

2m11.3269.1

Université de Montréal

**L'activation de la PI 3-kinase par les récepteurs  
 $\beta$ -adrénergiques est dépendante du sous-type**

par  
Julie Simard

Département de pharmacologie  
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de maîtrise  
en pharmacologie

Octobre 2004

©Julie Simard, 2004



W

4

U58

2005

V. 045

**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 :

L'activation de la PI 3-kinase par les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques est dépendante du sous-  
type

présenté par :  
Julie Simard

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr André De Léan, président-rapporteur  
Dr Guy Rousseau, directeur de recherche  
Dr Jean-François Gauchat, membre du jury

## Résumé

Lorsque le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique ( $\beta_2$ -AR) est stimulé par un agoniste, la G-protein receptor kinase (GRK) est recrutée à la membrane plasmique en entraînant avec elle la PI 3-kinase. La proximité entre le  $\beta_2$ -AR en conformation active et la PI 3-kinase provoque l'activation de cette dernière engendrant ainsi des mécanismes de survie cellulaire et anti-apoptotiques. Toutefois, même si en présence d'un agoniste le  $\beta_1$ -AR recrute à la membrane la GRK, l'activation de la PI 3-kinase par ce récepteur reste sujet à controverse. Dans cette étude, nous voulons déterminer si le  $\beta_1$ -AR possède une efficacité différente du  $\beta_2$ -AR pour activer la PI 3-kinase et si la portion carboxy-terminale des  $\beta$ -AR, qui interagit avec la GRK, est impliquée dans cette différence d'efficacité. À l'aide de cellules HEK dont le  $\beta_1$ -AR ou  $\beta_2$ -AR a été transfecté de façon transitoire, nous observons, en présence d'agoniste, que le  $\beta_2$ -AR a la capacité d'activer la voie de la PI 3-kinase/AKT contrairement au  $\beta_1$ -AR. Le changement du septième passage transmembranaire ainsi que du domaine carboxy-terminal par sa réciproque entraîne le changement de phénotype des récepteurs; le récepteur chimérique  $\beta_1$ X $\beta_2$ -AR a la capacité d'activer la voie de PI 3-kinase/AKT contrairement à la chimère  $\beta_2$ X $\beta_1$ -AR qui ne peut activer cette voie. Ces résultats indiquent que la différence de couplage entre les  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -AR avec la PI 3-kinase est causée par la présence de déterminants moléculaires au niveau du domaine carboxy-terminal des récepteurs.

**Mots-clés :**  $\beta$ -adrénergique, récepteur, protéine G, couplage, PI 3-kinase, AKT

## Abstract

When the  $\beta_2$ -Adrenergic receptor ( $\beta_2$ -AR) is occupied by an agonist, G protein receptor kinase-2 (GRK2) is recruited to the membrane and subsequently recruits PI 3-kinase from the cytosol. The proximity of activated  $\beta_2$ -AR and PI 3-kinase allows the activation of this enzyme. In contrast, it has been observed that the  $\beta_1$ -AR is unable to activate the PI 3-kinase/Akt pathway. We hypothesized that the difference might be due to molecular determinants present in the carboxy terminal of the  $\beta$ -AR subtype. Using transiently transfected HEK cells expressing either  $\beta_1$ - or  $\beta_2$ -AR, we observed that in presence of an agonist,  $\beta_2$ -AR is able to activate PI 3-kinase/Akt pathway but not  $\beta_1$ -AR. Switching the seventh transmembrane domain and the carboxy tail in the two receptors reverses this phenotype, i.e.  $\beta_1 \times \beta_2$ AR can activate PI 3-kinase/Akt whereas  $\beta_2 \times \beta_1$ AR cannot. These results indicate that the difference in the coupling to PI 3-kinase/Akt is due to molecular determinants present in the carboxy tail of the receptor.

**Keywords :**  $\beta$ -adrenergic, receptor, G protein, coupling, PI 3-kinase, AKT

## Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des abréviations.....	ix
Remerciements.....	xii

<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
--------------------------	----------

## Chapitre 1

1.1 Les catécholamines.....	2
1.2 Les récepteurs $\beta$ -adrénergiques.....	2
1.2.1 Agonistes et antagonistes.....	10
1.2.2 Structure.....	13
1.2.3 Modifications post-traductionnelles.....	17
1.2.4 Interactions ligands-récepteurs.....	19
1.2.5 Transmission du signal.....	22
1.2.6 Interactions protéines G-récepteurs.....	23
1.3 Les protéines G.....	23
1.3.1 Diversité et classification.....	24
1.3.2 Mode de fonctionnement.....	25
1.3.3 Sous-unité $\alpha$ .....	26
1.3.3.1 Structure.....	26
1.3.3.2 Modifications lipidiques.....	28
1.3.3.3 Effecteurs.....	29
1.3.4 Sous-unités $\beta/\gamma$ .....	30

1.3.4.1	Structure.....	30
1.3.4.2	Modifications lipidiques.....	32
1.3.4.3	Effecteurs.....	33
1.3.5	Couplage des récepteurs $\beta$ -adrénergiques.....	34
1.4	Désensibilisation.....	35
1.4.1	Découplage fonctionnel.....	36
1.4.1.1	Désensibilisation homologue.....	36
1.4.1.1.1	Les GRKs.....	37
1.4.1.1.2	Les arrestines.....	41
1.4.1.2	Désensibilisation hétérologue (via kinases effectrices).....	42
1.4.2	Séquestration.....	44
1.4.3	Régulation négative.....	45
1.4.3.1	Dégradation des récepteurs.....	46
1.4.3.2	Diminution de la synthèse des récepteurs.....	47
1.4.4	Différence dans la régulation de la désensibilisation des récepteurs $\beta$ -adrénergiques.....	48
1.5	Phosphoinositide 3-kinase.....	49
1.5.1	Domaines de liaison des PI.....	52
1.6	Protéine kinase B/AKT.....	53
1.6.1	Activation d'AKT.....	54
1.6.2	Voie de signalisation d'AKT.....	57
1.7	Stimulation $\beta$ -adrénergique et pathologies cardiovasculaires.....	58
1.7.1	Généralités $\beta$ -AR au niveau cariovasculaire.....	58
1.7.2	Défaillance cardiovasculaire.....	58
1.7.3	Hypertrophie.....	60

## **Chapitre 2**

Mise en contexte de l'article.....	62
------------------------------------	----

## **Chapitre 3**

Article.....	64
--------------	----

## **Chapitre 4**

Discussion.....	92
-----------------	----

<b>Conclusion</b> .....	97
-------------------------	----

<b>Bibliographie</b> .....	99
----------------------------	----

## Liste des tableaux

Tableau I :	Effets physiologiques des récepteurs adrénergiques sur divers tissus.....	4
Tableau II:	Effecteurs des sous-unités $\alpha$ et $\beta/\gamma$ des protéines G.....	30

## Liste des figures

Figure 1	Synthèse des catécholamines.....	5
Figure 2	Sécrétions des catécholamines.....	6
Figure 3	Classification des GPCR selon Joël Bockaert .....	8
Figure 4	Affinité relative des récepteurs $\beta$ -adrénergiques pour certains ligands .....	9
Figure 5	Structure primaire des récepteurs $\beta_1$ - et $\beta_2$ -adrénergiques.....	14
Figure 6	Schéma de l'interaction entre la noradrénaline et le $\beta_2$ -AR .....	21
Figure 7	Mode de fonctionnement des protéines G.....	27
Figure 8	Structure des sous-unités $\beta/\gamma$ des protéines G vue de la surface de la sous-unité $\alpha$ .....	31
Figure 9	Schéma général de la désensibilisation des récepteurs .....	38
Figure 10	Structure PtdIns.....	51
Figure 11	Voie de signalisation PI 3-kinase-AKT.....	56
Figure 1	PI 3-kinase activity with $\beta$ -AR stimulation.....	86
Figure 2	AKT activation with $\beta$ -AR stimulation.....	87
Figure 3	PI 3-kinase immunolocalisation to the membrane.....	88
Figure 4	GRK2 carboxy-terminal reduced PI 3-kinase to the membrane level.....	89
Figure 5	PI 3-kinase activity with chimeric $\beta$ -AR stimulation.....	90
Figure 6	AKT activity with chimeric $\beta$ -AR stimulation.....	91

## Liste des abréviations

$\alpha$ -AR : récepteur alpha-adrénergique

$\beta$ -AR : récepteur bêta-adrénergique

$\beta_1$ -AR : récepteur bêta1-adrénergique

$\beta_2$ -AR : récepteur bêta2-adrénergique

$\beta_3$ -AR : récepteur bêta3-adrénergique

Arg : arginine

Asn : asparagine

Asp : acide aspartique

BRCA1 : breast cancer gene 1

CRE : élément de réponse à l'AMPc

CREB : protéine de liaison de l'élément de réponse à l'AMPc

CREM : modulateur de l'élément de réponse à l'AMPc

CTX : toxine cholérique

DTT : dithiothreitol

EGFR: Epidermal growth factor receptor

GPCR : G protein-coupled receptor

GRK : G-protein-coupled receptor kinase

JNK3: kinase de Janus3

Lys : lysine

PDE 4D : phosphodiesterase 4D

PDK1 : phosphoinositide-dependent kinase 1

PH : domaine homologue à la pleckstrine

PI : phosphoinositide

PI 3-kinase : phosphoinositide 3-kinase

PIK : phosphoinositide kinase homology domain

PIP (3,4,5)P3 : phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate

PKA : protéine kinase A  
PKB : protéine kinase B  
PKC : protéine kinase C  
PtdIns : phosphatidylinositol  
PTX : toxine pertussique  
Ser : sérine  
Thr : thréonine  
Tyr : tyrosine  
V<sub>2</sub>R : récepteur V<sub>2</sub> à la vasopressine

*À Yan, Réjeanne, Richard, Jean-Philippe et  
Kim, qui ont su me supporter, m'encourager  
et me guider tout au long de ce long périple  
sinueux et remplis d'embûches.*

## **Remerciements**

Je tiens à remercier mon directeur de recherche le Dr Guy Rousseau pour sa patience d'or, son support, ses encouragements et ses si précieux conseils, ainsi que mes collègues et amis Matthieu Boucher et Stéphanie Falcao pour leur support technique et moral.

## Introduction

Le concept de récepteur fut exploré par les scientifiques il y a plus d'une centaine d'année, afin d'expliquer la spécificité et la sensibilité de la réponse cellulaire face à divers stimuli. Les récepteurs situés à la membrane permettent à une molécule hydrophile d'activer des voies de signalisation à l'intérieur d'un espace restreint, qui est délimité par une bicouche lipidique hydrophobe. Les récepteurs permettent d'entraîner des effets physiologiques et biologiques à l'intérieur de cet espace qui n'était pas accessible à la substance initialement.

Les récepteurs occupent une grande importance dans les organismes pluricellulaires puisqu'ils permettent aux cellules d'un même organisme ou d'un même tissu de communiquer entre elles. La communication entre les cellules permet la coordination des comportements afin que l'organisme fonctionne comme un tout.

Les récepteurs permettent également aux cellules d'être en contact avec leur environnement et ainsi s'adapter aux divers changements pouvant survenir dans leur entourage. La capacité de s'adapter aux divers changements environnementaux ainsi qu'aux différents stimuli est essentielle pour la survie des espèces animales. Par exemple, lorsqu'un animal sauvage est confronté à un prédateur, ce dernier doit être en mesure de répondre à ce stimulus afin d'assurer sa survie. En fait, le système nerveux autonome de l'animal s'adapte à cette situation en provoquant la sécrétion d'hormones de stress c'est-à-dire des catécholamines. Les catécholamines vont par la suite se lier aux récepteurs adrénergiques (AR), qui entraîneront l'activation de voies de signalisation intracellulaire. L'activation de ces voies de signalisation produira des effets physiologiques qui permettront à l'animal de s'adapter à la situation et donc d'échapper ou de combattre le prédateur.

# Chapitre 1

## 1.1 Les catécholamines

Les catécholamines c'est-à-dire l'épinéphrine, la norépinéphrine et la dopamine sont synthétisées à partir de tyrosine (figure 1) principalement par les glandes médullo-surrénales (Goldfien, 2001). Ces glandes constituent une portion hautement spécialisée du système nerveux sympathique et fonctionnent en présence de stress ou lors d'un changement de l'homéostasie.

Les catécholamines sont entreposées dans des granules de sécrétion d'environ 1 µm. La sécrétion des catécholamines est provoquée par la relâche d'acétylcholine des fibres pré-ganglionnaires (figure 2). En fait, l'acétylcholine entraîne une dépolarisation des membranes des axones ce qui occasionne un influx de calcium. L'augmentation de la concentration de calcium provoque la relâche du contenu des vésicules de sécrétion par exocytose dans la circulation sanguine (figure 2). Finalement, afin de mettre fin à la stimulation sympathique, les amines libres peuvent être métabolisées par l'enzyme catéchol-o-méthyltransférase et la monoamine, recaptées par les neurones sympathiques, conjuguées avec l'ion sulfate ou excrétées par les reins. La présence de catécholamines dans la circulation systémique produit de nombreux effets physiologiques (tableau I) qui sont médiés par les récepteurs adrénergiques au niveau de divers tissus (Goldfien, 2001).

## 1.2 Les récepteurs adrénergiques

Les récepteurs adrénergiques font partie de la famille 1A des GPCR selon la classification de Bockaert (Bockaert et al., 1998; Bockaert et al., 1999). Le Docteur Bockaert, qui s'intéresse à l'évolution des récepteurs à sept passages transmembranaires, a élaboré une nomenclature de classification des GPCR. Cette nomenclature est basée sur les similarités partagées par ces récepteurs au niveau de la séquence en acides aminés (Bockaert et al., 1998; Bockaert et al., 1999). En fait, il a procédé à la classification des GPCR des vertébrés en 5 familles (figure 3). Les familles 1, 2 et 3 représentent les trois familles classiques et comprennent la majorité des GPCR (Bockaert et al., 1998; Bockaert

et al., 1999). La taille des familles 4 et 5 est moins imposante que celle des familles 1 à 3 (figure 3), puisque ces deux familles comportent respectivement les récepteurs aux phéromones (VNs) associés aux protéines  $G_i$  ainsi que les « frizzled » et « smoothed » (Smo) qui sont impliqués dans le développement de la polarité des cellules au niveau du développement embryonnaire (Bockaert et al., 1999). La famille 1, qui comporte la majorité des GPCR incluant les récepteurs olfactifs, est divisée en trois sous-familles : la famille 1a, 1b et 1c. La famille 1a comprend les GPCR qui sont activés par de petites molécules comme les catécholamines, qui se lient dans la cavité formée par les domaines transmembranaires 3 et 4. En plus des  $\beta$ -AR, cette sous-famille comporte entre autre le récepteur de la rhodopsine dont le photon entre à l'intérieur de la cavité du récepteur afin d'activer le récepteur. Les sous-familles 1b et 1c comportent les récepteurs qui sont activés par de courts peptides ainsi que des protéines qui lient les domaines N-terminaux des récepteurs. Pour sa part, la famille 2 contient les récepteurs activés par des peptides comme le glucagon par exemple tandis que les récepteurs métabotropiques et sensibles au calcium appartiennent à la famille 3 (Bockaert et al., 1999).

Certains auteurs ont réalisés la classification des  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - et  $\beta_3$ -AR en se basant sur les affinités relatives des récepteurs dont la capacité des récepteurs à lier l'adrénaline ainsi que la noradrénaline, la sélectivité des récepteurs pour certains agonistes, antagonistes et radioligands, le couplage des  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - et  $\beta_3$ -AR avec les différentes protéines G ainsi que la structure et les gènes codants pour ces récepteurs (Alexander et al., 2001). Ces récepteurs lient spécifiquement l'épinéphrine ainsi que la norépinéphrine avec des affinités différentes selon le type de récepteur. Ahlquist fut le premier, en 1948, à différencier les deux types de récepteurs adrénergiques ( $\alpha$ - et  $\beta$ -AR) à l'aide de méthodes pharmacologiques (Wallukat, 2002). Par la suite, Lands, en 1967, a subdivisé les adrénoccepteurs en sous-types  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  et  $\beta_2$ -AR selon leur capacité à lier des agonistes naturels et certains antagonistes (Wallukat, 2002; Frielle et al., 1988; Strosberg,

Tissu ou organe	Récepteur	Effet physiologique
Cœur	$\beta_1$	↑ Force de contraction ↑ Vitesse de contraction
Vaisseaux sanguins	$\alpha$	Vasoconstriction
	$\beta_2$	Vasodilatation
Reins	$\beta$	↑ Relâche rénine
Bronchioles	$\beta_2$	Dilatation
Utérus	$\alpha$	Contraction
	$\beta_2$	Relaxation
Pancréas	$\alpha$	↓ Relâche insuline ↓ Relâche glucagon
	$\beta$	↑ Relâche insuline ↑ Relâche glucagon
Intestin	$\alpha$ et $\beta$	↓ Motilité ↑ Tonus sphincter
Foie	$\alpha$ et $\beta$	↑ Glycogénolyse
Tissu adipeux	$\beta$	↑ Lipolyse

Tableau I : Effets physiologiques des récepteurs adrénergiques sur divers tissus. Les  $\alpha$ - et  $\beta$ - AR ont la capacité d'augmenter (↑) ou de diminuer (↓) certains effets physiologiques.

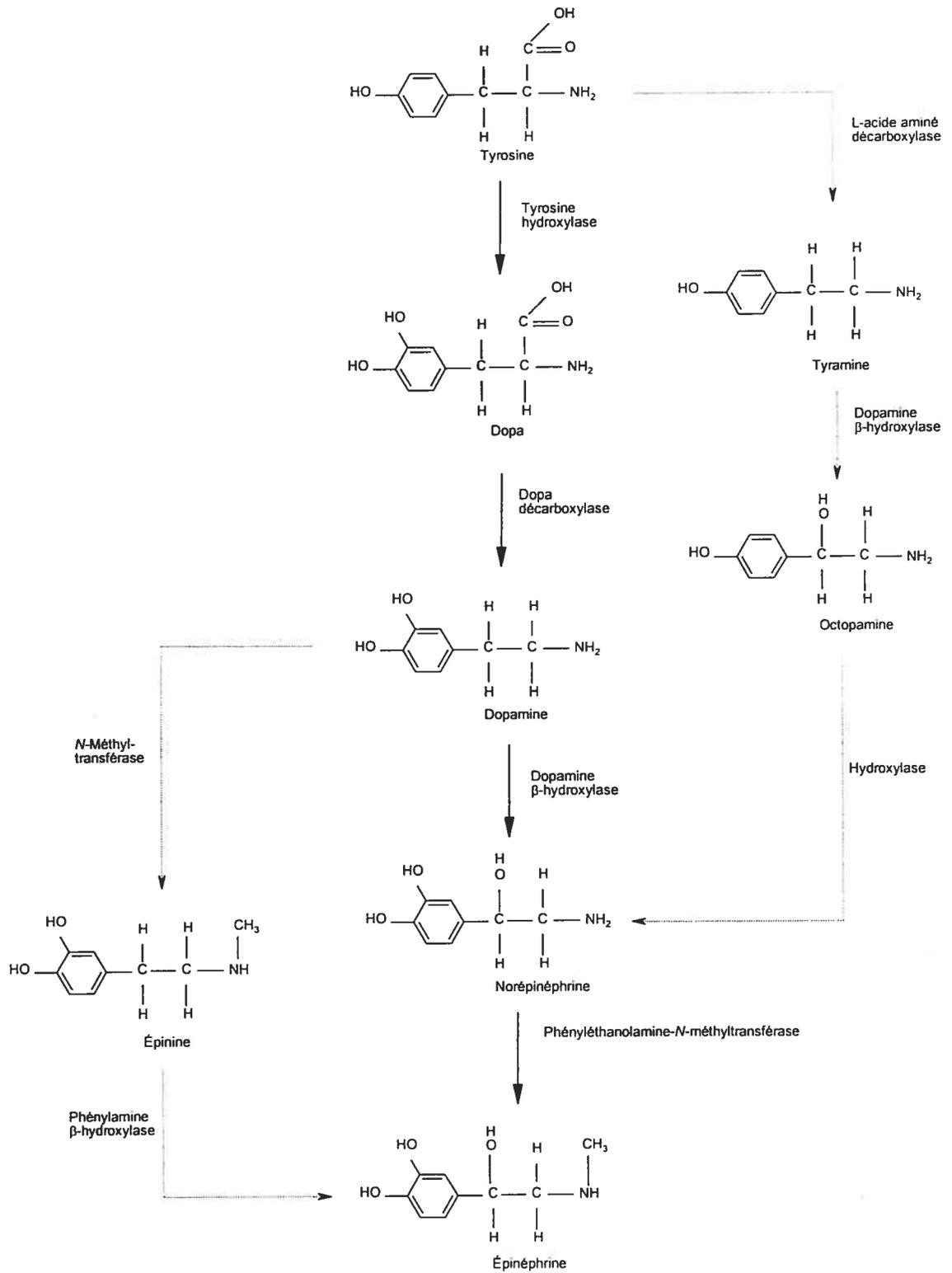


Figure 1 : Synthèse des catécholamines. Les catécholamines c'est-à-dire l'épinéphrine, la norépinéphrine et la dopamine sont synthétisées à partir de tyrosine.

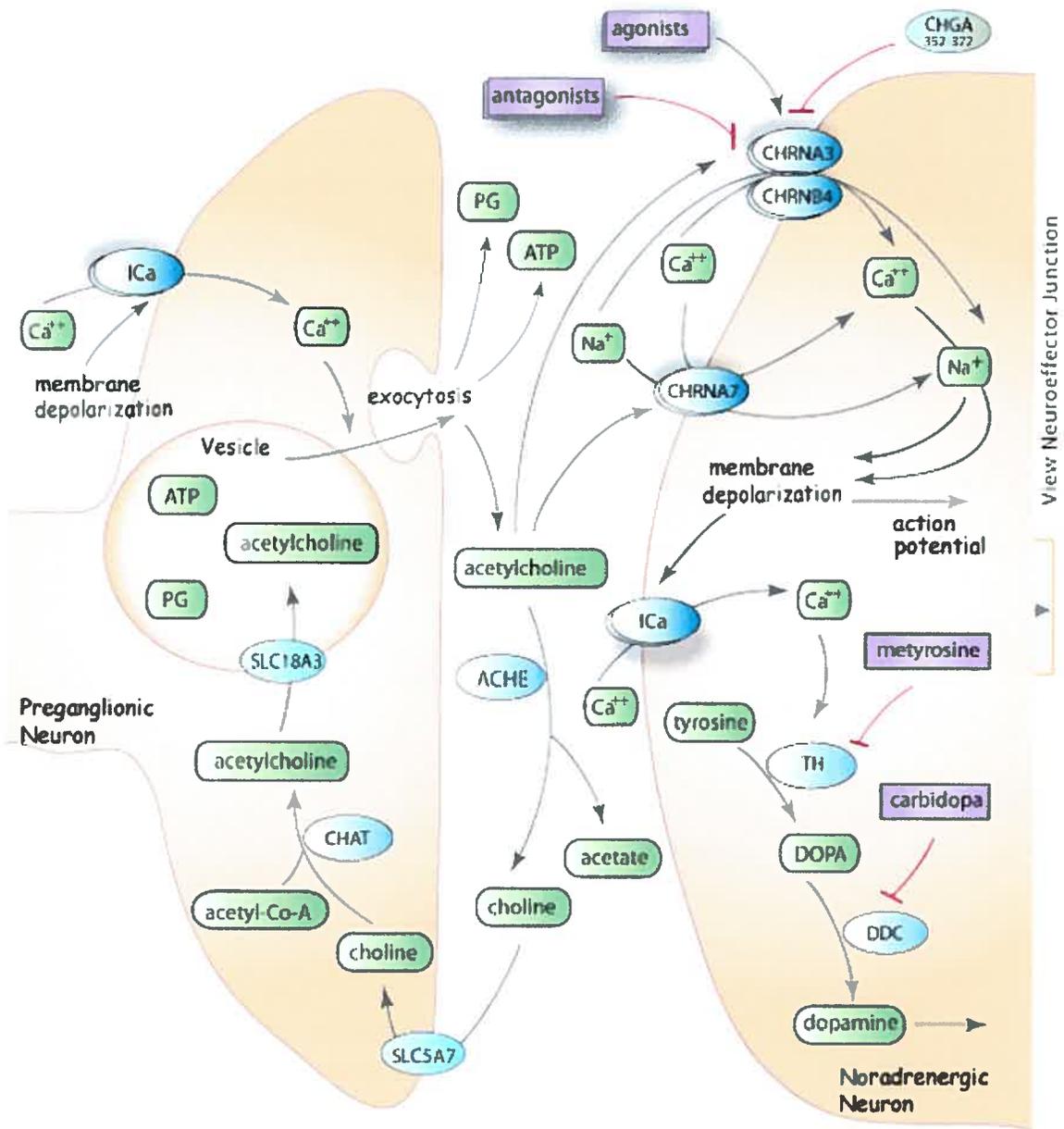


Figure 2 : Sécrétions des catcholamines. La relâche d'acétylcholine des fibres pré-ganglionnaires entraîne une dépolariation des membranes des axones ce qui occasionne un influx de calcium. L'augmentation de la concentration de calcium provoque la relâche des catécholamines entreposées dans les vésicules de sécrétion par exocytose. (Figure provenant de « The Pharmacogenetics and Pharmacogenomics Knowledge Base»)

1993; Lands et al., 1967). En ce qui a trait aux récepteurs  $\alpha$ -AR, la classification actuelle a été établie à l'aide de techniques de biologie moléculaire, qui ont révolutionné l'étude des récepteurs  $\alpha$ -AR. Les récepteurs  $\alpha_1$ -AR comportent les sous-types  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  et  $\alpha_{1D}$ , tandis que les récepteurs  $\alpha_2$ -AR comprennent les sous-types  $\alpha_{2A/D}$ ,  $\alpha_{2B}$  et  $\alpha_{2C}$  (Calzada et al., 2001). Ceci étant dit, nous nous attarderons uniquement aux récepteurs  $\beta$ -AR, puisqu'ils sont le sujet principal du présent mémoire. À ce jour, trois sous-types de récepteurs  $\beta$ -AR ( $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - et  $\beta_3$ -AR) ont été identifiés à l'aide de méthodes pharmacologiques et du clonage moléculaire. Un quatrième sous-type a été proposé sans aucune confirmation moléculaire jusqu'à maintenant (Wallukat, 2002; Kaumann, 1997). De ces sous-types de  $\beta$ -AR, c'est le  $\beta_2$ -AR qui a été le plus étudié et qui a servi de prototype dans de nombreuses études sur les adrénoccepteurs.

