées de façon significative lorsque comparé au groupe de souris non-

transgéniques (92), alors que la densité des β -ARs était la même dans les deux groupes. D'autres travaux ont par ailleurs rapporté que la capacité contractile basale de même que les mouvements de calcium dans les cardiomyocytes étaient également réduits dans le groupe de souris transgéniques (93), traduisant par le fait même les effets de cette régulation croisée. Utilisant le même modèle d'animaux transgéniques, un autre groupe de chercheurs a voulu étudier l'effet de la surexpression des α_{1B} -ARs sur les caractéristiques pharmacologiques et fonctionnelles récepteurs β -adrénergiques. Lemire et ses collègues (94) ont par ailleurs démontré que la capacité des β -ARs à stimuler l'adénylate cyclase était réduite de façon significative comparativement au groupe contrôle, et ce, pour une densité de récepteurs β -adrénergiques similaire. De plus l'utilisation de la phentolamine, qui est un inhibiteur spécifique des α_1 -ARs n'a pas eu d'effet sur la capacité de la forskoline ou du fluorure de sodium à stimuler l'adénylate cyclase, ce qui suggère que ni la protéine G ni l'adénylate cyclase ne sont fonctionnellement influencées par la surexpression des α_{1B} -ARs.

Parallèlement à cela, ces manipulations génétiques ont également permis de découvrir des résultats intéressants chez les souris dont l'expression du gène du récepteur α_1 -adrénergique est abolie (*knockout*). En effet, il semble que chez les souris dont l'expression d'un récepteur seul est inexistante, par exemple le α_{1A} -AR ou le α_{1D} -AR, le développement ainsi que la fonction cardiaques sont normaux (95,96). Par contre lorsque c'est le gène du α_{1B} -AR qui est aboli, on note chez ces souris une fonction cardiaque anormale, c'est-à-dire une contractilité

Strain		α_{1A} -AR	Refs	α_{1B} -AR	Refs	α_{1D} -AR	Refs
KO	Cardiac development	Normal	[5]	Normal	[4]	Normal	[6]
	Cardiac function	Normal	[5]	Decreased contractility	[19]	Normal	[6]
	Aortic contractility			Decreased	[4]	Decreased	[6]
	Pressor response	Decreased to A61603 Normal to PE	[5] [5]	Decreased to PE/NE Decreased activity	[4,29] [57]	Decreased to PE/NE	[6]
OE	CNS			Cardiac hypertrophy	[8]		
	α -MHC promoter/constitutive active			Cardiac dysfunction	[9,20]		
	α -MHC promoter/wild type	Enhanced cardiac contractility	[12]	Dilated cardiomyopathy	[21]		
	Isogenic promoter			Cardiac hypertrophy	[11]		
				Decreased CA	[11]		
				Hypotension	[11]		
				Autonomic failure	[10]		
				Neurodegeneration	[10]		

Abbreviations : AR, adrenoceptor; CA, catecholamines; CNS, central nervous system; KO, knockout mice; MHC, myosin heavy chain; NE, norepinephrine; OE, overexpression; PE, phenylephrine.

Tableau 1. Effets physiologiques causés par l'altération de l'expression du gène du récepteur α_1 -AR chez la souris.

Tableau tiré de Tanoue et al. (2003) (98)

diminuée (97). À cet effet, le tableau 1 résume bien quelques unes des études qui ont été publiées concernant la surexpression et la suppression des gènes du α_1 -AR. Ainsi, de façon générale, ces manipulations génétiques conjuguées aux études pharmacologiques permettent de cerner et de mieux comprendre le ou les rôles principaux de ces types de récepteurs au niveau de la contractilité cardiaque, de l'hypertrophie et du développement du cœur.

1.3.1.3. Les effets de la stimulation des α_1 -AR sur le métabolisme de l'AMPc

Toujours dans la lancée des travaux permettant d'élucider le mécanisme de régulation croisée, plusieurs ont observé des résultats contradictoires concernant l'effet de la

stimulation des α_1 -ARs sur le métabolisme de l'AMPc. En effet, Nabika et ses collègues ont démontré que la stimulation des récepteurs couplés à l'hydrolyse du phosphatidyl-inositol (PI) avait pour effet d'augmenter la production d'AMPc médiée par la stimulation des β -ARs (99). Des résultats similaires ont également été observés dans des pinéaloctes de rats où la stimulation des α_1 -ARs a également eu comme effet de faciliter la production d'AMPc par les β -ARs (100). Toutefois, Buxton et Brunton (101) ont publié dans la même année des résultats contradictoires à ceux mentionnés ci-dessus. En effet, ils ont remarqué à l'aide d'essais d'adénylate cyclase que l'accumulation d'AMPc cellulaire était réduite dans des myocytes ventriculaires de rats adultes suivant la stimulation des α_1 -ARs, possiblement due à une activité accrue des phosphodiésterases (PDE). Ces résultats suggèrent que la stimulation des récepteurs α_1 -adrénergiques n'empêcherait pas la production d'AMPc, mais qu'elle augmenterait sa dégradation, puisque l'addition des inhibiteurs de PDE avait renversé cet effet. Par contre, en 1993, des données publiées allaient encore une fois contredire les résultats précédents. En effet, des études ont démontré que la stimulation des α_1 -ARs par la phényléphrine et le méthoxamine réduisait l'accumulation d'AMPc dans des myocytes de rats néonataux, et ce, sans augmentation de l'activité des phosphodiésterases (102). Ces auteurs suggèrent que l'occupation des récepteurs α_1 -adrénergiques empêcherait l'accumulation d'AMPc médiée par les récepteurs β -adrénergiques via un couplage à la protéine G_i . En effet, un traitement au préalable avec la toxine pertussique, un inhibiteur de la protéine G_i , a augmenté d'une part la génération d'AMPc, et d'autre part l'activation de l'enzyme adénylate cyclase. À la lumière de ces résultats, il est nécessaire de dire que le mécanisme de régulation

croisée entre les α_1 -ARs et le métabolisme de l'AMPc n'est pas complètement résolu et que les nombreuses composantes de ces systèmes sont encore au cœur de bien des recherches.

Les évidences présentées ci-dessus concernant l'existence d'un mécanisme de régulation croisée entre les α_1 -ARs et les β -ARs ne constituent qu'un survol des différents travaux qui ont contribué à élucider ce phénomène. Il ne fait plus de doute aujourd'hui que la stimulation des α_1 -ARs module l'activité des récepteurs β -adrénergiques et la compréhension des différentes composantes impliquées dans ce processus est d'une importance cruciale. En raison de notre étude, nous nous pencherons plus en détail sur le rôle de la protéine kinase C dans la désensibilisation hétérologue des récepteurs β_1 - et β_2 -adrénergiques et les prochaines sections présenteront les indices qui nous ont amené à emprunter une telle avenue.

1.4. La protéine kinase C : structure et classification

Nous savons que toutes les cellules eukaryotes ont la capacité de s'adapter aux changements qui surviennent dans l'environnement intracellulaire, de même que de répondre aux stimuli qui proviennent de l'extérieur de la cellule. La plupart de ces réponses fonctionnelles nécessitent la phosphorylation de diverses protéines intracellulaires qui, lorsque phosphorylées, vont médier de nombreuses réactions. La classe d'enzymes qui catalyse la phosphorylation de différents substrats et permet ainsi ces événements fonctionnels comprend la classe des protéines kinases. Les protéines kinases sont divisées en deux catégories, et cette division tient du fait

qu'elles phosphorylent soit les résidus sérines/thréonines, soit les résidus tyrosines. La protéine kinase C fait partie de la classe des sérine/thréonine et elle fut décrite pour la première fois en 1979 par Takai et ses collègues (103) qui ont d'abord noté que son activation était dépendante du calcium et des phospholipides membranaires. Une année plus tard, ce sont les travaux de Kuo (104) qui ont rapporté que la PKC était exprimée dans la plupart des tissus, incluant le cœur. La poursuite des études visant à élucider plus spécifiquement la structure de la PKC a permis de découvrir que cette kinase ne relevait pas seulement d'une entité moléculaire simple, mais que plusieurs isoformes distincts existaient dans les cellules mammifères. Tel que démontré dans la figure 6, nous savons aujourd'hui que 11 isoformes de la PKC existent et qu'ils

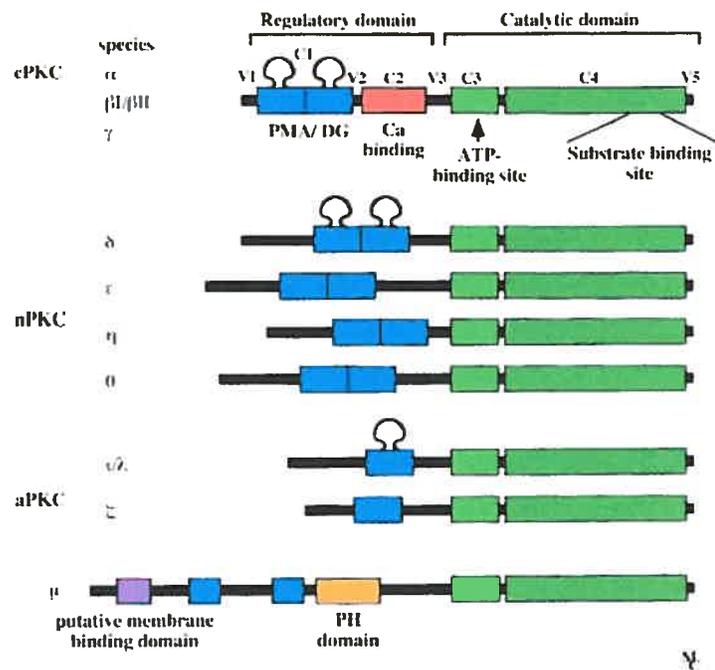


Figure 6. Classification des différents isoformes de la PKC

Figure tirée de Mochly-Rosen, D. et Gordon A.S. (1998) (105)

sont classés en trois sous-groupes, selon leurs propriétés régulatrices respectives qui sont régies par des domaines spécifiques. Les PKC classiques ou conventionnelles (cPKC) qui comprennent les isoformes α , β I, β II et γ , les PKC nouvelles (nPKC) qui regroupent les isoformes δ , ϵ , η et θ , et le troisième sous-groupe, soit les PKC atypiques (aPKC) qui incluent les isoformes ν/λ et ζ . Toutefois, tous les isoformes de la PKC sont composés d'une chaîne polypeptidique simple et comportent certains facteurs structuraux similaires. En effet, la présence de domaines conservés (C) entrecoupés de domaines variables (V) sont une des caractéristiques commune des PKC (105,106). Aussi, le domaine régulateur de la protéine est situé sur la portion N-terminal et comprend les régions V₁-C₂, alors que le domaine catalytique est situé au niveau du C-terminal de la protéine et inclut les régions V₃-V₅ (106). Tous les isoformes de la PKC sont également caractérisés par la présence d'un site de couplage pour l'ATP au niveau du domaine C₃ et possèdent également, au niveau du domaine C₄, le site de liaison au substrat. Ce qui caractérise les cPKC est la présence de quatre domaines homologues C₁, C₂, C₃, C₄, tous séparés par des domaines variables (105). Ces isoformes peuvent être activés par le calcium, les phosphatidylserines (PS), le DAG et les phorbol esters. Ce qui caractérise principalement les cPKC, est qu'ils dépendent du calcium pour leur activation, et c'est précisément au niveau du domaine C₂ que se situe ce site de liaison au calcium, alors que le site de liaison au DAG et aux PS se situe au niveau du domaine C₁. En ce qui concerne les nPKC, ils ne possèdent pas le domaine C₂ et ne dépendent donc pas du calcium pour leur activation, mais répondent au DAG et aux phorbol esters en présence des PS (107). Quant aux aPKC, ils sont également caractérisés par

l'absence du site de liaison au calcium et sont résistants à l'activation par le DAG et les phorbol esters. Par contre, les molécules capables d'activer les aPKC sont les PS, le phosphatidylinositol triphosphate (3,4,5-IP₃) et possiblement l'octapeptide angiotensine II (108,109).

1.4.1. La protéine kinase C : distribution tissulaire

Les techniques d'immunobuvardage de type Western et d'analyse de transfert par Northern ont permis à plusieurs de détecter la présence de différents isoformes de la PKC dans de nombreux tissus. Toutefois, cette distribution n'est pas uniforme et démontre combien la spécificité individuelle caractérise les différents isoformes de la PKC. En effet, les PKC α , β , δ , ϵ et ζ ont été observés dans plusieurs tissus, incluant le cerveau, le cœur, les muscles squelettiques, les poumons et la peau (110,111,112), alors que l'expression de la PKC γ serait presque exclusivement réservée au système nerveux (113). Puisque le sujet de notre étude concerne principalement le rôle de la PKC dans la désensibilisation des récepteurs β_1 - et β_2 -adrénergiques au niveau du cœur, nous nous attarderons plus spécifiquement aux isoformes de la PKC qui ont été détectés dans le tissu cardiaque. À cet effet, Shin et ses collègues (114) ont publié des résultats fort intéressants dans lesquels ils ont détecté la présence de plusieurs isoformes de la PKC dans des cœurs humains explantés. À l'aide de techniques d'immunobuvardage de type Western, ils ont tenté de détecter la présence des 11 isoformes de la PKC dans des préparations provenant de ventricules gauches de patients normaux et de patients souffrant d'insuffisance cardiaque (classes III-IV). Les résultats de leur étude présentés à la page suivante démontrent qu'il y aurait

effectivement présence de 9 isoformes de la PKC dans le cœur humain (Tableau 2), et ce, dans les deux groupes de patients. Ils n'ont cependant pas tenté de déterminer si dans des conditions pathologiques, les niveaux d'expression de certains isoformes pouvaient être altérés en raison de la variabilité quantitative observée due à une dégradation protéique possible de leurs échantillons. Toutefois, Bowling et ses collègues (107) ont observé une augmentation des niveaux d'expression de la PKC β I,

PKC isoforms	Molecular weight (kDa)	Location of expression	Bands detected
PKC- α	83	Soluble/particulate	Single
PKC- β I	83	Soluble/particulate	Single
PKC- β II	85, 83, 78	Soluble/particulate	Triplet
PKC- γ	—	—	None
PKC- δ	74, 70	Soluble/particulate	Doublet
PKC- ϵ	96, 93	Soluble/particulate	Doublet
PKC- η	78	Mainly particulate	Single
PKC- θ	—	—	None
PKC- ζ	72	Mainly soluble	Single
PKC- ι	72	Mainly soluble	Single
PKC- μ	106	Mainly particulate	Single

Tableau 2. Caractérisation des isoformes de la PKC détectés dans le ventricule gauche humain par immunobuvardage de type Western.

Tiré de Shin, H-G. et al. (2000) (114)

β II et α , de même qu'une augmentation de l'activité enzymatique de ces mêmes isoformes dans les fractions membranaires de cœur de patients souffrant d'insuffisance cardiaque. Des résultats similaires ont également été observés chez les rongeurs où il a été possible de remarquer que les animaux qui souffraient d'insuffisance cardiaque, d'hypertrophie ou étaient dans des situations post-infarctus

présentaient également des niveaux d'expression plus élevés des isoformes α , β , ϵ et ζ de la PKC (116,117,118,119).

1.4.2. La protéine kinase C : modes d'activation et de signalisation

Les mécanismes d'activation et de signalisation de la PKC sont aujourd'hui bien connus. En effet, les PKC nouvellement synthétisées sont liées à la membrane plasmique dans un état non-phosphorylé où elles sont inactives. Un des événements critiques de la régulation de la PKC est la phosphorylation par la kinase PDK-1 au niveau des boucles d'activations (120). La conséquence immédiate de cette réaction est l'autophosphorylation de la PKC au niveau de deux sites clés situés à l'extrémité C-terminal de la protéine. Suivant cette phosphorylation, l'enzyme quitte la membrane plasmique et est relâché dans le cytosole où il est maintenu dans une conformation inactive en raison de son couplage au domaine du pseudo-substrat, qui agit en quelque sorte comme une séquence auto-inhibitrice. Le recrutement de la PKC à la membrane en réponse au DAG et aux PS fournit l'énergie nécessaire afin de libérer le site de liaison du substrat qui était jusque là occupé par le domaine du pseudo-substrat, et permet ainsi l'activation de la PKC. Toutefois, la diversité des réponses biologiques qui découlent de l'activation des PKC est impressionnante et cette diversité tient du fait que chaque isoforme de la PKC possède un site de localisation distinct qui dicte pour ainsi dire sa disponibilité pour différents substrats. En effet, des techniques d'immunofluorescence ont permis de détecter les différents isoformes de la PKC inactifs dans diverses structures cytosoliques, et suivant leur activation, leur translocation a été observée dans des nouveaux sites distincts. Par

exemple, dans son état inactif, PKC β II est associée aux structures fibrillaires des cardiomyocytes, et il semble que son activation favorise sa translocation au niveau de la région périnucléaire ainsi qu'en périphérie cellulaire (121,122). De plus, les mêmes auteurs ont également observé le déplacement de la PKC ϵ de la région périnucléaire au niveau des structures striées des éléments contractiles des cardiomyocytes (121,122). Gordon et ses collègues ont aussi observé dans des cellules de type NG108-15, la translocation de la PKC δ de la région de l'appareil de Golgi, où elle réside dans sa forme inactive, aux régions nucléaires et périnucléaires (123). Évidemment, ceci ne représente que quelques exemples de la diversité des différents substrats ciblés par la PKC dans divers types cellulaires, et il va s'en dire que les conséquences physiologiques émanant de l'activation de ces différents isoformes sont toutes aussi nombreuses.

1.5. Rôle de la PKC dans la désensibilisation hétérologue des récepteurs β -adrénergiques

1.5.1. Premiers indices

Tel que mentionné précédemment, plusieurs travaux ont permis de démontrer qu'il y avait effectivement un mécanisme de régulation croisée qui existait entre les récepteurs α_1 -AR et β -adrénergiques. Les recherches visant à identifier les différentes molécules susceptibles de participer à ce phénomène ont fait part à plusieurs reprises de la participation probable de la PKC dans ce mécanisme. En effet, dans les années 1980, plusieurs ont rapporté que le traitement au phorbol ester, qui est un activateur non spécifique de la PKC, avait pour effet de diminuer la réponse de l'adénylate

cyclase suivant la stimulation des récepteurs β -adrénergiques dans des érythrocytes aviaires (124,125). Parallèlement à ces données, il a également été possible de constater une augmentation de la phosphorylation des récepteurs β -adrénergiques dans ces mêmes cellules. Des résultats similaires ont également été observés, cette fois dans des cellules mammifères (126,127,128), et il devenait de plus en plus évident que le mécanisme par lequel la PKC exerçait son effet serait probablement via une phosphorylation directe des récepteurs β -adrénergiques. En outre, nous savons que la structure primaire du récepteur β_2 -adrénergique possède deux sites de phosphorylation pour la PKA, soit au niveau de la troisième boucle intracellulaire ($_{259}RRSSK$) et au niveau du C-terminal ($_{343}RRSSLK$) (129). Des techniques de mutagenèse dirigée avaient par ailleurs établi que ces sites étaient effectivement phosphorylés par la PKA en réponse à la présence d'agonistes des récepteurs β -adrénergiques (130,131). De plus, l'identification de résidus basiques de chaque côté des sérines faisait en sorte que ces sites de phosphorylation pouvaient devenir des cibles potentielles pour la PKC (132) et pourrait ainsi expliquer l'effet des phorbol esters sur la capacité des récepteurs β -adrénergiques à stimuler l'adénylate cyclase. Par ailleurs, des expérimentations faites à l'aide de peptides synthétiques comprenant les deux sites de phosphorylation des PKA/PKC ont effectivement révélé être des substrats *in vitro* pour la PKA, ainsi que pour la PKC (131,132).