Les récepteurs  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -AR, qui sont encodés par des gènes distincts, sont biochimiquement et fonctionnellement similaires. Toutefois, en se basant sur les affinités relatives de ces récepteurs pour certains ligands, on constate qu'ils sont pharmacologiquement distincts (Figure 3). De plus, les  $\beta$ -AR démontrent également des différences au niveau de la distribution tissulaire (Frielle et al. 1988). En fait, les récepteurs  $\beta_1$ -AR prédominent au niveau du cœur et du tissu adipeux tandis que les récepteurs  $\beta_2$ -AR sont majoritaires au niveau du poumon, du foie et des muscles lisses (Frielle et al., 1988).

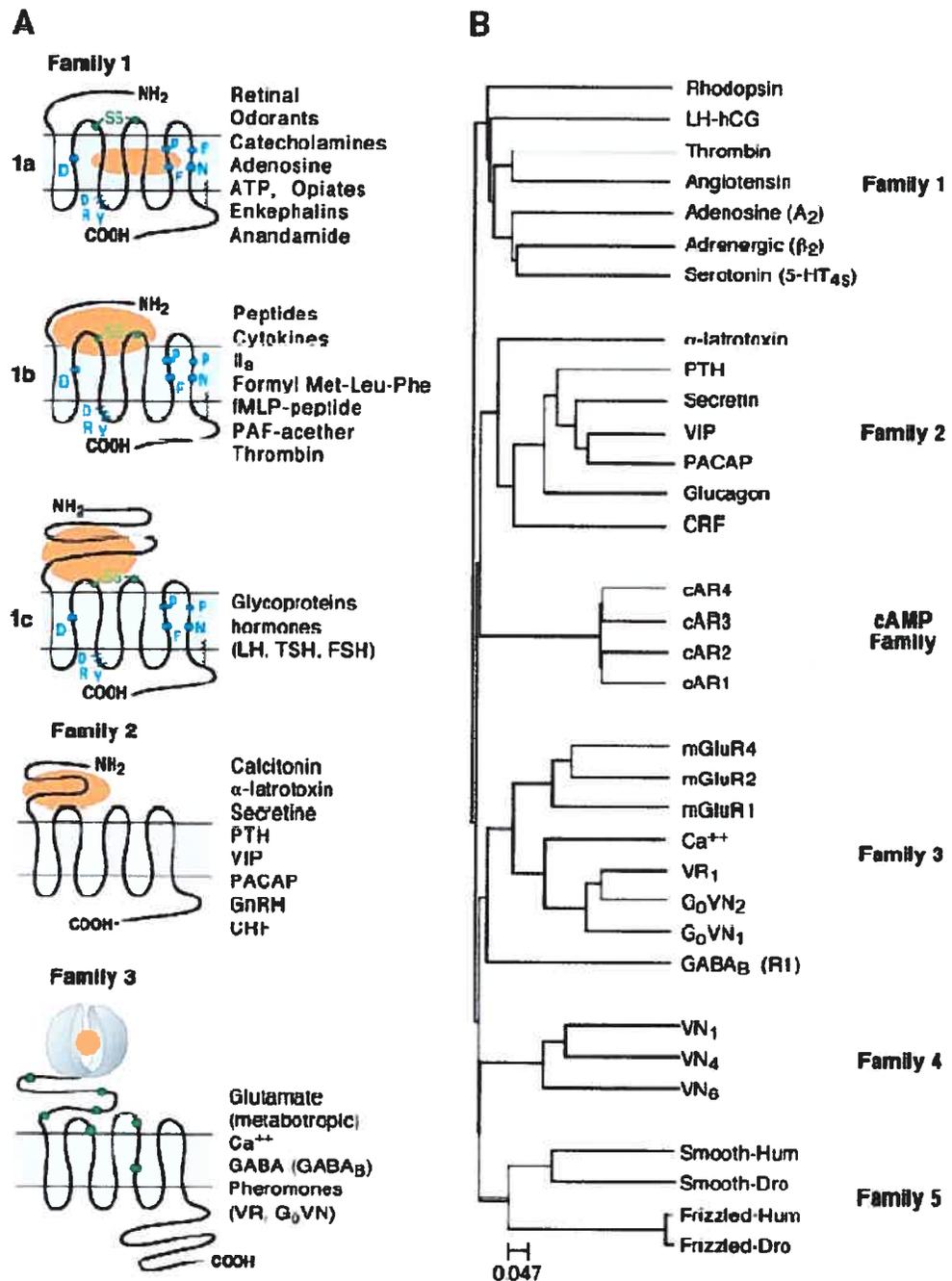


Figure 3 : Classification des GPCR selon Joël Bockaert (Bockaert et al., 1998 et 1999). En A) les trois familles classiques qui comprennent la majorité des GPCR. En B) dendrogramme des 5 familles de GPCR construit à partir d'un multi-alignement des régions transmembranaires.

A)

Récepteur  $\beta_1$ -adrénergique :

Isoprotérénol &gt; épinéphrine = norépinéphrine

Récepteur  $\beta_2$ -adrénergique :

Isoprotérénol &gt; épinéphrine &gt;&gt; norépinéphrine

B)

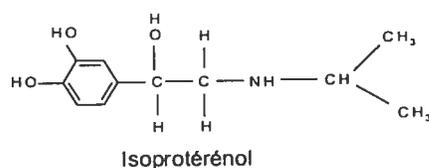


Figure 4 : Affinité relative des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques pour certains ligands. En A) l'affinité relative des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques pour isoprotérénol, l'épinéphrine et la norépinéphrine. En B) la structure de l'isoprotérénol, un agoniste qui possède une grande affinité pour les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques et dont l'utilisation est largement répandue dans les laboratoires pour la stimulation non-sélective des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques. Le groupement N-isopropyl correspond au  $\text{H}_3\text{C}-\text{CH}-\text{CH}_3$  situé à l'extrême droite de la molécule.

### 1.2.1 Agonistes et antagonistes

Le  $\beta_2$ AR est un prototype pour l'étude des récepteurs à 7 passages transmembranaires et a servi de modèle dans l'application de techniques telles les études de radioliation, l'isolation et la reconstitution de récepteur, le clonage, l'expression ainsi que l'introduction de mutations ponctuelles afin de déterminer les sites d'interaction ligands-récepteurs. Ceci a permis le développement d'une multitude d'agonistes et d'antagonistes qui sont non seulement utilisés dans les laboratoires de biologie moléculaire, mais qui possèdent également des intérêts cliniques.

La structure des catécholamines, qui sont les ligands endogènes des  $\beta$ -AR, a servi de modèle pour la conception des agonistes des  $\beta$ -AR (Ruffolo et al., 1991). En 1941, avant la classification des  $\beta$ -AR par Ahlquist en 1948, la pharmacologie de l'isoprotérénol en comparaison l'épinéphrine a été établie en se basant sur les effets bronchodilatateurs ainsi que sur leurs différentes efficacités à augmenter la pression sanguine chez les chiens et les chats anesthésiés (Ruffolo et al., 1991). Le profil pharmacologique de l'isoprotérénol, qui est le prototype des agonistes non sélectifs des  $\beta$ -AR, s'explique par la présence du groupement N-isopropyl (Figure 4). Ce groupement N-isopropyl entraîne une diminution de l'activité agoniste des  $\alpha$ -AR favorisant ainsi l'activité agoniste des  $\beta$ -AR. La chaîne de carbone adjacente au groupe N-amine de l'isoprotérénol est responsable de la sélectivité  $\alpha$ - et  $\beta$ -adrénergique. La longueur de la chaîne alkyle a un impact sur l'activité agoniste de la molécule sur le  $\beta$ -AR (Ruffolo et al., 1991). Entre autre, les substitutions 2-phenylethylamines, comme CC-25, CC-34 par exemple, et protokylol ont un plus grand effet agoniste que l'isoprotérénol sur les  $\beta$ -AR. Il existe également une relation tissu spécifique entre le volume moléculaire de la N substitution et l'activité agoniste des  $\beta$ -AR. Comparativement à l'isoprotérénol, le N-*t*-butylnorepinephrine a une plus grande affinité pour les  $\beta$ -AR de la trachée que pour les récepteurs situés au niveau des

oreillettes. La présence du groupement bulky alkyl sur le N-amino augmente l'affinité ainsi que la sélectivité pour les  $\beta$ -AR.

La modification de la chaîne latérale éthanolamine de l'isoprotérénol comme l'élimination du groupement  $\beta$ -hydroxyl est un autre moyen qui a été utilisé afin de générer une série d'agoniste (Ruffolo et al., 1991). Cette modification entraîne une diminution de l'activité agoniste de l'isoprotérénol ce qui implique que ce type de molécule agit comme un agoniste partiel de faible liaison. Ce type de ligand entraîne une augmentation du rythme cardiaque ainsi que l'atténuation de la bronchoconstriction induite par l'histamine au niveau pulmonaire (Ruffolo et al., 1991). Parmi les molécules phénothylamines, dont le groupe  $\beta$ -hydroxyl est absent, on compte entre autre la dobutamine et la dopéxamine qui sont utilisés comme agents inotropes. Le rimitérol, qui résulte de l'incorporation d'une groupement amine dans l'anneau pipéridine de l'isoprotérénol, a des effets bronchodilatateurs chez l'humain et entraîne des effets beaucoup moins importants que l'isoprotérénol au niveau de la tachycardie cardiovasculaire (Ruffolo et al., 1991).

Les anneaux aromatiques ont également des effets sur l'activité agoniste des  $\beta$ -AR. L'élimination d'un ou deux groupements hydroxyls aromatiques entraîne une diminution de l'effet de l'isoprotérénol sur les  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -AR (Ruffolo et al., 1991). De plus, les composés phénothylamine mono-hydroxylés sont moins puissants que les catécholamines et plusieurs d'entre eux sont utilisés comme agents thérapeutiques. L'absence du groupement catéchol, qui résulte en l'élimination d'un site de métabolisme rapide, permet dans de nombreux cas d'augmenter la biodisponibilité orale et ainsi de prolonger la durée d'action du composé (Ruffolo et al., 1991). Il existe de nombreux patrons de substitution au niveau des anneaux aromatiques. Entre autre, il est possible de former des dérivés résorcinol ainsi que de remplacer le groupe *Meta*-hydroxyl. Les dérivés résorcinol sont utilisés en clinique pour leurs effets bronchodilatateurs tandis que les substitutions *meta*-hydroxyméthyl ont donné naissance à des ligands comme le salbutamol qui sont utilisés dans le traitement de l'asthme. En fait, les agonistes ayant une substitution *meta*-hydroxyl

ont une sélectivité substantielle pour les  $\beta_2$ -AR de la trachée et agissent comme agonistes partiels au niveau des oreillettes (Ruffolo et al., 1991). Toutefois, l'ajout d'un second groupement *meta*-hydroxyméthyl sur le salbutamol abolit l'activité agoniste  $\beta$ -adrénergique. L'addition d'un chlore en position 3 réduit le potentiel agoniste  $\beta$ -adrénergique de l'isoprotérénol et confère une sélectivité  $\beta_1$ -AR à ce type de ligands. L'ajout de chlore en position 3 donne naissance à des agonistes comme le clenbutérol et le mabutérol. Le clenbutérol est un agoniste pour les  $\beta_2$ -AR, mais qui possède une moins bonne efficacité que la salbutamol (Ruffolo et al., 1991). Le clenbutérol est également utilisé en clinique pour le traitement de l'asthme.

Les  $\beta$ -AR sont les récepteurs qui démontrent le plus grand lien direct entre la structure des agonistes et des antagonistes parmi tous les récepteurs des neurotransmetteurs (Ruffolo et al., 1991). Tous les antagonistes  $\beta$ -adrénergiques possèdent le groupement phényléthanolamine qui est présent chez les agonistes naturels et l'abolition du groupement catéchol hydroxyl mène à la formation d'antagonistes. Même les dérivés aussi simple que le des-hydroxyisoprotérénol possède une activité agoniste sur les  $\beta$ -AR de l'artère de cochon d'inde (Ruffolo et al., 1991). Comme pour les agonistes, l'affinité et la sélectivité des antagonistes  $\beta$ -adrénergiques est augmentée par la présence du groupement bulky alkyl sur le N-amino et la modification de la structure de l'isoprotérénol par l'ajout de groupement a donné naissance à des milliers d'antagonistes  $\beta$ -adrénergiques. Parmi ceux-ci, certains démontrent une excellente efficacité et sont utilisés comme agent thérapeutique dans le milieu clinique.

Les antagonistes  $\beta$ -AR les plus utilisés en clinique sont les analogues aryloxypropanolamines qui appartiennent à la catégorie des phénoxypropanolamines, qui comportent entre autre l'alprénolol, le bétaxolol, l'aténolol, le métoprolol. La majorité des variations structurales des aryloxypropanolamines comportent une substitution du noyau aromatique ainsi qu'une substitution du groupement N amine. Ces antagonistes sont entre

autre employés en clinique pour le traitement de certaines pathologies cardiovasculaires dont l'arythmie cardiaque et la défaillance cardiaque puisqu'ils provoquent des effets  $\beta$ -bloqueurs au niveau de la stimulation adrénérgique.

Afin d'effectuer la caractérisation directe des  $\beta$ -AR, des radioligands ont été développés. La structure de ces radioligands est inspirée des antagonistes  $\beta$ -adrénergiques et prend avantage de l'affinité et sélectivité que les antagonistes possèdent pour les  $\beta$ -AR. Parmi les radioligands couramment utilisés pour les récepteurs  $\beta$ -AR on dénote entre autre le [ $^{125}$  I]-ICYP, [ $^{125}$  I]-IHYP, [ $^3$ H]-CGP, [ $^3$ H]-DHA, [ $^3$ H]-PRP et le [ $^3$ H]-CRZ.

Étant donné que ces agonistes et antagonistes possèdent une bonne sélectivité et que ce sont des molécules qui démontrent une bonne efficacité, la recherche sur ces ligands a peu évolué au cours des dernières années. De plus, certains ligands utilisés en clinique comme le salbutamol, le clenbutérol et le bétaxolol donnent de bons résultats ce qui a ralenti le développement de nouvelles molécules.

### 1.2.2 Structure

La structure primaire des récepteurs  $\beta$ -AR est constituée d'une séquence polypeptidique unique, qui est bien conservée entre les espèces (Benovic et al., 1985, Stosberg, 1993). Les  $\beta$ -AR possèdent une partie amino-terminale extracellulaire, une queue carboxy-terminale cytosolique ainsi que sept domaines transmembranaires hydrophobiques (figure 5). Chaque passage transmembranaire comporte de 20 à 28 acides aminés organisés en hélice  $\alpha$  (Frielle et al., 1988). Les régions transmembranaires sont reliées entre elle par des boucles hydrophiles extracellulaires et cytosoliques (Stosberg, 1993). Chez l'humain le récepteur  $\beta_1$ -AR possède 477 acides aminés tandis que le récepteur  $\beta_2$ -AR en contient 413. Ces deux récepteurs possèdent une identité de 50%

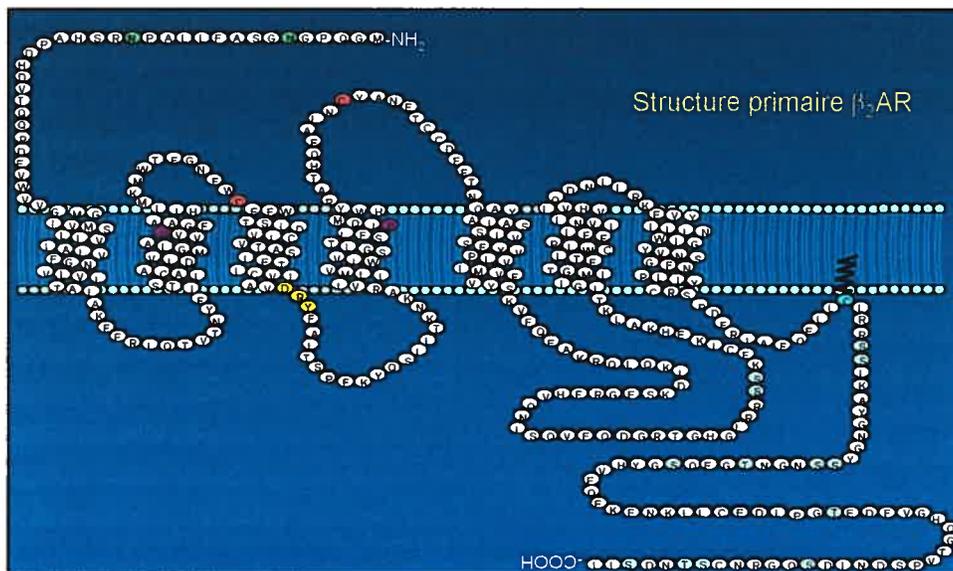
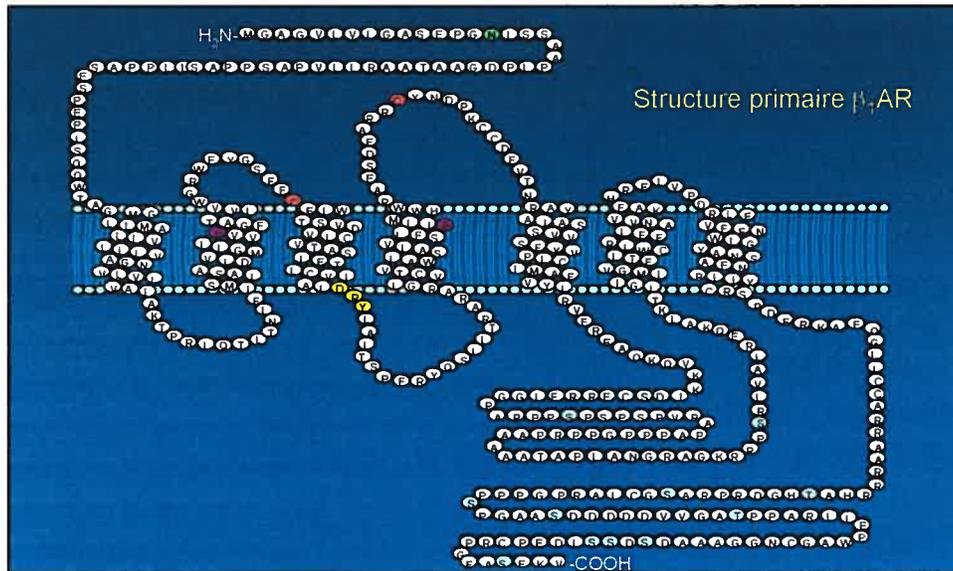


Figure 5: Structure primaire des récepteurs  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -adrénergiques. Les résidus en jaune forment le motif DRY. En mauve, des résidus de proline sont conservés et seraient impliqués au niveau de la structure des récepteurs. Les résidus en vert sont des sites de glycosylation. Les cystéines de couleur rouge sont impliquées dans la formation du pont S-S tandis que le résidu en bleu correspond au site de palmitoylation. Les sites potentiels et connus de phosphorylation de la PKA et des GRK sont représentés en turquoise.

en considérant la séquence nucléotidique totale. Les séquences codantes pour les  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -AR sont donc mieux conservées au niveau des passages transmembranaires qui contiennent les sites de liaison pour l'agoniste. Dans un même ordre d'idées, les deux premières boucles cytosoliques sont bien conservées comparativement aux boucles extracellulaires qui le sont moins (Frielle et al., 1988). La séquence primaire des  $\beta$ -AR diverge également au niveau de la troisième boucle cytosolique ainsi qu'au niveau des parties N- et C-terminales (Green et al., 1994).

La troisième boucle cytosolique est le domaine le plus variable des GPCR (Cheung et al., 1991). Le  $\beta_1$ -AR possède au centre de sa troisième boucle une séquence de 24 acides aminés riche en résidus de proline qui ne se retrouve pas chez le  $\beta_2$ -AR (Tang et al., 1999; Green et al., 1994; Frielle et al., 1988). En fait, cette séquence comporte 14 résidus de proline ce qui donne de la rigidité à la structure du  $\beta_1$ -AR au niveau de cette boucle (Green et al., 1994). Par le fait même, ce motif riche en résidus de proline affecte la structure du  $\beta_1$ -AR ce qui implique la présence d'une conformation et une structure tertiaire différente entre les  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -AR. Il a été suggéré que cette séquence serait responsable des différences entre les  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -AR au niveau de la signalisation (Tang et al., 1999; Green et al., 1994) et de l'atténuation de la réponse de certains agonistes (Green et al., 1994). La séquence riche en résidus de proline du  $\beta_1$ -AR a la capacité d'interagir avec des protéines comportant des domaines SH<sub>3</sub> (Tang et al., 1999) dont l'endophiline 1 initialement nommée SH3p4/p8/p13. L'endophiline 1 est impliquée au niveau du recyclage des vésicules synaptiques (Sugiura et al., 2004). La séquence riche en résidus de proline du  $\beta_1$ -AR est également retrouvée chez d'autres GPCR comme le  $\beta_3$ -AR,  $\alpha_{2A}$ -AR et le récepteur D<sub>4</sub> à la dopamine (Oldenhof et al., 1998).

Au niveau de la structure primaire des  $\beta$ -AR, le second domaine dont le nombre d'acides aminés varie considérablement est la partie C-terminale. De façon générale, les récepteurs ayant un grand domaine C-terminal possèdent une troisième boucle

cytoplasmique plus courte et inversement. Une explication possible serait que ces régions contiennent des séquences importantes pour la structure et la fonction des récepteurs. De plus, le caractère acide de la partie C-terminale et la troisième boucle cytoplasmique augmente en s'éloignant de la membrane plasmique. Toutefois, ces régions partagent une composition chimique similaire et peuvent être phosphorylées par différentes kinases (Strader et al., 1992).

La famille des GPCR possède un motif de trois acides aminés, qui est hautement conservé au cours de l'évolution: le motif DRY (Asp-Arg-Tyr) (figure 5) (Scheer et al. 2000). Le motif DRY est situé sur la partie cytosolique de la troisième hélice transmembranaire et occuperait un rôle important au niveau de l'activation des GPCRs (Scheer et al. 2000; Alewijnse et al. 2000). Le résidu d'arginine du motif serait responsable de la transduction du signal tandis que le résidu aspartate serait responsable de l'activation des GPCRs (Alewijnse et al. 2000). Il a été suggéré que l'activation du récepteur implique la protonation du résidu aspartate (Alewijnse et al. 2000; Rasmussen et al. 1999). De plus, une étude de mutagenèse dirigée chez le  $\beta_2$ -AR propose que la protonation du résidu d'aspartate entraîne un mouvement au niveau du sixième passage transmembranaire (figure 6), ce qui permet l'activation du récepteur (Rasmussen et al., 1999). Pour sa part, le résidu de glutamate 134 serait impliqué au niveau de la recapture du proton (Arnis et al., 1994).

Finalement, la structure primaire des récepteurs adrénergiques, sérotoninergiques et dopaminergiques possède deux résidus de proline qui sont conservés, soit un au niveau du deuxième passage transmembranaire et un autre au niveau du quatrième passage transmembranaire. La conservation de ces résidus de proline suggère qu'ils seraient impliqués au niveau de la structure des récepteurs. Entre autre, ces résidus forment des coudes dans les segments transmembranaires ce qui permettrait aux chaînes latérales des acides aminés des segments voisins de bien s'imbriquer (Strader et al., 1992)

En conclusion, les  $\beta_1$ -et  $\beta_2$ -AR sont des récepteurs à sept passages transmembranaires hydrophobes reliés entre eux par des boucles hydrophiles. Malgré une grande homologie entre les domaines transmembranaires, la structure primaire de ces récepteurs diverge principalement au niveau de la troisième boucle cytosolique ainsi qu'au niveau des parties N- et C-terminales.