1.5.2. Conséquences de la régulation croisée des α_{1B} -AR sur les β -ARs :

la PKC est-elle impliquée?

Nous avons vu dans une des sections précédentes que la surexpression des α_{1B} -ARs dans un modèle de souris transgéniques avait affecté le fonctionnement des récepteurs β -adrénergiques et laissait pour ainsi dire, présager l'existence d'un mécanisme de régulation croisée entre les deux types de récepteurs. En effet, Akhter et ses collègues (92) avaient observé une diminution des mesures de contractilité du ventricule gauche dans le groupe de souris transgéniques, ce qui laissait sous-entendre que d'importantes interactions entre la signalisation des α_{1B} -ARs et des β -ARs seraient impliquées dans ce phénomène. Parallèlement à ces travaux, Lemire et ses collaborateurs (94) avaient également obtenus des résultats qui allaient dans le même sens que ceux présentés par Ahkter, puisqu'ils avaient constaté, dans le groupe de souris transgéniques, une diminution de la capacité des récepteurs β -adrénergiques à stimuler l'adénylate cyclase. Considérant d'une part le fait que la PKC est activée suivant la stimulation des récepteurs α_{1B} -adrénergiques et d'autre part la disponibilité des évidences de plus en plus nombreuses concernant le rôle des phorbol esters dans la régulation des récepteurs β -adrénergiques, ces chercheurs ont voulu vérifier l'implication de la PKC dans ce processus. À l'aide des techniques d'immunobuvardage de type Western, ils ont comparé les niveaux d'expression de certains isoformes de la PKC dans les cœurs de souris transgéniques et les résultats qu'ils ont obtenus suggèrent que la PKC pourrait effectivement jouer un rôle dans la désensibilisation hétérologue des récepteurs β -adrénergiques. En effet, ils ont remarqué une augmentation des niveaux d'expression des isoformes β II, δ et ϵ dans

le groupe de souris qui surexpriment le α_{1B} -AR (94). Cette augmentation a par ailleurs été détectée non seulement dans la quantité de PKC totale, mais également dans la fraction membranaire des cœurs de souris, ce qui laisse sous-entendre une activation accrue de ces isoformes. Cette constatation, avec entre autres les évidences mentionnées précédemment, suggèrent que la PKC jouerait un rôle dans le phénomène de régulation croisée qui implique les récepteurs α_1 - et β -adrénergiques.

1.6. Fondements de l'hypothèse de l'étude

Tel que présenté dans les pages précédentes, le concept de régulation croisée a, depuis les 20 dernières années, retenu l'attention de nombreux groupes de chercheurs, et il est généralement accepté que la stimulation d'un RCPG peut moduler de façon parallèle des réponses qui concernent également d'autres RCPG. En outre, l'impact d'un tel phénomène au niveau des récepteurs adrénérgiques ainsi que ses conséquences physiologiques font que l'élucidation précise des mécanismes impliqués dans une telle régulation sont d'une importance cruciale. Les nombreux indices présentés ci-dessus suggérant que la PKC pourrait effectivement jouer un rôle dans la désensibilisation hétérologue des récepteurs β_1 - et β_2 -adrénergiques sont des éléments qui nous ont fait emprunter une telle avenue.

1.6.1. Potentiel de désensibilisation des β_1 - et β_2 -ARs par la PKC

Il est aujourd'hui bien accepté que la phosphorylation des récepteurs β_1 - et β_2 -adrénergiques est, entre autres choses, une des caractéristiques qui témoigne de leur désensibilisation. En outre, les mécanismes impliqués dans la désensibilisation

homologue sont bien connus mais il reste que les phénomènes qui provoquent la désensibilisation hétérologue, eux, sont plus obscurs et plus complexes. Nous avons vu que les récepteurs β_1 - et β_2 -adrénergiques possèdent des sites de phosphorylation pour la PKA, et la présence de résidus basiques qui entourent ces sites font qu'ils constituent également une cible intéressante pour la PKC. Parmi les différentes molécules susceptibles de provoquer une phosphorylation, la PKC a retenu notre attention en raison des nombreuses données rapportées concernant l'effet des phorbol esters sur les récepteurs β -adrénergiques. De plus, l'augmentation des niveaux d'expression des isoformes β_{II} , δ et ϵ de la PKC, observée dans un modèle de souris transgéniques qui surexpriment le α_{1B} -AR ont été, à nos yeux, des évidences qui nous ont poussé à vérifier le rôle de différents isoformes de la PKC sur la désensibilisation des récepteurs β_1 - et β_2 -adrénergiques.

1.7. Volets de l'étude

1.7.1. Choix des isoformes de la PKC

La plupart des études qui ont tenté de déterminer le rôle de la PKC dans la désensibilisation des récepteurs β -adrénergiques l'ont fait sans distinction spécifique entre les différents isoformes. En effet, l'utilisation du phorbol ester qui est un activateur non spécifique, stimule l'ensemble des isoformes de la PKC, mais ne permet pas d'étudier de façon unique le rôle d'un isoforme en particulier. Nous avons choisi de transfecter distinctement 4 isoformes de la PKC, actifs de façon constitutive, dans des cellules de type HEK 293, afin de vérifier précisément s'ils modulaient l'activité des récepteurs β_1 - et β_2 -adrénergiques. Parmi les 11 isoformes

de la PKC qui existent et considérant leur distribution tissulaire variée, il était important, en raison de notre étude, d'arrêter notre choix sur des isoformes dont la présence avait déjà été détectée dans le cœur humain. À cet égard, notre choix s'est arrêté sur les isoformes α , β II, ϵ et ζ . En plus d'être présents dans le cœur humain (114), ces isoformes font partie des trois sous-groupes qui caractérisent la famille des PKC : PKC α et PKC β II font partie de la famille des PKC conventionnelles, PKC ϵ appartient au groupe des PKC nouvelles, et PKC ζ compte parmi le groupe des PKC atypiques.

1.7.2. Conséquences fonctionnelles de la surexpression des isoformes de la PKC sur les β -ARs

Le but principal de notre étude étant de vérifier si la PKC cause une désensibilisation hétérologue des récepteurs β -adrénergiques, nous avons effectué des essais d'adénylate cyclase qui consistent à mesurer la production d'AMPc suivant la stimulation des récepteurs par un agoniste. Bien des études ont démontré qu'effectivement, la PKC modifie de façon négative l'activité des récepteurs (124,125,126), mais peu se sont attardé à vérifier si les récepteurs pouvaient être différemment affectés par les différents isoformes de la PKC. Nous savons qu'il existe des différences dans le couplage de ces deux types de récepteurs (59,60,61) et il était essentiel pour nous de tester l'effet des différents isoformes de la PKC, de façon distincte, sur les β_1 -ARs et les β_2 -ARs.

1.7.3. Interactions physiques entre la PKC et les β -ARs

Il est bien établi qu'une des conséquences de l'activation de la PKC est sa translocation du cytosole à la membrane plasmique (121,122,123) pour mieux interagir avec leurs cibles. Afin de vérifier si la PKC interagit directement avec les β -ARs, nous avons utilisé la technique de co-immunoprécipitation afin de voir si effectivement, il y a translocation des isoformes de la PKC et interaction directe avec les β -ARs.

1.7.4. Phosphorylation des récepteurs

Nous savons qu'un des mécanismes impliqué dans la désensibilisation hétérologue est causé par la phosphorylation des récepteurs. Afin de vérifier si la PKC pouvait causer ce phénomène, la mutation des sites de phosphorylation (PKA/PKC) des récepteurs β_1 et β_2 -adrénergiques a été effectuée et des essais d'adénylates cyclases ont par la suite été conduits afin de déterminer si cette modification renversait l'effet préalablement observé par les différents isoformes de la PKC.

CHAPITRE 2. ARTICLE : *Role of specific protein kinase C isoforms in modulation of β_1 - and β_2 -adrenergic receptors.*

Role of specific protein kinase C isoforms in modulation of β_1 - and β_2 -adrenergic receptors.

Julie Guimond^{1,2}, Aida M. Mamarbachi¹, Bruce G. Allen^{1,3}, Hansjörg Rindt⁴
and Terence E. Hébert^{1,3,5†}

- 1) Centre de recherche, Institut de Cardiologie de Montréal
- 2) Programme de Sciences Biomédicales, Université de Montréal
- 3) Département de biochimie et Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Autonome, Université de Montréal
- 4) Myogen, Inc. 7575 W. 103rd Avenue, Suite 102 Westminster, CO 80021-5426
- 5) Département d'anesthésiologie, Université de Montréal

† To whom correspondence should be addressed

T. E. Hébert

Centre de Recherche, Institut de Cardiologie de Montréal

5000 rue Bélanger est, Montréal, PQ, Canada, H1T 1C8

Phone (514) 376-3330 ext. 3473

Fax (514) 376-1355

██

Keywords : G protein-coupled receptors, molecular crosstalk, protein kinase C, adrenergic receptors.

Summary

The function of β AR is modulated by the activity status of α_1 -adrenergic receptors (α_1 AR) via molecular crosstalk and this becomes evident when measuring cardiac contractile responses to adrenergic stimulation. The molecular mechanism underlying this crosstalk is unknown. We have previously demonstrated that overexpression of α_{1B} AR in transgenic mice leads to a marked desensitization of β AR-mediated adenylyl cyclase stimulation which is correlated by increased levels of activated PKC β , δ and ϵ (Lemire *et al.*, 1998 J. Mol. Cell. Cardiol. 30:1827-1839). Therefore, we wished to determine which PKC isoforms play a role in heterologous β AR desensitization and also which isoforms of the β AR were the molecular target(s) for PKC. In experiments using constitutively activated (CA) PKC expression constructs transfected into HEK 293 cells also expressing the β_2 AR, CA-PKC overexpression was first confirmed by immunoblots using specific anti-PKC antibodies. We then demonstrated that the different PKC subtypes lead to a decreased maximal cAMP accumulation following isoproterenol stimulation with a rank order of PKC α \geq PKC ζ > PKC ϵ > PKC β II. However, a much more dramatic desensitization of adenylyl cyclase stimulation was observed in cells co-transfected with different PKC isoforms and β_1 AR. Further, the modulation of β_1 AR by PKC isoforms had a different rank order than for the β_2 AR: PKC β II > PKC α > PKC ϵ > PKC ζ . PKC-mediated desensitization was reduced by mutating consensus PKA/PKC sites in the third intracellular loop and/or the carboxy-terminal tail of either receptor. Our results demonstrate that the β_1 AR is the most likely molecular target for PKC-



mediated heterologous desensitization in the mammalian heart and that modulation of adrenergic receptor activity in any given cell type will depend on the complement of PKC isoforms present.



Introduction

Transmembrane signalling is a fundamental cellular mechanism by which various signals alter the response of effector proteins, either directly or through the production of intracellular second messengers. Alpha- and beta-adrenergic receptors (α AR and β AR, respectively) are members of an extensive family of membrane proteins containing 7 membrane-spanning regions. In the heart, the various adrenergic receptors are also important regulators of the chronotropic, inotropic and lusitropic responses and play a significant role in the development of heart failure (see (1-3) for review).

Prolonged exposure of receptors to agonists leads to a time-dependent loss of responsiveness which has been termed desensitization. Two basic types of desensitization have been defined, both of which rely on phosphorylation of the receptor (see (4-6) for review). Homologous desensitization refers to the specific loss of an agonist-mediated signal while other receptor systems remain intact. Generally, homologous desensitization requires agonist-dependent phosphorylation by a group of receptor-specific kinases known as GRKs (G protein-coupled receptor kinases). Heterologous receptor desensitization refers to a general decline in responsiveness in multiple receptor systems when second messenger-generating systems activate enzymes such as cAMP-dependent protein kinase (PKA) and/or PKC regardless of their agonist occupancy. This latter type of regulation has also been referred to as

molecular crosstalk. Both types of receptor desensitization have been demonstrated to regulate both β_1 AR and β_2 AR (7-10).

There is significant molecular crosstalk between the α - and β -adrenergic systems. α_1 AR are predominantly coupled to the inositide-specific phospholipases via members of the Gq family of G proteins (11-13). Activation of this pathway leads to formation of the second messengers inositol-triphosphate and diacylglycerol which modulate intracellular calcium concentration and PKC activity, respectively (12). A number of studies have also demonstrated that α_1 AR activation can inhibit β AR-mediated modulation of cardiac Cl^- and Ca^{2+} channels (14,15). In isolated rat hearts, α_1 AR agonists inhibit the activity of β AR in a model of ischemia-reperfusion (16). Thus, heterologous desensitization of β AR via α_1 AR may represent an important mechanism to regulate β AR activity.

Both homologous and heterologous desensitization of adrenergic receptor signalling has been linked to the development and progression of heart failure. Heart failure is characterized by a decrease in the positive inotropic response, which correlates with desensitization of β_1 AR and β_2 AR (see (17) for review). Further, although β_2 AR numbers remain relatively unaffected there are significant decreases in levels of β_1 AR during the progression towards heart failure. We have demonstrated that α_{1B} AR overexpression leads to the development of dilated cardiomyopathy and heart failure (18). Evidence also suggests that heterologous desensitization of β AR via

α_1 AR occurs in these animals. In fact, overexpression of α_{1B} AR in transgenic mice lead to a decreased AC stimulation by β AR involving both GRKs (19) and PKC (20). Specifically in the latter study, increased expression levels and membrane localization of PKC β II, PKC δ , and PKC ϵ have also been found in these animals, suggesting a possible role for PKC in that heterologous desensitization (20). The different PKC isoforms comprise a family of 11 members, classified into 3 groups according to their regulatory properties. The activity of conventional protein kinase isozymes (cPKCs; α , β I, β II and γ) is stimulated by diacylglycerol, calcium, and phosphatidylserine, that of novel isozymes (nPKCs; δ , ϵ , η /L and θ) by diacylglycerol and phosphatidylserine, and that of atypical PKC isoforms (aPKCs; ζ , ι / λ) by phosphatidylserine (see (21,22) for review). PKC isoforms from all three families are expressed in the mammalian heart (23,24).

Although the effects of specific GRKs and PKA on receptor desensitization have been well characterized, little information exists on the role of individual isoforms of PKC on desensitization of either β_1 AR or β_2 AR. Our goal was to determine which PKC isoforms are implicated in this process and whether β_1 AR or β_2 AR would be differentially affected. Thus we expressed various constitutively active isoforms (α , β II, ϵ and ζ) from the three PKC families with either the β_1 AR or β_2 AR in HEK 293 cells and determined whether isoproterenol-stimulated adenylyl cyclase activity was altered.

Experimental Procedures

Materials

Unless otherwise stated, all chemicals were of reagent grade or higher and were obtained from Sigma.

Eukaryotic Expression Vectors.

PKC isoforms- Constitutively activated (containing mutations or deletions in the pseudosubstrate domains) versions of bovine PKC α (A25E) and PKC β II (Δ aa6-159), rat PKC ϵ (A148E) and mouse PKC ζ (Δ aa1-238) were subcloned into the cytomegalovirus (CMV) expression vector pRc-CMV (InVitrogen) as described previously (25-28).

HA- β ₁AR- The *Hind*III/*Xho*I fragment of the plasmid pCMV-HA- β ₁AR, which encodes the murine β ₁AR (a generous gift of Dr. Brian Kobilka, Stanford University), was subcloned into the *Hind*III/*Xho*I site of pcDNA3 (RSV; InVitrogen) plasmid to yield pcDNA3 (RSV)-HA- β ₁AR. This construct was used to create a HA- β ₁AR mutated in a consensus PKA/PKC site- β ₁AR (S301A).

His β ₂AR-YFP- A His β ₂AR-YFP construct which recapitulates properties of wildtype human β ₂AR was used as described previously (29-31). A mutated β ₂AR construct with both consensus PKA/PKC sites altered (β ₂AR (S261A; S262A; S345A; S346A), (32)) was subcloned into pcDNA3.

EGFP- As a control for transfections, EGFP in pcDNA3 (Clontech) was used. All constructs were verified by restriction analysis and bi-directional sequencing.

Cell Culture and Transfection.

HEK 293 cells were cultured in DMEM containing 10% fetal calf serum (Mediacorp) and 100 units/ml penicillin/streptomycin and 2mM L-glutamine (InVitrogen). Transfection of β ARs and all CA-PKC isoforms was performed with LipofectAMINE 2000 reagent (InVitrogen), according to the manufacturer's protocol. Briefly, medium was aspirated from 75cm² flasks and cells were washed with 5ml Opti-Mem (InVitrogen). For each plate to be transfected, 5 μ g of each cDNA was diluted into 200 μ l of medium without serum (37°C), and 30 μ l of LipofectAMINE was diluted into 100 μ l of Opti-Mem (37°C). Once the LipofectAMINE was diluted, it was combined with the DNA mixture, incubated at room temperature for 15 minutes, and spread onto cells in 5ml of serum-free DMEM. Flasks were incubated at 37°C in a 5% CO₂ incubator for 3 to 5 hours and 5ml of DMEM containing 20% fetal calf serum was added. 24h later, medium was aspirated and replaced with DMEM containing 10% fetal calf serum. 48h after transfection, cells were prepared for determination of adenylyl cyclase activity, immunoprecipitation, metabolic labelling or for Western blotting as described below. Determination of transfection efficiency was confirmed by Western blot analysis and percentage of GFP-positive cells.

Membrane preparation.

Membranes were prepared from cells 48h after transfection as described previously (29,30). Briefly, cells were washed twice with ice-cold PBS. They were then disrupted by homogenization with a polytron in 10 ml of ice-cold buffer containing 5 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2 mM EDTA, 5 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml benzamidine and 5 µg/ml soybean trypsin inhibitor. Lysates were centrifuged at 500 x g for 5 minutes at 4°C to remove nuclei and unbroken cells. The supernatant was then centrifuged at 45,000 x g for 20 minutes and the pellet washed twice in the same buffer. Membrane were resuspended in a buffer containing 75 mM Tris pH 7.4, 12.5 MgCl₂ and 5 mM EDTA and used immediately for adenylyl cyclase and binding assays.

Receptor quantification.

Membranes were prepared and washed as described above. Total βAR number was calculated from binding experiments using a saturating concentration (300 pM) of [¹²⁵I] cyanopindolol (CYP; Perkin-Elmer) as the radioligand. Briefly, membrane preparations (10 µg of protein) were incubated with [¹²⁵I]-CYP for 90 minutes at room temperature in a total volume of 0.5 ml in the presence or absence of 10 µM alprenolol or propranolol to define specific binding.

Measurement of adenylyl cyclase activity.

Adenylyl cyclase activity was assayed in the same membrane preparation according to published methods (33) using 50µg of protein in a total volume of 50µl. Adenylyl cyclase in membrane preparations competes with other enzymes for ATP and the

cAMP formed is hydrolyzed to 5'AMP. Analogously, GTP, which is required for hormone-induced activation or inhibition of adenylyl cyclases is also metabolized. Consequently, the addition of ATP and GTP to counteract this alternative metabolism of ATP and/or GTP as well as inhibitors of cAMP phosphodiesterases (IBMX) were used in the reaction mix. Myokinase was also added to the mix in order to enhance adenylyl cyclase activity and to help maintain ATP levels during the reaction. Stimulation of adenylyl cyclase activity was assessed by production of [α ³²P]-cAMP using membrane preparations in the presence of increasing concentrations of isoproterenol. Enzyme activities were determined following a 15 minute incubation in the presence of 1nM to 100 μ M isoproterenol, 100 μ M forskolin, 10nM NaF or the vehicle at 37°C. The reaction was stopped with the addition of stop solution containing unlabeled ATP, unlabeled cAMP and [³H] cAMP. This procedure is used to overwhelm adenylyl cyclase and cAMP phosphodiesterases with substrate and thereby effectively prevents the further formation or degradation of [³²P] cAMP. The mixtures in the reaction tubes were then diluted and decanted onto chromatography columns for purification of sample cAMP. The assay employs a two column system to separate [³²P] cAMP from labelled ATP, ADP, AMP and P_i. Data were calculated as pmoles cAMP produced/min/mg protein, and analyzed by least squares regression using GraphPad PRISM.

Western Blot Analysis.

Membrane protein (25 μ g) was boiled for 5 minutes and loaded into lanes of a 7.5% (PKC) or 10% (β AR) SDS polyacrylamide gel. A positive control for the different

PKC isoforms (rat brain cytosol) was also loaded for each experiment. Proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and transferred to a polyvinylidene difluoride PVDF membrane. Membranes were incubated in 5% non-fat dry milk in 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20 (TBST) solution (pH 7.5) for 2h at room temperature, followed by incubation with primary antibodies (PKC α , PKC β II, PKC ϵ and PKC ζ ; Santa Cruz, 1:200 dilution) in TBST at 4°C overnight (antibody dilutions were made according to the manufacturer's guidelines). Following removal of the primary antibody, membranes were washed (3 X 10 minutes) with TBST and incubated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated affinity purified goat anti-rabbit secondary antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories, 1:5000 dilution) in TBST containing 5% non-fat dry milk for 2 hours at room temperature. Membranes were again washed (3 X 10 minutes) with TBST and immune complexes visualized by enhanced chemiluminescence (Perkin-Elmer Life Sciences).

Immunoprecipitation.

48 h after transfection, cells expressing the HA or His-tagged receptors were washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) and disrupted by homogenization with a polytron (2 x 20s) in 10 ml of ice-cold lysis buffer comprising 5mM Tris-HCL, pH 7.4, 2mM EDTA, 10ug/ml benzamidine, 5ug/ml leupeptin, and 5ug/ml trypsin inhibitor. Homogenates were centrifuged at 1000 rpm for 5 minutes at 4°C to remove debris and the resulting supernatants centrifuged for 20 minutes at 16 000 rpm at 4°C. Pellets were resuspended in 1ml of RIPA buffer

containing 50mM Tris (pH 7.4), 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 0.1% SDS, 1% NP40, 0.5% sodium deoxycholate, 1mM PMSF 10ug/ml benzamidine, 5ug/ml leupeptin, and 5ug/ml trypsin inhibitor, homogenized and incubated for 1 hour at 4°C. Mouse monoclonal anti-HA antibody (Roche, 2µg) or mouse monoclonal anti-His antibody (Amersham Biosciences, 2µg) was added to 450µl of protein extract and incubated overnight at 4°C. Anti-mouse agarose IgG (Sigma, 100µl) was then added and samples were incubated for 3 hours at 4°C. Mouse agarose-antibody-antigen complexes were collected by centrifugation at 10 000 rpm for 1 minute at 4°C. Pellets were washed 3 times in RIPA buffer and resuspended in 48µl of 1 X SDS gel-loading buffer and boiled at 100°C for 5 min. Protein samples were resolved by 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, transferred to PVDF membranes and subjected to immunoblotting using rabbit polyclonal PKC α , PKC β II, or PKC ϵ antibodies as described above. Blots were subsequently stripped using Tris-HCl pH 8.0, 5mM β -mercaptoethanol and 6M guanidine-HCl (60 minutes) and re-probed with anti- β ₁AR or anti- β ₂AR (to confirm efficacy of immunoprecipitation; Santa Cruz, 1:1000 dilution) either as described above.

Statistical Analysis.

Data are presented as mean \pm SEM and differences were analyzed using an unpaired Student's *t*-test. A probability of less than 0.05 was considered significant.

Results

To verify previous studies (7,8,34,35) on the effects of PKC activation on activity of β_1 AR and β_2 AR respectively, HEK293 cells transfected with either receptor were treated with 10 nM PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate, a potent non-specific PKC activator) for 15 minutes and the ability of isoproterenol to activate adenylyl cyclase was determined. Our data show that PMA caused a significant decrease (42%) in the ability of β_1 AR to stimulate adenylyl cyclase, while β_2 AR was affected to a much lower extent (23%) (Figure 1).

In order to determine if particular PKC isoforms from the different PKC families selectively modulated either the β_1 AR or the β_2 AR, we co-expressed individual CA-PKCs with each receptor in HEK293 cells. To confirm the overexpression of the different CA-PKC isoforms, immunoblots using specific anti-PKC antibodies were performed on membranes from transfected cells. These initial studies revealed comparably increased levels of expression of the four PKC isoforms over GFP-transfected control cells (Figure 1c). Binding experiments indicated no significant differences in the number of β AR or their affinity for the specific antagonist CYP between the PKC transfected and GFP-transfected control cells (data not shown).

Effect of CA-PKC overexpression on adenylyl cyclase stimulation by β_2 AR.

We next measured the ability of isoproterenol to stimulate adenylyl cyclase activity in HEK cells transfected with the β_2 AR and each specific CA-PKC isoform.

Maximal adenylyl cyclase activity was decreased in membrane preparations of cells transfected with PKC compared to control GFP transfected cells while basal adenylyl cyclase activity was unaffected. Figure 2 shows the effect of different PKC isoforms on adenylyl cyclase stimulation by β_2 AR. Overexpression of CA-PKC α decreased the potency of β_2 AR to stimulate adenylyl cyclase by 28% (Figure 2A) compared to the control condition. PKC ζ overexpression also had a similar effect on β_2 AR stimulation of adenylyl cyclase activity, which was decreased by 28% as well (Figure 2B). Adenylyl cyclase activity was decreased by 26% following overexpression of novel PKC ϵ (Figure 2C), and PKC β II modulated also reduced isoproterenol-stimulated adenylyl cyclase activity but to a lesser extent (17%, Figure 2D). No significant alterations ($p < 0.05$) were detected in the EC₅₀ values between GFP-transfected controls and any of the CA-PKC isoforms (Table 1).

Effect of CA-PKC overexpression on adenylyl cyclase stimulation by β_1 AR.

Similar experiments were conducted in HEK 293 cells transiently transfected with β_1 AR, and the results clearly demonstrate that overexpression of specific CA-PKC isoforms causes a much more dramatic effect on the capacity of β_1 AR to stimulate adenylyl cyclase than the β_2 AR (Figure 3). Overexpression of PKC β II decreased the ability of β_1 AR to stimulate adenylyl cyclase activity by 63% (Figure 3A) while PKC ϵ overexpression effect was of 50% (Figure 3B). Adenylyl cyclase activity was decreased by 46% following overexpression of PKC α (Figure 3C), and PKC ζ overexpression affected the ability of the β_1 AR to stimulate adenylyl cyclase by 40%

(Figure 3D). As was the case for the β_2 AR, no significant alterations ($p < 0.05$) were detected in the EC_{50} values between GFP-transfected controls and any of the CA-PKC isoforms (Table 1). These results correlate with our data shown in Figure 1, where stimulation of PKC with PMA also showed a significantly larger effect on the β_1 AR.

Mutation of PKC consensus sites in both β_1 AR and β_2 AR abrogates PKC effects.

To address the possibility of a direct phosphorylation of the receptors by specific PKC isoforms, mutation of consensus PKA/PKC phosphorylation sites was performed on both β_1 AR and β_2 AR. Both of these receptors remain functional and bind ligand with similar affinity as their wildtype counterparts (data not shown; (32)). As before, adenylyl cyclase activity was assessed 48h after transfection of HEK 293 cells with mutant receptors with and without (GFP control) the CA-PKC isoform which yielded the maximal effect on the WT receptor. For the β_1 AR, mutation of the single PKA/PKC consensus site in the third intracellular loop, β_1 AR (S301A), lead to a loss of the ability of PKC β II to desensitize the receptor in HEK 293 cells (Figure 4A). A similar loss of CA-PKC α effect on β_2 AR desensitization was seen when β_2 AR (S261A; S262A; S345A; S346A) was co-transfected (Figure 4B). These results indicate that mutation of the PKA/PKC phosphorylation sites abrogates PKC β II and PKC α effect on β_1 AR and β_2 AR respectively, suggesting that a direct phosphorylation of the β ARs by PKC is likely to be responsible for the desensitization observed with wild type receptors.

Differential association of CA-PKC isoforms with both β_1 AR and β_2 AR.

We next wanted to determine whether PKC was physically associated with either β_1 AR and/or β_2 AR. In order to test whether PKC directly interacts with β ARs, co-immunoprecipitation experiments with β_1 AR and β_2 AR bearing different epitope tags (HA and His, respectively) and different CA-PKCs were performed. Immunoprecipitates were first blotted for the presence of each receptor to confirm that the efficacy of receptor pulldown (Figure 5). In our hands both anti-HA and anti-GFP (Figure 5C) or anti-HIS (data not shown) antibodies immunoprecipitate their tagged receptors with similar efficiency. Association between β_1 AR and PKC β II and PKC ϵ was demonstrated by immunoblot with the specific antibodies following immunoprecipitation with anti-HA or anti-His antibodies (Figure 5a). We did see an interaction between β_2 AR and PKC ϵ but not with PKC α (Figure 5b). The strong interaction between the β_1 AR and PKC β II is consistent with the functional data on receptor desensitization (Figures 2 and 3) and suggests that the β_1 AR may be a better substrate for PKC than the β_2 AR. Recall that PKC α and PKC β II had the largest effects functionally on β_2 AR and β_1 AR, respectively. Curiously, the low amount of PKC ϵ associated with either receptor appears to be similar suggesting that additional organizational complexity of receptor/PKC interactions remain to be characterized.

Finally, mutation of the PKA/PKC consensus sites does not appear to alter the physical interaction with CA-PKC (data not shown) suggesting that other determinants may be implicated in the PKC/receptor interaction. Taken together, our results suggest that differences in direct interactions between PKC and β ARs may be

at least partially responsible for the extent of desensitization seen when comparing the β_1 AR and β_2 AR.

Discussion

β AR are targets for homologous and heterologous modulation by G protein-coupled receptors kinases and second messenger-activated kinases such as PKA and PKC. The independence from the requirement for agonist occupation renders these receptors highly susceptible to crosstalk from many other receptor-dependent and independent mechanisms which activate PKC. To date and to our knowledge, modulation of either β AR subtype by PKC has only been demonstrated in response to stimulation with phorbol ester (7,8). One exception is a study which demonstrated that activation of PKC α caused a rightward shift in the EC₅₀ for agonist stimulation of human β_1 AR-mediated activation of adenylyl cyclase in SK-N-MC cells and a similar effect was noted when membranes from these cells were treated with purified PKC (35). No other studies have addressed directly whether, in a given tissue or cell line, the β_1 AR or β_2 AR is a preferential target for heterologous regulation by *specific* PKC isoforms. We have demonstrated that both receptors are modulated by different PKC isoforms and show differential rank orders for members of the three major PKC families. Further, we show that the β_1 AR is clearly modulated to a much greater extent, at least with respect to adenylyl cyclase stimulation, than the β_2 AR.

Cellular content of PKC isoforms determines specificity of heterologous GPCR regulation.

Evidence strongly suggests that there are qualitative and quantitative differences in receptor modulation by PKA, PKC and GRKs. The β_1 AR and β_2 AR certainly differ

in their susceptibility to modulation by PKA and different GRK isoforms (10). We have now demonstrated that this applies to different PKC isoforms as well. In fact, β_1 AR is considerably more sensitive to PKC-mediated desensitization. Mutation of the single PKA/PKC consensus site in the β_1 AR (S301A) or the two consensus sites in the β_2 AR (S261A; S262A; S345A; S346A) renders these receptors insensitive to co-expressed CA-PKC isoforms or to phorbol esters (data not shown). It has recently been demonstrated that abrogation of putative C-terminal tail GRK and PKA phosphorylation sites in the β_1 AR lead to reduced receptor desensitization and internalization (36). Curiously, only one of the putative PKA sites is also a PKC site (S301) suggesting that mutation of this site alone leads to significant reduction in receptor desensitization.

Thus, the cellular complement of specific kinase isoforms, as well as the complement of receptor systems that can activate or recruit them, may determine levels of β_1 AR or β_2 AR homologous or heterologous desensitization to some extent. This also has implications in terms of the development of any given receptor system. The regulation of any nascent receptor system will also depend on simultaneous developmental upregulation of specific homologous and heterologous desensitization pathways.

PKC regulation of β -adrenergic signalling in normal and failing hearts.

Our study has consequences for regulation of cardiac β -adrenergic signalling. In the mammalian heart, stimulation of β AR results in robust increases in both force and

rate of contraction (see (1-3) for review). β AR couple to G_s , and this complex leads to the activation of adenylyl cyclase (AC), which transforms intracellular ATP into 3'5' cyclic-adenosine monophosphate (cAMP). There are significant differences in the effects of specific stimulation of β_1 AR and β_2 AR. The β_1 AR is specifically coupled to G_s and leads to global increases in cAMP levels leading to PKA modulation of the sarcoplasmic reticulum protein phospholamban and other myofilament proteins (37). Thus the β_1 AR plays a role in the chronotropic, inotropic and lusitropic responses to β -adrenergic stimulation. The β_2 AR however, exhibits dual coupling to G_s and G_i which limits the physical distance the cAMP signal can travel in the cardiomyocyte (thus limiting the role of the β_2 AR in the lusitropic response).

Interestingly, it has been reported that overexpression of α_{1B} AR in transgenic mice resulted in an increased amount of PKC β II, PKC δ and PKC ϵ associated with the particulate fraction isolated from the hearts of these animals (20). Our results presented here are consistent with the notion that PKC β II is the predominant regulator of β_1 AR signalling in the mouse heart. Although the PKC mutation in the β_1 AR abrogated the functional effects on adenylyl cyclase activity, direct phosphorylation by PKC remains to be confirmed. We would also expect that these interactions would be manifest after α_1 AR stimulation. Thus, signals which activate some PKC isoforms such as PKC β II in the heart would be expected to impinge on β -adrenergic receptor signalling to a significant extent under physiological conditions. However, this pattern may change dramatically under pathophysiological conditions.

It is clear that changes in the ratio of β_1 AR to β_2 AR occur during the progression to heart failure in that the numbers of β_1 AR drop significantly while β_2 AR numbers remain relatively constant (38,39). This “upregulation” in net “ β_2 AR” tone may be linked to its anti-apoptotic signalling during the compensatory phase of heart failure (40-44). In contrast, the β_1 AR has been demonstrated to be pro-apoptotic (42,44). Thus the relative effect of PKC stimulation might be expected to be diminished or altered in this case.

Down regulation of receptors by PKC.

Curiously, PKC has been implicated in the downregulation of β_1 AR in different cells by reducing β_1 AR promoter activity and thus synthesis of new receptors (45). However, the specific PKC isoforms implicated in this process have not been identified. Our data suggests that individual PKC isoforms do not lead to substantial changes in receptor expression which is perhaps not surprising as we were using transient transfections. In any case, our results are consistent with the selective downregulation of β_1 AR also being mediated by PKC. Longer-term studies will be required to determine the roles of the specific PKC isoforms in receptor downregulation. Further, the role of PKCs in long term regulation of β_2 AR number will also have to be considered.

Effector-specific effects.

We have demonstrated that the β_1 AR-mediated activation of adenylyl cyclase is preferentially disrupted by overexpression of various PKC isoforms relative to that

mediated by the β_2 AR. This is consistent with the strong association of β_1 AR with PKC β II as compared to the weaker association of β_1 AR with PKC α (the two isoforms yielding the greatest effect on their respective receptors). We cannot unequivocally state that other effectors, such as the various MAP kinase pathways, regulated by both receptors would be affected to the same extent by the different CA-PKCs. It is interesting that PKC ϵ (Figure 5) was associated to a modest and similar extent with both receptors in co-immunoprecipitation studies. Perhaps this is because it is important for regulation of other downstream signalling pathways or perhaps both receptors act as scaffolds for other potential substrates. It remains to be determined whether PKCs are constitutively associated with these receptors or are recruited after receptor activation.

These issues are further complicated by the existence of β_1 AR/ β_2 AR heterodimers which display distinct properties from either of the parent homodimeric receptors (29,30). Other potentially confounding and cell-specific factors which may effect the regulation of homodimeric or heterodimeric β_1 AR and β_2 AR are the number of scaffolding proteins which are associated with both such as NHERF (46), PSD-95 (47) and MAGI-2 (48). The relative importance of all these factors will have to be resolved in future studies.

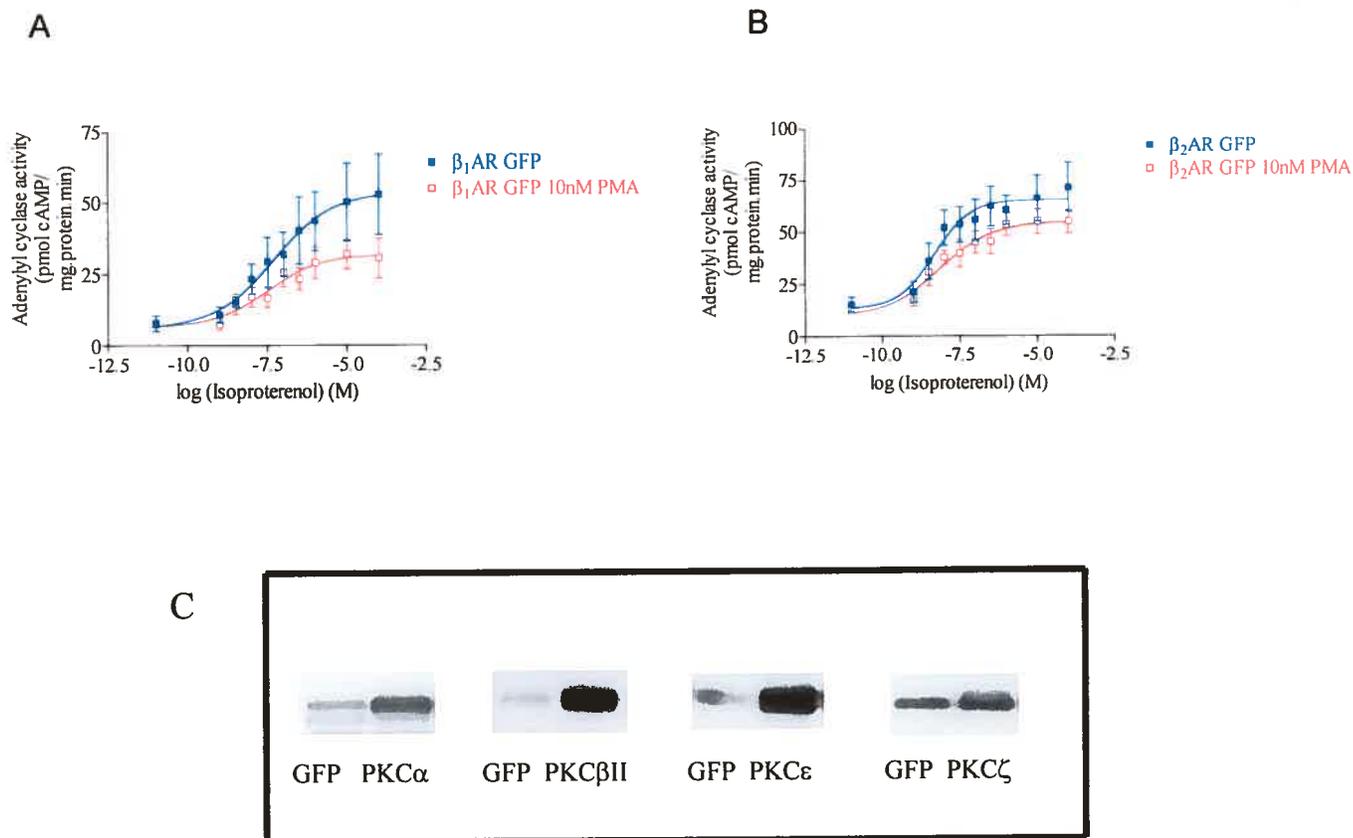
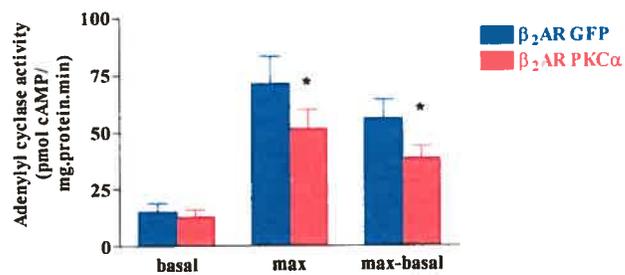
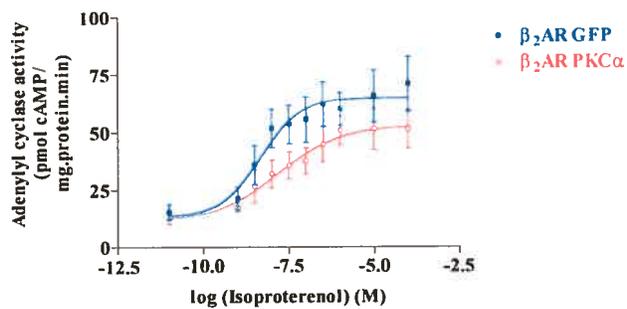
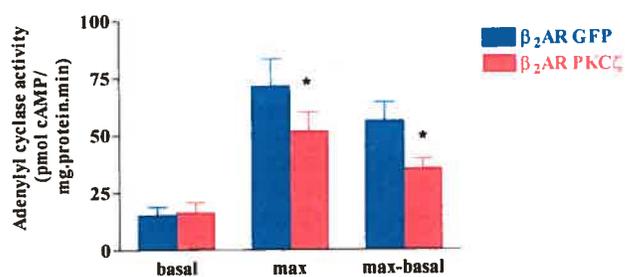
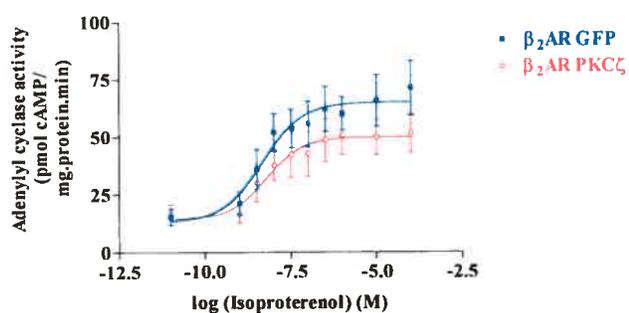