### 1.2.3 Modifications post-traductionnelles

Les  $\beta$ -AR possèdent une partie N-terminale, qui diffère selon le sous-type de récepteur. Cette partie N-terminale est sujette à des modifications post-traductionnelles sur la séquence consensus Asn-X-Ser/Thr (où X = n'importe quel acide aminé). Cette séquence permet la N-glycosylation du récepteur (Strosberg, 1993). Le  $\beta_1$ -AR possède uniquement un site de N-glycosylation sur le résidu d'asparagine en position 11, contrairement au  $\beta_2$ -AR qui possède deux sites de N-glycosylation sur les résidus d'asparagine en position 6 et 11 (Frielle et al., 1988). Des études de mutagenèse dirigée ont démontré que la N-glycosylation du  $\beta_2$ -AR n'est pas requise pour la liaison avec l'agoniste ou le couplage d'avec sa protéine G (Dixon et al., 1987), mais serait impliquée au niveau de la redistribution des récepteurs dans la cellule. (Terman and Insel, 1988).

Les deux premières boucles extracellulaires comportent des résidus de cystéine en position 106, 184 et 341, qui sont conservés entre les GPCR (Dohlman et al., 1990). Les résidus de cystéine en position 106 et 184 sont impliqués dans la formation d'un pont disulfure entre les deux premières boucles extracellulaires (figure 5). Ce pont disulfure, qui permet de relier les passages transmembranaires 2 et 3 aux passages transmembranaires 4 et 5, occupe donc une place importante au niveau de la structure, de la conformation et des rôles fonctionnels des récepteurs  $\beta$ -AR (Wallukat, 2002; Dohlman et al., 1990). En effet, des études de mutagenèse dirigée ont démontré que la substitution des résidus de cystéine en position 106 et 184 par des résidus de valine affecte dramatiquement la liaison entre le ligand et son récepteur (Dixon et al., 1987). À partir du gène codant pour le  $\beta_2$ -AR, une

étude *in vitro* a également permis d'estimer que le récepteur aurait la possibilité de former un maximum de sept ponts disulfures à partir de quinze résidus de cystéine (Dohlman et al., 1990). De plus, des études à l'aide de DTT, un agent réducteur, ont permis de mettre en évidence le rôle fonctionnel des ponts disulfures (figure 6) au niveau de la liaison ligand-récepteur et de la formation de la poche de liaison du ligand (Dohlman et al., 1990).

La palmitoylation est une modification post-traductionnelle qui consiste en l'ajout d'un lipide, l'acide palmitique, sur un résidu de cystéine via un lien covalent (Wess, 1998; Qanbar et al., 2003). La plupart des GPCR possèdent au moins un résidu de cystéine conservé au niveau du domaine C-terminal. (O'Dowd et al., 1989; Wess, 1998). La modification covalente de ces résidus de cystéine entraîne la formation d'une ancre membranaire lipophile, engendrant une quatrième boucle cytosolique (Wess, 1998). Pour sa part, le  $\beta_2$ -AR est palmitoylé sur le résidu de cystéine 341 (Strosberg, 1993; O'Dowd et al., 1989; Moffett et al., 1993). Il a été démontré par mutagenèse dirigée que la palmitoylation joue un rôle important au niveau du couplage entre le  $\beta_2$ -AR et la protéine Gs (O'Dowd et al., 1989, Moffett et al., 1993). La mutation du résidu de cystéine 341 par un résidu de glycine empêche la palmitoylation du récepteur et provoquerait une diminution de la capacité du  $\beta_2$ -AR stimulé par un agoniste à activer l'adénylate cyclase (O'Dowd et al., 1989). En fait, la forme non-palmitoylée du  $\beta_2$ -AR est hautement phosphorylée et largement découplée de la protéine Gs (Moffett et al., 1993). Ceci suggère donc que la présence de la quatrième boucle cytoplasmique permettrait au récepteur d'adopter une conformation favorable au couplage avec sa protéine G (Strosberg, 1993). L'absence de la quatrième boucle cytosolique exposerait les sites de phosphorylation aux mécanismes de régulation (Moffett et al., 1993). Dans un même ordre d'idées, la régulation du  $\beta_2$ -AR palmitoylé stimulé par un agoniste pourrait représenter un autre mécanisme de régulation des GPCR (Mouillac et al., 1992).

Les  $\beta$ -AR peuvent également être régulés par phosphorylation via différentes kinases. La protéine kinase A (PKA) peut phosphoryler les  $\beta$ -AR sur la séquence consensus

Arg/Lys-Arg-X-(X)-Ser/Thr (Strosberg, 1993). Les  $\beta_2$ -AR possèdent deux sites consensus permettant la phosphorylation par la PKA : un site au niveau de la troisième boucle cytosolique et un site dans le domaine C-terminal contrairement au  $\beta_1$ -AR qui ne possède qu'un seul site de phosphorylation situé dans la troisième boucle cytosolique (Rousseau et al., 1996; Strosberg, 1993; Benovic et al., 1988; Lohse, 1993). Ces sites de phosphorylation consensus sont situés à proximité des sites d'interaction entre le récepteur et sa protéine G, ce qui implique que la phosphorylation du récepteur par la PKA a des conséquences importantes sur le découplage du récepteur (Strosberg, 1993). Dans un même ordre d'idées, les  $\beta$ -AR peuvent être phosphorylés par la protéine kinase C (PKC). Cette dernière utiliserait les mêmes sites consensus que la PKA afin de réguler les récepteurs (Benovic et al., 1988; Lohse, 1993). Par le fait même, la phosphorylation des récepteurs via la PKC entraînerait des effets similaires à ceux engendrés par la PKA (Lohse, 1993). Finalement, les G-protein-coupled receptor kinases (GRKs), qui sont des sérine/thréonine kinases, phosphorylent les  $\beta$ -AR sur des sites localisés majoritairement dans la partie C-terminale du récepteur (Strosberg, 1993). Lorsque ces sites sont phosphorylés nous observons une désensibilisation c'est-à-dire une réduction de la réponse des récepteurs. Toutefois, la phosphorylation des  $\beta$ -AR par les GRKs et la PKA ainsi que ces effets seront décrits de manière plus détaillée dans la section sur la désensibilisation des récepteurs.

#### 1.2.4 Interactions ligands-récepteurs

Les récepteurs  $\beta$ -AR possèdent une structure heptahélicale qui forme une poche permettant la liaison d'agonistes et d'antagonistes (Wallukat, 2002). Des études de mutagenèse dirigée démontrent que les ligands des récepteurs  $\beta$ -AR interagissent avec le résidu d'aspartate en position 113 du troisième passage membranaire (figure 6), le résidu de sérine en position 165 du quatrième passage transmembranaire ainsi qu'avec les résidus de sérine aux positions 204 et 207 du cinquième passage membranaire (Wallukat, 2002; Strader et al., 1989; Strosberg, 1993).

Le résidu d'aspartate en position 113 (figure 6), qui est conservé dans tous les récepteurs adrénergiques, est le plus important pour l'interaction entre le ligand et le récepteur (Strosberg, 1993). En effet, le groupement carboxylique du résidu d'aspartate agirait comme contre-ion pour la fonction amine du ligand. La substitution du résidu d'aspartate pour un acide aminé autre que le glutamate abolit la liaison entre le récepteur et l'agoniste (Strosberg, 1993). Pour leur part, les résidus de sérine en position 204 et 207 (figure 6) forment des ponts hydrogènes avec les groupements méta et para-hydroxyl de l'anneau catéchol des ligands (Strader et al., 1989). L'interaction ligand-récepteur peut également être affectée par la mutation de plusieurs autres acides aminés situés au niveau des passages transmembranaires (Strader et al., 1987; Strosberg, 1993). Entre autre, le résidu de sérine 165 du quatrième passage transmembranaire, le résidu de phénylalanine 290 du sixième passage transmembranaire ainsi que les quatre résidus de cystéine situés en position 106, 184, 190 et 191 perturbent la liaison de ligands sur les récepteurs.

Par contre, la majorité des régions hydrophiles des  $\beta$ -AR ne sont pas indispensables pour la liaison de ligand sur un récepteur (Dixon et al., 1987). En effet, il a été démontré par mutagenèse dirigée que certains résidus et/ou régions hydrophiles pouvaient être éliminés sans affecter l'interaction entre le ligand et le récepteur. Parmi ceux-ci, on dénote le domaine N-terminal, la partie N-terminale de la deuxième et de la quatrième boucle extracellulaire, la majeure partie de la troisième boucle cytosolique et du domaine C-terminal (Dixon et al., 1987). Toutefois, la substitution des résidus de cystéines impliqués au niveau de la formation du pont disulfure entre les deux premières boucles extracellulaires (position 106 et 184) altère les propriétés de liaison des agonistes (Dixon et al., 1987) comme nous l'avons précédemment mentionné. En fait, l'absence du pont disulfure déstabiliserait la structure du récepteur. Le positionnement des boucles

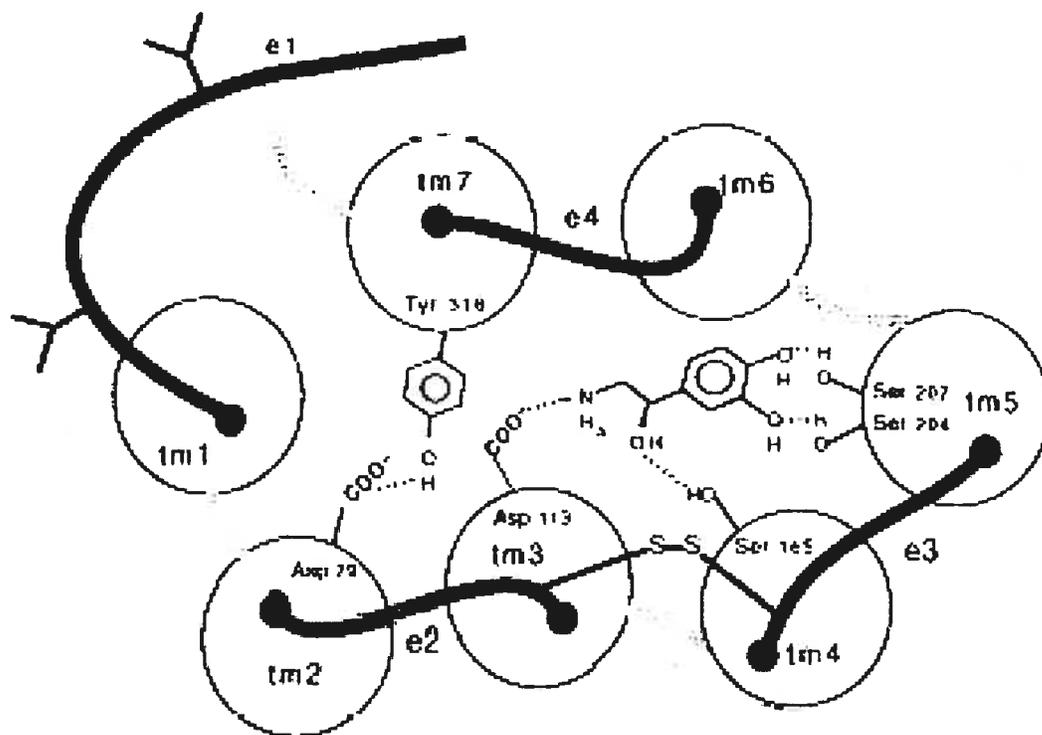


Figure 6: Schéma de l'interaction entre la norépinéphrine et le  $\beta_2$ -AR. Les ligands des récepteurs  $\beta$ -AR interagissent avec le résidu d'aspartate en position 113 du troisième passage membranaire, le résidu de sérine en position 165 du quatrième passage transmembranaire ainsi qu'avec les résidus de sérine aux positions 204 et 207 du cinquième passage membranaire (Strosberg et al., 1993).

hydrophiles est donc important afin que le récepteur puisse adopter une conformation active.

Bien que les passages transmembranaires soient impliqués au niveau de la liaison entre le récepteur et son ligand, quelques résidus seulement de ces domaines transmembranaires permettent la différenciation des sous-types de récepteurs adrénergiques. À l'aide de récepteurs chimériques  $\beta_1$ -/ $\beta_2$ -AR, il a été démontré que le quatrième passage transmembranaire est responsable de la détermination des propriétés  $\beta_1$ - versus  $\beta_2$ -AR lors de la liaison d'agonistes (Frielle et al., 1988b; Nagatomo et al., 2001). Pour leurs parts, le sixième et le septième passages transmembranaires seraient primordiaux afin de déterminer la liaison des antagonistes sélectifs pour les  $\beta_1$ - ou  $\beta_2$ -AR. En plus, les interactions entre le  $\beta_2$ -AR et les antagonistes  $\beta$ -AR ont été étudiées à l'aide de marquage par photoaffinité (Dohlman et al., 1988; Wong et al., 1988; Nagatomo et al., 2001). Ces études suggèrent l'implication du deuxième ainsi que du septième passage transmembranaire lors de la liaison d'antagonistes sur les  $\beta$ -AR, ce qui concorde avec les conclusions apportées par les études réalisées à l'aide de récepteurs chimériques.

### 1.2.5 Transmission du signal

Suite à la liaison d'un agoniste ou d'un antagoniste sur le récepteur, ce dernier modifie sa conformation afin de permettre ou non la transmission du signal, c'est-à-dire l'activation de la sous-unité  $\alpha$  de la protéine G. Par exemple, lorsqu'un agoniste se lie au  $\beta_2$ -AR, la chaîne latérale du résidu de tyrosine en position 316 se déplace du résidu d'aspartate en position 113 du troisième passage transmembranaire vers le résidu d'aspartate en position 79 du deuxième passage transmembranaire (figure 6) afin d'éviter l'encombrement stérique avec l'agoniste et de favoriser la formation de ponts hydrogène (Strosberg, 1993; Nagatomo et al., 2001). Ce changement de conformation provoqué par l'agoniste va permettre l'initiation de la transmission du signal via certaines hélices situées du côté cytosolique du récepteur. Par contre, la liaison d'un antagoniste sur le  $\beta_2$ -AR

provoque la formation d'un pont hydrogène entre le résidu de tyrosine en position 316 et le résidu d'asparagine en position 312, ce qui empêche l'activation de la protéine Gs (Strosberg; 1993).

### 1.2.6 Interactions protéines G-récepteurs

Les protéines G interagissent avec les récepteurs via une multitude de sites intracellulaires. Des études réalisées à l'aide de récepteurs chimériques démontrent que la deuxième boucle intracellulaire ainsi que les parties N-terminale et C-terminale de la troisième boucle intracellulaire sont les régions critiques au niveau de la reconnaissance et de la sélectivité des protéines G (Dixon et al., 1987b; Strader et al., 1987b; Wess, 2001; Wess, 1997). De plus, ces régions agiraient en coopérativité afin d'assurer la reconnaissance ainsi que l'activation efficace de la protéine G (Wong et al., 1990; Liggett et al., 1991; Wong et al., 1994; Blin et al., 1995; Wess, 2001). Chez certains GPCR, la partie C-terminale de la quatrième boucle intracellulaire, qui est à proximité de la membrane plasmique, pourrait également moduler la sélectivité ainsi que l'efficacité de l'interaction entre le récepteur et sa protéine G (Wess; 2001).

Dans un même ordre d'idées, des études réalisées à l'aide de peptides synthétiques dérivés de certaines régions de récepteurs appuient les conclusions apportées par les études de récepteurs chimériques (Wess; 2001). Entre autre, un peptide correspondant à la partie C-terminale de la troisième boucle cytosolique du  $\beta_2$ -AR est suffisant pour activer la protéine Gs. (Okamoto et al., 1991).

## 1.3 Les protéines G

Afin de permettre la transmission du signal, les  $\beta$ -AR sont couplés à des protéines G qui servent d'intermédiaires ainsi que d'amplificateur de signal entre le récepteur et les

effecteurs intracellulaires (Gudermann et al., 1997). Les protéines G couplées aux GPCR sont hétérotrimériques et sont constituées d'une sous-unité  $\alpha$ , d'une sous-unité  $\beta$  ainsi que d'une sous-unité  $\gamma$ . Ces sous-unités possèdent respectivement des masses de 39-45 kDa, 35-39 kDa et 6-8 kDa (Nürnberg et al., 1995; Gudermann et al., 1997). Les protéines G sont associées à la membrane plasmique du côté cytosolique par des lipides et peuvent être majoritairement solubilisées à l'aide de détergents.

### 1.3.1 Diversité et classification

La classification des protéines G est basée sur les similitudes des séquences nucléotidiques des sous-unités  $\alpha$  (Gudermann, et al., 1997; Simon et al., 1991). Les sous-unités  $\alpha$ , dont 23 ont été identifiées, sont encodées par 17 gènes et sont sous-divisées en quatre sous-familles :  $G_{\alpha s}$ ,  $G_{\alpha i}$ ,  $G_{\alpha q}$  et  $G_{\alpha 12}$  (Simon et al., 1991; Nürnberg et al., 1995, Gudermann et al., 1997). L'analyse des séquences nucléotidiques de certaines sous-familles démontre que les sous-familles  $G_{\alpha i}$  et  $G_{\alpha q}$  proviendraient de gènes étroitement liés entre eux au cours de l'évolution (Nürnberg et al., 1995). Toutefois, les gènes codant pour les membres des sous-familles  $G_{\alpha s}$  et  $G_{\alpha 12}$  ne seraient pas reliés au niveau évolutif.

Chaque sous-famille est constituée d'isotypes spécifiques, qui sont hautement conservés entre les espèces (Simon et al., 1991). Par exemple, la sous-famille  $G_s$  comporte les isotypes  $G_s$  et  $G_{olf}$ . Ces isotypes, qui entraînent l'augmentation des niveaux d'AMPc, possèdent une homologie de séquence nucléotidique de 88% (Simon et al., 1991).

En ce qui a trait aux sous-unités  $\beta$ , il y a six isotypes de sous-unité  $\beta$  ( $\beta_1$  à  $\beta_6$ ), qui ont été identifiés. Ces derniers sont encodés par quatre gènes et possèdent une homologie de séquence variant de 50% à 83% (Rens-Domiano et al., 1995; Simon et al., 1991). Pour leurs parts, les sous-unités  $\gamma$  possèdent douze isotypes et sont encodées par de multiples gènes (Gudermann et al., 1997; Clapham et al., 1996). Par le fait même, les sous-unités  $\gamma$  sont très différentes les unes des autres au niveau structural (Neer, 1995; Nürnberg et al.,

1995). Les sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  sont fortement associées et peuvent être considérées comme une seule sous-unité fonctionnelle. En fait, ces sous-unités sont dissociables uniquement par dénaturation (Rens-Domiano et al., 1995).

Les divers isotypes des sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  peuvent s'associer entre eux pour ainsi former diverses combinaisons, qui pourraient avoir différentes affinités pour certains récepteurs (Simon et al., 1991). En effet, ces nombreuses combinaisons pourraient réguler les relations entre les protéines G et les récepteurs ainsi que la cinétique d'activation de la réponse. Toutefois, ceci reste à confirmer.

### 1.3.2 Mode de fonctionnement

L'activation d'un GPCR par un agoniste provoque l'échange du GDP pour un GTP au niveau de la sous-unité  $\alpha$  (figure 7). La liaison du GTP va provoquer la dissociation de la sous-unité  $\alpha$  des sous-unités  $\beta/\gamma$  et du récepteur. La dissociation des sous-unités va permettre à la sous-unité  $\alpha$ -GTP ainsi qu'aux sous-unités  $\beta/\gamma$  d'interagir et d'activer diverses effecteurs comme des canaux ioniques ou des enzymes, qui génèrent des molécules régulatrices ainsi que des seconds messagers. Finalement, la sous-unité  $\alpha$ , qui possède une activité GTPasique intrinsèque, va hydrolyser le GTP en GDP ce qui va lui permettre de lier à nouveau les sous-unités  $\beta/\gamma$  pour ainsi revenir à l'état inactif (Wess, 2001; Gilman, 1987; Conklin et al., 1993, Clapham, 1997).

Afin d'étudier les fonctions des protéines G, deux toxines bactériennes sont fréquemment utilisées: la toxine du choléra (CTx) et la toxine pertussique (PTx) (Nürnberg et al., 1995). La CTx provoque l'activation constitutive de  $G_s$  et  $G_i$  en modifiant un résidu d'arginine localisé au niveau d'une région de liaison du nucléotide de  $G_\alpha$ . Cette modification abolit l'activité GTPasique de la sous-unité  $\alpha$  (Nürnberg et al., 1995). Pour sa part, la PTx provoque des effets inhibiteurs en catalysant le transfert d'un ADP du  $NAD^+$  sur un résidu de cystéine de la sous-unité  $\alpha$  des protéines  $G_i/G_o$  et  $G_t$  (Nürnberg et al.,

1995). Le résidu de cystéine participant à l'ADP-ribosylation est situé quatre acides aminés en amont du groupement COOH-terminal ce qui empêche le couplage entre la protéine G et le récepteur (Nürnberg et al., 1995).

### 1.3.3 Sous-unité $\alpha$

#### 1.3.3.1 Structure

La structure cristallisée de la sous-unité  $\alpha$  a été déterminée à l'aide de GTP $\gamma$ S, de GDP et de ALF $_4^-$ , qui forme un complexe avec les sous-unités  $\alpha$  et qui entraîne son activation (Bigary et al., 1987; Noel et al., 1993; Lambright et al., 1994; Sondek et al., 1994). Ces structures cristallisées ont permis de détailler la structure de la protéine G $_{\alpha}$ , qui avait été déduite à partir des structures cristallisées des protéines ras p21 et EF-Tu, qui sont des protéines possédant une activité GTPasique (Rens-Domiano et al., 1995; Neer, 1995). La sous-unité  $\alpha$  est constituée de trois domaines : un domaine GTPasique constitué de six feuillets  $\beta$  encerclés par six hélices, un domaine en hélice  $\alpha$  composé d'une longue hélice centrale ceinturée par cinq courtes hélices ainsi qu'un domaine N-terminal adoptant une conformation hélicale (Lambright et al., 1996).

Le domaine GTPasique comporte la poche de liaison pour le nucléotide guanine, la boucle pour la liaison du phosphate, le site de liaison pour le Mg $^{2+}$  ainsi que l'anneau de liaison pour la guanine (Rens-Domiano et al., 1995). Ce domaine de concert avec le domaine en hélice  $\alpha$  permet donc à la protéine G $_{\alpha}$  d'interagir avec le nucléotide.

Des études réalisées à l'aide de la PTx démontrent que la partie C-terminale de la sous-unité  $\alpha$  permet l'interaction entre la protéine G $_{\alpha}$  et le récepteur (Simon et al., 1991; Rens-Domiano et al., 1995; Neer, 1995). Dans un même ordre d'idées, l'activation d'un récepteur

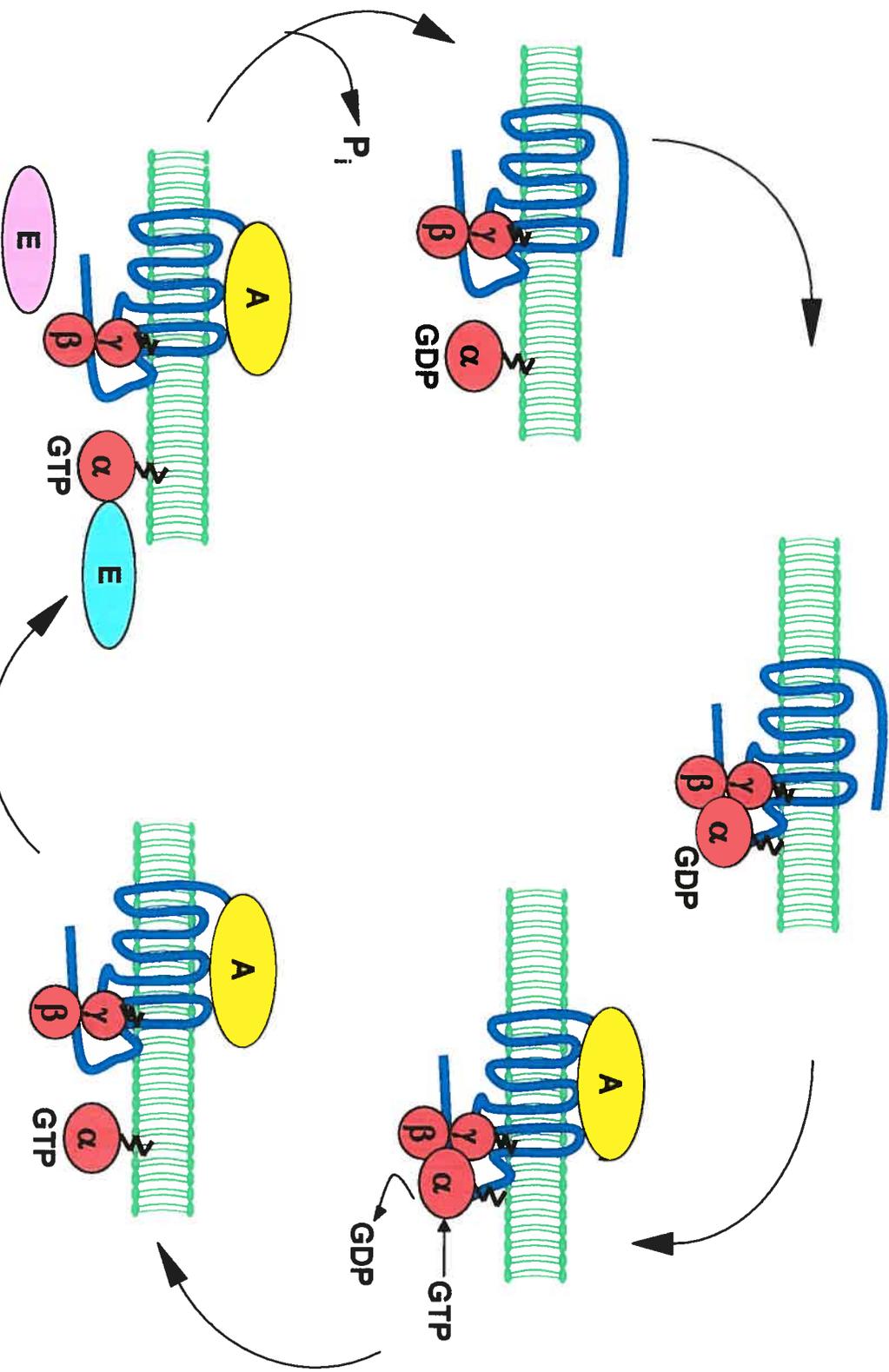


Figure 7. Mode de fonctionnement des protéines G. La stimulation d'un GPCR par un agoniste provoque l'échange du GDP pour un GTP au niveau de la sous-unité  $\alpha$ . La liaison du GTP va entraîner la dissociation de la sous-unité  $\alpha$  des sous-unités  $\beta/\gamma$  et du récepteur. La dissociation des sous-unités va permettre à la sous-unité  $\alpha$ -GTP ainsi qu'aux sous-unités  $\beta/\gamma$  d'interagir et d'activer des effecteurs. La sous-unité  $\alpha$  va hydrolyser le GTP en GDP ce qui va lui permettre de lier à nouveau les sous-unités  $\beta/\gamma$  pour ainsi revenir à l'état inactif.

par un agoniste provoque des changements conformationnels au niveau des boucles flexibles de la sous-unité  $\alpha$  et de la région Switch II, qui est située au-dessus du tunnel central de la sous-unité  $\beta$  et qui adopte différentes conformations selon qu'elle est

liée au GDP ou au GTP (Lambright et al., 1996; Wall et al., 1995). Ces changements de conformation entraînent l'échange du GDP pour le GTP. Entre autre, le mouvement de l'hélice  $\alpha$  en C-terminal provoque une diminution de l'affinité de la sous-unité  $\alpha$  pour le GDP (Neer, 1995).