Figure 1. *Effect of PMA on adenylyl cyclase stimulation by β ARs.* Cells were incubated with 10nM PMA at 37°C for 15 min. Adenylyl cyclase activity mediated by stimulation of (A) β_1 AR or (B) β_2 AR was assessed as described in *Experimental Procedures*. Cells were cotransfected with EGFP both as a transfection marker and because EGFP is used as a control for cotransfection of CA-PKC isoforms in subsequent experiments. The results represent mean \pm SEM of 3 independent experiments performed in triplicate. (C) Representative Western blot showing overexpression of various CA-PKCs (right lanes) compared to their GFP mock transfected controls (left lanes). Data are representative of three independent experiments.

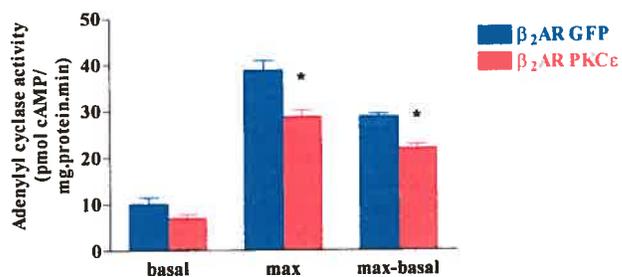
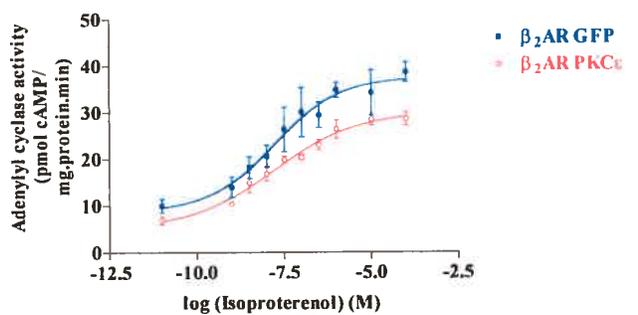
A



B



C



D

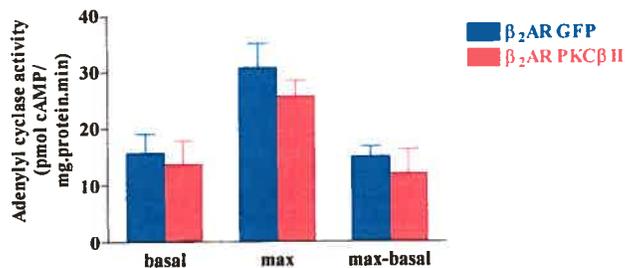
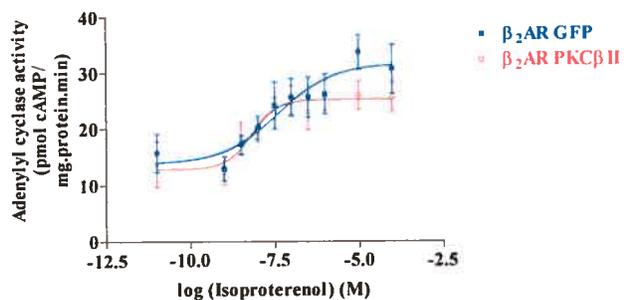


Figure 2. *Effect of CA-PKC on adenylyl cyclase activity stimulation by β_2 AR.* Stimulation of adenylyl cyclase activity was assessed by production of [32 P]-cAMP from [α - 32 P]-ATP using membrane preparations in the presence of increasing concentrations of isoproterenol (1nM to 100 μ M). Right panel: Basal, Maximal (Max) and Net (Maximal-Basal) isoproterenol-stimulated adenylyl cyclase activity taken from the dose-response curve. The level of endogenous β_2 AR in HEK 293 cells was 0.01 +/- 0.01 pmol/mg (n=3). Membranes were prepared from HEK 293 cells as described in *Experimental Procedures*. Control cells expressing GFP vector alone displayed a markedly lower stimulation (presumably due to the low levels of endogenous β_2 AR in these cells) of adenylyl cyclase under the same conditions used for receptor transfected cells (data not shown). Data represent mean \pm SEM for β_2 AR \pm PKC α , (A), β_2 AR \pm PKC ζ , (B), β_2 AR \pm PKC ϵ (C) and β_2 AR \pm PKC β II (D). The results represent mean \pm SEM of 3 independent experiments performed in triplicate. Representative experiments (n =3) are shown. Asterisks denote statistical significance (p<0.05) between GFP-transfected and CA-PKC-transfected cells.

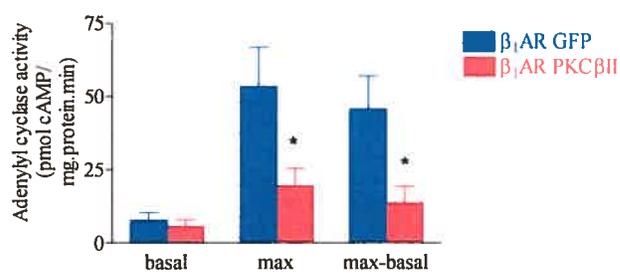
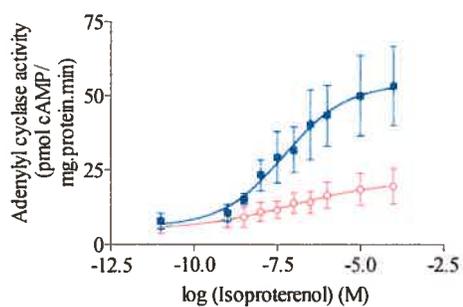
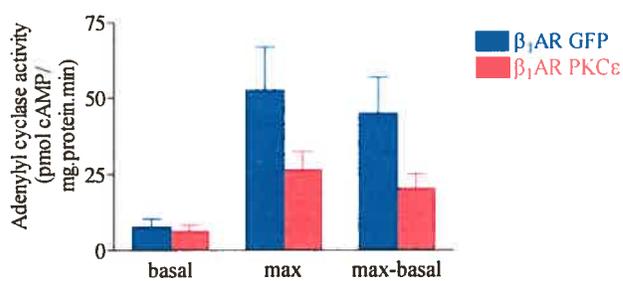
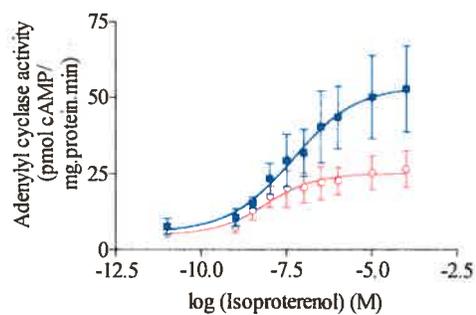
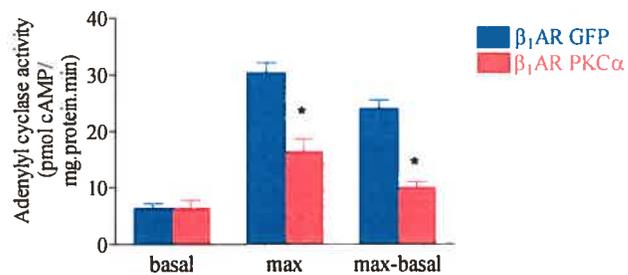
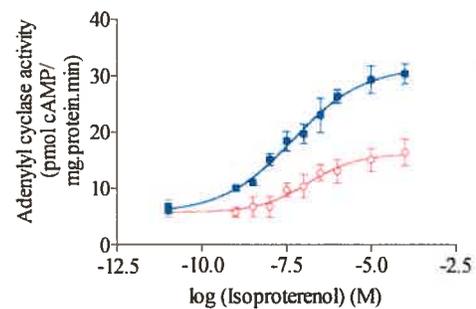
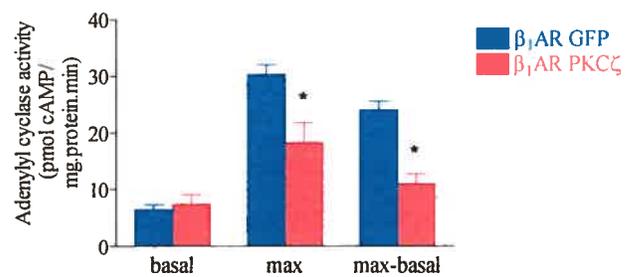
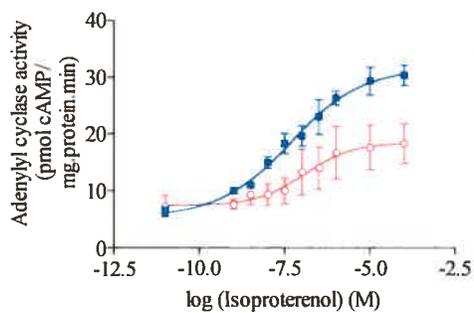
A**B****C****D**

Figure 3. *Effect of CA-PKC on adenylyl cyclase activity stimulation by β_1AR .* Stimulation of adenylyl cyclase activity was as in Figure 2. Right panel: Basal, Maximal (Max) and Net (Maximal-Basal) isoproterenol-stimulated adenylyl cyclase activity taken from the dose-response curve. Data represent mean \pm SEM for $\beta_1AR \pm PKC\beta II$, (A), $\beta_1AR \pm PKC\epsilon$, (B), $\beta_1AR \pm PKC\alpha$ (C) and $\beta_1AR \pm PKC\zeta$ (D). The results represent mean \pm SEM of 3 independent experiments performed in triplicate. Asterisks denote statistical significance ($p < 0.05$) between GFP-transfected and CA-PKC-transfected cells.

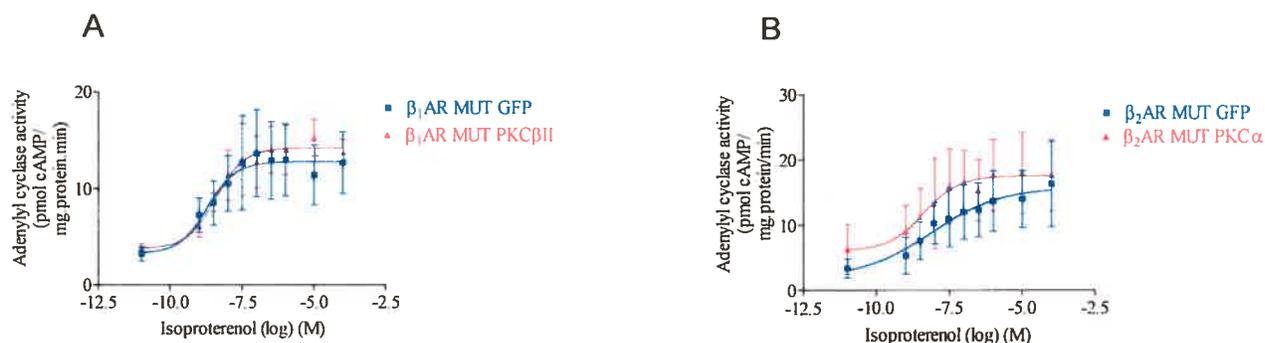


Figure 4. *Effects of mutating β_1 AR and β_2 AR phosphorylation sites on CA-PKC effect.* Mutation of consensus PKA/PKC sites of β_1 AR (S301A) and β_2 AR (S261A; S262A; S345A; S346A) prevented PKC β II (A) and PKC α (B) effects, respectively. Measurement of adenylyl cyclase activity was performed as described in *Experimental Procedures*. Maximal adenylyl cyclase values are not significantly different and receptors were expressed at similar levels between GFP and CA-PKC co-transfections (data not shown). The results represent mean \pm SEM of 3 independent experiments performed in duplicate.

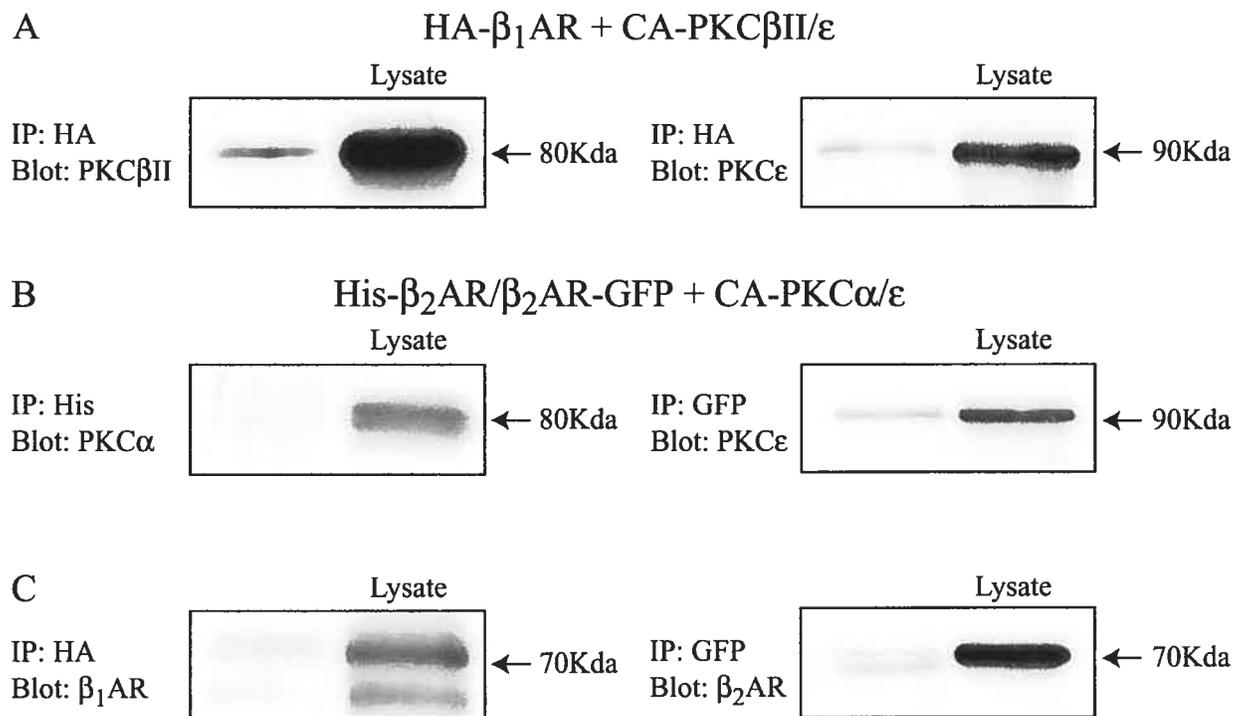


Figure 5. Recruitment of CA-PKC isoforms to β_1 AR and β_2 AR. A) Immunoblot with either anti-PKC β II (left) or anti-PKC ϵ (right) antibodies after immunoprecipitation of HA-tagged β_1 AR. B) Immunoblot with either anti-PKC α (left) or anti-PKC ϵ (right) antibodies after immunoprecipitation of HIS-tagged β_2 AR or GFP-tagged β_2 AR, respectively. C) Blots were stripped and re-probed with anti- β_1 AR (left) or anti- β_2 AR (right) antibodies. Whole cell lysates are seen in the right lanes of each separate blot. Data are representative of three independent experiments.

	EC50 (mean +/- SD, nM)	P values
β_1 -AR GFP	85 ± 118	0.67
β_1 -AR PKC β II	55 ± 24	
β_1 -AR GFP	85 ± 110	0.37
β_1 -AR PKC ϵ	10.9 ± 0.5	
β_1 -AR GFP	63 ± 45	0.49
β_1 -AR PKC α	298 ± 467	
β_1 -AR GFP	62 ± 45	0.23
β_1 -AR PKC ζ	240 ± 200	
β_2 -AR GFP	4.9 ± 0.8	0.09
β_2 -AR PKC α	15.8 ± 6.2	
β_2 -AR GFP	4.85 ± 0.7	0.4
β_2 -AR PKC ζ	9.0 ± 7.4	
β_2 -AR GFP	32.7 ± 40	0.63
β_2 -AR PKC ϵ	19.0 ± 0.7	
β_2 -AR GFP	196 ± 351	0.39
β_2 -AR PKC β II	16.3 ± 13.4	

Table 1. Efficacy of adenylyl cyclase stimulation by β_1 AR or β_2 AR co-transfected with various CA-PKC isoforms. HEK 293 cells expressing β_1 AR or β_2 AR with or without (GFP) different CA-PKCs were assayed for adenylyl cyclase activity. Membranes were prepared from HEK 293 cells as described in *Experimental Procedures*. EC₅₀ values and Hill coefficients were calculated by least squares regression. No significant differences in efficacy were seen when comparing absence or presence of the various CA-PKCs. Data are mean ± SD of a least three separate experiments.