Pour sa part, la partie N-terminale de la protéine  $G_\alpha$  permet l'interaction entre la sous-unité  $\alpha$  et les sous-unités  $\beta/\gamma$  (Simon et al., 1991; Rens-Domiano et al., 1995). Des études réalisées à l'aide de trypsine démontrent que la protéolyse de la partie N-terminale de la sous-unité  $\alpha$  abolit l'interaction entre la sous-unité  $\alpha$  et les sous-unités  $\beta/\gamma$  (Simon et al., 1991; Rens-Domiano et al., 1995). De plus, des spéculations basées sur la structure cristallisée de la protéine  $G_{\alpha t}$  stipulent que la protéine  $G_\alpha$  pourrait interagir avec les sous-unités  $\beta/\gamma$  au niveau des régions Switch (Rens-Domiano et al., 1995).

Afin de permettre la transmission du signal, la protéine  $G_\alpha$  possède des sites d'interaction avec des effecteurs. Des études, réalisées à l'aide de protéines G chimériques, démontrent que la protéine  $G_\alpha$  interagit avec les effecteurs via trois régions: la région I (résidus 236 à 240), la région II (résidus 276 à 285) et la région III (résidus 349 à 356). De plus, la structure cristallisée de la protéine  $G_{\alpha i2}$  suggère qu'il y aurait une région d'interaction supplémentaire dans le domaine en hélice  $\alpha$  (Rens-Domiano et al., 1995).

### 1.3.3.2 Modifications lipidiques

Toutes les protéines  $G_\alpha$  subissent des modifications lipidiques co- et/ou post-traductionnelle. (Wedegaerther et al., 1995; Nürnberg et al., 1995). Les acides gras,

myristate et/ou palmitate, s'attachent à l'aide d'un lien covalent sur le domaine N-terminal de la sous-unité  $\alpha$ .

La N-myristoylation est une modification co-traductionnelle qui consiste en l'ajout d'un acide gras saturé de 14 carbones à la protéine naissante. Le lipide est additionné sur le résidu de glycine qui devient l'extrémité du domaine N-terminal suite à l'enlèvement du résidu de méthionine initiateur qui est situé en amont de la glycine (Wedegaertner et al., 1995, Nürnberg et al., 1995). Le myristate se lie de manière irréversible à la sous-unité  $\alpha$  via un lien amide. Cette modification lipidique permet d'augmenter la lipophilicité de la sous-unité  $\alpha$  tout en contribuant à la spécificité des interactions protéine-protéine (Nürnberg et al., 1995). De plus, il semblerait que la myristoylation de la sous-unité  $\alpha$  permet d'augmenter l'affinité de la sous-unité  $\alpha$  pour les sous-unités  $\beta/\gamma$  en plus d'augmenter son potentiel à activer des effecteurs (Nürnberg et al., 1995).

Dans un même ordre d'idées, toutes les sous-unités  $\alpha$  (à l'exception de  $G_{\alpha t}$ ) sont palmitoylées (Nürnberg et al., 1995; Wedegaertner et al., 1995). La palmitoylation est une modification post-traductionnelle, réversible, qui survient sur un résidu de cystéine situé près du domaine N-terminal via un lien thioester labile. Certaines protéines  $G_{\alpha}$  sont myristoylées et palmitoylées. Il a été démontré à l'aide de sous-unités  $\alpha$  chimériques, que les formes non-palmitoylées de sous-unités  $\alpha$  n'étaient pas en mesure d'activer ses effecteurs (Wedegaertner et al., 1993).

### 1.3.3.3 Effecteurs

La sous-unité  $\alpha$  libre a la capacité d'interagir et de réguler une variété d'enzymes et de canaux ioniques dont l'adénylate cyclase, la phosphodiesterase, la phospholipase C ainsi que les canaux potassiques et calciques tel que mentionné dans le tableau II (Rens-Domiano et al., 1995).

	Sous-unité $\alpha$	Sous-unités $\beta/\gamma$
GMPc		
phosphodiesterase	↑	↑
GRK <sub>2</sub>		↑
Protéines régulatrices		
Ras		↑
PI-3kinase		↑
Phospholipase C- $\beta$	↑	↑
Adénylate cyclase	↑, ↓	↑, ↓
Canaux Ca <sup>2+</sup>	↑, ↓	
Canaux K <sup>+</sup>	↑	↑
Canaux Cl <sup>-</sup>	↑	
Canaux Na <sup>+</sup>	↑, ↓	

Tableau II: Effecteurs des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta/\gamma$  des protéines G. Les différentes sous-unités des protéines G ont la capacité d'interagir avec divers effecteurs pour ainsi les réguler. Le tableau présente les différents effecteurs pouvant interagir et être modulés de manière positive (↑) ou négative (↓) par les sous-unités  $\alpha$  et/ou les sous-unités  $\beta/\gamma$  des protéines G.

### 1.3.4 Sous-unités $\beta/\gamma$

#### 1.3.4.1 Structure

La sous-unité  $\beta$  est constituée de deux régions distinctes : la partie N-terminale, qui est constituée d'une hélice  $\alpha$  d'environ 20 acides aminés et d'une région de séquences répétitives comportant sept motifs W-D répétés (figure 8) (Clapham et al., 1997; Rens-Domiano et al., 1995). Chaque motif W-D répété comporte une séquence hautement conservée d'environ 40 acides aminés, qui contient certains résidus caractéristiques (Simon et al., 1991). En fait, le motif W-D répété est délimité par des paires de résidus de glycine-histidine (GH) et de tryptophane-aspartate (WD). La longueur de la région entre les résidus WD et GH est variable (Clapham et al., 1997). Le motif W-D répété est présent dans de nombreuses protéines impliquées au niveau de diverses voies de signalisation, de l'épissage de l'ARN pré-messager, de la régulation transcriptionnelle, de l'assemblage du

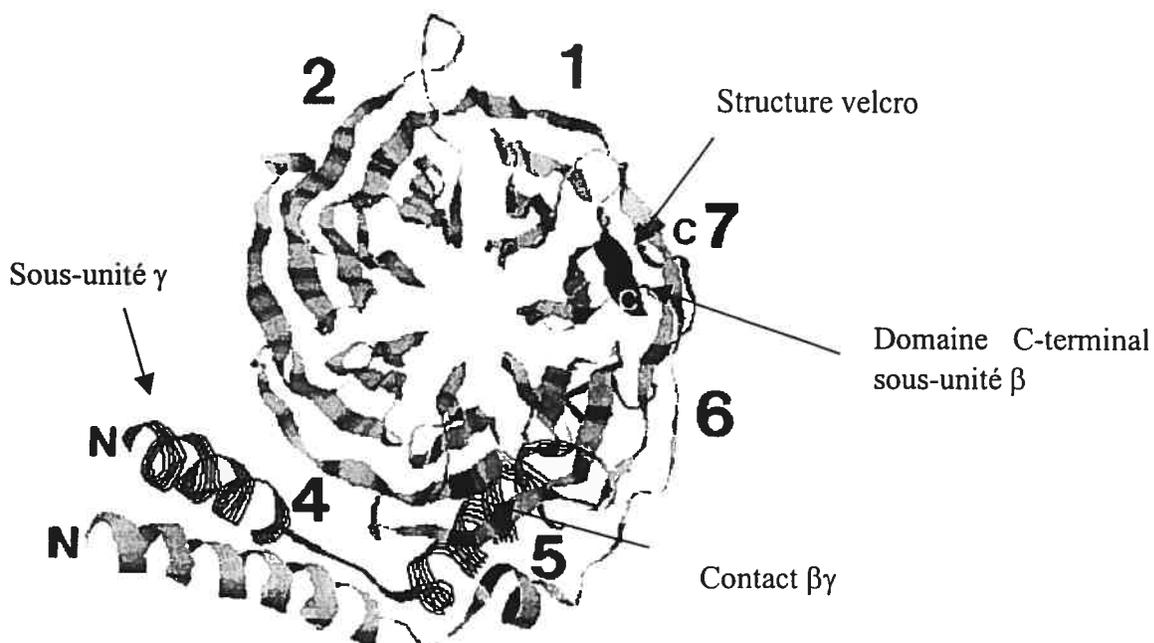


Figure 8: Structure des sous-unités  $\beta/\gamma$  des protéines G vue de la surface de la sous-unité  $\alpha$ . La sous-unité  $\gamma$  est représentée par la structure lignée noire et s'étend au bas de l'anneau formé par la sous-unité  $\beta$ . La sous-unité  $\beta$  est illustrée par la structure en gris. Le domaine C-terminal de la sous-unité  $\beta$ , situé près de la lame 7, est représenté en noir. La lame 7 comporte une structure velcro permettant de maintenir la structure dans cette conformation. Les lames sont numérotées de 1 à 7 de manière à ce que le premier motif WD soit situé dans la lame 1. Le contact entre les sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  est représenté par un carré noir (Clapham et al., 1997).

cytosquelette et du trafic vésiculaire. De plus, le motif W-D répété serait impliqué au niveau de l'assemblage de complexes macromoléculaires et serait essentiel aux fonctions de ces protéines (Clapham et al., 1997; Neer, 1995). La structure cristallisée de la sous-unité  $\beta$  démontre que le motif W-D répété est constitué de feuilletts  $\beta$  organisés en anneau formant une structure en hélice qui est similaire aux hélices servant à propulser les bateaux (figure 8). Chaque lame de l'hélice est composée de quatre feuilletts  $\beta$  (Clapham et al., 1997). La septième lame comporte une structure en attache velcro (velcro-snap) qui permet de maintenir la sous-unité  $\beta$  dans cette conformation (Clapham et al., 1997; Neer et al., 1996; Clapham et al., 1996).

Pour sa part, la sous-unité  $\gamma$  est constituée d'une hélice  $\alpha$  dont la région N-terminale forme une structure en superhélice (coiled-coil) avec la portion N-terminale de la sous-unité  $\beta$  (Clapham et al., 1997; Neer, 1995). La sous-unité  $\gamma$  s'étend au bas de l'anneau formé par la sous-unité  $\beta$  (figure 8) et interagit avec les résidus des lames 5, 6 et 7. La structure en superhélice des sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  permet d'expliquer l'association étroite qui existe entre ces deux sous-unités. La sélectivité de la sous-unité  $\gamma$  pour les différentes sous-unités  $\beta$  est déterminée par une séquence de 14 résidus situés au milieu de la sous-unité  $\gamma$  (Neer, 1995). Dans un même ordre d'idées, la sous-unité  $\beta/\gamma$  se lie de manière asymétrique à la sous-unité  $\alpha$  principalement via les résidus des lames 1, 2 et 3.

#### 1.3.4.2 Modifications lipidiques

Les sous-unités  $\beta/\gamma$  des protéines G disposent d'une lipophilicité plus élevée que la sous-unité  $\alpha$  (Nürnberg et al., 1995). En fait, les sous-unités  $\gamma$  peuvent subir des modifications lipidiques au niveau de la partie C-terminale. La partie C-terminale des sous-unités  $\gamma$  comporte un motif CAAX, qui permet la prénylation de la sous-unité  $\gamma$  (Simonds et al., 1991; Clapham et al., 1997; Rens-Domiano et al., 1995). Toutefois, selon l'isotype de protéine  $G\gamma$ , le type de prénylation peut différer. En effet, la protéine  $G\gamma_1$  est farnésylée

tandis que l'isotype  $G\gamma_2$  est géranylgeranylée. Dans tous les cas de prénylation, le lipide se lie au résidu de cystéine du motif CAAX via un lien thioester stable. La prénylation est suivie d'une protéolyse des trois acides aminés en C-terminal (AAX) ainsi que d'une carboxyméthylation sur le résidu de cystéine en C-terminale (Clapham et al., 1996; Simonds et al., 1991). Le rôle du groupement carboxyméthyl est toutefois inconnu, mais ce dernier pourrait contribuer à la signalisation cellulaire (Rens-Domiano et al., 1995, Simon et al., 1991). Des études de mutagenèse démontrent que la prénylation est nécessaire pour l'attachement de la sous-unité au niveau membranaire (Simonds et al., 1991; Rens-Domiano et al., 1995). En plus de ces fonctions au niveau membranaire, la prénylation adéquate de la sous-unité  $\gamma$  en combinaison avec le domaine C-terminal servirait à spécifier le couplage d'avec le récepteur (Kisselev et al., 1995). Toutefois, le dimère  $\beta/\gamma$  est formé en absence de prénylation (Higgins et al., 1994)

Des études de phosphorylation *in vitro* démontrent que la sous-unité  $\beta$  des protéines G pourrait être phosphorylée sur un résidu histidine par une enzyme qui utilise le GTP comme substrat (Wieland et al., 1993; Clapham et al., 1996). De plus, ces études réalisées à l'aide de cellules leucémiques humaines 60 (HL-60) suggèrent que le phosphate du résidu histidine pourrait être transféré à la molécule de GDP de la sous-unité  $\alpha$ , ce qui implique que la protéine  $G_\gamma$  pourrait agir comme un donneur de phosphate et ce sans qu'un agoniste se lie au récepteur (Wieland et al., 1993; Clapham et al., 1996). Une autre étude démontre que ce transfert de phosphate sur le GDP de la sous-unité  $\alpha$  ne se produirait pas dans les systèmes biologiques (Hohenegger, et al., 1996).

#### 1.3.4.3 Effecteurs

Comme les sous-unités  $\alpha$ , les sous-unités  $\beta/\gamma$  possèdent des sites d'interaction protéine-protéine, qui permettent au dimère  $G_{\beta/\gamma}$  de réguler des effecteurs (Rens-Domiano et al., Clapham et al., 1996, Simon et al., 1991). Entre autre, les sous-unités  $\beta/\gamma$  régulent l'adénylate cyclase, la phospholipase C, les canaux potassiques ainsi que la

phosphoinositide 3 kinase (PI 3-kinase), la protéine Ras qui entraîne l'activation de ERK (Tableau II) (Nürnberg et al., 1995; Rens-Domiano et al., 1995; Neer, 1995). Le dimère  $G_{\beta\gamma}$  peut interagir avec les récepteurs en plus de contribuer à la désensibilisation des récepteurs en recrutant la protéine GRK2 à la membrane cellulaire. De nombreuses cibles des sous-unités  $\beta/\gamma$  comme les GRKs ou la phospholipase C possèderaient des domaines PH (pleckstrin homology) qui permettent des interactions avec les lipides (Clapham et al., 1996).

### 1.3.5 Couplage

Afin de moduler les différents signaux extracellulaires, certains GPCR ont la capacité de se coupler à de multiples protéines G appartenant à des sous-familles différentes (Gudermann et al., 1997). Par exemple, le  $\beta_2$ -AR a la capacité de se coupler à la protéine  $G_s$ , qui entraîne l'activation de la PKA, ainsi qu'à la protéine  $G_i$  (Xiao et al., 1995; Daaka et al., 1997). Le changement de couplage de la protéine  $G_s$  à  $G_i$  s'effectuerait via phosphorylation du récepteur par la PKA et donc à l'aide d'un mécanisme permettant le découplage lors de la désensibilisation hétérologue (Daaka et al., 1997; Zamah et al., 2002; Communal et al., 1999). Des études, réalisées à l'aide de  $\beta_2$ -AR mutants (ne pouvant être phosphorylées par la PKA), démontrent que ces récepteurs mutants ne sont pas en mesure d'activer ERK 1/2, une kinase activée par la sous-unité  $\beta/\gamma$  de la protéine  $G_i$  (Daaka et al., 1997).

En ce qui a trait au couplage du  $\beta_1$ -AR, durant de nombreuses années, nous avons cru que le  $\beta_1$ -AR se couplait uniquement à la protéine  $G_s$ . Toutefois, des études récentes démontrent que le  $\beta_1$ -AR pourrait également se coupler à la protéine  $G_i$  et ainsi entraîner l'activation des MAP kinases ERK 1/2 et p38 (Hu et al., 2003; Chesley et al., 2000). Le couplage entre le  $\beta_1$ -AR et la protéine  $G_i$  demeure un sujet controversé, puisque ceci n'est pas universellement accepté.

Le couplage des  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -AR à des protéines G appartenant à diverses sous-familles peut entraîner des réponses cellulaires différentes. Entre autre, il a été démontré que la stimulation des  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -AR provoquait des effets opposés au niveau de l'apoptose dans les cardiomyocytes (Communal et al., 1999; Zaugg et al., 2000; Xiao et al., 1999). En fait la protéine  $G_s$  provoque des effets pro-apoptotiques via la PKA tandis que la protéine  $G_i$  entraîne des effets anti-apoptotiques via l'activation de la PI 3-kinase, une voie de survie cellulaire. Bien que les  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -AR semblent se coupler aux mêmes protéines G c'est-à-dire  $G_s$  et  $G_i$ , la divergence observée au niveau de la réponse cellulaire, pourrait représenter la résultante du couplage des récepteurs et donc la balance entre les deux effets.

## 1.4 Désensibilisation

Suite à une stimulation par un agoniste, les  $\beta$ -AR modifient leurs conformations afin d'activer des voies de signalisation intracellulaire (Neer, 1995). Toutefois, lorsque cette stimulation est soutenue, un mécanisme de régulation intracellulaire similaire aux boucles de rétro-inhibition retrouvées au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire est activé (Lohse, 1993). Ce mécanisme, qui permet aux cellules de contrôler et de réguler leur réponse cellulaire suite à une stimulation par un agoniste spécifique, se nomme désensibilisation. La désensibilisation entraîne une réduction de la réponse suite à une stimulation répétée ou de longue durée par un stimulus (Lohse, 1993). La désensibilisation est un phénomène pouvant être sous-divisé selon le type de stimulation c'est-à-dire hétérologue (généralisée) ou homologue (spécifique au récepteur); selon l'intervalle de temps de la stimulation rapide (quelques minutes) ou lent (quelques heures et/ou jours) et finalement selon le type de mécanisme découplage (une perte de fonction du récepteur) ou régulation négative (diminution du nombre de récepteurs) (Lohse, 1993).

La désensibilisation a été étudiée de manière détaillée chez les récepteurs à activité tyrosine kinase et les GPCR dont les  $\beta$ -AR. Ce processus comporte trois étapes : le découplage fonctionnel, la séquestration ainsi que la déphosphorylation ou la dégradation (Marchese et al., 2003; Shiina et al., 2000).

#### 1.4.1 Découplage fonctionnel

Les mécanismes de désensibilisation rapide (quelques secondes à quelques minutes suite à la stimulation par l'agoniste) affectent la fonction des récepteurs (Lohse, 1993; Barak et al., 1999; Pitcher et al., 1998). L'étape critique de ces mécanismes de désensibilisation est la phosphorylation des récepteurs. La phosphorylation des récepteurs peut être exécutée soit par des kinases spécifiques aux récepteurs c'est-à-dire les GRKs ou via des kinases effectrices tel la PKA ou la PKC. En fait, les GRKs phosphorylent uniquement les récepteurs en conformation active qui sont occupés par un agoniste. Ce type de désensibilisation est dit homologue (Rapacciuolo et al., 2003; Pitcher et al., 1998). Par contre, la phosphorylation par les kinases effectrices est dite hétérologue, puisque ces kinases ont la capacité de phosphoryler les récepteurs qui ne sont pas en conformation inactive.

##### 1.4.1.1 Désensibilisation homologue (via kinases spécifiques au récepteur)

Lorsque les  $\beta$ -AR sont activés par un agoniste, la sous-unité  $\alpha$  de la protéine G se dissocie des sous-unités  $\beta/\gamma$ . Les sous-unités  $\beta/\gamma$  libres vont recruter les GRKs cytosoliques à la membrane cellulaire (figure 9). Lorsque recrutées au niveau membranaire, les GRKs, qui sont des kinases à sérine/thréonine, vont phosphoryler les  $\beta$ -AR en conformation active (Marchese et al., 2003). La phosphorylation des  $\beta$ -AR par ces kinases au niveau du domaine C-terminal entraîne la création de sites de haute affinité, qui permettent aux arrestines cytosoliques d'être recrutées à la membrane des cellules et ainsi

lier les récepteurs phosphorylés (Luttrell et al., 2002, Kohout et al., 2003, Claing et al., 2002). La liaison des arrestines provoque le découplage entre le récepteur et sa protéine G.

#### 1.4.1.1.1 Les GRKs

Dans le processus de désensibilisation, le rôle des GRKs est de phosphoryler les GPCR en conformation active afin de créer sur les récepteurs des sites de haute affinité pour la liaison des arrestines (Luttrell et al., 2002). Les GRKs constituent une famille de sept kinases à sérine/thréonine (GRK1 à 7), qui phosphorylent les GPCR en conformation active (Shenoy et al., 2003; Hisatomi et al., 1998). À l'exception des GRKs 1 et 7, qui sont majoritairement exprimées dans la rétine et de GRK4, qui est exprimée au niveau des testicules, du cerveau et du rein les GRKs sont exprimées de façon ubiquitaire (Krupnick et al., 1998; Pitcher et al., 1998, Shenoy et al., 2003). Les GRKs possèdent une homologie variant de 53% à 93% au niveau de la séquence nucléotidique. Les plus grandes divergences sont entre les GRKs 1 et 2 (Pitcher et al., 1998). En se basant sur leurs similitudes au niveau de la séquence nucléotidique ainsi que leurs fonctionnalités, les GRKs sont divisées en trois classes : la classe des rhodopsines kinases qui inclut GRK1 et GRK7, la classe des  $\beta$ -adrenergic kinase ( $\beta$ -ARK) qui comporte GRK2 et GRK3 ainsi que la classe GRK4 qui est constituée des GRKs 4, 5 et 6 (Hisatomi et al., 1998, Weiss et al.,

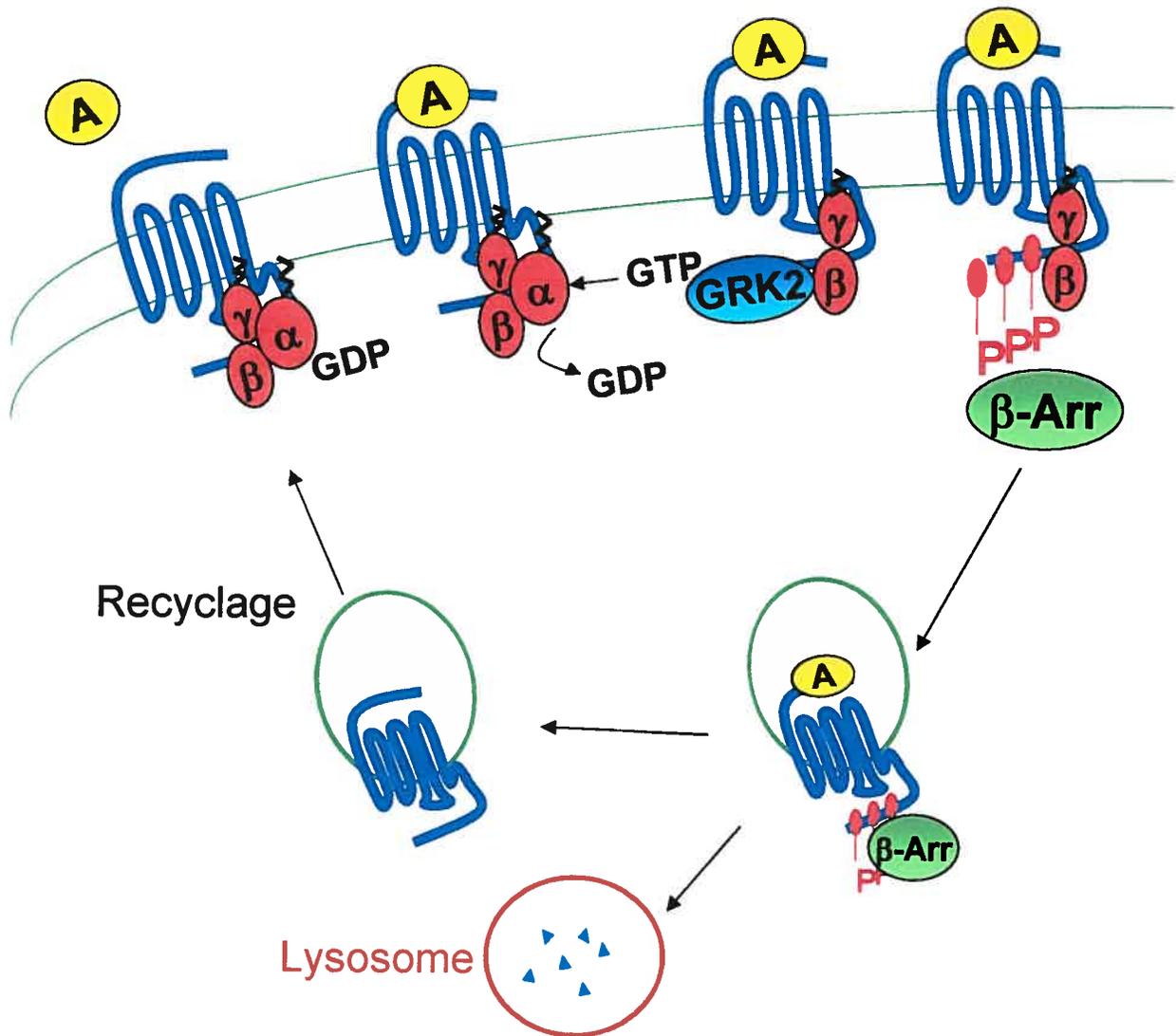


Figure 9 : Schéma général désensibilisation des récepteurs. Lorsque les  $\beta$ -AR sont activés par un agoniste, la sous-unité  $\alpha$  de la protéine G se dissocie des sous-unités  $\beta/\gamma$ . Les sous-unités  $\beta/\gamma$  libres vont recruter les GRKs cytosoliques à la membrane cellulaire. Les GRKs vont phosphoryler les  $\beta$ -AR en conformation active au niveau du domaine C-terminal entraînant ainsi la création de sites de haute affinité. Ces sites de haute affinité vont permettre aux arrestines cytosoliques d'être recrutées à la membrane des cellules et de lier les récepteurs phosphorylés. La liaison des arrestines provoque le découplage entre le récepteur et sa protéine G.