Acknowledgements

TEH is a MacDonald Scholar of the Heart and Stroke Foundation of Canada. This work was supported by grants from the Heart and Stroke Foundation of Québec and the Natural Sciences and Engineering Research Council to TEH and HR. We would like to thank Peter Fishman, Catherine Lavoie, Nathalie Ethier and Benoit Boivin for helpful discussions.

References

1. Xiao, R. P., Cheng, H., Zhou, Y. Y., Kuschel, M., and Lakatta, E. G. (1999) *Circ Res* **85**, 1092-1100
2. Xiao, R. P. (2001) *Sci STKE* **2001**, RE15
3. Steinberg, S. F. (1999) *Circ Res* **85**, 1101-1111
4. Kohout, T. A., and Lefkowitz, R. J. (2003) *Mol Pharmacol* **63**, 9-18
5. Selbie, L. A., and Hill, S. J. (1998) *Trends Pharmacol Sci* **19**, 87-93
6. Ferguson, S. S., and Caron, M. G. (1998) *Semin Cell Dev Biol* **9**, 119-127
7. Freedman, N. J., Liggett, S. B., Drachman, D. E., Pei, G., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1995) *J Biol Chem* **270**, 17953-17961
8. Bouvier, M., Guilbault, N., and Bonin, H. (1991) *FEBS Lett* **279**, 243-248
9. Pitcher, J., Lohse, M. J., Codina, J., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1992) *Biochemistry* **31**, 3193-3197
10. Zhou, X. M., and Fishman, P. H. (1991) *J Biol Chem* **266**, 7462-7468
11. Piascik, M. T., and Perez, D. M. (2001) *J Pharmacol Exp Ther* **298**, 403-410
12. Graham, R. M., Perez, D. M., Hwa, J., and Piascik, M. T. (1996) *Circ Res* **78**, 737-749
13. Lazou, A., Fuller, S. J., Bogoyevitch, M. A., Orfali, K. A., and Sugden, P. H. (1994) *Am J Physiol* **267**, H970-978
14. Chen, L., el-Sherif, N., and Boutjdir, M. (1996) *Circ Res* **79**, 184-193
15. Oleksa, L. M., Hool, L. C., and Harvey, R. D. (1996) *Circ Res* **78**, 1090-1099
16. Lochner, A., Tromp, E., and Mouton, R. (1996) *Mol Cell Biochem* **160-161**, 129-136
17. Brodde, O. E. (1991) *Pharmacol Rev* **43**, 203-242

18. Lemire, I., Ducharme, A., Tardif, J. C., Poulin, F., Jones, L. R., Allen, B. G., Hebert, T. E., and Rindt, H. (2001) *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **281**, H931-938
19. Akhter, S. A., Milano, C. A., Shotwell, K. F., Cho, M. C., Rockman, H. A., Lefkowitz, R. J., and Koch, W. J. (1997) *J Biol Chem* **272**, 21253-21259
20. Lemire, I., Allen, B. G., Rindt, H., and Hebert, T. E. (1998) *J Mol Cell Cardiol* **30**, 1827-1839
21. Newton, A. C. (2001) *Chem Rev* **101**, 2353-2364
22. Newton, A. C. (1995) *J Biol Chem* **270**, 28495-28498
23. Schreiber, K. L., Paquet, L., Allen, B. G., and Rindt, H. (2001) *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **281**, H2062-2071
24. Steinberg, S. F., Goldberg, M., and Rybin, V. O. (1995) *J Mol Cell Cardiol* **27**, 141-153
25. Uberall, F., Giselbrecht, S., Hellbert, K., Fresser, F., Bauer, B., Gschwendt, M., Grunicke, H. H., and Baier, G. (1997) *J Biol Chem* **272**, 4072-4078
26. Baier-Bitterlich, G., Uberall, F., Bauer, B., Fresser, F., Wachter, H., Grunicke, H., Utermann, G., Altman, A., and Baier, G. (1996) *Mol Cell Biol* **16**, 1842-1850
27. Muramatsu, M., Kaibuchi, K., and Arai, K. (1989) *Mol Cell Biol* **9**, 831-836
28. Soh, J. W., Lee, E. H., Prywes, R., and Weinstein, I. B. (1999) *Mol Cell Biol* **19**, 1313-1324
29. Lavoie, C., Mercier, J. F., Salahpour, A., Umapathy, D., Breit, A., Villeneuve, L. R., Zhu, W. Z., Xiao, R. P., Lakatta, E. G., Bouvier, M., and Hebert, T. E. (2002) *J Biol Chem* **277**, 35402-35410
30. Lavoie, C., and Hebert, T. E. (2003) *Can J Physiol Pharmacol* **81**, 186-195

31. Lavine, N., Ethier, N., Oak, J. N., Pei, L., Liu, F., Trieu, P., Rebois, R. V., Bouvier, M., Hebert, T. E., and Van Tol, H. H. (2002) *J Biol Chem* **277**, 46010-46019
32. Hebert, T. E., Loisel, T. P., Adam, L., Ethier, N., Onge, S. S., and Bouvier, M. (1998) *Biochem J* **330**, 287-293
33. Salomon, Y., Londos, C., and Rodbell, M. (1974) *Anal Biochem* **58**, 541-548
34. Bouvier, M., Leeb-Lundberg, L. M., Benovic, J. L., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1987) *J Biol Chem* **262**, 3106-3113
35. Zhou, X. M., Curran, P., Baumgold, J., and Fishman, P. H. (1994) *J Neurochem* **63**, 1361-1370
36. Rapacciuolo, A., Suvarna, S., Barki-Harrington, L., Luttrell, L. M., Cong, M., Lefkowitz, R. J., and Rockman, H. A. (2003) *J Biol Chem* **278**, 35403-35411
37. Xiao, R. P., and Lakatta, E. G. (1993) *Circ Res* **73**, 286-300
38. Mende, U., Eschenhagen, T., Geertz, B., Schmitz, W., Scholz, H., Schulte am Esch, J., Sempell, R., and Steinfath, M. (1992) *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **345**, 44-50
39. Eschenhagen, T., Mende, U., Diederich, M., Nose, M., Schmitz, W., Scholz, H., Schulte am Esch, J., Warnholtz, A., and Schafer, H. (1992) *Mol Pharmacol* **42**, 773-783
40. Kuschel, M., Zhou, Y. Y., Cheng, H., Zhang, S. J., Chen, Y., Lakatta, E. G., and Xiao, R. P. (1999) *J Biol Chem* **274**, 22048-22052
41. Jo, S. H., Leblais, V., Wang, P. H., Crow, M. T., and Xiao, R. P. (2002) *Circ Res* **91**, 46-53
42. Chesley, A., Lundberg, M. S., Asai, T., Xiao, R. P., Ohtani, S., Lakatta, E. G., and Crow, M. T. (2000) *Circ Res* **87**, 1172-1179

43. Singh, K., Communal, C., Sawyer, D. B., and Colucci, W. S. (2000) *Cardiovasc Res* **45**, 713-719
44. Communal, C., Singh, K., Pimentel, D. R., and Colucci, W. S. (1998) *Circulation* **98**, 1329-1334
45. Li, Z., Vaidya, V. A., Alvaro, J. D., Iredale, P. A., Hsu, R., Hoffman, G., Fitzgerald, L., Curran, P. K., Machida, C. A., Fishman, P. H., and Duman, R. S. (1998) *Mol Pharmacol* **54**, 14-21
46. Hall, R. A., Premont, R. T., Chow, C. W., Blitzler, J. T., Pitcher, J. A., Claing, A., Stoffel, R. H., Barak, L. S., Shenolikar, S., Weinman, E. J., Grinstein, S., and Lefkowitz, R. J. (1998) *Nature* **392**, 626-630
47. Hu, L. A., Tang, Y., Miller, W. E., Cong, M., Lau, A. G., Lefkowitz, R. J., and Hall, R. A. (2000) *J Biol Chem* **275**, 38659-38666
48. Xu, J., Paquet, M., Lau, A. G., Wood, J. D., Ross, C. A., and Hall, R. A. (2001) *J Biol Chem* **276**, 41310-41317

CHAPITRE 3. DISCUSSION GÉNÉRALE

3.1. Effet de la surexpression de certains isoformes de la PKC sur la modulation des β_1 - et β_2 -AR

Les nombreux indices présentés dans la section 1 à l'effet que la PKC pouvait être impliquée dans la désensibilisation hétérologue des récepteurs β_1 - et β_2 -adrénergiques nous ont poussé à étudier de plus près cette possibilité. Afin de vérifier notre hypothèse, nous avons effectué des analyses fonctionnelles et interactionnelles des β_1 - et β_2 -AR, en présence de certains isoformes de la PKC. Tel que présenté dans l'article qui constitue le Chapitre 2, nous avons noté à l'aide d'essais d'adénylate cyclase que la capacité des β_1 - et β_2 -AR à stimuler cet enzyme était considérablement réduite lorsque les récepteurs étaient co-exprimés avec certains isoformes de la PKC actifs de façon constitutive. Cependant, nous avons noté que l'effet généré par la PKC différait selon l'isoforme utilisé, et il semble également que cette surexpression ait davantage affecté le β_1 - que le β_2 -AR. Par ailleurs, en utilisant des techniques de co-immunoprécipitation, nous avons observé une interaction directe entre les différents isoformes de la PKC et les β_1 - et β_2 -AR. Ces résultats suggèrent d'une part l'activation des isoformes, puisqu'il y a translocation au niveau membranaire, et d'autre part la possibilité que les β_1 - et β_2 -AR constituent effectivement des cibles potentielles pour la PKC. De plus, les résultats des essais d'adénylate cyclases faits avec les β_1 - et β_2 -AR dont les sites de phosphorylations ont été modifiés témoignent effectivement de la possibilité d'une telle phosphorylation, puisque l'effet généré par la PKC sur les récepteurs de type sauvage n'a pas été observé avec les récepteurs mutants. La prochaine section présentera, selon une perspective plus large, des liens avec certaines recherches dont le centre d'intérêt concerne de façon connexe

l'objectif de ce travail, afin de définir l'importance physiologique qui découle de nos résultats.

3.2. Potentiation des effets selon l'isoforme de la PKC

Tel que présenté dans l'article, nous avons observé que l'amplitude des effets médiés par la PKC sur les récepteurs β_1 - et β_2 -AR a varié de façon considérable selon l'isoforme utilisé. Plusieurs pistes nous permettent d'envisager que ces différences observées ne sont pas le fruit du hasard, mais qu'elles témoignent effectivement de la spécificité marquante attribuée à chaque isoforme. Les nombreuses études qui ont permis de découvrir que la PKC ne relevait pas d'une entité moléculaire simple nous obligent à considérer les différents isoformes de cette kinase de façon unique, et cela, indépendamment du sous-groupe auquel ils appartiennent. En effet, la seule différence de ~50 acides aminés qui caractérise les PKC β I et PKC β II semble être responsable du rôle spécifique attribué à chacun de ces isoformes (133). Nous avons vu dans la section 1 qu'une des particularités qui caractérise les différents isoformes de la PKC concernent leur localisation au niveau cellulaire et que cette caractéristique dicterait en quelque sorte la disponibilité des différents isoformes pour leurs substrats. Dans l'éventualité où nous voudrions caractériser de façon plus précise les modifications apportées par les différents isoformes, l'utilisation de la microscopie confocale pourrait s'avérer utile. Entre autres, la disponibilité d'anticorps secondaires marqués à la fluoresceine (134) de même que les techniques permettant la génération et l'expression de protéines de fusion GFP-PKC (135,136) ainsi que des marqueurs

d'organelles (137) sont quelques unes des techniques qui nous permettraient de clarifier ces interrogations.

De même, si nous poussons notre questionnement encore plus loin, il semble que la localisation distincte de chaque isoforme dans leur état inactif de même que dans leur état actif ne soit pas aléatoire, mais dépendrait de leur liaison à différentes protéines d'ancrages. Plusieurs protéines de ce type ont été identifiées et classées en deux catégories (105). Les protéines d'ancrages qui se lient à la PKC lorsque celle-ci est dans un état inactif, les RICKs, (*Receptor for Inactive C-Kinase*) et les autres, dont la liaison s'effectue lorsque les isoformes sont dans leur état actif : RACKs (*Receptor for Activated C-Kinase*). Les données récentes qui témoignent de l'importance de ces protéines d'ancrage proposeraient un modèle selon lequel chaque isoforme de la PKC pourrait se lier à plusieurs RICKs, de même qu'à plusieurs RACKs (105), et que ces mêmes protéines d'ancrages serviraient de 'protéines-adapteurs' pour plusieurs autres enzymes de signalisation différentes. Ces données, si elles sont exactes, viendraient ajouter à la complexité des schémas déjà établis de la signalisation cellulaire, et il faudrait désormais prendre en considération non seulement l'existence des différents isoformes ainsi que leur localisation respective, mais également les différentes possibilités émanant d'une liaison à de telles protéines d'ancrage. À ce jour, l'existence de RACKs correspondant spécifiquement aux PKC β II (138), PKC ϵ (139) et PKC α (140) ont été identifiés et l'intérêt grandissant pour ce secteur d'études devrait éventuellement mener à une caractérisation plus spécifique de ces protéines. Par ailleurs, tel que présenté dans la figure 7 de la page suivante, il est important de

mentionner que les RACKs ne constituent pas des substrats en soi pour la PKC, mais que la liaison de ces deux molécules mène à une augmentation/facilitation de la phosphorylation du substrat par la PKC. En effet, suivant la liaison de la PKC à la protéine RACK (bleu), on peut remarquer que le site de liaison au substrat demeure libre. En ce qui concerne la présente étude, il s'avérerait intéressant de pousser plus loin une telle investigation puisqu'elle pourrait permettre de comprendre l'organisation spatiale de la transduction des signaux, qui sommes toutes, est essentielle à la caractérisation précise de la signalisation cellulaire. Par ailleurs, Yarwood et ses

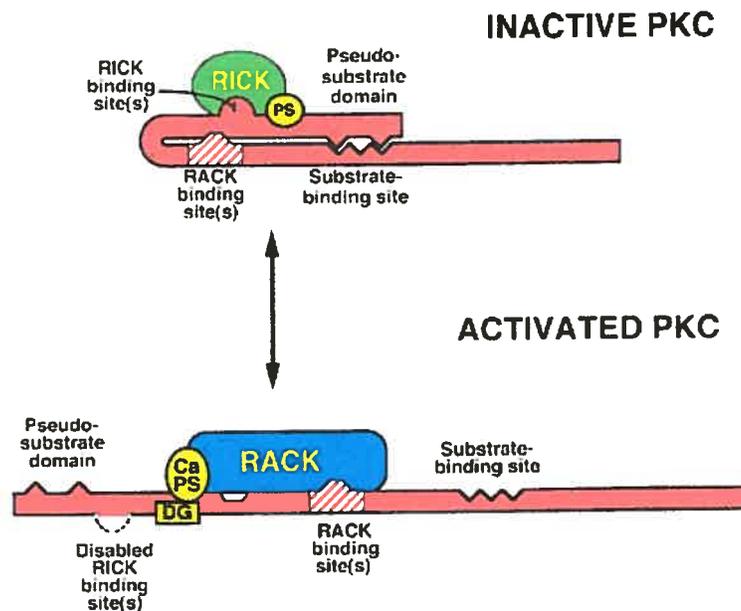


Figure 7. Modèle d'interaction de la PKC avec les protéines d'ancrage RICKs (vert) et RACKs (bleu).

Figure tirée de Mochly-Rosen et al. (1998) (105)

collègues (141) ont démontré que RACK1, qui est la protéine d'ancrage associée à la PKC β II, pourrait se lier au phosphodiesterase (PDE4D5) et que cette liaison dirigerait l'activité de cet enzyme à des sites spécifiques. Comme cet enzyme est responsable de la dégradation de l'AMPc, il pourrait être intéressant pour nous, dans l'éventualité où nous voudrions approfondir cet aspect, de vérifier si une telle interaction a lieu dans notre modèle, à l'aide de techniques de co-immunoprécipitation. De plus, il serait également important de vérifier si ces protéines d'ancrage sont associés aux récepteurs β_1 - et β_2 -adrénergiques, à l'aide de cette même technique.

Bien entendu, plusieurs questions concernant la signalisation qui découle de l'activation de la PKC demeurent en suspens et il ne fait plus aucun doute que les différents phénomènes qui régissent cette signalisation sont très complexes. Plusieurs suggèrent par ailleurs que les nombreuses protéines impliquées dans la signalisation cellulaire seraient organisées en un complexe 'multi-enzymes' qui favoriserait la régulation croisée entre plusieurs mécanismes de signalisation (105).

3.3. Conséquences de l'activation de la PKC sur β ARK-1

Les différentes expériences menées dans le cadre de ce projet ont été orchestrées dans le but de vérifier si les caractéristiques fonctionnelles des récepteurs β_1 - et β_2 -adrénergiques étaient modifiées en présence de différents isoformes de la PKC. Toutefois, nous ne sommes pas sans savoir que d'autres voies de signalisation ou d'autres effecteurs peuvent également être affectés par une telle surexpression. Par

exemple, il est connu que le PMA active la protéine kinase cytosolique β ARK-1 qui, comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, est impliquée dans la désensibilisation homologue des récepteurs β -adrénergiques. En effet, Winstel et ses collègues (142) ont observé que l'utilisation du PMA dans des cellules de type HEK 293 avait pour effet non seulement de provoquer l'activation de β ARK-1 cytosolique, mais également sa translocation au niveau membranaire. Des résultats similaires ont également été observés par l'équipe de M. DeBlasi, où ils ont démontré que l'utilisation du PMA causait la phosphorylation de β ARK-1 dans des leucocytes mononucléaires humains (143). Ainsi, il serait intéressant de tester de façon singulière l'effet des isoformes α , β II, ϵ et ζ de la PKC sur l'activité de β ARK-1. Une alternative possible consisterait à vérifier si la présence des différents isoformes de la PKC provoque la phosphorylation de β ARK-1, car si tel est effectivement le cas, cela représenterait un point de départ additionnel d'où pourrait émerger un carrefour menant à une signalisation croisée. À cet égard, l'utilisation de protéines purifiées (par exemple, les différents isoformes de la PKC ainsi que β ARK) pourrait s'avérer intéressante afin de déterminer si le degré de phosphorylation de β ARK-1 est effectivement modulé par la présence de ces isoformes. Par la technique de SDS-PAGE, l'autoradiographie pourrait nous permettre de détecter l'incorporation de ^{32}P suivant l'incubation de ces deux protéines avec du phosphate marqué. Ainsi, une caractérisation plus spécifique des différents isoformes de la PKC impliqués dans l'activation de β ARK-1 nous permettrait d'élucider cet aspect.

3.4. Activation des différents isoformes de la PKC sur la désensibilisation :

phosphorylation, internalisation et régulation négative

Nos premières expériences visaient à vérifier si la capacité des récepteurs β -adrénergiques à stimuler l'adénylate cyclase était altérée en présence des différents isoformes de la PKC. Tel que mentionné précédemment, ces résultats suggèrent que les récepteurs β -adrénergiques constitueraient effectivement des cibles potentielles pour la PKC et que la phosphorylation des récepteurs serait le mécanisme par lequel cette désensibilisation pourrait s'opérer. Le but de la présente étude est de déterminer si la PKC est effectivement impliquée dans la phosphorylation des β_1 - et β_2 -AR, mais nous savons que la désensibilisation implique également plusieurs autres mécanismes, comme l'internalisation et la régulation négative. Ainsi, nous avons testé l'effet des PKC résultant d'une exposition aigue au PMA (15 minutes), mais l'effet d'une exposition chronique pourrait également s'avérer intéressante. En outre, l'utilisation du PMA sur une plus longue période a déjà été utilisée et les résultats obtenus à cet effet sont très intéressants et sont selon nous, digne de mention dans le cadre de cette étude. En effet, Fishman et ses collègues (144) ont observé dans des cellules gliales de rat que le traitement au PMA pendant 24 heures avait pour effet non seulement d'induire des altérations au niveau fonctionnel, mais également de provoquer la régulation négative des récepteurs β_2 -adrénergiques. Ces résultats proposent que la stimulation des différents isoformes de la PKC peut induire des effets de façon immédiate, mais la portée de ces altérations atteint également des mécanismes qui concernent toutes les phases impliquées dans la désensibilisation.