1998). Les membres de la famille GRK2 partagent une homologie de séquence d'environ 84% et phosphorylent spécifiquement les  $\beta$ -AR (Pitcher et al., 1998).

Les GRKs sont constituées d'un domaine N-terminale d'environ 185 acides aminés, qui permet la reconnaissance des récepteurs, d'un domaine catalytique central de 263-266 acides aminés et d'un domaine C-terminale très variable en ce qui a trait à la longueur (105 à 230 résidus) et la structure (Krupnick et al., 1998; Pitcher et al., 1998). Le domaine C-terminal est impliqué au niveau de la régulation des interactions protéine-protéine et serait le site de plusieurs modifications post-transcriptionnelles.

Une caractéristique importante des GRKs est la spécificité pour leurs substrats, qui dépend de l'affinité pour le récepteur ainsi que de la distribution tissulaire. Tel que mentionné précédemment, les GRKs phosphorylent uniquement les GPCR en conformation active c'est-à-dire stimulé par un agoniste (Pitcher et al., 1998) En fait, les GRKs lient et phosphorylent les régions du récepteur qui sont exposées suite au changement de conformation provoqué par l'agoniste. Toutefois, les sites d'interaction entre le récepteur et les GRKs sont distincts des sites de phosphorylation (Pitcher et al., 1998). En plus de servir de substrat aux GRKs, les GPCR servent d'activateurs aux kinases. Des études de protéolyse démontrent que la troisième boucle intracellulaire des GPCR, qui est responsable de l'initiation de la transduction du signal, serait également impliquée dans la terminaison du signal médié par les GRKs (Pitcher et al., 1998).

Les GRK2 et 3 possèdent un domaine pleckstrin-homology (PH) d'une centaine de résidus situé dans le domaine C-terminal (Pitcher et al., 1998). Les domaines PH sont constitués de six blocs contenant des résidus hydrophobiques qui sont conservés. Les blocs sont séparés par des inserts de longueur variable. En plus des récepteurs, les domaines PH permettent aux GRK2 et 3 d'interagir avec des partenaires d'interaction. Les enzymes connues qui interagissent avec les sous-unités  $\beta/\gamma$  des protéines G hétérotrimériques sont le

phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>), l'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>) et la PKC (Pitcher et al., 1998).

L'interaction entre le domaine C-terminal des GRK2 et 3 et les sous-unités  $\beta/\gamma$  des protéines G permet le recrutement des GRKs au niveau membranaire suite à l'activation des protéines G. L'association entre les sous-unités  $\beta/\gamma$  des protéines G et le domaine C-terminal de GRK2 a été démontrée par une étude *in vitro* réalisée à l'aide de la  $\beta$ -ARK bovine recombinante. Cette étude permet de mettre en évidence que les sous-unités  $\beta/\gamma$  augmente par un facteur dix la phosphorylation des  $\beta_2$ -AR et de la rhodopsine par la GRK2 (Pitcher et al., 1992). Par la suite, Kim C.M. et al. (1993) ont obtenu des données cinétiques et quantitatives, qui ont démontré que l'interaction entre GRK2 et les sous-unités  $\beta/\gamma$  est de haute affinité et importante pour la localisation cellulaire de la kinase.

La partie N-terminale du domaine PH de GRK2 est constituée d'une poche hydrophobique en baril  $\beta$ , ce qui lui permet de lier des molécules lipophiliques dont le PIP<sub>2</sub> (Pitcher et al., 1998, DebBurman et al., 1995). Dans un même ordre d'idées, il a été démontré que les GRKs sont des enzymes dépendantes des lipides et que les lipides chargés permettraient la régulation des GRK2 et 3 via un mécanisme qui n'implique pas la modulation de l'état d'autophosphorylation (Pitcher et al., 1998; DebBurman et al., 1995). En effet, la phosphorylation des  $\beta$ -AR par GRK2 requiert la présence simultanée du PIP<sub>2</sub> et des sous-unités  $\beta/\gamma$  des protéines G (Pitcher et al., 1995; Pitcher et al., 1998). La liaison simultanée du PIP<sub>2</sub> et des sous-unités  $\beta/\gamma$  au domaine PH de GRK2 est nécessaire pour l'association membranaire de la kinase et augmente de manière synergique la phosphorylation du récepteur (Pitcher et al., 1995).

Tel que mentionné précédemment, les sous-unités  $\beta/\gamma$  ont la capacité d'activer certaines voies de signalisation (Clapham et al., 1997). Dans un même ordre d'idées, il a été démontré que la partie C-terminale de GRK2 lie les sous-unités  $\beta/\gamma$  ce qui permet de les

piéger et ainsi inhiber les voies de signalisation activées par ces sous-unités (Blackmer et al., 2001).

#### 1.4.1.1.2 Les arrestines

Suite à la phosphorylation des récepteurs par les GRKs, il y a création de sites de haute affinité ce qui permet au récepteur de recruter une protéine nommée arrestine (Gaidarov et al., 1999). Les arrestines occupent un rôle central au niveau de la désensibilisation homologue en permettant de relier certaines étapes de la désensibilisation (Luttrell et al., 2002). Au niveau des mammifères, quatre arrestines ont été clonées dont deux visuelles (l'arrestine visuelle et l'arrestine cône) impliquées uniquement dans la phototransduction et exprimées seulement dans la rétine (Gaidarov et al., Luttrell et al., 2002). Pour leurs parts, les deux autres arrestines c'est-à-dire la  $\beta$ -arrestine 1 et 2 (arrestine 2 et 3) sont exprimées de façon ubiquitaire et seraient impliquées dans la régulation de divers GPCR. La famille des arrestines comportent plusieurs variantes créées par épissage alternatif, dont l'expression est dépendante du tissu (Böhm et al., 1997).

L'arrestine provoque le découplage entre le récepteur et sa protéine G ce qui entraîne l'arrêt du signal médié par la protéine G (Gaidarov et al., 1999; Shenoy et al., 2003). En fait, l'arrestine est en compétition directe avec la protéine G (Gaidarov et al., 1999). Toutefois, les  $\beta$ -arrestines possèdent une fonction supplémentaire qui n'est pas observée chez les arrestines visuelles (Luttrell et al., 2002). Des études de colocalisation démontrent que les arrestines non-visuelles interagissent directement avec la clathrine et serviraient d'adaptateur entre les  $\beta_2$ -AR en conformation active et les puits tapissés de clathrine (Goodman et al., 1996). De plus, il a été démontré que la partie N-terminale des  $\beta$ -arrestines interagit avec l'adaptateur hétérotétramérique AP-2 (Luttrell et al., 2002). L'adaptateur AP-2 permet de relier les récepteurs à la machinerie endocytotique en interagissant avec la clathrine ainsi qu'en initiant la formation de puits tapissés de clathrine (Luttrell et al., 2002). Donc, les  $\beta$ -arrestines seraient en mesure de cibler les récepteurs vers

la machinerie endocytotique (Luttrell et al. 2002) ce qui entraîne l'internalisation des récepteurs qui est importante pour la resensibilisation des récepteurs et la régulation négative.

Dans un même ordre d'idées, il a récemment été démontré que les  $\beta$ -arrestines seraient également impliquées au niveau du recrutement de la kinase SRC et de la transmission du signal de ERK1/2 et de JNK3 par les GPCR (Luttrell et al., 2002; Lefkowitz, 1998). Lorsque des mutants dominants négatifs de la  $\beta$ -arrestine, qui bloquent l'endocytose des récepteurs, sont exprimés, l'activation des MAP kinases est bloquée (Daaka et al., 1998). De plus, d'autres inhibiteurs de l'endocytose comme la concanavaline A, le sucrose en concentration hypertonique, une déplétion intracellulaire de potassium, une température basse ainsi que le monodansylcadaverine produisent le même effet (Luttrell et al., 1997). Ceci signifie donc que l'internalisation des GPCR est nécessaire pour l'activation de ERK 1/2 contrairement à d'autres voies de signalisation classique comme la voie impliquant l'adénylate cyclase (Lefkowitz, 1998). Les  $\beta$ -arrestines agiraient comme protéines d'échafaudage ce qui permettraient le recrutement de ces MAP kinases au niveau des récepteurs et ainsi conférer aux récepteurs une activité enzymatique spécifique importante pour la régulation de la croissance et de la différenciation cellulaire (Luttrell et al., 2002). Des études démontrent que les  $\beta$ -arrestines liées au  $\beta_2$ -AR en conformation active recruterait la PDE 4D, qui dégrade l'AMPc (Perry et al., 2002). En fait, les  $\beta$ -arrestines agiraient comme protéines d'échafaudage pour l'enzyme, ce qui permet de réguler le taux d'AMPc à deux niveaux c'est-à-dire en découplant le  $\beta_2$ -AR de sa protéine Gs ce qui inhibe l'adénylyl cyclase ainsi qu'en dégradant l'AMPc via la PDE 4D (Perry et al., 2002).

Les fonctions accomplies par les arrestines au niveau de l'endocytose des GPCR seraient régulées par un processus de phosphorylation/déphosphorylation (Lefkowitz, 1998). Entre autre, il a été démontré que la  $\beta$ -arrestine 1 serait constitutivement phosphorylée sur le résidu de sérine en position 412 situé dans le domaine C-terminal

(Lefkowitz, 1998). Lorsque la  $\beta$ -arrestine 1 est recrutée au niveau membranaire par le  $\beta_2$ -AR en conformation active, la  $\beta$ -arrestine 1 serait rapidement déphosphorylée. La déphosphorylation serait essentielle afin que la  $\beta$ -arrestine 1 puisse accomplir ses tâches au niveau de l'endocytose des récepteurs mais pas pour la liaison de l'arrestine avec le récepteur (Lefkowitz, 1998). Les kinases ainsi que les phosphatases impliquées dans ce processus de régulation n'ont toutefois pas été identifiées (Lefkowitz, 1998). De plus, il semblerait que les autres membres de la famille des arrestines ne possèderaient pas de résidu de sérine en position 412. Par le fait même, ces dernières seraient régulées soit par phosphorylation sur des sites différents ou par un processus complètement différent (Lefkowitz, 1998).

#### 1.4.1.2 Désensibilisation hétérologue (via kinases effectrices)

En plus d'être phosphorylés par les GRKs, les  $\beta$ -AR peuvent également être phosphorylés par des kinases activées par des seconds messagers comme la PKA et la PKC (Lohse, 1993; Rapacciuolo et al., 2003). Ce type de phosphorylation entraîne la désensibilisation hétérologue qui se caractérise par la phosphorylation des récepteurs en conformation active et inactive par une kinase effectrice (Rapacciuolo et al., 2003). La phosphorylation des  $\beta$ -AR par ces kinases est suffisante pour provoquer le découplage entre le récepteur et sa protéine G en absence d'arrestine (Luttrell et al., 1999). La désensibilisation hétérologue représente une boucle de rétro-inhibition directe dans laquelle un second messenger vient atténuer l'activité d'un récepteur afin de diminuer la production de second messenger (Lohse, 1993; Kohout et al., 2003). Par conséquent, la désensibilisation hétérologue représente un mécanisme général de désensibilisation comparativement à la désensibilisation homologue qui se fait via des kinases qui sont spécifiques au récepteur (Lohse, 1993).

Il a été démontré que sous conditions optimales, la désensibilisation homologue et hétérologue du  $\beta_2$ -AR serait sensiblement comparable. En effet, une perte de fonction de

50-70% serait observée lorsque que le  $\beta_2$ -AR est phosphorylé par les GRKs comparativement à 40-50% lorsqu'il est phosphorylé par la PKA. Dans un même ordre d'idées, la désensibilisation induite par la phosphorylation par la PKA est plus lente que la désensibilisation médiée par les GRKs (temps de demi-vie de 2 minutes versus 15 secondes) et serait plus sensible à la concentration d'agonistes ( $EC_{50} \approx 10$  nM comparativement  $\approx 300$ nM) (Lohse, 1993). En fait, des études de mutagenèse dirigée suggèrent qu'une faible concentration d'agoniste induirait la phosphorylation aux sites de la PKA tandis qu'une concentration élevée d'agoniste entraînerait une phosphorylation aux sites de la PKA et des GRKs (Hausdorff et al., 1989).

#### 1.4.2 Séquestration

Suite au découplage fonctionnel, ce qui signifie quelques minutes après la stimulation du récepteur par l'agoniste (Barak et al., 1999), les  $\beta$ -AR sont internalisés via des vésicules spécialisées, principalement des puits tapissés de clathrine (Zhang et al., 1996). La clathrine est une protéine trimérique formée par trois branches. L'endocytose via ces puits tapissés de clathrine serait prédominante chez les  $\beta$ -AR (Marchese et al., 2003). Toutefois, des études récentes démontrent que les  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -AR pourraient également internalisés via la voie des cavéoles, une structure riche en cholestérol (Rapacciuolo et al., 2003; Marchese et al., 2003). Il existerait une troisième voie d'endocytose, qui ne nécessite pas de clathrine ou de cavéoles et qui est indépendante des arrestines (Marchese et al., 2003; Claing et al., 2002). Par contre, cette voie alternative d'endocytose, qui est peu caractérisée, ne serait pas employée par le  $\beta$ -AR, mais par certains GPCR comme les récepteurs muscariniques M2 (Marchese et al. 2003, Claing et al., 2002). En fait, il existe une certaine plasticité au niveau des voies d'endocytose des récepteurs et donc lorsqu'une voie d'internalisation est bloquée par un inhibiteur, le récepteur va se diriger vers une autre voie d'endocytose.

Finalement, suite à leur internalisation, les  $\beta$ -AR se retrouvent dans des endosomes à partir desquels ils pourront soit être déphosphorylés et recyclés à la membrane cellulaire afin de subir une deuxième vague de stimulation ou être dégradés par protéolyse dans les lysosomes ce qui entraîne une diminution du nombre de récepteur et contribue à la régulation négative (Marchese et al., 2003). De façon générale au niveau des GPCR, il y a deux groupes de récepteurs ceux qui empruntent facilement la voie de recyclage, comme le  $\beta_2$ -AR, et ceux qui se dirigent vers la voie de dégradation (Marchese et al., 2003). La décision de se diriger vers l'une ou l'autre de ces voies se prend au niveau des endosomes primitifs.

### 1.4.3 Régulation négative

Lorsque la stimulation du récepteur par l'agoniste est soutenue pendant plusieurs heures ou quelques jours, le découplage fonctionnel qui survient rapidement fait place à un mécanisme beaucoup plus lent : la régulation négative. La régulation négative se définit comme étant la diminution du nombre total de récepteurs dans la cellule suite à une stimulation soutenue par un agoniste (Lohse, 1993; Böhm et al., 1997). Cette diminution du nombre de récepteur serait rendue possible grâce à la combinaison de deux phénomènes: l'augmentation de la dégradation des récepteurs et la diminution de la synthèse des récepteurs par des mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels (Lohse, 1993; Pitcher et al., 1998; Böhm, et al., 1997). Toutefois, les mécanismes de régulation négative sont moins connus que le découplage fonctionnel.

#### 1.4.3.1 Dégradation des récepteurs

Au moins deux voies de signalisation intracellulaire contribuent à la dégradation du  $\beta_2$ -AR soit une dépendante de la PKA et l'autre dépendante des GRKs (Böhm et al., 1997; Lohse, 1993). Des études réalisées à l'aide de  $\beta_2$ -AR mutants suggèrent que la phosphorylation dépendante de la PKA augmente la dégradation des  $\beta_2$ -AR contrairement à

la phosphorylation dépendante des GRKs (Böhm et al., 1997; Lohse, 1993). Dans un même ordre d'idées, il a été démontré que les  $\beta_2$ -AR mutants, dont les sites de phosphorylation pour les GRKs ont été supprimés, possèdent une régulation négative normale, contrairement aux mutants, dont les sites de phosphorylation pour la PKA ont été abolis et dont la régulation négative est plus lente (Böhm et al., 1997; Lohse, 1993). Ceci suggère donc que la phosphorylation dépendante des GRKs n'a pas d'effet sur la dégradation des récepteurs contrairement à la phosphorylation dépendante de la PKA. Dans un même ordre d'idées, les désensibilisations hétérologues et homologues n'ont pas le même rôle dans la dégradation du récepteur. Au-delà de la phosphorylation, il est également possible que la conformation adoptée par un récepteur, dépendamment de la kinase qui le phosphoryle, permettrait l'exposition de séquences de ciblage vers les lysosomes. Toutefois, une faible proportion des  $\beta_2$ -AR séquestrés sont ciblés vers les lysosomes. La majorité des  $\beta_2$ -AR sont recyclés à la membrane cellulaire (Böhm et al., 1997; Lohse, 1997). Lorsque la stimulation est soutenue, les récepteurs subissent plusieurs cycles d'endocytose et de recyclage, qui sont accompagnés d'une petite proportion de  $\beta_2$ -AR qui sont ciblés vers les lysosomes (Böhm et al., 1997).

Les arrestines, qui sont impliquées dans la désensibilisation homologue, peuvent contribuer à la dégradation des récepteurs, puisque ces dernières peuvent être ubiquitinées (Shenoy et al., 2003). L'ubiquitination consiste en l'ajout d'une petite protéine de 76 résidus nommée ubiquitine, qui permet aux vésicules endocytotiques d'être dirigées vers les lysosomes afin d'y dégrader les récepteurs internalisés (Böhm et al., 1997; Shenoy et al., 2003). L'ubiquitination de la  $\beta$ -arrestine est nécessaire à l'internalisation du  $\beta_2$ -AR (Shenoy et al., 2003). Toutefois, l'ubiquitination de la  $\beta$ -arrestine du  $\beta_2$ -AR est transitoire ce qui implique qu'elle contribue peu ou pas à la dégradation du  $\beta_2$ -AR contrairement à la  $\beta$ -arrestine du récepteur  $V_2$  à la vasopressine ( $V_2R$ ) dont l'ubiquitination est stable (Shenoy et al., 2003). Donc, la cinétique de déubiquitination détermine le trafic intracellulaire des récepteurs.

#### 1.4.3.2 Diminution de la synthèse des récepteurs

La diminution de la synthèse des GPCR résulterait en une réduction de la transcription génique ou d'évènements post-transcriptionnels comme la déstabilisation de l'ARNm (Böhm et al., 1997). En ce qui a trait au  $\beta_2$ -AR, la déstabilisation de l'ARNm semblerait être le mécanisme favorisé et serait responsable de la diminution du messenger suite à une stimulation soutenue. Il a été suggéré que dans certaines circonstances la production d'AMPC pourrait entraîner une répression de la transcription du gène codant pour le  $\beta_2$ -AR (Böhm et al., 1997).

La diminution de la synthèse des récepteurs est médiée par une diminution de l'ARNm, qui est déstabilisée (Lohse, 1993; Böhm et al., 1997). La déstabilisation de l'ARNm dépend fortement de la production d'AMPC ainsi que de l'activation de la PKA. Il a été suggéré que la PKA phosphoryle un facteur impliqué dans la dégradation de l'ARNm codant pour le  $\beta_2$ -AR ou dans l'induction de la transcription et de la traduction de ce facteur (Böhm et al., 1997). En fait, une petite protéine liant l'ARNm du  $\beta_2$ -AR a été identifiée. Cette protéine, qui est induite par les agonistes  $\beta$ -adrénergiques, a la capacité de lier l'ARNm du  $\beta_2$ -AR et d'entraîner la régulation négative de ce récepteur spécifiquement, puisque la protéine ne lie pas l'ARNm des récepteurs  $\beta_1$ - et  $\beta_3$ -AR (Böhm et al., 1997).

Au sein d'une même famille de récepteurs, les sous-types démontrent des patrons de régulation négative différents (Lohse, 1993; Liang et al., 2003). Par exemple, les  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -AR manifestent des degrés différents de régulation négative, la régulation négative du  $\beta_1$ -AR est plus modeste que celle du  $\beta_2$ -AR (Lohse, 1993; Suzuki et al., 1992, Liang et al., 2003). Lors d'une stimulation soutenue, le  $\beta_1$ -AR subirait une régulation positive contrairement au  $\beta_2$ -AR qui serait régulé négativement (Liang et al., 2003). Les deux sous-types de  $\beta$ -AR seraient internalisés, mais uniquement le  $\beta_2$ -AR serait dirigé vers les

lysosomes afin d'y être dégradés (Liang et al., 2003). Le domaine C-terminal serait responsable des différences de régulation des récepteurs  $\beta$ -AR en conformation active (Liang et al., 2003). De plus en plus d'évidences suggèrent que le domaine C-terminal serait important pour le trafic endosomal (Liang et al., 2003). En plus, il a été constaté que les sous-types de récepteur qui désensibilisent de façon marquée, comme le  $\beta_2$ -AR, démontrent également un effet marqué au niveau du découplage, de l'internalisation et de la régulation négative ce qui suggère que ces mécanismes agiraient de manière coordonnée (Lohse, 1993).

#### 1.4.4 Différences dans la régulation de la désensibilisation des récepteurs $\beta$ -adrénergiques

Des études dénotent certaines différences entre les mécanismes de désensibilisation des  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -AR (Rousseau et al., 1996; Zhou et al., 1995; Suzuki et al., 1992). Entre autre, le  $\beta_1$ -AR serait plus résistant à la désensibilisation homologue que le  $\beta_2$ -AR (Rousseau et al., 1996; Zhou et al., 1995), ce qui implique qu'il existe une différence significative entre la vitesse d'internalisation du  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -AR (Shiina et al., 2000).

Il a été démontré que le domaine C-terminal des  $\beta$ -AR est important pour la détermination du patron de désensibilisation qui est dépendant du sous-type (Rousseau et al., 1996). Dans un même ordre d'idées, des études réalisées à l'aide de récepteurs chimériques ont suggéré que la région riche en résidus de proline de la troisième boucle intracellulaire du  $\beta_1$ -AR serait partiellement responsable des différences observées au niveau de l'internalisation des  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -AR (Green et al., 1994). Par la suite, Shiina et al. ont démontré que le domaine C-terminal et la troisième boucle cytosolique étaient les deux régions majoritairement responsables des différences d'internalisation entre les sous-types de  $\beta$ -AR (Shiina et al., 2000). De plus, ils ont également démontré que la résistance à la désensibilisation homologue du  $\beta_1$ -AR résulterait de la faiblesse de l'interaction entre la  $\beta$ -

arrestine et le  $\beta_1$ -AR (Shiina et al., 2000 et 2001). De plus, la  $\beta$ -arrestine interagirait de façon transitoire avec le  $\beta_1$ -AR stimulé par un agoniste ce qui expliquerait la différence dans la désensibilisation homologue entre les  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -AR. Les domaines intracellulaires du  $\beta_1$ -AR interagirait avec la  $\beta$ -arrestine avec une affinité plus faible que le  $\beta_2$ -AR (Shiina et al., 2001).