Ainsi, dans l'éventualité où nous voudrions approfondir cette question, l'utilisation d'une lignée de cellules qui surexpriment de façon stable différents isoformes de la PKC (actifs de façon constitutive) pourrait nous permettre d'observer quels seraient les effets de cette surexpression à long terme sur les niveaux d'expression des récepteurs β_1 - et β_2 -AR. Ceci permettrait une caractérisation plus spécifique du rôle de certains isoformes de la PKC dans la modulation des niveaux d'expression des β_1 - et β_2 -AR. Afin d'élucider notre questionnement face à ces interrogations, des essais de liaison pourraient être effectués afin de déterminer les niveaux d'expression des β_1 - et β_2 -AR.

L'idée que la protéine kinase C pourrait jouer un rôle non seulement dans la phosphorylation mais également dans la régulation négative des récepteurs β -adrénergiques, nous amènent à nous interroger sur la possibilité d'une éventuelle implication au niveau de l'internalisation. Permettons-nous une petite parenthèse pour rappeler les différentes composantes impliquées dans l'internalisation des récepteurs β -adrénergiques. Par exemple, en ce qui concerne le mécanisme d'internalisation des récepteurs β_2 -adrénergiques, l'implication de β ARK-1 à cet égard est bien connu. Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction, la phosphorylation par cette kinase permet la liaison d'une molécule de β -arrestine au récepteur, ce qui compromet par la suite l'interaction entre le récepteur et la protéine G. Puis, de façon subséquente, les récepteurs phosphorylés sont dirigés dans des vésicules de clathrines, qui seront à leur tour déplacées vers des endosomes. C'est le schéma d'internalisation classique, issu de travaux exhaustifs et qui caractérise

principalement β ARK-1 et le β_2 -AR. Par contre, la définition précise qui régit l'internalisation du récepteur β_1 -AR est plus obscure. Toutefois, des données récentes proposent un modèle selon lequel la PKA serait impliquée dans l'internalisation de ce récepteur. En effet, nous savons qu'il existe deux voies par lesquelles les RCPG sont susceptibles d'internaliser, soient via les vésicules de clathrines, ou encore via les structures caveolaires. Rapacciuolo et ses collègues (145) ont à ce propos observé que la phosphorylation du β_1 -AR par la PKA dirigerait l'internalisation de ce récepteur vers les caveolae, alors que l'action de β ARK-1 le conduirait vers les vésicules de clathrines. Ils ont également testé l'effet de l'activation de la PKC sur l'internalisation du β_1 -AR mais leurs données rapportent que contrairement à la PKA, la PKC ne serait pas impliquée dans ce processus. Par contre, il semble en être tout autrement pour le récepteur β_2 -adrénergique. En effet, des études faites sur des cellules A431 ont démontré que la suppression spécifique de la PKC par oligodéoxynucléotides antisense avait pour effet de prévenir l'association de la β -arrestine et du récepteur β_2 -adrénergique (146). Ces évidences nous poussent à penser que la PKC pourrait être effectivement impliquée dans l'internalisation du β_2 -AR, et une explication possible, qui viendrait renforcer ce modèle, impliquerait que l'activation de la PKC modulerait le couplage de la β -arrestine au complexe de signalisation via la phosphorylation (146). Il est par ailleurs tentant de penser que ces spéculations sont véridiques puisque comme nous l'avons mentionné plus haut, il a été démontré que la PKC pouvait activer β ARK-1. En ce qui concerne la présente étude, il serait intéressant de vérifier quels sont les isoformes spécifiques de la PKC qui sont impliqués dans ce phénomène. De ce fait, après la transfection des différents

isoformes de la PKC, il pourrait être utile de détecter par immunoprécipitation si l'association du récepteur β_2 -adrénergique et de la β -arrestine est augmentée suivant cette surexpression, à l'aide d'anticorps spécifiques. Une autre alternative consisterait à utiliser la technique de BRET (*Bioluminescence Resonance Energy Transfer*), qui permet de vérifier s'il y a interaction physique entre deux molécules *in vivo*. Pour ce faire, il faudrait transfecter de façon transitoire le récepteur β_2 -adrénergique et la β -arrestine avec des partenaires de fluorescence ou de luminescence distincts, comme la GFP et la luciférase, afin de vérifier si l'interaction physique entre les deux est augmentée suivant la transfection d'un isoforme de la PKC (actif de façon constitutive).

3.5 Potentiation des effets sur les β_1 - et les β_2 -AR :

conséquence de la localisation cellulaire des récepteurs?

Les résultats des essais d'adénylate cyclase obtenus avec les récepteurs β_1 - et β_2 -AR en présence des différents isoformes de la PKC ont témoigné de la diminution de la capacité des récepteurs β -adrénergiques à stimuler l'adénylate cyclase. Par ailleurs, il semble que cette surexpression ait davantage affecté le β_1 - que le β_2 -AR et cette 'modulation inégale' n'est guère surprenante, si on considère les notions présentées ci-dessus. En effet, nous avons vu que la localisation des différents isoformes de la PKC de même que la proximité des substrats qui en découlent modulent l'effet médié par la PKC. Or, nous savons qu'il existe également des différences dans la localisation cellulaire des récepteurs β_1 - et β_2 -adrénergiques, et il serait intéressant de vérifier si cet aspect pourrait être (en partie) responsable de ce ciblage différencié. En

outre, certaines études rapportent que le récepteur β_2 -adrénergique serait localisé dans des sous-domaines membranaires comme les cavéolae, alors que cette caractéristique diffère quelque peu pour le β_1 -AR (147,148). Cette compartimentation spécifique du β_2 -AR pourrait peut-être le transformer en un substrat difficilement atteignable et cette spécificité pourrait ainsi expliquer l'effet 'modéré' médié par la PKC à l'endroit du β_2 -AR. Afin de vérifier cette hypothèse, l'utilisation du filipin ou de la cyclodextrine pourrait s'avérer utile puisque ces deux substances provoquent le démantèlement de la structure des caveolae (148,20). Il serait donc intéressant de voir quelle est la conséquence de cette modification au niveau de l'effet médié par la PKC sur le β_2 -AR, particulièrement sur les isoformes de la PKC qui ont affecté le moins la capacité du β_2 -AR à stimuler l'adénylate cyclase, comme la PKC β II, par exemple.

3.6. Double-couplage du β_2 -AR : la PKC est-elle impliquée?

Tel que nous l'avons mentionné dans l'introduction, une des particularités qui caractérise le β_2 -AR est sa capacité d'interagir avec les protéines G_s et G_i . Certains chercheurs ont par ailleurs proposé que la phosphorylation du β_2 -AR par la PKA permettrait ou faciliterait ce renversement de couplage, puisque d'une part, la phosphorylation par la PKA diminue l'affinité du β_2 -AR pour la protéine G_s , et que d'autre part, cette même réaction augmente considérablement l'affinité du récepteur pour la protéine G_i (149). Une question qui demeure en suspens en rapport avec ces données et notre étude est la possibilité que ce renversement de couplage ait également lieu en réponse à l'activation de la PKC. En effet, certaines similarités qui

concernent la PKA et la PKC nous permettent de spéculer qu'il ne serait pas impossible qu'un tel événement ait lieu. D'abord, comme nous l'avons abordé précédemment, ces kinases sont toutes les deux impliquées dans la désensibilisation hétérologue des récepteurs β -adrénergiques. Puis, le β_2 -AR possède les sites de phosphorylation au niveau de la troisième boucle intracellulaire ainsi que dans la région C-terminal qui constituent des cibles pour la PKA de même que pour la PKC. Il serait tentant de penser que la phosphorylation du β_2 -AR par la PKC puisse également provoquer un renversement de couplage, comme il semble en être le cas pour la PKA. Pour examiner l'influence de la PKC sur le double-couplage du β_2 -AR, il faudrait utiliser un système entièrement reconstitué de composantes purifiées (β_2 -AR, PKC, G_i). À cet égard, Zamah et ses collègues (149) ont publié des données fort intéressantes dans lesquelles ils ont démontré que suivant la phosphorylation *in vitro* du β_2 -AR par la PKA, la reconstitution du récepteur phosphorylé à l'intérieur de vésicules phospholipidiques témoignait de l'augmentation du couplage à la protéine G_i en raison de son habileté à lier le $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$. Des expériences similaires pourraient également être conduites afin de valider notre questionnement en rapport avec la possible implication de la PKC sur la théorie du renversement de couplage qui caractérise le β_2 -AR. Par exemple, rappelons-nous que les isoformes α et ζ de la PKC ont tous deux provoqué une diminution de la capacité du récepteur β_2 -adrénergique à stimuler l'adénylate cyclase de 28%. Pourrait-il être possible qu'une proportion de cet effet soit dû à un renversement de couplage de la protéine G_s vers la protéine G_i ? Dans cette optique, il pourrait être intéressant d'approfondir cet aspect afin de comprendre

plus clairement les mécanismes qui sont responsables du renversement de couplage qui caractérise le β_2 -AR.

L'implication de la PKC dans ce double-couplage serait d'autant plus importante à élucider puisqu'il est connu que le récepteur β_2 -adrénergique est capable d'activer la voie ERK, alors que le β_1 -AR ne possède pas cette propriété. Une explication proposée par certains met en lumière la possibilité que le couplage du β_2 -AR à la protéine G_i lui confère de nouvelles voies de signalisation qui lui permettrait d'atteindre la voie de ERK (149,150,151,152). Tel que démontré dans la figure 8,

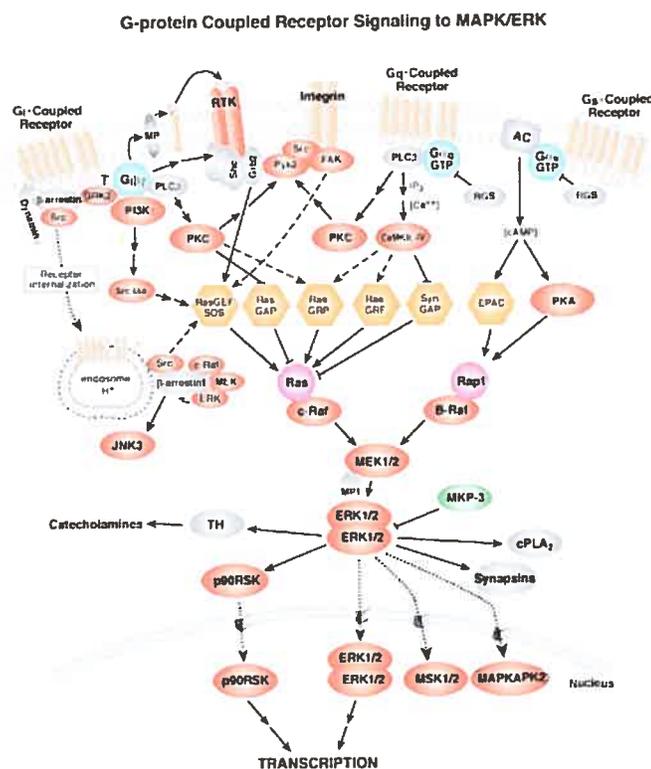


Figure 8. Mécanismes d'activation des voies MAPK par les RCPG

Figure tirée du site Internet www.cellsignal.com/retail/reference/pathway/GPCR.asp

la théorie qui est mise de l'avant à ce propos, implique que les sous-unités $G\beta\gamma$ de la protéine G_i pourraient provoquer la trans-activation des récepteurs à activité tyrosine kinase (153,154), et que ces récepteurs, une fois activés, recruteraient un complexe de signalisation impliquant Shc et Grb2. Le recrutement de ce complexe permettrait subséquemment l'activation de la protéine Ras, qui constitue le point de départ de la voie ERK (155,156). Maintenant, si nous revenons aux résultats de notre étude, les expériences de co-immunoprécipitations ont démontré une interaction directe entre certains isoformes de la PKC et le β_2 -AR. Il est tentant de spéculer qu'une telle interaction pourrait peut-être moduler d'autres voies de signalisation, dont la voie de ERK. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait utile de mesurer la capacité du β_2 -AR à stimuler la voie de ERK1/2 en réponse à la transfection de différents isoformes de la PKC. Ainsi, une fois les échantillons dénaturés par la technique de SDS-PAGE, nous pourrions déterminer l'activité de ERK1/2 (p42/p44) par immunobuvardage avec des anticorps spécifiques (anti-phospho-ERK). Parallèlement à cela nous pourrions également vérifier si l'association des différents isoformes de la PKC avec le β_2 -AR module d'autres effecteurs, comme le canal calcique de type L ($Ca_v1.2$). En effet, Hell et ses collègues (157) ont publié des données dans lesquelles ils rapportent l'association directe du β_2 -AR avec ce type de canal. Il serait donc intéressant de voir quel est l'effet de la translocation de la PKC sur la capacité du β_2 -AR à interagir avec le $Ca_v1.2$. Pour ce faire, des expériences de co-immunoprécipitation avec des anticorps spécifiques comme l'anti- β_2 -AR et l'anti- α_{1c} (qui constitue le pore central

du Cav1.2) pourraient être conduites afin de vérifier si la PKC module cette association.

3.7 Effet de la PKC sur l'hétérodimérisation des β_1 - et β_2 -AR

Il est maintenant généralement accepté que les RCPG peuvent former des homodimères et des hétérodimères. En outre, l'utilisation de techniques récentes de transfert d'énergie, soient le FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) et le BRET ont permis de découvrir que des hétérodimères appartenant à la même classe ou à des classes différentes de RCPG existent, et il semble que la formation de ces hétérodimères module la fonction de ces mêmes récepteurs en régulant certaines propriétés, telles la liaison au ligand, la signalisation, de même que le *trafficking* (150). À cet égard, des données récentes démontrent effectivement que les récepteurs β_1 - et β_2 -adrénergiques forment des hétérodimères (159). En effet, des expériences de co-immunoprécipitation et de BRET suggèrent que ces deux types de récepteurs interagissent physiquement et que leurs propriétés pharmacologiques et fonctionnelles sont altérées lorsqu'ils forment un hétérodimère (159,160). Maintenant, qu'en est-il de la potentiation de l'effet de la PKC sur cet hétérodimère? Nous avons vu dans le chapitre 2 qui constitue l'article, que l'effet généré par les différents isoformes de la PKC avait affecté le récepteur β_1 -AR de façon plus dramatique, alors que l'effet observé sur le β_2 -AR était moindre. Il serait intéressant de déterminer comment les différents isoformes de la PKC exercent leur effet lorsque ces deux types de récepteurs sont co-exprimés. Ainsi, nous pourrions transfecter de façon transitoire les deux types de récepteurs, possédant chacun des partenaires de fluorescence, et déterminer, à l'aide de la technique de BRET, s'il y a effectivement

interaction physique. Puis, suivant cette confirmation, des essais d'adénylate cyclase pourraient être conduits suivant la transfection d'un isoforme de la PKC dans des cellules qui co-expriment les deux types de récepteurs. Ainsi, nous pourrions comparer la capacité des hétérodimères à stimuler l'adénylate cyclase avec et sans les différents isoformes de la PKC afin de voir si ce 'partenariat' module l'effet de la PKC à l'endroit des β_1 - et β_2 -ARs.

3.8. Phosphorylation des β -ARs par la PKC

Tel que nous l'avons mentionné dans le chapitre 2 qui constitue l'article, il est tentant de croire que les différents isoformes de la PKC exercent leur effet sur les β -ARs via la phosphorylation. En effet, les expériences menées avec les récepteurs dont les sites de phosphorylations ont été modifiés laissent présager la possibilité d'un tel phénomène. Afin de clarifier de façon plus exhaustive ces résultats, nous avons tenté de quantifier de façon précise cette éventualité à l'aide d'essais de marquage métabolique (résultats non-montrés). Les résultats que nous avons obtenus étaient à nos yeux peu convaincants. D'une part, les récepteurs de type sauvage qui étaient co-exprimés avec un isoforme de la PKC ne démontraient pas (ou très peu) les signes d'une phosphorylation accrue. Et d'autre part, les récepteurs mutants dont les sites de phosphorylation étaient modifiés semblaient quant à eux légèrement phosphorylés, bien qu'aucune différence n'était visible entre les récepteurs qui avaient préalablement été transfectés avec, ou sans un isoforme de la PKC. La possibilité que des difficultés au niveau de la technique utilisée soit responsable de ces résultats n'est pas écartée. Ou encore, il n'est pas impossible que ces récepteurs soient phosphorylés

par une autre kinase (β ARK-1, par exemple). Ainsi, la modification du protocole, ou l'utilisation d'une autre méthode (protéines purifiées) pourraient peut-être permettre de démontrer de façon plus convainquante l'existence de ce phénomène.

3.9. En conclusion

La récente émergence du concept de régulation croisée est venue modifier les schémas déjà établis de la signalisation cellulaire. En effet, il n'est dorénavant plus possible de considérer ces schémas de façon singulière ou linéaire, mais il faut désormais adopter une vue d'ensemble considérablement plus large, afin d'apprécier la complexité de cette signalisation. Les RCPG ont fait l'objet de nombreuses études en rapport avec ce phénomène et il est aujourd'hui bien accepté que la stimulation d'un RCPG peut moduler de façon parallèle des réponses qui concernent d'autres RCPG. Comme ce travail a été accompli à l'Institut de Cardiologie de Montréal, l'idée d'étudier ce phénomène sur les récepteurs β_1 - et β_2 -adrénergiques venait de soit, en raison de l'importance physiologique de ces récepteurs au niveau cardiaque. Puis, comme nous savons qu'il existe des différences au niveau de leurs propriétés distinctes, l'idée d'étudier ces récepteurs de façon séparée paraissait, sommes toutes, intrigante. Il en a été de même pour les différents isoformes de la PKC. La plupart des études visant à caractériser le rôle ou les effets de cette protéine ont été rapportées par l'utilisation de PMA. Mais comme nous savons qu'il existe 11 isoformes distincts de cette kinase, la caractérisation (du moins pour quatre isoformes) plus précise de leur rôle dans la désensibilisation hétérologue des récepteurs β_1 - et β_2 -adrénergiques a été pour nous très motivante.

Les phénomènes que nous avons observés dans cette étude coïncident avec les travaux qui se penchent sur la régulation croisée entre les RCPG. En effet, nous avons observé que la PKC, qui est activée suivant la stimulation des récepteurs α_1 -adrénergiques module l'activité des récepteurs β_1 -et β_2 -adrénergiques, suggérant par le fait même, l'existence d'un tel phénomène. D'autre part, la caractérisation précise du rôle de la PKC dans ce mécanisme revêt une importance plus que capitale puisque comme nous l'avons mentionné dans l'introduction, il semble que les niveaux d'expression de certains isoformes de la PKC seraient augmentés dans des cas d'insuffisance cardiaque (115). De plus, la constatation alarmante que les niveaux d'expression des récepteurs β_1 -AR sont diminués dans ces mêmes cas pathologiques (66,67), alors que ceux des α_1 -AR sont augmentés (87,88), vient renforcer l'idée que la compréhension détaillée de ce phénomène est plus que nécessaire. Alors que les mécanismes qui sont responsables de la modulation des niveaux d'expression des α_1 -AR ou encore des β_1 -AR demeurent obscurs, il reste que les évidences qu'une telle modulation se manifeste dans des cas d'insuffisance cardiaque impliquent que l'origine de cette régulation croisée fait partie intégrante des mécanismes qui mènent à la manifestation de pathologies cardiaques. À la lumière de ces données, il n'est pas nécessaire de dire que la compréhension précise de ce phénomène pourrait avoir des conséquences bénéfiques au niveau thérapeutique. Quoi qu'il en soit, il reste que bien des questions demeurent en suspens. Pourquoi, par exemple, le récepteur β_1 -adrénergique est plus affecté que le β_2 -AR? Et pourquoi certains isoformes de la PKC provoquent des effets plus dramatiques, alors que d'autres n'ont que des effets

substantiels? Nous avons tenté de proposer des réponses à ces interrogations, mais il demeure que de nombreuses précisions restent à être apportées.