## 1.5 Phosphoinositide 3-kinase

Il a été démontré que l'endocytose des  $\beta$ -AR nécessite la présence de D-3 phosphoinositides. Ce lipide phosphorylé est généré par la phosphoinositide 3-kinase (PI 3-kinase) (Gaidarov et al., 1999; Naga Prasad, 2001). L'inhibition de l'activité de la PI 3-kinase atténue l'internalisation des  $\beta_2$ -AR (Naga Prasad et al., 2001; Marchese et al., 2003). De plus, il a été suggéré que les lipides phosphorylés générés par la PI 3-kinase seraient critiques au niveau de la dynamique d'internalisation des récepteurs (Naga Prasad et al., 2002).

Les PI 3-kinases constituent une famille d'enzymes lipidiques, qui catalysent l'addition d'un phosphate en position 3' de l'anneau inositol des phosphatidylinositides (PI) (Naga Prasad et al., 2002; Rameh et al., 1999). Selon le substrat utilisé, les PI 3-kinases peuvent générer trois lipides différents soit le PtdIns-3-P, le PtdIns-3,4-P<sub>2</sub> et le PtdIns-3,4,5,-P<sub>3</sub> (Figure 10) (Corvera et al., Vanhaesebroeck et al., 2001). La production de D3-phosphoinositides est régulée négativement par PTEN, une protéine suppresseur de tumeur (Leslie et al., 2002). Cette phosphoinositide 3-phosphatase agit comme antagoniste direct de la PI 3-kinase en métabolisant le PIP<sub>3</sub> en PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> (Leslie et al., 2002; Vanhaesebroeck, 1999). Les cellules n'exprimant pas PTEN possèdent un niveau élevé de PIP<sub>3</sub> et PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> ce qui implique que les voies de signalisation de la PI 3-kinase sont constitutivement activées (Cantrell, 2001).

Les PI 3-kinases sont inhibées par deux molécules : la wortmannin ainsi que le LY294002 (Vanhaesebroeck et al., 2001). Ces inhibiteurs de faible poids moléculaire possèdent des structures différentes (Vanhaesebroeck et al., 1999) et inhibent la PI 3-kinase via des mécanismes différents. La wortmannin se lie de façon covalente à la sous-unité catalytique de l'enzyme tandis que le LY294002 est en compétition pour le site de liaison de l'ATP (Vanhaesebroeck et al., 1999). *In vitro* les PI 3-kinases des classes I, II et III démontrent une sensibilité similaire pour ces deux inhibiteurs (Vanhaesebroeck et al., 1999).

La famille des PI 3-kinases comporte neuf membres isolés à partir de cellules de mammifères (Rameh et al., 1999) divisée en trois classes (I, II et III) en fonction de leurs structures et du substrat préférentiellement utilisé par l'enzyme (Rameh et al., 1999; Vanhaesebroeck et al., 2001). *In vitro*, les PI 3-kinases appartenant à la classe I utilisent préférentiellement le PtdIns (4,5)P<sub>2</sub> comme substrat (Vanhaesebroeck et al., 2000). Pour sa part, la classe I est sous-divisée en deux sous-classes: A et B, qui sont respectivement activées par les récepteurs à activité tyrosine kinase et les GPCR (Vanhaesebroeck et al., 2001). La classe IA comporte trois isoformes de PI 3-kinase ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\delta$ ). Toutefois, les enzymes de la classe IA étant principalement activées par les récepteurs à activité tyrosine kinase, elles ne seront pas décrites dans ce mémoire. La classe IB est constituée de la PI 3-kinase- $\gamma$ , qui est un hétérodimère constitué d'une sous-unité catalytique (p110 $\gamma$ ) et d'une sous-unité régulatrice (p101) (Vanhaesebroeck et al., 2001 et 1999). De plus, la génération

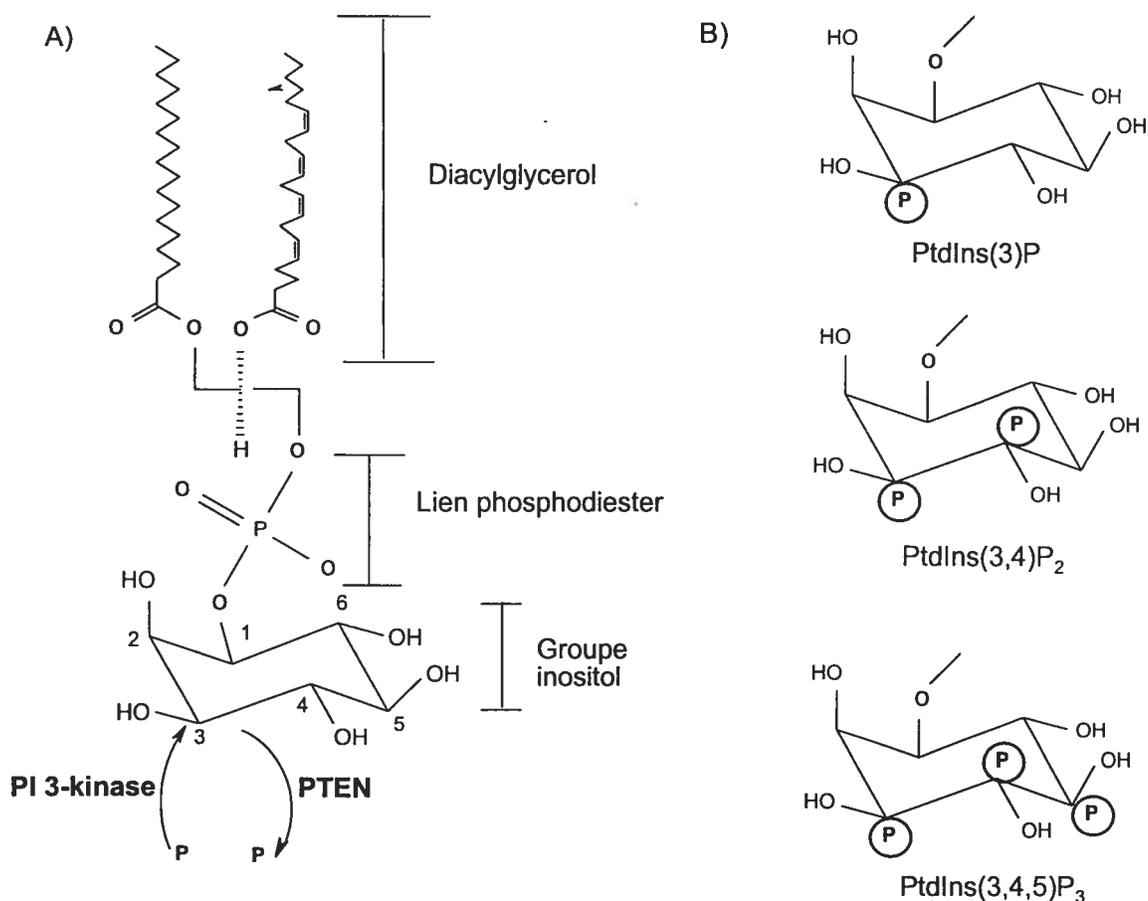


Figure 10 : Structure du phosphoinositol . La structure du phosphoinositol est représentée en A). On remarque que la structure du phosphoinositol comporte un groupe inositol, un lien phosphodiester ainsi que le diacylglycerol. Les PI 3-kinases constituent une famille d'enzymes lipidiques qui catalysent l'addition d'un phosphate en position 3' de l'anneau inositol des phosphatidylinositides tandis que PTEN est une phosphoinositide 3-phosphatase agit comme antagoniste direct de la PI 3-kinase. Les différents phosphoinositols générés par la PI 3-kinase sont illustrés en B). Selon le substrat utilisé, les PI 3-kinases peuvent générer trois lipides différents soit le PtdIns-3-P, le PtdIns-3,4-P<sub>2</sub> et le PtdIns-3,4,5,-P<sub>3</sub>.

de PIP<sub>3</sub> par les PI 3-kinases appartenant à la classe IB serait moins importante que la production de lipides par les enzymes de la classe IA (Vanhaesebroeck et al., 2001 et 1999). Les PI 3-kinases de la classe IB sembleraient être présentes uniquement chez les mammifères et disposer d'une distribution tissulaire restreinte, ce qui explique pourquoi le PIP<sub>3</sub> n'est pas généré dans tous les types cellulaires (Vanhaesebroeck et al., 2001). L'isoforme  $\gamma$  est spécifiquement impliquée dans la désensibilisation homologue des GPCR. Au niveau cytosolique, il a été démontré par immunoprécipitation que le domaine « phosphoinositide kinase homology » (PIK) de la PI 3-kinase- $\gamma$  interagit directement avec le domaine PH de GRK2 (Naga Prasad et al., 2001). Lorsque le  $\beta_2$ -AR est stimulé par un agoniste, la PI 3-kinase- $\gamma$  qui est complexée à GRK2 est recrutée à la membrane des cellules via les sous-unités  $\beta/\gamma$  des protéines G hétérotrimériques (Naga Prasad et al., 2001). Les sous-unités  $\beta/\gamma$  vont par la suite activer les PI 3-kinases- $\gamma$  (Cantrell, 2001; Vanhaesebroeck et al., 2001). L'activation de l'enzyme entraîne une augmentation du niveau de D-3 PtdIns ce qui provoque l'activation de voies de signalisation. Les PI 3-kinases appartenant à la classe I sont impliquées au niveau de la prolifération cellulaire, de la survie cellulaire, de la croissance cellulaire, du réarrangement du cytosquelette ainsi que de l'internalisation des récepteurs (Naga Prasad et al., 2002; Vanhaesebroeck et al., 2001, Cantrell, 2001).

### 1.5.1 Domaines de liaison des PI

Les PI 3-kinases génèrent différentes formes de PI phosphorylés, qui sont reconnus par deux domaines de liaison des lipides : les domaines FYVE et les domaines PH (Vanhaesebroeck et al., 2001 et 1999). Ces domaines de liaison ont été identifiés dans de nombreuses protéines. Les domaines FYVE sont constitués de 60 à 80 résidus comportant huit résidus de cystéine conservés formant deux centres de coordination avec le Zn<sup>2+</sup> (Vanhaesebroeck et al., 1999). Les domaines FYVE lient spécifiquement le PtdIns(3)P. Pour leurs parts, les domaines PH interagissent préférentiellement avec le PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> et le PIP<sub>3</sub> (Vanhaesebroeck et al., 1999). Toutefois, la majorité des domaines PH interagissent

avec le  $\text{PIP}_3$  et lie le  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  avec une affinité plus faible (Vanhaesebroeck et al., 1999). Les domaines PH sont des domaines globulaires protéiques d'environ une centaine d'acides aminés. Les domaines PH sont constitués d'un feuillet  $\beta$ -sandwich à neufs brins et d'une hélice  $\alpha$  située à l'extrémité. Les domaines PH possèdent un côté avec un potentiel électrique positif. Ce potentiel est créé par la distribution des résidus d'acides aminés et donne un pouvoir attraction spécial permettant la liaison des PI qui sont chargés négativement. La fonction des domaines PH est de relocaliser des protéines cytosoliques sous les surfaces membranes (Lemmon et al., 2002).

Les domaines PH ont été identifiés sur plus de 150 protéines dont des kinases, des phospholipases, des adaptateurs protéiques, des protéines structurales et des facteurs d'échange nucléotidiques (Vanhaesebroeck et al., 2001 et 1999). La liaison d'un lipide phosphorylé au domaine PH d'une protéine affecte la localisation, la conformation ainsi que l'activité de la protéine en question (Cantrell, 2001; Vanhaesebroeck et al., 2001 et 2000).

## 1.6 Protéine kinase B/AKT

Quelques années avant que les fonctions du domaine PH soient clairement identifiés, la protéine kinase B (PKB) a été la première protéine connue à contenir ce type de domaine (Vanhaesebroeck et al., 2000; Cantrell, 2001).

PKB est une protéine kinase qui possède un très haut niveau d'homologie avec la PKA et la PKC (Vanhaesebroeck et al., 2000). PKB est également nommée AKT ou c-AKT, car PKB est l'homologue cellulaire de l'oncoprotéine virale v-AKT (Vanhaesebroeck et al., 2000). PKB portait aussi le nom de RAC (Related to A and C) kinase, mais ce dernier n'est plus employé dans la littérature afin d'éviter toutes confusions avec la petite protéine G Rac (Vanhaesebroeck et al., 2000). PKB/AKT est une Ser/Thr kinase de 57 kDa possédant un domaine PH au niveau de la partie N-terminale, ce qui lui permet d'interagir

avec le PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> et le PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> avec une affinité équivalente (Milburn et al., 2003; Vanhaesebroeck et al., 2000). Chez les mammifères, il existe trois isoformes d'AKT ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ), qui sont encodés par trois gènes différents. Les isoformes  $\beta$  et  $\gamma$  possèdent une homologie de séquence de 81% à 83% avec l'isoforme  $\alpha$ , qui est l'isoforme le plus exprimé et le plus étudié (Vanhaesebroeck et al., 2000; Milburn et al., 2003).

Tous les isoformes d'AKT sont constitués d'un domaine PH dans la partie N-terminale, d'un domaine kinase et d'une queue régulatrice dans le domaine C-terminal (Vanhaesebroeck et al., 2000). Pour la suite de ce mémoire, nous utiliserons l'appellation AKT pour désigner cette protéine.

### 1.6.1 Activation d'AKT

À l'état basal, AKT est inactif dans le cytosol des cellules. Toutefois, lorsque la cellule est stimulée, la PI 3-kinase est recrutée et activée à la membrane plasmique afin de phosphoryler les PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> en PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, qui pourra par la suite être converti en PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> par des phosphatases (Milburn et al., 2003). La phosphorylation des lipides par la PI 3-kinase entraîne le recrutement d'AKT inactif au niveau membranaire via son domaine PH, qui interagit avec le PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> et le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> (Sugden, 2003; Milburn et al., 2003; Vanhaesebroeck et al., 2000). L'interaction entre AKT et le PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> et/ou le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> n'est pas suffisante pour activer la kinase. Cette interaction induit un changement de conformation, qui provoque l'exposition de la boucle d'activation d'AKT (Sugden, 2003; Milburn et al., 2003). Une seconde Ser/Thr kinase, la phosphoinositide-dependent-kinase-1 (PDK1), possède un domaine PH lui permettant d'interagir avec le PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> et le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> avec une affinité plus grande qu'AKT (Sugden, 2003). Le domaine PH de PDK1 permet à cette dernière d'être recrutée au niveau membranaire et de co-localiser avec AKT (Milburn et al., 2003; Sugden, 2003). PDK1 va phosphoryler la boucle d'activation de AKT qui est exposée suite au changement de conformation d'AKT. Il a été démontré que PDK1 n'est pas en mesure de phosphoryler le

type sauvage d'AKT en absence de 3-phosphoinositide et ce dans des conditions où un mutant d'AKT dont le domaine PH a été supprimé a la capacité d'être activé (Milburn et al., 2003). PDK1 phosphoryle AKT $\alpha$  sur le résidu de thréonine en position 308 et les isoformes  $\beta$  et  $\gamma$  d'AKT sur des résidus équivalents (Vanhaesebroeck et al., 2000).

AKT peut également être phosphorylé à la membrane des cellules sur un résidu non-catalytique du motif hydrophobe situé dans le domaine C-terminal de la kinase (Milburn et al., 2003). La phosphorylation du résidu Ser en position 473 de l'isoforme  $\alpha$  de AKT et sur des résidus équivalents sur AKT $\beta$  et  $\gamma$  est essentielle à l'activation maximale de AKT (Milburn et al., 2003; Sugden, 2003). La kinase responsable de cette phosphorylation n'est pas clairement caractérisée. Par contre, des études réalisées à l'aide de cellules souches embryonnaires PDK1 $^{-/-}$  démontrent que PDK1 n'est pas responsable de la phosphorylation du résidu situé dans le motif hydrophobe d'AKT (Sugden, 2003 et Milburn et al., 2003). La phosphorylation de ce résidu pourrait s'effectuer via une transphosphorylation ou une autophosphorylation suite à la phosphorylation du premier résidu PDK1 ou via PDK2 (Vanhaesebroeck et al., 2000; Milburn et al., 2003).

Suite à son activation, AKT est retournée au niveau du cytosol, puis éventuellement dans le noyau afin d'activer des voies de signalisation. Le mécanisme par lequel AKT est redistribué dans les différents compartiments cellulaires n'est pas clairement établi (Vanhaesebroeck et al., 2000).

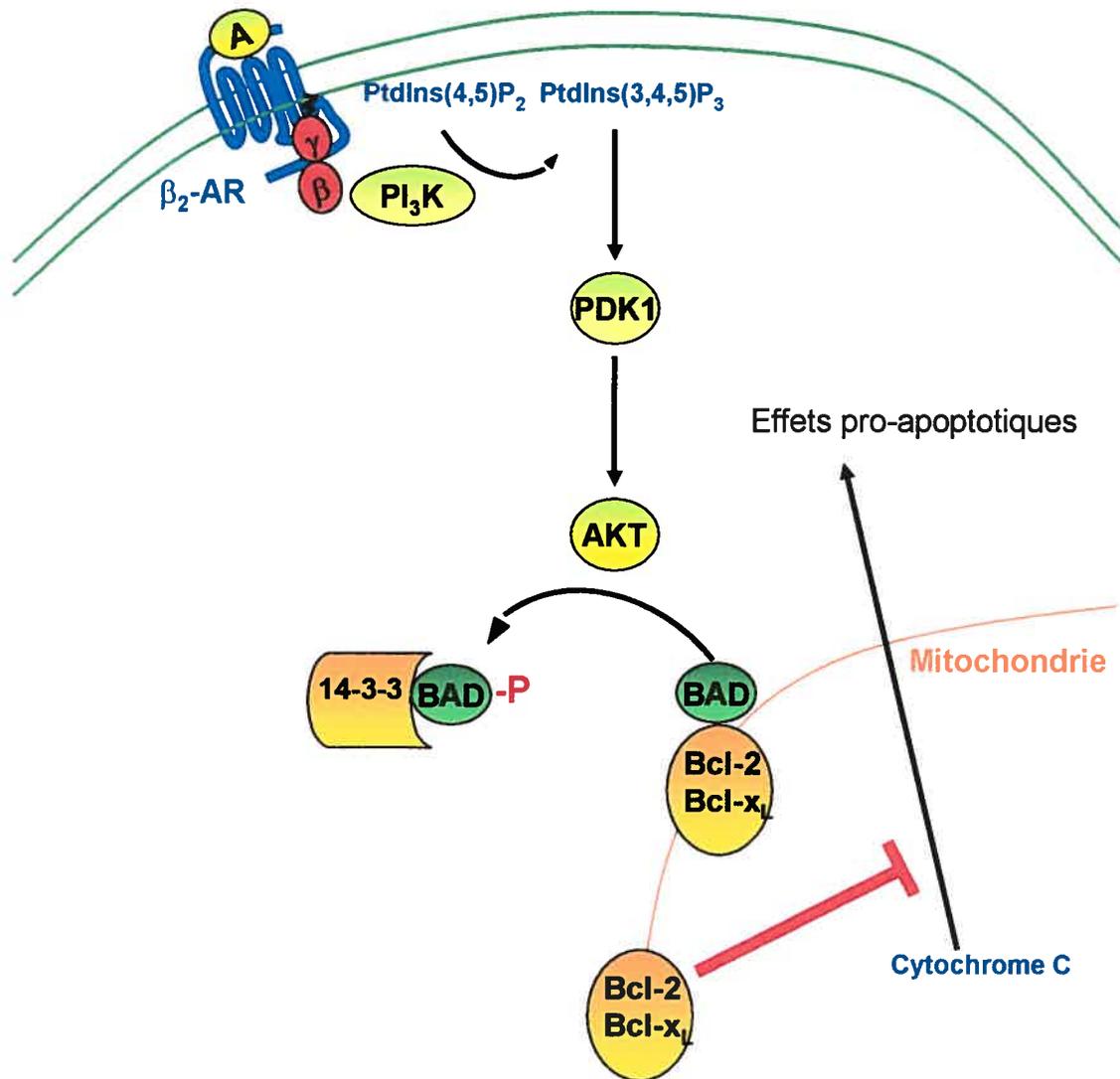


Figure 11 : Voie de signalisation PI 3-kinase-AKT. L'activation des  $\beta_2$ -AR provoque des effets anti-apoptotiques via l'activation de la PI 3-kinase et d'AKT par la protéine  $G_i$  dans les cardiomyocytes. Suite à l'activation et à la redistribution d'AKT dans le cytosol, AKT phosphoryle la protéine pro-apoptotique Bad sur un résidu de sérine. La protéine Bad exerce son effet pro-apoptotique en formant un hétérodimère non fonctionnel avec les facteurs de survie cellulaire Bcl-2 et Bcl- $X_L$ , au niveau de la mitochondrie. La liaison de Bad avec Bcl-2 et Bcl- $X_L$  inhibe l'activité des facteurs de survie cellulaire. Lorsque la protéine Bad est phosphorylée par AKT, la protéine Bad se dissocie des facteurs de survie et se relocalise dans le cytosol. Au niveau cytosolique, la protéine Bad phosphorylée interagit avec la protéine 14-3-3 ce qui permet donc aux protéines Bcl-2 et Bcl- $X_L$  de bloquer l'efflux de cytochrome C de la mitochondrie au cytosol et d'inhiber l'activation des caspases qui entraîne l'apoptose des cellules.

### 1.6.2 Voies de signalisation d'AKT

L'activation d'AKT entraîne l'activation ou inhibition de multiples seconds messagers qui déclenchent divers effets biologiques et physiologiques. Entre autre, AKT est impliquée au niveau de la survie cellulaire, de la transduction du signal de l'insuline, du recrutement de la protéine Raf à la membrane plasmique, du maintien de la production de NO par les cellules endothéliales et interfère avec les activités biologiques de BRCA1 (breast-cancer-susceptibility-gene-1) (Vanhaesebroeck et al., 2000). Toutefois, seule la voie de signalisation activée par les  $\beta$ -AR sera discutée dans ce mémoire.

Il a été démontré dans les cardiomyocytes que l'activation des  $\beta_2$ -AR provoque des effets anti-apoptotiques via l'activation de la PI 3-kinase et d'AKT par la protéine  $G_i$  (Zamah et al., 2002). Suite à l'activation et à la redistribution d'AKT dans le cytosol, AKT phosphoryle la protéine pro-apoptotique Bad sur un résidu de sérine (figure 11). La protéine Bad exerce son effet pro-apoptotique en formant un hétérodimère non fonctionnel avec les facteurs de survie cellulaire Bcl-2 et Bcl- $X_L$ , qui sont situés au niveau de la mitochondrie (figure 11) (Frank et al., 1997). La liaison de Bad avec Bcl-2 et Bcl- $X_L$  inhibe l'activité des facteurs de survie cellulaire. Lorsque la protéine Bad est phosphorylée par AKT sur le résidu de sérine en position 112 ou 136 (Vanhaesebroeck et al., 2000), la protéine Bad se dissocie des facteurs de survie et se relocalise dans le cytosol (Frank et al., 1997). Au niveau cytosolique, la protéine Bad phosphorylée interagit avec la protéine 14-3-3 (figure 11) ce qui permet donc aux protéines Bcl-2 et Bcl- $X_L$  de bloquer l'efflux de cytochrome C de la mitochondrie au cytosol et d'inhiber l'activation des caspases qui entraîne l'apoptose des cellules (Frank et al., 1997).

Bien qu'il ait été démontré que le  $\beta_2$ -AR active la voie de survie cellulaire d'AKT via la protéine  $G_i$  et la PI 3-kinase, il a également été démontré que le  $\beta_1$ -AR pouvait activer la PI 3-kinase (Naga Prasad, 2001) et ce malgré le fait que ces deux sous-types

entraînent des effets opposés au niveau de l'apoptose (Communal et al., 1998 et 1999). Ainsi la controverse subsiste toujours à savoir si les  $\beta_1$ -AR peuvent activer la voie de la PI 3-kinase/AKT et avoir des effets anti-apoptotiques.

## 1.7 Stimulation $\beta$ -adrénergique et pathologies cardiovasculaires

### 1.7.1 Généralités $\beta$ -AR au niveau cardiovasculaire

Certains organes sont très sensibles aux catécholamines endogènes et leurs activités peuvent être rapidement modulées par des variations de concentrations locales. Le cœur est un de ces organes qui est innervé par le système sympathique ce qui lui permet de s'adapter à diverses situations tant environnementales que pathologiques. Une stimulation continue et importante du cœur par les catécholamines peut donc entraîner des pathologies. Nous verrons au cours des prochaines pages deux pathologies qui impliquent les catécholamines soit la défaillance cardiovasculaire et l'hypertrophie cardiaque.

### 1.7.2 Défaillance cardiovasculaire

La défaillance cardiovasculaire est décrite comme étant un état dans lequel le cœur est incapable de maintenir une circulation adéquate afin de répondre aux besoins de l'organisme malgré une pression veineuse acceptable (Harris, 1983). Rapidement lors des premières études sur cette pathologie, il a été constaté que les concentrations de catécholamines étaient augmentées suggérant que leurs récepteurs pouvaient être affectés. Par la suite, il a été démontré que dans des cœurs de patients avec défaillance cardiaque il y avait une diminution de la densité des  $\beta_1$ -AR mais pas des  $\beta_2$ -AR. Au niveau cardiaque, le  $\beta_1$ -AR est le sous-type qui est majoritairement exprimé (Land et al., 1967) dans une proportion  $\beta_1$ :  $\beta_2$ -AR de 80:20 (del Monte et al., 1993; Koch et al., 1996). Or dans les cœurs avec défaillance, la densité des  $\beta_1$ -AR diminue mais pas ceux des  $\beta_2$ -AR pour atteindre une proportion de 60:40 (del Monte et al., 1993). Un changement dans les

concentrations d'ARNm de ces récepteurs survient parallèlement à une diminution de la densité des  $\beta_1$ -AR suggérant qu'une régulation transcriptionnelle ou une diminution de la stabilité de l'ARNm sont des éléments importants dans l'expression des  $\beta_1$ -AR durant la défaillance cardiaque (Post et al., 1999).

Ce qui est surprenant dans ces observations, c'est que selon les données expérimentales obtenues dans des cellules exprimant ces récepteurs, les  $\beta_2$ -AR ont une propension plus grande à la désensibilisation que les  $\beta_1$ -AR (Suzuki et al., 1992; Rousseau et al., 1996). Or dans le cas de cette pathologie cardiaque nous observons le contraire. Il est possible que les hauts taux de norépinéphrine favorise plus particulièrement la désensibilisation des  $\beta_1$ -AR dû à une meilleure affinité pour ces récepteurs (environ 20 fois) que pour les  $\beta_2$ -AR (Bristow et al., 1994). Ceci pourrait également expliquer l'augmentation d'apoptose observée dans cette pathologie (Communal et al., 1998). Toutefois d'autres études seront nécessaires pour confirmer cette hypothèse. Néanmoins il est également à noter qu'il y a un découplage entre les  $\beta_2$ -AR et les protéines G, ce qui diminue l'intensité de la réponse de ces récepteurs.

Selon les données cliniques, les  $\beta$ -bloqueurs ont des effets positifs sur les coeurs défaillants. Une étude comparative entre un  $\beta$ -bloqueur de seconde génération, le métoprolol et un bloqueur non-sélectif  $\beta/\alpha$  de troisième génération, le carvedilol, a démontré que les deux agents avaient des effets positifs sur la fonction ventriculaire (Metra et al., 2000). L'effet protecteur de ces agents serait particulièrement intéressant parce qu'il bloque les effets néfastes des catécholamines particulièrement ceux reliés aux récepteurs  $\beta_1$ -AR (Bristow, 2000). Ainsi il semble que les  $\beta$ -AR auraient un rôle prépondérant dans cette pathologie.

### 1.7.3 Hypertrophie

Le muscle cardiaque a la capacité de pouvoir adapter sa masse à la charge hémodynamique. Lorsque la charge du coeur augmente de manière soutenue, les myocytes enclenchent une série d'événements leur permettant de s'adapter. L'hypertrophie est le procédé au cours duquel les cellules cardiaques deviennent plus grosses contrairement à l'hyperplasie qui est un mécanisme au cours duquel le nombre de cellules augmentent ce qui implique une division nucléaire (Opie, 1998). Donc, lorsqu'une pathologie comme l'hypertension augmente la charge hémodynamique de manière soutenue, le système cardiovasculaire va éventuellement modifier le rapport masse du coeur/masse du corps. L'augmentation de la pression hémodynamique va entraîner une augmentation du volume cellulaire et non une élongation des cellules cardiaques.

L'hypertrophie cardiaque est souvent associée à une augmentation de l'activité des nerfs sympathiques intracardiaques et une élévation de catécholamines plasmatiques (Siri, 1988). Le traitement des cardiomyocytes avec des agonistes  $\beta$ -adrénergiques favorise l'activation de l'adénylate cyclase, la production de cAMP et la stimulation de CREB (Markou et al., 2004) ce qui va augmenter la transcription de gènes qui possède un site pour CREB (Müller et al., 2001). Toutefois, Markou et al. ont dernièrement apporté des évidences démontrant que la phosphorylation et l'activation de CREB dans les myocytes ventriculaires adultes étaient médiées via les MAPks/MSK1 ainsi que la voie de signalisation PKA/AMPC suite à une stimulation des  $\beta$ - et  $\alpha_1$ -AR par la phényléphrine (Markou et al., 2004). En plus d'être impliqué dans les mécanismes de régulation de la transcription comme CREB, l'expression du gène codant pour les  $\beta_1$ -AR serait diminuée en présence d'hypertrophie cardiaque induite par l'isoprotérénol contrairement au gène codant pour la protéine  $Gs\alpha$  (Kizaki et al., 2004).

Il a également été démontré, dans des études *in vivo*, qu'un mutant de la PI 3-kinase ou AKT qui est constitutivement actif favorise une augmentation de la taille du coeur alors

qu'un dominant négatif de cet enzyme diminue la taille du tissu cardiaque (Shioi et al., 2000; Shioi et al., 2002; Condorelli et al., 2002). Ainsi nous pouvons penser que les récepteurs  $\beta_2$ -AR pourraient jouer un rôle dans l'hypertrophie cardiaque via l'activation de la PI 3-kinase.

Ce bref aperçu de deux pathologies cardiaques, la défaillance et l'hypertrophie cardiaque, nous ont démontré que les  $\beta$ -AR pouvaient jouer un rôle dans ces pathologies et que la régulation de la PI-3 kinase par ces récepteurs s'avère être un élément clé dans la compréhension de ces pathologies.

## Chapitre 2

### Mise en contexte de l'article

Les  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -AR possèdent une identité de 50% au niveau de la séquence nucléotidique. Malgré cette grande identité entre les  $\beta_1$ -et  $\beta_2$ -AR et le fait qu'ils peuvent se coupler aux mêmes protéines G, il existe des différences considérables entre ces deux sous-types de récepteurs. L'activation des  $\beta_1$ -AR mène à des processus apoptotiques via l'activation de la PKA et de la calcium-calmoduline-kinase II alors que l'activation des  $\beta_2$ -AR inhibe les processus apoptotiques via l'activation de la PI 3-kinase.

Selon certaines études, la GRK serait impliquée dans le mécanisme par lequel les  $\beta_2$ -AR activent la PI 3-kinase. Lorsque les  $\beta_2$ -AR sont activés, la GRK subit une translocation du cytosol à la membrane. Or au niveau du cytosol, la GRK est associée à la PI 3-kinase et c'est lors de sa translocation à la membrane que la GRK entraîne la PI-3 kinase à ce niveau. La proximité entre les  $\beta_2$ -AR actifs et la PI 3-kinase stimule son activation, activation qui favorise une activité anti-apoptotique et de survie cellulaire.

Malgré le fait que les GRK ont également la capacité d'interagir avec les  $\beta_1$ -AR, il semble, selon plusieurs études que ces récepteurs n'activent pas la PI 3-kinase. Toutefois, il existe une étude qui a démontré l'activation de la PI 3-kinase par les  $\beta_1$ -AR. Ainsi l'ambiguïté subsiste toujours à savoir si ces récepteurs peuvent activer la PI 3-kinase. Toutefois, il a été observé que la stimulation des  $\beta_1$ -AR favorise une activité pro-apoptotique et donc il est peu probable que l'efficacité de ces récepteurs à activer la PI 3-kinase soit comparable à celle des  $\beta_2$ -AR.

De plus, comme vraisemblablement la queue carboxy-terminale des  $\beta$ -AR interagit avec une protéine-clé, la GRK, dans le processus de translocation de la PI 3-kinase à la

membrane, nous voulons savoir si en interchangeant cette partie entre les différents sous-types nous pourrions changer les phénotypes des différents sous-types de récepteurs.

À la fin de ce projet, nous devrions déterminer si les deux sous-types de  $\beta$ -AR peuvent activer la voie de la PI 3-kinase et si la queue carboxy-terminale de ces récepteurs joue un rôle dans cette activation.

## **Chapitre 3**

### **Article**

## Accord des coauteurs

### A) Déclaration des coauteurs d'un article

#### 1. Identification de l'étudiant et du programme

Julie Simard

M. Sc. pharmacologie

#### 2. Description de l'article

Julie Simard, Matthieu Boucher, Rachel Massé, Guy Rousseau, Determinants present in the receptor carboxy-tail explain the difference in  $\beta$ -adrenergic receptor subtype coupling to phosphoinositide 3-kinase, *Cellular Signaling*.

Cet article a été soumis le 19 octobre 2004.

#### 3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Julie Simard inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre

L'activation de la PI 3-kinase par les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques est dépendante du sous-type.

MATTHIEU BOUCHER

Coauteur

28/10/04

Date

RACHEL MASSÉ

Coauteur

28/10/2004

Date

GUY ROUSSEAU

Coauteur

28/10/2004

Date

## Determinants present in the receptor carboxy-tail explain the difference in $\beta$ -adrenergic receptor subtype coupling to phosphoinositide 3-kinase

Julie Simard, Matthieu Boucher, Rachel Massé, Guy Rousseau

Département de pharmacologie de l'Université de Montréal  
Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Autonome  
Centre de Biomédecine Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal

Running Title:  $\beta$ -adrenergic subtypes and PI 3-kinase activation

**Key words :  $\beta$ -adrenergic receptor, subtype, G protein, PI 3-kinase, Akt, Agonist**

**Address for correspondence:**

Guy Rousseau, Ph.D.

Centre Biomédecine Hôpital du Sacré-Coeur  
5400 Boul. Gouin Ouest Montréal (Québec)  
H4J 1C5 Canada  
Phone: (514)-338-2222, ext.3421  
Fax: (514)-338-2694  
[REDACTED]

## Abstract

When the  $\beta_2$ -Adrenergic receptor ( $\beta_2$ -AR) is occupied by an agonist, G protein receptor Kinase-2 (GRK2) is recruited to the membrane and subsequently recruits PI 3-kinase from the cytosol. The proximity of activated  $\beta_2$ -AR and PI 3-kinase allows the activation of this enzyme. In contrast, it has been observed that the  $\beta_1$ -AR is unable to activate the PI 3-kinase/Akt pathway. We hypothesized that the difference might be due to molecular determinants present in the carboxy terminal of the  $\beta$ -AR subtype. Using transiently transfected HEK cells expressing either  $\beta_1$ - or  $\beta_2$ -AR, we observed that in presence of an agonist,  $\beta_2$ -AR is able to activate PI 3-kinase/Akt pathway but not  $\beta_1$ -AR. Switching the seventh transmembrane domain and the carboxy tail in the two receptors reverses this phenotype, i.e.  $\beta_1 \times \beta_2$ AR can activate PI 3-kinase/Akt whereas  $\beta_2 \times \beta_1$ AR cannot. These results indicate that the difference in the coupling to PI 3-kinase/Akt is due to molecular determinants present in the carboxy tail of the receptor.

## Introduction

$\beta_2$ -adrenergic receptors ( $\beta_2$ -AR) have anti-apoptotic properties mediated by PI 3-kinase pathway stimulation [1]. The proposed mechanism by which this activation occurs is dependent on the G protein-coupled receptor kinases (GRKs). At the basal level, GRK2 forms a complex with PI 3-kinase in the cytosol[2]. When  $\beta_2$ -AR is occupied by an agonist, GRK2 is translocated to the membrane and recruits PI 3-kinase from the cytosol to the membrane [2]. The proximity of the PI 3-kinase and the stimulated receptor induce the activation of the enzyme.

In contrast,  $\beta_1$ -AR have pro-apoptotic activity due to stimulation of PKA or CAM KII [3]. Indeed, it has been observed that stimulation of  $\beta_1$ -AR with an agonist induces apoptosis and this can be prevented in presence of inhibitors of PKA or CAM-KII [4].

Interestingly it has been shown that stimulated  $\beta_1$ -AR can also recruit GRK at the membrane. The interaction of the  $\beta$ -AR with the GRK is mainly related to intracellular loops and carboxy tail of the receptor [5]. When activated, GRK induces the phosphorylation of certain serine/threonine residues in the carboxy tail of both  $\beta$ -AR subtypes to allow the interaction with  $\beta$ -arrestin. This interaction with  $\beta$ -arrestin prevents further activation of the receptor and are involved in  $\beta_2$ -AR endocytosis [6, 7].

Because GRK interacts with molecular determinants in carboxy tail of the receptor, we hypothesize that differences in the coupling of the  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -AR with the PI 3-kinase are mainly due to this portion of the receptor.

This study was designed to determine the relative efficiency of  $\beta_1$ -AR and  $\beta_2$ -AR to stimulate the PI 3-kinase pathway and to test if the carboxyl tail of these receptors are responsible for the difference.

## **Material and Methods**

### *DNA constructions, cell transfection, and culture*

Mouse  $\beta_1$ -AR and human  $\beta_2$ -AR subcloned into pcDNA3 were used. Two chimeric receptors consisting of the  $\beta_1$ -AR with the carboxyl-terminal tail of the  $\beta_2$ -AR and the reciprocal  $\beta_2$ -AR with the carboxyl-terminal tail of the  $\beta_1$ -AR were constructed as follows. A restriction site for Hpa I was created by polymerase chain reaction (PCR) at position 2070 in the  $\beta_1$ -AR. The new restriction site in the  $\beta_1$ -AR were created with three primers. Two primers were used for the hybridation with the receptor sequence. Those primers contained 21 base pairs and had respectively the sequence: CGCCTCAGAAGCCATAGAGCC and TCGTGTGCACAGTGTGGGCCA. The third primer was utilised to introduce the restriction site. This primer which contained 24 base pairs had the sequence: GGTGGAAAGCGTTAACCACGTTGG. The mutated  $\beta_1$ -AR and the  $\beta_2$ -AR wt were double digested with Hpa I and Xho I. The result of this digestion is two fragments of 6540bp and 486bp for the mutated  $\beta_1$ -AR and two fragments 5998bp and

1362bp for the  $\beta_2$ -AR wt. The appropriate restriction fragments (containing the seventh transmembrane domain and the carboxy-terminal portion of the receptor) were isolated, exchanged for their counterparts and re-ligated. Positive clones were selected by enzymatic digestion and confirmed by sequencing.

The  $\beta$ -AR wild type (wt), chimeric receptors and/or carboxy-terminal of the GRK<sub>2</sub> (ct-GRK<sub>2</sub>) were transiently transfected in human embryonic kidney (HEK 293) cells with the calcium phosphate precipitation method. We performed all experiments at 48 hours, i.e. the maximal receptor expression determined by ligand binding and cells were starved overnight 24 hours before the experiments in a medium without fetal bovine serum.

HEK 293 cells were maintained in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin and streptomycin, 1 mM glutamine, 0.25  $\mu$ g/ml fungizone in an atmosphere of 95% air/ 5% CO<sub>2</sub> at 37°C.

The day of the experiment, cells were treated with isoproterenol for the indicated times and cytosolic or membrane fractions were prepared.

#### *Cytosolic and membrane preparation*

Cells were washed three times with 10 ml of phosphate-buffered saline at 4°C and mechanically detached in 1 ml of ice-cold buffer containing 5 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2 mM EDTA, 5  $\mu$ g/ml leupeptin, 5  $\mu$ g/ml soybean trypsin inhibitor, and 10  $\mu$ g/ml benzamidine. Cells were then lysed with a sonicator (3 bursts of 10 seconds at max speed), and the

lysates were centrifuged at 1,000 x g for 5 minutes at 4°C. The supernatant were centrifuged at 45,000 X g for 20 minutes. The supernatant was used as cytosolic preparation and protein content was assessed using the Bradford method (Bio-Rad). The pelleted membranes were resuspended in 250 µl of a solubilization buffer (buffer A) containing 50 mM Tris pH 7.5, 20 mM β-glycerophosphate, 20 mM NaF, 5 mM EDTA, 10 mM EGTA, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mM benzamidine, 0.5 mM PMSF, 10 µg/ml leupeptin, 5 mM DTT, 1 µM microcystin LR, and 1% Triton X-100; and solubilized for 2 hours at 4°C. Then the membranes were centrifuged at 10,000 x g for 15 minutes. The protein content was assessed using the Lowry method (Bio-Rad).

#### *Radioligand binding assay*

Radioligand binding assays were conducted essentially as described previously [8] with ~ 5 µg of membrane proteins in a total volume of 0.5 ml containing 250 pM [<sup>125</sup>I]CYP in the presence or absence of 10 µM alprenolol to define nonspecific binding. The binding reactions were incubated at room temperature for 90 minutes and terminated by rapid filtration with ice-cold 25 mM Tris-HCl, pH 7.4, over Whatman GF/C glass fiber filters preincubated for ≥30 minutes in a buffer containing 25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.1% bovine serum albumin, and 0.3% polyethylenimine.

### *Immunoprecipitation of $\beta$ -AR*

Rabbit anti- $\beta_1$ - or  $\beta_2$ -AR polyclonal antibodies (Santa-Cruz, Ca; 1:200) were added to 150-250  $\mu$ g of solubilized membrane protein and gently agitated overnight at 4°C. Five  $\mu$ l of anti-mouse IgG agarose (Santa-Cruz, CA) was then added for an additional 2 hours at 4°C with gentle agitation. The immunoprecipitates were centrifuged at 10,000 X g for 15 minutes at 4°C. The pellet was washed 5 times and resuspended in buffer A, eluted into sample buffer and then subjected to SDS-PAGE and Western blotting as described below.

### *Western blotting*

Western blotting was conducted as described previously [9]. Briefly, aliquots of 50-75  $\mu$ g of cytosolic or membrane protein preparations were subjected to 10% denaturing polyacrylamide gel electrophoresis as previously described. Transfer was performed with a Trans-Blot SD Semi-dry transfer cell (Bio-Rad) on Protran nitrocellulose membrane (Mandel, Montréal, Québec). Protein transfer efficiency was assessed using Ponceau red S dye. Non-specific sites were blocked using 5% non-fat dry milk in TBS-T (10 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl and 0.05% Tween 20) and membranes were incubated at 4°C overnight with primary antibody (Phospho-Akt (Ser 473) and Akt from Cell Signaling Technology, Mississauga, Canada or PI 3-kinase from Santa-Cruz, CA) diluted 1:1000 in 5% non-fat dry milk into TBS-T. Subsequently, membranes were washed and incubated for 45 minutes at room temperature with the secondary antibody (diluted 1:5000 in 5% non-fat dry milk into TBS-T) conjugated to horseradish peroxidase. Membranes were washed and exposed on a

Scientific Imaging Film (Perkin Elmer Life Sciences, Ontario) or on a Kodak ImageStation 440CF using Enhanced Chemiluminescence Reagent (Perkin Elmer Life Sciences, Ontario). Band intensities were analyzed using Kodak 1D v.3.5.5 Scientific Imaging Software.

### ***PI 3-kinase activity***

PI 3-kinase activity was measured as previously described [10]. Briefly, 250-375  $\mu\text{g}$  of cytosolic and membrane proteins were precipitated with anti-phosphotyrosine antibody conjugated to biotin (1:50, Santa-Cruz, CA) overnight at 4°C. The immune complex was pelleted and washed three times with lysis buffer and twice with phosphate-buffered saline buffer containing 0.1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ . The immune pellet was then suspended in activation buffer (35 mM ATP, 0.2 mM adenosine, 30 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mg/mL L- $\alpha$ -phosphatidylinositol and 20  $\mu\text{Ci}$  [ $\gamma$ <sup>32</sup>P]-ATP (Amersham Pharmacia Biotech, Baie-d'Urfé, Canada) and incubated at room temperature for 20 minutes. The reaction was stopped with the addition of 100  $\mu\text{L}$  hydrogen chloride 1M and 200  $\mu\text{L}$  of Chloroform:Methanol (1:1). The aqueous phase was then discarded. Eighty  $\mu\text{L}$  of hydrogen chloride:Methanol (1:1) were then added before discarding the aqueous phase. Twenty  $\mu\text{L}$  of the organic phase containing <sup>32</sup>P-phosphatidylinositol were resolved by thin layer chromatography on K6 Silica Gel plates (Whatman, Clifton, NJ) in a solvent system containing chloroform:methanol:ammonium hydroxide (45:35:10). Plates were exposed to film for three to five days (-80°C).

### *Statistical analysis*

Results are expressed as mean  $\pm$  SEM and were evaluated using analysis of variance adapted for factorial experimental design. Orthogonalization was performed when necessary [11]. For figure 4, ANOVAs were performed followed by Bonferroni post-hoc correction.  $p < 0.05$  was considered significant.

## **Results**

### *Expression of $\beta$ -AR subtypes in HEK 293 cells*

HEK 293 cells were transiently transfected with DNA encoding for  $\beta_1$ -AR Wt,  $\beta_2$ -AR Wt,  $\beta_1 \times \beta_2$ -AR or  $\beta_2 \times \beta_1$ -AR. Stimulation of the receptor were performed 48 hours after transfection were maximal  $\beta$ -AR expression was observed (around 500fmol/mg of proteins).

### *Stimulation of $\beta_2$ -AR but not $\beta_1$ -AR induce activation of PI 3-kinase/Akt pathway*

PI 3-kinase activation by the  $\beta_1$ - or  $\beta_2$ -AR was measured by *in vitro* phosphorylation of L- $\alpha$ -phosphatidylinositol. Transfected cells were stimulated with isoproterenol 1 $\mu$ M for 0, 5 or 15 minutes at 37°C. Stimulation of  $\beta_2$ -AR-for 5 or 15 min induced a significant augmentation in the PI 3-kinase activity as compared to the basal activity (non-stimulated; figure 1). In contrast,  $\beta_1$ -AR stimulation has no effect of the PI 3-kinase activity. Thus, the

stimulation of  $\beta_2$ -AR but not  $\beta_1$ -AR by isoproterenol induces activation of PI 3-kinase in our model.

To confirm difference between stimulation of  $\beta$ -AR subtypes on the PI 3-kinase activity, we measured Akt activation, a downstream PI 3-kinase effector. Akt activation, determined by its phosphorylation state, was significantly increased in presence of a  $\beta_2$ -AR-stimulation for 5 and 15 minutes as compared to basal state (figure 2). Stimulation of  $\beta_1$ -AR did not modify the phosphorylation state of Akt as compared to the basal, confirming that  $\beta_1$ -AR cannot induce PI3-kinase/Akt pathway activation in our model.

*Stimulation of  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -AR induce PI 3-kinase recruitment to the plasma membrane*

To determine whether  $\beta_1$ -AR can recruit PI 3-kinase to the plasma membrane, immunolocalisation of PI 3-kinase was performed using Western blotting with anti-P110 $\gamma$  antibody. Transiently transfected cells with  $\beta_1$ - or  $\beta_2$ -AR were stimulated by isoproterenol 1 $\mu$ M for 0, 5 or 15 minutes at 37°C. Both  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -AR-stimulated can recruit the enzyme at plasma membrane (figure 3). Compared with control (non-stimulated), presence of PI 3-kinase was significantly increased ( $p < 0.05$ ) at plasma membrane by  $\beta_1$ -AR or  $\beta_2$ -AR-stimulated by agonist for 5 or 15 minutes. No significant difference was found between 5 and 15 minutes of stimulation. Thus, both subtypes of  $\beta$ -AR can recruit PI 3-kinase at plasma membrane after a stimulation of 5 or 15 minutes by an adrenergic agonist.

*Recruitment of PI 3-kinase to the plasma membrane is GRK2-dependent*

It has been shown that PI 3-kinase and GRK2 form a cytosolic complex [2]. To determine whether the mechanism of PI 3-kinase recruitment to the plasma membrane is GRK2-dependent,  $\beta_1$ - or  $\beta_2$ -AR was transiently co-transfected with carboxyl-terminal (ct) of GRK2 in HEK 293 cells. Cells co-transfected with  $\beta_1$ - or  $\beta_2$ -AR and ct-GRK2 was stimulated by isoproterenol 1  $\mu$ M for 5 minutes. ct-GRK2 alone had no effect. Stimulation of the  $\beta_2$ -AR for 5 minutes with isoproterenol in presence of ct-GRK2 significantly decreased ( $p < 0.001$ ) PI 3-kinase recruitment to the plasma membrane (figure 4) as compared to 5 minutes stimulation for the  $\beta_2$ -AR.

When  $\beta_1$ -AR was stimulated for 5 minutes with the agonist, the presence of ct-GRK2 significantly decreased ( $p < 0.001$ ). PI 3-kinase recruitment to the plasma membrane (figure 4). Thus, PI 3-kinase recruitment to the plasma membrane by  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -AR stimulation is GRK2-dependent.

*PI 3-kinase/Akt pathway activation following stimulation of  $\beta_1$ X $\beta_2$ -AR and  $\beta_2$ X $\beta_1$ -AR*

To determine the importance of the  $\beta$ -AR carboxy tail in the PI 3-kinase activation, we constructed two chimeric receptors which consisted of the  $\beta_1$ -AR with the carboxy tail of the  $\beta_2$ -AR ( $\beta_1$ X $\beta_2$ -AR) and the reciprocal receptor which consisted of  $\beta_2$ -AR with the carboxy tail of the  $\beta_1$ -AR ( $\beta_2$ X $\beta_1$ -AR). When the  $\beta_1$ X $\beta_2$ -AR were stimulated by isoproterenol 1  $\mu$ M for 5 or 15 minutes, PI3-kinase activity was significantly increased

(figure 5;  $p < 0.05$ ). On the other hand, the stimulation of the  $\beta_2 \times \beta_1$ -AR by the adrenergic agonist for 5 or 15 minutes did not increase PI3-kinase activity. These results suggest that the carboxy tail of the  $\beta_2$ -AR contained molecular determinants which are required for PI3-kinase activation.