RÉFÉRENCES

1. Katz, A.M. (1992) *Physiology of the Heart*, 2nd edn, Raven Press, New York, 274-302
2. Opie, L.H. (1984) *The Heart. Physiology, Metabolism, Pharmacology and Therapy*, Grune & Stratton, Orlando, 1-14
3. Ahlquist R.P. (1948) *Am. J. Physiol.* **153**, 586-600
4. Fredriksson R, Lagerstrom M.C., Lundin L.G., Schioth H.B. (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol. Pharmacol.* **63**, 1256-1272
5. Bockaert, J., Pin, J-P. (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors : an evolutionary success. *EMBO J.*, **18**, 1723-1729
6. Lefkowitz, R.J. (2000) The superfamily of heptahelical receptors. *Nature Cell Biology*, **2**, E133-E136
7. Ross E.M., Gilman, A.G. (1977) Resolution of some components of adenylate cyclase necessary for catalytic activity. *J. Biol. Chem.*, **252**, 6966-6969
8. Hermans, E. (2003) Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors. *Pharmacol. Therap.*, **99**, 25-44
9. Ford, C.E., Skiba, N.P., Bae, H., Daaka, Y., Reuveny, E., Shekter, L.R., Rosal, R., Weng, G., Yang, C-S., Iyengar, R., Miller, R.J., Jan, L.Y., Lefkowitz, R.J., Hamm, H.E. (1998) Molecular basis for interactions of G protein $\beta\gamma$ subunits with effectors. *Science*, **280**, 1271-1274

10. Wieland, T., Mittmann, C. (2003) Regulators of G-protein signalling: multifunctional proteins with impact on signalling in the cardiovascular system *Pharmacol. Therap.*, **97**, 95-115
11. Morris, A.J., Malbon, C.C. (1999) Physiological Regulation of G Protein-Linked Signaling. *Physiol. Rev.*, **79**, 1373-1430
12. Gautam, N. Domnes, G.B., Yan, K., Kisselev, O. (1998) The G protein $\beta\gamma$ complex. *Cell Signal.*, **10**, 447-455
13. Blake B.L., Wing M.R., Zhou J.Y., Lei Q., Hillmann J.R., Behe C.I., Morris R.A., Harden T.K., Bayliss D.A., Miller R.J., Siderovski D.P. (2001) G β association and effector interaction selectivities of the divergent G γ subunit G γ 13. *J. Biol. Chem.*, **276**, 49267-49274
14. Hur, E-M., Kim, K-T. (2002) G protein-coupled receptor signalling and cross-talk: Achieving rapidity and specificity. *Cellular Signalling*, **14**, 397-405
15. Neubig, R.R. (1994) Membrane organization in G-protein mechanisms. *FASEB J.*, **8**, 939-46
16. Moffett, S. Brown, D.A., Linder, M.E. (2000) Lipid-dependent targeting of G proteins into rafts. *J. Biol.Chem.*, **275**, 2191-2198.
17. Shaul, P.W., Anderson, R.J., (1998) Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction. *Am. J. Physiol.*, **275**; L-843-L-851.
18. Haasemann, M., Cartaud, J., Muller-Esterl, W., Dunia, I., (1998) Agonist-induced redistribution of bradykinin B2 receptor in caveolae. *J. Cell. Sci.*, **111**, 917-928.

19. Lisanti, M.P., Scherer, P.E., Tang, Z., Sargiacomo, M. (1994) Caveolae, caveolin and caveolin-rich membrane domains: a signalling hypothesis. *Trends Cell. Biol.*, **4**, 231-235.
20. Rybin, V.O., Xu, X., Lisanti, M.P., Steinberg, S.F. (2000) Differential targeting of β -adrenergic receptor subtypes and adenylyl cyclase to cardiomyocyte caveolae. A mechanism to functionally regulate the cAMP signaling pathway. *J. Biol. Chem.*, **275**, 41447-41457
21. Milligan, G., Svoboda, P., Brown, C.M. (1994) Why are there so many adrenoceptor subtypes? *Biochem. Pharmacol.*, **48**, 1059-1071
22. Langer, S.Z. (1974) Presynaptic regulation of catecholamine release. *Biochem. Pharmacol.*, **23**, 1793-1800
23. Schimmel, R.J. (1976) Roles of alpha and beta adrenergic receptors in control of glucose oxidation in hamster epididymal adipocytes. *Biochem. Biophys. Acta*, **428**, 379-387
24. Civantos Calzada, B., De Artinano, A.A. (2001) Alpha-adrenoceptor subtypes. *Pharmacol. Res.*, **44**, 195-208
25. Btherseln, S., Pettinger, W.A. (1977) A functional basis for classification of α -adrenergic receptors. *Life Sci.*, **21**, 595-606
26. Drew, G.M., Whiting, S.B. (1979) Evidence for two distinct types of postsynaptic alpha-adrenoceptor in vascular smooth muscle in vivo. *Br. Pharmacol.*, **67**, 207-215
27. Michel, M.C., Kenny, B., Schwinn, D.A. (1995) Classification of α_1 -adrenoceptor subtype. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol*, **352**, 1-10

28. Hieble, J.P., Bylund, D.B., Clarke, D.E., Eikenburg, D.C., Langer, S.Z., Lefkowitz, R.J., Minneman, K.P., Ruffolo, R.R. (1995) International Union of Pharmacology. X. Recommendation for nomenclature of alpha 1-adrenoceptors: consensus update. *Pharmacol. Rev.*, **47**, 267-270
29. Faure, C., Gouhier, C., Langer, S.Z., Graham, D., (1995) α_1 -adrenoceptor subtypes in human tissues by competitive RT-PCR analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **213**, 935-943
30. Hirasawa, A., Horie, K., Tanaka, T., Takagaki, K., Murai, M., Yano, J., Tsujimoto, G. (1993) Cloning, functional expression and tissue distribution of human cDNA for the α_{1C} -adrenergic receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **195**, 902-909
31. Price, D.T., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G., Berkowitz, D., Schwinn, D.A. (1994) Localization of mRNA for three distinct alpha1-adrenergic receptor subtypes in human tissues: implications for human alpha-adrenergic physiology. *Mol. Pharmacol.*, **45**, 171-175
32. Weinberg, D.H., Trivedi, P., Tan, C.P., Mitra, S., Perkins-Barrow, A., Borkowski, D., Strader, C.D., Bayne, M. (1994) Cloning, expression, and characterization of human α -adrenergic receptors α_{1A} , α_{1B} , and α_{1C} . *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **201**, 1296-1304
33. Jahnel, U., Jakob, H., Nawrath, H. (1992) Electrophysiologic and inotropic effects of alpha-adrenoceptor stimulation in human isolated atrial heart muscle. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **346**, 82-87

34. Skomedal, T., Aass, H., Osnes, J.B., Fjeld, N.B., Klingen, G., Langslet, A. and Semb, G. (1985) Demonstration on an alpha adrenoceptor-mediated inotropic effect on norepinephrine in human atria. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **233**, 441-446
35. Brodde, O.E., Bruck, H., Leineweber, K., Seyfarth, T. (2001) Presence, distribution and physiological function of adrenergic and muscarinic receptor subtypes in the human heart. *Basic Res. Cardiol.*, **96**, 528-538
36. Berridge, M.J., Irvine, R.F. (1989) Inositol phosphates and cell signalling. *Nature*, **341**, 197-205
37. French, N. (1995) α_2 -adrenoceptors and I_2 sites in the mammalian central nervous system. *Pharmacol. Ther.*, **68**, 175-208
38. Bylund, D.B. (1995) Pharmacological characteristics of α_2 -adrenergic receptor subtypes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **763**, 1-7
39. Berkowitz, D.E., Price, D.T., Bello, E.A., Page, S.O., Schwinn, D.A. (1994) Localization of messenger RNA for three distinct α_2 -adrenergic receptor subtypes in human tissues: Evidence for species heterogeneity and implications for human pharmacology. *Anaesthesiology*, **81**, 1235-1244
40. Shorr, R.G.L., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G. (1981) Purification of the β -adrenergic receptor. Identification of the hormone binding subunit. *J. Biol. Chem.*, **256**, 5820-5826
41. Shorr, R.G.L., Strohsacker, M.W., Lavin, T.N., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G. (1982) The β_1 -adrenergic receptor of the turkey erythrocyte. Molecular heterogeneity revealed by purification and photoaffinity labeling. *J. Biol. Chem.*, **257**, 12341-12350

42. Brandt, D.R., Asano, T., Pedersen, S.E., Ross, E.M. (1983) Reconstitution of catecholamine-stimulated guanosine triphosphatase activity. *Biochemistry*, **22**, 4357-4362
43. Cerione, R.A. Codina, J., Benovic, J., Lefkowitz, R.J., Birnbaumer, L., Caron, M.G. (1984) Mammalian beta2-adrenergic receptor: reconstitution of functional interactions between pure receptor and pure stimulatory nucleotide binding protein of the adenylate cyclase system. *Biochemistry*, **23**, 4519-4525
44. Cerione, R.A. *et al.* (1984) Reconstitution of a hormone-sensitive adenylate cyclase system. The pure beta-adrenergic receptor and guanine nucleotide regulatory protein confer hormone responsiveness on the resolved catalytic unit. *J. Biol. Chem.*, **259**, 9979-9982
45. May, D.C., Ross, E.M., Gilman, A.G., Smigel, M.D. (1985) Reconstitution of catecholamine-stimulated adenylate cyclase activity using three purified proteins *J. Biol. Chem.*, **260**, 15829-15833
46. Granneman, J.G., Lahners, K.N., Chandhry, A. (1993) Quantitative relationship between alpha 1-adrenergic receptor density and the receptor-mediated calcium response in individual astroglial cells. *Mol. Pharmacol.*, **44**, 254-270
47. Van Spronsen, A., Nahmias, C., Krief, S., Briend-Sutren, M.M., Strosberg, A.D., Emorine, L.J. (1993) The promoter and intron/exon structure of the human and mouse beta 3-adrenergic-receptor genes. *Eur. J. Biochem.*, **213**, 1117-1124
48. Strosberg, A.D. (1997) Structure and function of the β_3 -adrenergic receptor. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **37**, 421-450

49. Hausdorff, W.P., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1990) Turning off the signal : desensitization of beta-adrenergic receptor function. *FASEB J.* **4**, 2881-2889
50. Emorine, L.J., Feve, B., Pairault, J., Briend-Struten, M.M., Marullo, S., Delavier-Klutchko, C., Strosberg, A.D. (1991) Structural basis for functional diversity of β_1 - β_2 - and β_3 -adrenergic receptors. *Biochem. Pharmacol.*, **41**, 853-859
51. Gauthier, C., Langin, D., Balligand, J.L. (2000) β_3 -adrenoceptors in the cardiovascular system. *TIPS.*, **21**, 426-431
52. Seppet, E.K. (2003) Negative inotropy starts with the β_3 -adrenoceptor. *Cardiovasc. Res.*, **59**, 262-265
53. Gauthier, C., Leblais, V., Kobzik, L et al. (1998) The negative inotropic effect of β_3 -adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle. *J. Clin. Invest.* **102**, 1377-1384
54. Varghese, P., Harrison, R.W., Lofthouse, R.A. et al. (2000) β_3 -adrenoceptor deficiency blocks nitric oxide-dependent inhibition of myocardial contractility, *J. Clin. Invest.*, **106**, 697-703
55. Brodde, O-E., Karad, K., Zerkowski, H-R., Rohm, N., Reidemeister, J.C. (1983) Coexistence of beta 1- and beta 2-adrenoceptors in human right atrium. Direct identification by (+/-)-[125I]iodocyanopindolol binding. *Circ. Res.*, **53**, 752-758
56. Robberecht, P., Delhaye, M., Taton, G., De Neef, P., Waelbroeck, M., De Smet, J.M., Leclerc, J.L., Chatelain, P., Christophe, J. (1983) The human heart beta-adrenergic receptors. I, Heterogeneity of the binding sites: presence of 50% beta 1- and 50% beta 2-adrenergic receptors. *Mol. Pharmacol.*, **24**, 169-173

57. Stiles, G.L., Taylor, S., Lefkowitz, R.J. (1983) Human cardiac beta-adrenergic receptors : subtype heterogeneity delineated by direct radioligand binding. *Life Sci.*, **33**, 467-473
58. Steinberg, S.F. (1999) The molecular basis for distinct beta-adrenergic receptor subtypes actions in cardiomyocytes. *Circ. Res.*, **85**, 1101-1111
59. Xiao, R.P. (2000) Cell logic for dual coupling of a single class of receptors to Gs and Gi proteins. *Circ. Res.*, **87**, 635-637
60. Xiao, R.P., Avdonin, P., Zhou, Y.Y., Cheng, H., Akhter, S.A., Eschenhagen, T., Lefkowitz, R.J., Koch, W.J., Lakatta, E.G. (1999) Coupling of β_2 -adrenoceptor to Gi proteins and its physiological relevance in murine cardiac myocytes. *Circ. Res.*, **84**, 43-52
61. Daaka, Y., Luttrell, L.M., Lefkowitz, R.J. (1997) Switching of the coupling of the β_2 -adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature*, **390**, 88-91
62. Xiao, R.P., Ji, X., Lakatta, E.G. (1995) Functional coupling of the beta2-adrenoceptor to a pertussis toxin-sensitive G protein in cardiac myocytes. *Mol. Pharmacol.*, **47**, 322-329
63. Xiao, R.P., Lakatta, E.G. (1993) Beta1-adrenoceptor stimulation and beta2-adrenoceptor stimulation differ in their effects on contraction, cytosolic Ca^{2+} and Ca^{2+} current in single rat ventricular cells. *Circ. Res.*, **73**, 286-300
64. Wallukat, G. (2002) The β -adrenergic receptors. *Herz*, **27**, 683-690
65. Haft, J. (1974) Cardiovascular injury induced by sympathetic catecholamines. *Prog. Cardiovasc. Dis.*, **17**, 73-86

66. Ungerer, M, Bohm, M., Elce, J.S., Erdmann, E., Lohse, M.J. (1993) Cardiac failure : Altered expression of beta-adrenergic receptor kinase and beta1-adrenergic receptors in the failing human heart. *Circulation*, **87**, 454-463
67. Bristow, M.R., Minobe, W., Rasmussen, R., Hershberger, R.E., Hoffman, B.B. (1993) Beta1-and beta2-adrenergic receptors-mediated adenylate cyclase stimulation in non failing and failing human ventricular myocardium. *J. Clin. Invest.*, **92**, 2737-2745
68. Wang, X., Dhalla, N.S. (2000) Modification of beta-adrenoceptor signal transduction pathway by genetic manipulation and heart failure. *Mol. Cell. Biochem.*, **214**, 131-155
69. Altschuld, R.A., Starling, R.C., Hamlin, R.L., Bilman, G.E., Hensley, J., Castillo, L., Fertel, R.H., Hohl, C.M., Robitaille, P.M., Jones, L.R. (1995) Response of Failing Canine and Human Heart Cells to beta sub 2- Adrenergic Stimulation. *Circulation*, **92**, 1612-1618
70. Post, S.R., Hammond, H.K., Insel, P.A. (1999) β -adrenergic receptors and receptor signaling in heart failure. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **39**, 343-360
71. Pitcher, J.A., Freedman, N.J., Lefkowitz, R.J. (1998) G protein-coupled receptor kinases. *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 653-692
72. Laporte, S.A. *et al.* (1999) The β_2 -adrenergic receptor/ β -arrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 3712-3717
73. Rapacciuolo, A., Suvarna, S., Barki-Harrington, L., Luttrell, L.M., Cong, M., Lefkowitz, R.J., Rockman, H.A. (2003) Protein kinase A and G protein-coupled

- receptor kinase phosphorylation mediates beta-1 adrenergic receptor endocytosis through different pathways. *J. Biol. Chem.*, **278**, 35403-35411
74. Claing, A., Perry, S.J., Achiriloaie, M., Walker, J.K., Albanesi, J.P., Lefkowitz, R.J., Premont, R.T. (2000) Multiple endocytic pathways of G protein-coupled receptors delineated by GIT1 sensitivity. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 1119-1124
75. Teixeira, A., Chaverot, N., Schroder, C., Strosberg, A.D., Couraud, P.O., Cazaubon, S. (1999) Requirement of caveolae microdomains in extracellular signal-regulated kinase and focal adhesion kinase activation induced by endothelin-1 in primary astrocytes. *J. Neurochem.*, **72**, 120-128
76. Guest, S.J., Hadcock, J.R., Watkins, D.C., Malbon, C.C. (1990) β_1 - and β_2 -adrenergic receptor expression in differentiating 3T3-L1 cells. Independent regulation at the level of mRNA. *J. Biol. Chem.*, **265**, 5370-5375
77. Podlowski, S. Luther, H.P., Morwinski, R., Muller, J., Wallukat, G. (1998) Agonistic Anti-beta1-Adrenergic Receptor Autoantibodies From Cardiomyopathy Patients Reduce the beta1-Adrenergic Receptor Expression in Neonatal Rat Cardiomyocytes. *Circulation*, **98**, 2470-2476
78. Lefkowitz, R.J. (1998) G-protein-coupled receptors. III New roles for receptor kinases and β -arrestins in receptor signaling and desensitization. *J. Biol. Chem.*, **273**, 18677-18680
79. Dumont, J.E. (1980) Actions of hormones and neurotransmitters with known receptors but unknown coupled effector systems. *Trends Pharmacol. Sci.*, **1**, 219-222

80. Vazquez-Prado, J., Medina, L.D., Garcia-Sainz, J.A. (1997) Activation on endothelin ET_A receptors induces phosphorylation of α_{1B} -adrenoreceptors in rat-1 fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, **272**, 27330-27337
81. Dzimir, N. (2002) Receptor crosstalk. Implications for cardiovascular function, disease and therapy. *Eur. J. Biochem.*, **269**, 4713-4730
82. Sprenkle, A.B., Murray, S.F., Glembotski, C.C. (1995) Involvement of multiple cis elements in basal and alpha-adrenergic agonist inducible atrial natriuretic factor transcription: Roles for serum response elements and an SP-1-like element. *Circ. Res.*, **77**, 1060-1069
83. Li, H.T., Long, C.S., Gray, M.O., Rokosk, D.G., Honbo, N.Y., Karliner, J.S. (1997) Cross Talk Between Angiotensin AT sub 1 and alpha sub 1-Adrenergic Receptors: Angiotensin II Downregulates alpha sub 1a-Adrenergic Receptor Subtype mRNA and Density in Neonatal Rat Cardiac Myocytes. *Circ. Res.*, **81**, 396-403
84. Bristow, M.R., Hershberger, R.E., Port, J.D., Gilbert, E.M., Sandoval, A., Rasmussen, R., Cates, A.E., Feldman, A.M. (1990) Beta-adrenergic pathways in nonfailing and failing human ventricular myocardium. *Circulation*, **82**, (Suppl.1) 112-116
85. Brodde, O.E. (1996) Beta-adrenergic receptors in failing human myocardium. *Basic Res. Cardiol.*, **91**, (Suppl.2) 35-40
86. Engelhardt, S., Bohm, M., Erdmann, E., Lohse, M.J. (1996) Analysis of beta-adrenergic receptor mRNA levels in human ventricular biopsy specimens by quantitative polymerase chain reactions: progressive reduction of beta 1-adrenergic receptor mRNA in heart failure. *Am. J. Coll. Cardiol.*, **27**, 146-154

87. Corr, P.B., Shayman, J.A., Kramer, J.B., Kipnis, R.J. (1981) Increased alpha-adrenergic receptors in ischemic cat myocardium. A potential mediator of electrophysiological derangements. *J. Clin. Invest.*, **67**, 1232-1236
88. Corr, P.B., Yamada, K.A., Datorre, S.D. (1990) Modulation of alpha-adrenergic receptors and their intracellular coupling in the ischemic heart. *Basic Res. Cardiol.*, **85**, Suppl.1, 31-45
89. Boutidjir, M., Restivo, M., Wei, Y., El-Sherif, N. (1992) Alpha 1- and beta-adrenergic interactions on L-type calcium current in cardiac myocytes. *Pflugers Arch.*, **421**, 397-399
90. Lochner, A., Tromp, E., Mouton, R. (1996) Signal transduction in myocardial ischaemia and reperfusion. *Mol. Cell. Biochem.*, **161**, 129-136
91. Strang, K.T., Moss, R.L. (1995) alpha1-Adrenergic Receptor Stimulation Decreases Maximum Shortening Velocity of Skinned Single Ventricular Myocytes From Rats. *Circ. Res.*, **77**, 114-120
92. Ahkter, S.A., Milano, C.A., Shotwell, K.F., Cho, M-C., Rockman, H.A., Lefkowitz, R.J., Koch, W.J. (1997) Transgenic mice with cardiac overexpression of α_{1B} -adrenergic receptors. In vivo α_1 -adrenergic receptor mediated regulation of β -adrenergic signaling. *J. Biol. Chem.*, **272**, 21253-21259
93. Grupp, I.L., Lorenz, J.N., Walsh, R.A., Boivin, G.P., Rindt, H. (1998) Overexpression of alpha1B-adrenergic receptor induces left ventricular dysfunction in the absence of hypertrophy. *Am. J. Physiol.*, **275**, (*Heart Circ. Physiol.* 44), H1338-H1350

94. Lemire, I., Allen, B.G., Rindt, H., Hebert, T.E. (1998) Cardiac-specific overexpression of α_{1B} -adrenergic receptor regulates β -adrenergic receptor activity via molecular crosstalk. *J Mol. Cell. Cardiol.*, **30**, 1827-1839
95. RoKosh, D.G., and Simpson, P.C. (2002) Knockout of the $\alpha_{1A/C}$ -adrenergic receptor subtype : the $\alpha_{1A/C}$ is expressed in resistance arteries and is required to maintain arterial blood pressure. *PNAS. USA*, **94**, 11589-11594
96. Tanoue, A. et al. (2002) The α_{1D} -adrenergic receptor directly regulates arterial blood pressure via vasoconstriction. *J. Clin. Invest.*, **109**, 765-775
97. McWhinney, C.D. et al. (2000) α_1 adrenergic signaling in a cardiac murine atrial myocyte (HL-1) cell line. *Mol. Cell. Biochem.*, **214**, 111-119
98. Tanoue, A., Koshimizu T-A., et al. (2003) Insights into α_1 adrenoceptor function in health and disease from transgenic animal studies. *Trends Endocr. Metab.*, **14**, 107-113
99. Nabika, T., Nara, Y., Yamori, Y., Lovenberg, W., Endo, J. (1985) Angiotensin II and phorbol ester enhance isoproterenol- and vasoactive intestinal peptide (VIP)-induced cyclic AMP accumulation in vascular smooth muscle cells.. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **131**, 30-36
100. Vanecek, J., Sudgen, D., Weller, J., Klein, D.C. (1985) Atypical synergistic alpha1- and beta-adrenergic regulation of adenosine 3', 5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate in rat pinealocytes. *Endocrinology*, **116**, 2167-2173
101. Buxton, I.L.O., Brunton, L.L. (1985) Action of the cardiac α_1 -adrenergic receptor. Activation of cyclic AMP degradation. *J. Biol. Chem.*, **26**, 6733-6737

102. Barrett, S., Honbo, N., Karliner, J.S. (1993) Alpha 1-adrenoceptor-mediated inhibition of cellular cAMP accumulation in neonatal rat ventricular myocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **347**, 384-393
103. Takai, Y., Kishimoto, A., Iwasa, Y., Kawahara, Y., Mori, T., Nishizuka, Y. (1979) Calcium-dependent activation of a multifunctional protein kinase by membrane phospholipids. *J. Biol. Chem.*, **254**, 3692-3695
104. Kuo, J.F., Andersson, R.G.G., Wise, L., Mackerlova, L., Salomonsson, I., Brackett, N.L., Katoh, L., Shoji, M., Wren, R.W. (1981) Calcium-dependent protein kinase: widespread occurrence in various tissues and phyla of the animal kingdom and comparison of effects of phospholipid, calmodulin, and trifluoperazine. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **77**, 7039-7043
105. Mochly-Rosen, D., Gordon, A.S. (1998) Anchoring proteins for protein kinase C : a means for isozyme selectivity. *FASEB J.*, **12**, 35-42
106. Harrington, E.O., Ware, J.A. (1995) Diversity of the protein kinase C gene family : implications for cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc. Med.*, **5**, 193-199
107. Mellor, H., Parker, P.J. (1998) The extended protein kinase C superfamily. *Biochem. J.*, **332**, 281-292
108. Nakanishi, H., Brewer, K.A., Exton, J.H. (1993) Activation of the zeta isozyme of protein kinase C by phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate. *J. Biol. Chem.*, **268**, 13-16
109. Takeishi, Y., Jalili, T., Ball, N.A., Walsh, R.A. (1999) PKC translocation without changes in Gq and PLC-protein abundance in cardiac hypertrophy and failure. *Am. J. Physiol.*, **277**, H2298-H2304

110. Hug, H., Sarre, T.F. (1993) Protein kinase C isoenzymes : divergence in signal transduction? *Biochem J.*, **291**, 329-343
111. Bogoyevitch, M.A., Parker, P.J., Sugdes, P.H. (1993) Characterization of protein kinase C isotype expression in adult rat heart. Protein kinase C-epsilon is a major isotype present, and it is activated by phorbol esters, epinephrine, and endothelin. *Circ. Res.*, **72**, 757-767
112. Khalil, R.A., Lajoie, C., Resnick, M.S., Morgan, K.G. (1992) Ca²⁺-independent isoforms of protein kinase C differentially translocate in smooth muscle. *Am. J. Physiol.*, **263**, C714-C719
113. Chang, J.D., Xu, Y., Raychowdhury, M.K., Ware, J.A. (1993) Molecular cloning and expression of a cDNA encoding a novel isoenzyme of protein kinase C (nPKC). A new member of the nPKC family expressed in skeletal muscle, megakaryoblastic cells, and platelets. *J. Biol. Chem.*, **268**, 14208-14218
114. Shin, H-G., Barnett, J.V., Chang, P., Reddy, S., Drinkwater, D.C., Pierson, R.N., Wiley, R.G., Murray, K.T. (2000) Molecular heterogeneity of protein kinase C expression in human ventricle. *Cardiovascular Research*, **48**, 285-299
115. Bowling, N., Walsh, R.A., Song, G., Estridge, T., Sandusky, G.E., Fouts, R.L., Mintze, K., Pickard, T., Roden, R., Bristow, M.R., Sabbah, H.N., Mizrahi, J.L., Gromo, G., King, G.L., Vlahos, C.J. (1999) Increased protein kinase C activity and expression of Ca²⁺ sensitive isoforms in the failing human heart. *Circulation*, **99**, 384-391

116. Wang, J., Liu, X., Arneja, A.S., Dhalla, N.S. (1999) Alterations in protein kinase A and protein kinase C levels in heart failure due to genetic cardiomyopathy. *Can. J. Cardiol.*, **15**, 683-690
117. Gu, X., Bishop, S.P. (1994) Increased protein kinase C and isozyme redistribution in pressure-overload cardiac hypertrophy in the rat. *Circ. Res.*, **75**, 926-931
118. Takeishi, Y., Bhagwat, A., Ball, N.A., Kirkpatrick, D.L., Periasamy, M., Walsh, R.A (1999) Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on protein kinase C and SR proteins in heart failure. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **276**, H53-H62
119. Wang, J., Liu, X., Sentex, E. (2003) Increased expression of protein kinase C isoforms in heart failure due to myocardial infarction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **284**, H2277-H2287
120. Malhotra, A., Singh Kang, B.P., Opawumi, D., Belizaire, W., Meggs, L.G. (2001) Molecular biology of protein kinase C signaling in cardiac myocytes. *Mol. Cell. Biochem.*, **225**, 97-107
121. Mochly-Rosen, D., Henrich, C.J., Cheever, L., Khaner, H., Simpson, P.C. (1990) A protein kinase C isozyme is translocated to cytoskeletal elements on activation. *Mol. Biol. Cell*, **1**, 693-706
122. Disatnik, M-H., Buraggi, G., Mochly-Rosen, D. (1994) Localization of protein kinase C isozymes in cardiac myocytes. *Exp. Cell. Res.*, **210**, 287-297
123. Gordon, A.S., Yao, L., Wu, Z-L., Coe, I.R., Diamond, I. (1997) Ethanol alters the subcellular localization of delta and epsilon protein kinase C in NG108-15 cells. *Mol. Pharmacol.*, **52**, 554-559

124. Sibley, D.R., Nambi, P., Peters, J.R., Lefkowitz, R.J. (1984) Phorbol diesters promote beta-adrenergic receptor phosphorylation and adenylate cyclase desensitization in duck erythrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **121**, 973-979
125. Kelleher, D.J., Pessin, J.E., Ruoho, A.E., Johnson, G.L. (1984) Phorbol ester induces desensitization of adenylate cyclase and phosphorylation of the beta-adrenergic receptor in turkey erythrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 4316-4320
126. Garte, S., Belman, S. (1980) Tumour promoter uncouples beta-adrenergic receptor from adenylyl cyclase in mouse epidermis. *Nature*, **284**, 171-173
127. Brostrom, M.A., Brostrom, C.O., Brotman, L.A., Lee, C-S., Wolff, D.J., Geller, H.M. (1982) Alterations of glial tumor cell Ca²⁺ metabolism and Ca²⁺-dependent cAMP accumulation by phorbol myristate acetate. *J. Biol. Chem.*, **257**, 6758-6765
128. Kassis, S., Zaremba, T., Patel, J., Fishman, P.H. (1985) Phorbol esters and beta-adrenergic agonists mediate desensitization of adenylate cyclase in rat glioma C6 cells by distinct mechanisms *J. Biol. Chem.*, **260**, 8911-8917
129. Dixon, R.A.F., Kobilka, B.K., Strader, D.I., Benovic, J.L., Dohlman, H.G., Freille, T., Bolanowski, M.A., Bennett, L.D., Rands, E., Diehl, R.E., Mumford, R.A., Slater, E.E., Sigal, I.S., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., Strader, C.D. (1986) Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature*, **321**, 75-80
130. Hausdorf, W.P., Bouvier, M., O' Dowd, B.F., Irons, G.P., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1989) Phosphorylation sites on two domains of the beta2-adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization. *J. Biol. Chem.*, **264**, 12657-12665

131. Bouvier, M., Collins, S., O' Dowd, B.F., Campbell, P.T., De Blasi, A., Kobilka, B.K., MacGregor, C., Irons, G.P., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1989) Two distinct pathways for cAMP-mediated down-regulation of the beta 2- adrenergic receptor. Phosphorylation of the receptor and regulation of its mRNA level. *J. Biol. Chem.*, **264**, 16786-16792
132. Bouvier, M. (1990) Cross-talk between second messengers. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **594**, 120-129
125. Chalfant, C., Ohno, S., Fisher, A.A., Bisnauth, L.D., Watson, J., Cooper, D. (1996) A carboxy-terminal deletion mutant of protein kinase C beta II inhibits insulin-stimulated 2-deoxyglucose uptake in L6 rat skeletal muscle cells. *Mol. Endocrinol.*, **10**, 1273-1281
126. Gordon, A.S., Yao, L., Wu, Z.L., Coe, I.R., Diamond, I. (1997) Ethanol alters the subcellular localization of delta- and epsilon protein kinase C in NG108-15 cells. *Mol. Pharmacol.*, **52**, 554-559
127. Schaefer, M., Albrecht, N., Hofmann, T., Gudermann, T. (2001) Diffusion-limited translocation mechanisms of protein kinase C isotypes. *FASEB J.*, **15**, 1634-1636
128. Babwah, A.V., Dale, L.B., Ferguson, S.S.G. (2003) Protein kinase C isoform-specific differences in the spatial-temporal regulation and decoding of metabotropic glutamate receptor1a-stimulated second messenger responses. *J. Biol. Chem.*, **278**, 5419-5426
129. Wang, W.L., Yeh, S.F., Chang, Y.I., Hsiao, S.F., Lian, W.W., Lin, C.H., Huang, C.Y., Lin, W.J. (2003) PICK1, an anchoring protein that specifically targets protein kinase C alpha to mitochondria selectively upon serum stimulation in NIH 3T3 cells. *J. Biol. Chem.*, **278**, 37705-37712

130. Ron, D., Luo, J., Mochly-Rosen, D. (1995) C2 region-derived peptides inhibit translocation and function of beta protein kinase C *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, **270**, 24180-24187
131. Csukai, M., Chen, C-H., De Matteis, M.A., Mochly-Rosen, D. (1997) The coatomer protein beta'-COP, a selective binding protein (RACK) for protein kinase C epsilon. *J. Biol. Chem.*, **272**, 29200-29206
132. Staudinger, J., Zhou, J., Burgess, R., Elledge, S.J., Olsen, E.N. (1995) PICK1: a perinuclear binding protein and substrate for protein kinase C isolated by the yeast two-hybrid system. *J. Cell Biol.*, **128**, 263-271
133. Yarwood, S.J., Steele, M.R., Scotland, G., Houslay, M.D., Bolger, G.G. (1999) The RACK1 signaling scaffold protein selectively interacts with the cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D5 isoform. *J. Biol. Chem.*, **274**, 14909-14917
134. Winstel, R., Freund, S., Krasel, C., Hoppe, E., Lohse, M.J. (1996) Protein kinase cross-talk: membrane targeting of the beta-adrenergic receptor kinase by protein kinase C. *PNAS USA*, **93**, 2105-2109
135. Chuang, T.T., LeVine, H., De Blasi, A. (1995) Phosphorylation and activation of beta-adrenergic receptor kinase by protein kinase C. *J. Biol. Chem.*, **270**, 18660-18665
136. Leavitt, M., Setola, V., Fishman, P.H. (2001) Protein kinase C-mediated down-regulation of beta(2)-adrenergic receptor and gene expression in rat C6 glioma cells. *J. Neurochem.*, **77**, 823-829
137. Rapacciuolo, A., Suvarna, S., Barki-Harrington, L., Luttrell, L.M., Cong, M., Lefkowitz, R.J., Rockman, H.A. (2003) Protein kinase A and G protein-coupled

- receptor kinase phosphorylation mediates beta-1 adrenergic receptor endocytosis through different pathways. *J. Biol. Chem.*, **278**, 35403-35411
138. Lin, F., Wang, H-Y., Malbon, C.C. (2000) Gravin-mediated formation of signaling complexes in beta 2-adrenergic receptor desensitization and resensitization. *J. Biol. Chem.*, **275**, 19025-19034
139. Rybin, V.O., Xiaohong, X., Lisanti, M.P., Steinberg, S.F. (2000) Differential targeting of beta-adrenergic receptor subtypes and adenylyl cyclase to cardiomyocytes caveolae. A mechanism to functionally regulate the cyclic AMP signaling pathway. *J. Biol. Chem.*, **275**, 41447-41457
140. Xiang, Y., Rybin, V.O., Steinberg, S.F., Kobilka, B. (2002) Caveolar localization dictates physiologic signaling of beta2-adrenoceptors in neonatal cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.*, **277**, 34280-34286
141. Zamah, A.M., Delahunty, M., Luttrell, L.M., Lefkowitz, R.J. (2002) Protein kinase A-mediated phosphorylation of the beta 2-adrenergic receptor regulates its coupling to Gs and Gi. Demonstration in a reconstituted system. *J. Biol. Chem.*, **277**, 31249-31256
142. Daaka, Y., Luttrell, L.M., Lefkowitz, R.J. (1997) Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature*, **390**, 88-91
143. Maudsley, S., Pierce, K.L., Zamah, A.M., Miller, W.E., Ahn, S., Daaka, Y., Lefkowitz, R.J., Luttrell, L.M. (2000) The beta2-adrenergic receptor mediates extracellular signal-regulated kinase activation via assembly of a multi-receptor complex with the epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.*, **275**, 9572-9580

144. Xhe, W.Z., Zheng, M., Koch, W.J., Lefkowitz, R.J., Kobilka, B.K., Xiao, R.P. (2001) Dual modulation of cell survival and cell death by beta(2)-adrenergic signaling in adult mouse cardiac myocytes. *PNAS USA*, **98**, 1607-1612
145. Crespo, P., Xu, N., Simonds, W.F., Gutkind, J.S. (1994) Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein beta gamma subunits. *Nature*, **369**, 418-420
146. Luttrell, L.M., Della Roca, G.J., van Biesen, T., Luttrell, D.K., Lefkowitz, R.J. (1997) Gbetagamma subunits mediate Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. A scaffold for G protein-coupled receptor-mediated Ras activation. *J. Biol. Chem.*, **272**, 4637-4644
147. Hawes, B.E., Luttrell, L.M., van Biesen, T., Lefkowitz, R.J. (1996) Phosphatidylinositol 3-kinase is an early intermediate in the G beta gamma-mediated mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *J. Biol. Chem.*, **271**, 12133-12136
148. Lopez-Illasaca, M., Crespo, P., Pellici, P.G., Gutkind, J.S., Wetzer, R. (1997) Linkage of G protein-coupled receptors to the MAPK signaling pathway through PI 3-kinase gamma. *Science*, **275**, 394-397
149. Davare, M.A., Avdonin, V., Hall, D.D., Peden, E.M., Burette, A., Weinberg, R.J., Horne, M.C., Hoshi, T., Hell, J.W. (2001) A beta2 adrenergic receptor signaling complex assembled with the Ca²⁺ channel Cav1.2. *Science*, **293**, 98-101
150. Gomes, I., Jordan, B.A., Gupta, A., Rios, C., Trapaidze, N., Devi, L.A. (2001) G protein-coupled receptor dimerization : implications in modulating receptor function. *J. Mol. Med.*, **79**, 226-242

151. Lavoie, C., Hebert, T.E. (2003) Pharmacological characterization of putative beta1-beta2-adrenergic receptor heterodimers. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **81**, 186-195
152. Lavoie, C., Mercier, J-F., Salahpour, A., Umapathy, D., Breit, A., Villeneuve, L.R., Zhu, W-Z., Xiao, R-P., Lakatta, E.G., Bouvier, M., Hebert, T.E. (2002) Beta 1/beta 2-adrenergic receptor heterodimerization regulates beta 2-adrenergic receptor internalization and ERK signaling efficacy. *J. Biol. Chem.*, **277**, 35402-35410