To confirm results obtained for the PI 3-kinase activation by chimeric  $\beta$ -AR, we determined the activation status of Akt. Chimeric receptor was stimulated with isoproterenol  $1\mu\text{M}$  for 0, 5 or 15 minutes at  $37^\circ\text{C}$ . Akt phosphorylation was significantly increased ( $p < 0.05$ ) in HEK cells expressing  $\beta_1 \times \beta_2$ -AR (figure 6). Stimulation of  $\beta_2 \times \beta_1$ -AR by adrenergic agonist had no effect on AKT phosphorylation as compared to basal activity. Thus chimeric  $\beta_1 \times \beta_2$ -AR increases Akt phosphorylation and confirmed that the carboxy tail of the  $\beta_2$ -AR contained molecular determinants required for PI 3-kinase activation.

### **Discussion**

The results of the current study demonstrate that stimulation of  $\beta_2$ -AR, but not  $\beta_1$ -AR, induces PI 3-kinase activation. This subtype-dependent activation has been reinforced by the fact that Akt, a PI 3-kinase downstream effector, was selectively activated by  $\beta_2$ -AR stimulation. However, both receptor subtypes can recruit the PI 3-kinase to the plasma membrane via a GRK2-dependent mechanism.

To determine the potential contribution of the carboxyl terminal domains of the  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -AR in the PI 3-kinase activation, chimeric  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -AR which the seventh domain and the carboxyl-terminal domain has been exchanged with the other subtype were constructed. We observed that the chimeric  $\beta_1$ x $\beta_2$ -AR can activate PI 3-kinase in contrast to the wild type  $\beta_1$ -AR. Reciprocally,  $\beta_2$ -AR lost its ability to activate PI 3-kinase when its carboxy-terminal domain is lost. This result demonstrated that the  $\beta_2$ -AR carboxyl-terminal domain contains important molecular determinants for the PI 3-kinase activation.

The present study confirms the PI 3-kinase activation by  $\beta_2$ -AR stimulation observed in other studies [2, 12]. However the kinetics of PI 3-kinase activation previously reported for  $\beta_2$ -AR stimulation was different to the one observed in the present study. PI 3-kinase was rapidly activated following  $\beta_2$ -AR stimulation and returned to basal levels after 10 minutes. In our study, we observed a significant PI 3-kinase activation with a 5-minute  $\beta_2$ -AR stimulation, that was maintained after 15 minutes. The difference in activation patterns can be due to the agonist concentration used. In the previous study [2], 10  $\mu$ M of isoproterenol was used which is 10 times higher than the concentration used in the present study. Higher concentration of agonist may induce more rapid PI 3-kinase recruitment to the membrane and thus activation of the enzyme.

Our results demonstrate that isoproterenol-stimulated  $\beta_1$ -AR for 15 minutes cannot activate PI 3-kinase. These results contrast with those reported in a previous study which activation of PI 3-kinase can be observed in presence of stimulated  $\beta_1$ -AR using HEK 293 cells [2].

Two possibilities can explain the discrepancy between both studies. First, 1  $\mu$ M of

isoproterenol is sufficient to induce sub-maximal adenylyl cyclase activity [8] but not enough to induce PI 3-kinase activation. Second, in our study we use transiently transfected cells that express around 500 fmol receptor/mg of membrane proteins which is close to physiological level but can be less compared to the lipofectamine technique used by Naga Prasad et coll [2].

In isolated cardiomyocytes, where the total  $\beta$ -AR density is around 300-500 fmol/mg of membrane proteins [13] and the  $\beta_1$ : $\beta_2$ -AR ratio is 75:25, it has been observed that  $\beta_2$ -AR-mediated anti-apoptotic effects through the PI 3-kinase pathway [1], whereas the  $\beta_1$ -AR stimulation induced apoptosis by a mechanism involving CamKII [4] or PKA [14, 15]. This suggests that  $\beta_2$ -AR, but not  $\beta_1$ -AR, can efficiently activate PI 3-kinase, a difference that may be related to their respective active conformations. Further studies are needed to confirm this hypothesis.

The present study demonstrated that both receptor subtypes recruited PI 3-kinase to the plasma membrane when stimulated by the agonist. Naga Prasad et al. [2] had previously demonstrated that PI 3-kinase and GRK2 formed a cytosolic complex and the recruitment of the enzyme to the plasma membrane was facilitated by GRK2 in an agonist-dependent manner. Our results confirmed that PI 3-kinase is recruited to the plasma membrane via a GRK2-dependent mechanism. Both receptor subtypes had the capacity to recruit PI 3-kinase to the plasma membrane. This result can be explained by the fact that both  $\beta$ -AR subtype are desensitized by GRK in presence of a sustained stimulation [16].

We also observed that the diminution of PI 3-kinase recruitment caused by the co-transfection of ct-GRK2 with the  $\beta_1$ - or  $\beta_2$ -AR is less important for the  $\beta_1$ -AR than the  $\beta_2$ -AR. This might be explained by difference of affinity between the  $\beta$ -AR subtype and GRK-2, the latter having more affinity for the  $\beta_2$ -AR [16]. As a matter of fact, the literature had reported some differences in the  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -AR desensitization mechanisms [8, 17, 18],  $\beta_1$ -AR being more resistant to homologous desensitization than the  $\beta_2$ -AR [8, 17].

GRK-2 is important for the PI 3-kinase recruitment to the plasma membrane, we thought this might suggest that the carboxyl-terminal domain of the receptor is important for the PI 3-kinase activation because the carboxyl-terminal domain of the  $\beta$ -AR contains sites phosphorylated by GRK2. Furthermore, Shiina et al. [16] had demonstrated that the carboxyl-terminal domain and the third cytosolic loop are the regions mostly responsible of the difference in internalization behaviour between both  $\beta$ -AR subtypes. Our results indicate that the carboxyl-terminal domain is important for the activation of the enzyme.

Previous studies [2, 19] had demonstrated that PI 3-kinase activity is necessary for the sequestration of the G protein-coupled receptors [2]. In fact, PI 3-kinase inhibition attenuates  $\beta_2$ -AR sequestration. Moreover, phosphorylated lipids generated by PI 3-kinase are critical for the receptor internalization dynamics [20, 21]. These observations and the fact that the  $\beta_2$ -AR is more internalized than the  $\beta_1$ -AR can be explain in part by the present study who indicate that the PI 3-kinase is activated by the  $\beta_2$ -AR but not by the  $\beta_1$ -AR.

**Conclusion**

In conclusion, we observe that PI 3-kinase activation is  $\beta$ -AR subtype-sensitive and the difference is due to molecular determinants present in the carboxy-terminal of the receptors.

**Acknowledgements**

The authors want to thank Dr. Terry Hébert for critical reading of the manuscript. M.B. is a scholar of the Fond de Recherche en Santé du Québec-Heart and Stroke Foundation of Québec-Réseau de Santé Cardiovasculaire and G.R. is a scholar of the Fonds de Recherche en Santé du Québec. This work was supported by National Sciences and Engineering Research Council of Canada.

**Figures legend**

**Figure 1 PI 3-kinase activity with  $\beta$ -AR stimulation.** HEK cells were transfected with  $\beta_1$ -AR or  $\beta_2$ -AR. Forty-eight hours after transfection, cells were stimulated with 1  $\mu$ M isoproterenol for the indicated times. PI 3-kinase activity was determined by the level of [ $^{32}$ P]-PI produced by the stimulation of  $\beta_1$ -AR ( $\square$ ) or  $\beta_2$ -AR ( $\blacksquare$ ) expressing cells. Shown is a representative autoradiograph of the TLC plate experiments (n= 4-5). \* p < 0.05 vs 0 minute.

**Figure 2 Akt activation with  $\beta$ -AR stimulation.** HEK cells were transfected with  $\beta_1$ -AR or  $\beta_2$ -AR. Forty-eight hours after the transfection, cells were stimulated with 1  $\mu$ M isoproterenol for the indicated times. Akt activity was determined by phosphorylated form of Akt on the total amount of Akt under the stimulation of  $\beta_1$ -AR ( $\square$ ) or  $\beta_2$ -AR ( $\blacksquare$ ) expressing cells. Shown is a representative immunoblot of the experiments (n= 4-5). \* p < 0.05 vs 0 minute.

**Figure 3 PI 3-kinase immunolocalisation to the membrane.** Forty-eight hours after transfection, cells were stimulated with 1  $\mu$ M isoproterenol for the indicated times. Membranes were isolated, solubilized and around 100  $\mu$ g of membrane proteins were migrated on a 10% SDS-PAGE gel. Plasma membrane PI 3-kinase levels increased with cells expressing  $\beta_1$ -AR ( $\square$ ) or  $\beta_2$ -AR ( $\blacksquare$ ). Shown is a representative immunoblot of the experiments (n= 3-4). \* p < 0.05 vs 0 minute.

**Figure 4 GRK2 carboxy-terminal reduced PI 3-kinase to the membrane level.** HEK cells were co-transfected with ct-GRK-2 and  $\beta$ -AR subtypes. Forty-eight hours after the transfection, cells were stimulated with 1  $\mu$ M isoproterenol for 5 minutes. PI3-kinase at the membrane level decreased with cells expressing  $\beta_1$ -AR ( $\square$ ) or  $\beta_2$ -AR ( $\blacksquare$ ) in presence of ct-GRK2. Shown is a representative immunoblot of the experiments (n= 4-6). \* p < 0.05 vs 0 minute.

**Figure 5 PI 3-kinase activity with chimeric  $\beta$ -AR stimulation.** HEK cells were transfected with  $\beta_1$ x $\beta_2$ -AR or  $\beta_2$ x $\beta_1$ -AR. Forty-eight hours after transfection, cells were stimulated with 1  $\mu$ M isoproterenol for the indicated times. PI 3-kinase activity was determined by the level of [ $^{32}$ P]-PI produced by the stimulation of  $\beta_1$ x $\beta_2$ -AR ( $\square$ ) or  $\beta_2$ x $\beta_1$ -AR ( $\blacksquare$ ) expressing cells. Shown is a representative autoradiograph of the TLC plate experiments (n= 4-5). \* p < 0.05 vs 0 minute.

**Figure 6 Akt activity with chimeric  $\beta$ -AR stimulation.** HEK cells were transfected with  $\beta_1$ x $\beta_2$ -AR or  $\beta_2$ x $\beta_1$ -AR. Forty-eight hours after the transfection, cells were stimulated with 1  $\mu$ M isoproterenol for the indicated times. Akt activity was determined by phosphorylation levels on the total amount of Akt produced by the stimulation of  $\beta_1$ x $\beta_2$ -AR( $\square$ ) or  $\beta_2$ x $\beta_1$ -AR( $\blacksquare$ ) expressing cells. Shown is a representative immunoblot of the experiments (n= 6-7). \* p < 0.05 vs 0 minute.

## References

1. 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.
2. Naga Prasad S.V., Barak L.S., Rapacciuolo A., Caron M.G. and Rockman H.A. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 18953-18959.
3. Xiao R.P., Zhu W., Zheng M., Chakir K., Bond R., Lakatta E.G. and Cheng H. (2004) *Trends Pharmacol. Sci.* 25, 358-365.
4. Zhu W.Z., Wang S.Q., Chakir K., Yang D., Zhang T., Heller Brown J., Devic E., Kobilka B.K. Cheng H. and Xiao R.P. (2003) *J. Clin. Invest.* 111, 617-625.
5. Barak L.S., Wilbakns A.M. and Caron M.G. (2003) *ASSAY Drug Devel. Tech.* 1, 339-346.
6. Kohout T.A., Lin F.S., Perry S.J., Conner D.A. and Lefkowitz R.J. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 1601-1606.
7. Prossnitz E.R. (2004) *Life Sciences* 75, 893-899.
8. Rousseau G., Nantel F. and Bouvier M. (1996) *Mol. Pharmacol.* 49, 752-760.
9. Boucher M., Nim S., de Montigny C. and Rousseau G., (2004) *Eur. J. Pharmacol.* 495, 185-191.
10. Boucher M., Pesant S., Falcao S., de Montigny C., Schampaert E., Cardinal R. and Rousseau G. (2004) *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 43, 416-422.
11. Winer B.J. *Statistical principles in experimental design*. McGraw-Hill, New-York, 1971.
12. Jo S.H., Leblais V., Wang P.H., Crow M.T. and Xiao R.P. (2002) *Circ. Res.* 91, 46-53.
13. Laurent C.E., Cardinal R., Rousseau G., Vermeulen M., Bouchard C., Wilkinson M., Armour J.A. and Bouvier M. (2001) *Am.J. Physiol.* 280, R355-R364.
14. Zaugg M., Xu W., Lucchinetti E., Shafiq S.A., Jamali N.Z. and Siddiqui M.A.Q. (2000) *Circulation* 102, 344-350.

15. Communal C., Singh K., Sawyer D.B. and Colucci W.S. (1999) *Circulation* 100, 2210-2212.
16. Shiina T., Kawasaki A., Nagao T. and Kurose H. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 29082-29090.
17. Zhou X., Pak M., Wang Z. and Fishman P. (1995) *Cell. Signalling* 7, 207-217.
18. Suzuki T., Nguyen C., Nantel F., Bonin H., Valiquette M., Frielle T. and Bouvier M. (1992) *Molecular pharmacology* 41, 542-548.
19. Gaidarov I., Krupnick J.G., Falck J.R., Benovic J.L. and Keen J.H. (1999) *EMBO J.* 18, 871-881.
20. Marchese A., Chen C., Kim Y.M. and Benovic J. (2003) *Trends Biochem Sci.* 28, 369-376.
21. Naga Prasad S.V., Laporte S.A., Chamberlain D., Caron M.G., Barak L. and Rockman H.A. (2002) *J. Cell. Biol.* 158, 563-575.

Figure 1

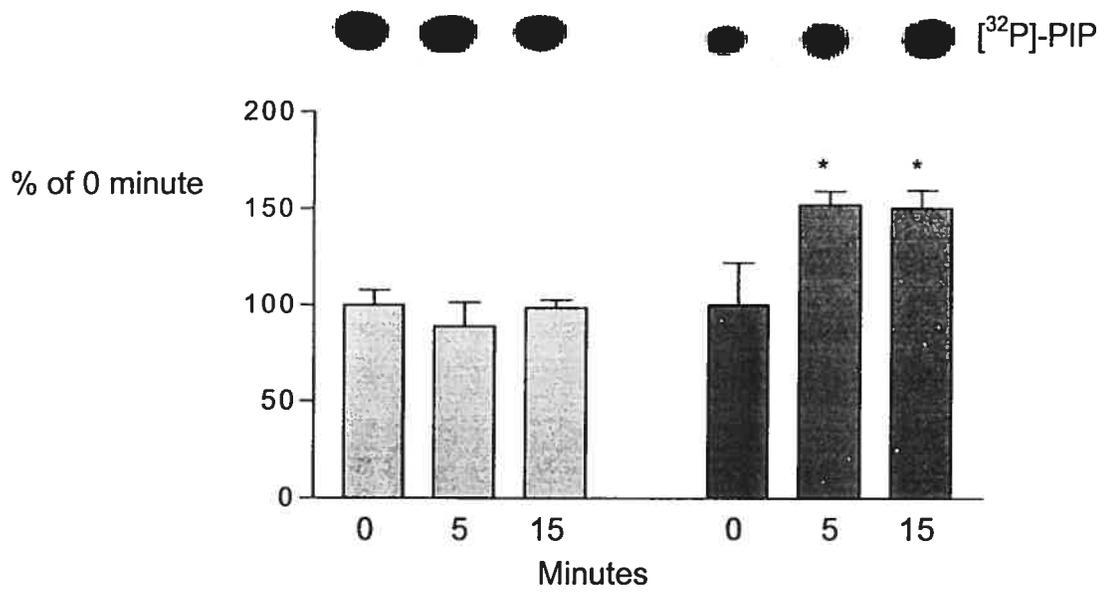


Figure 2

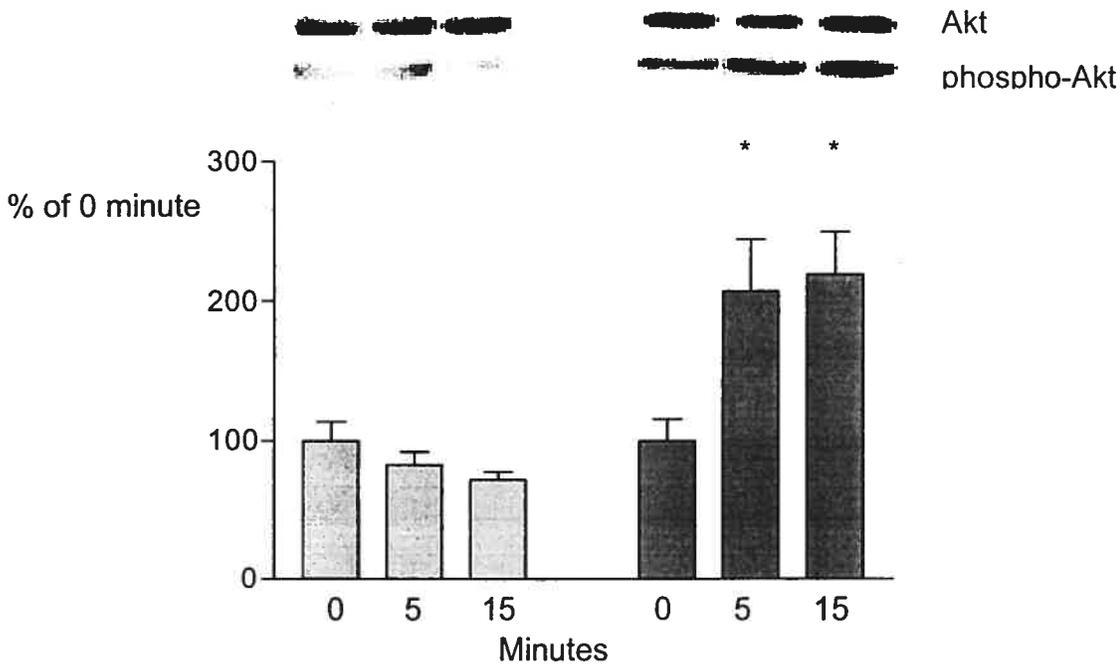


Figure 3

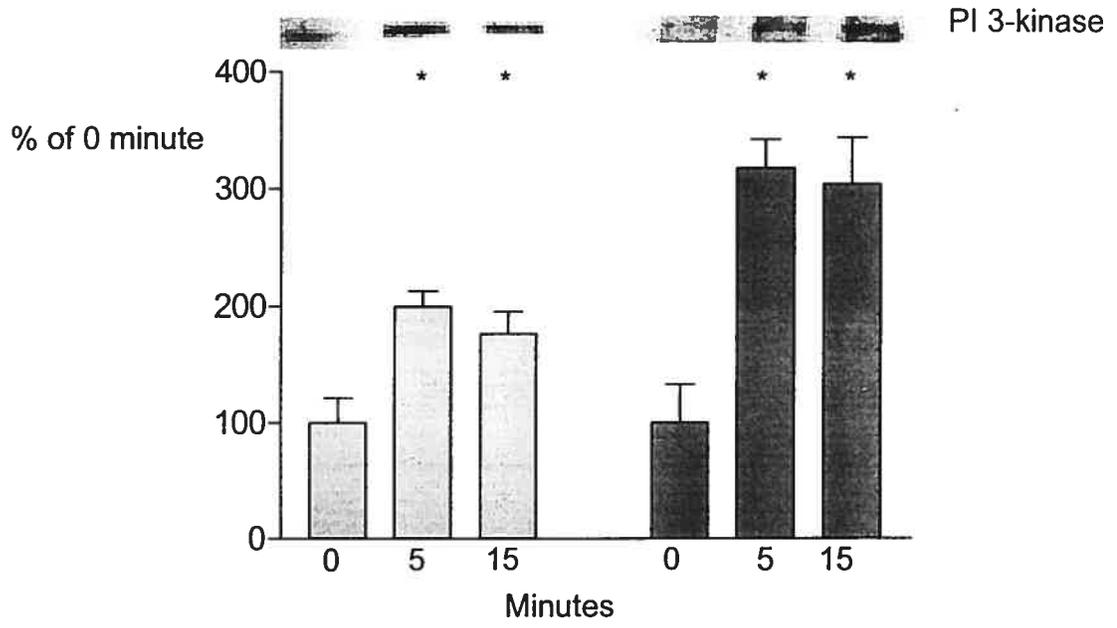


Figure 4

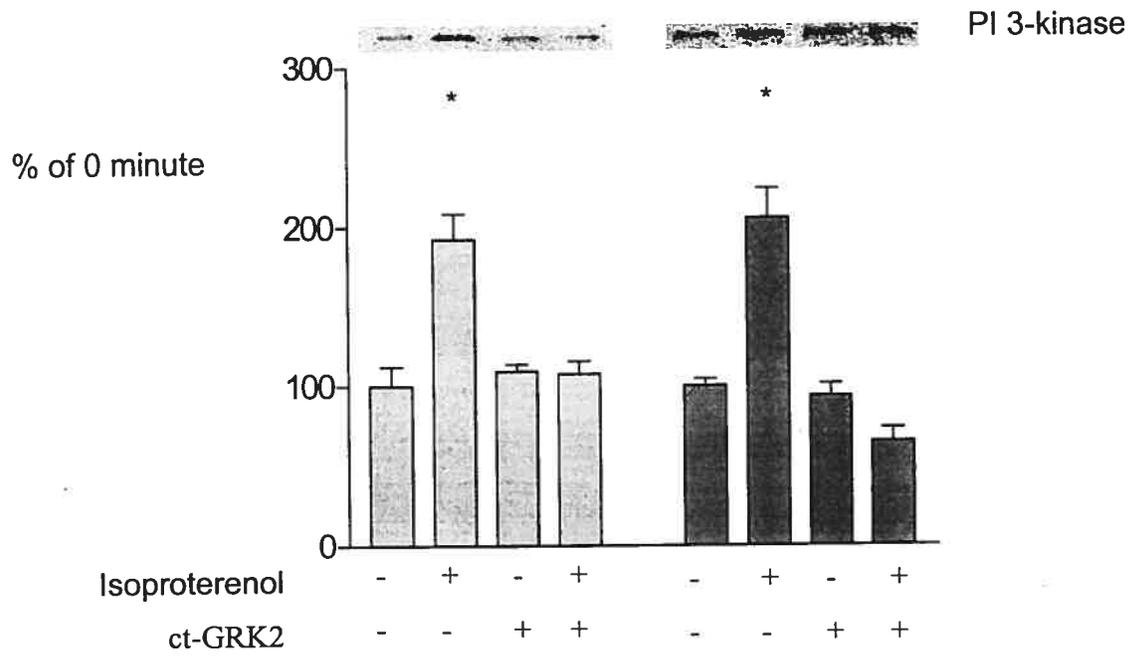


Figure 5

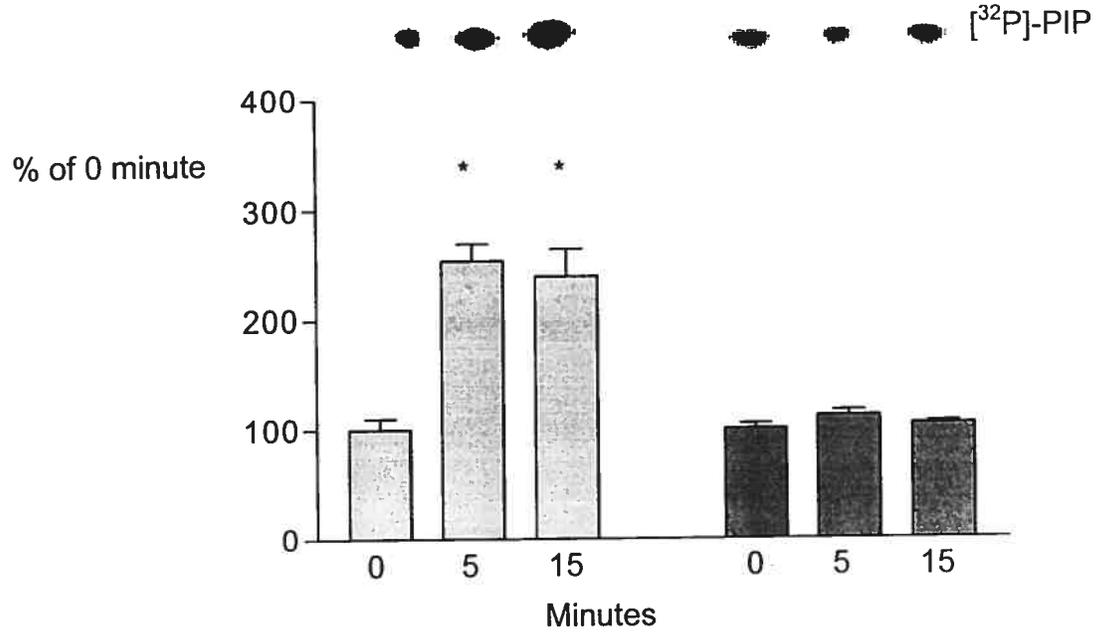
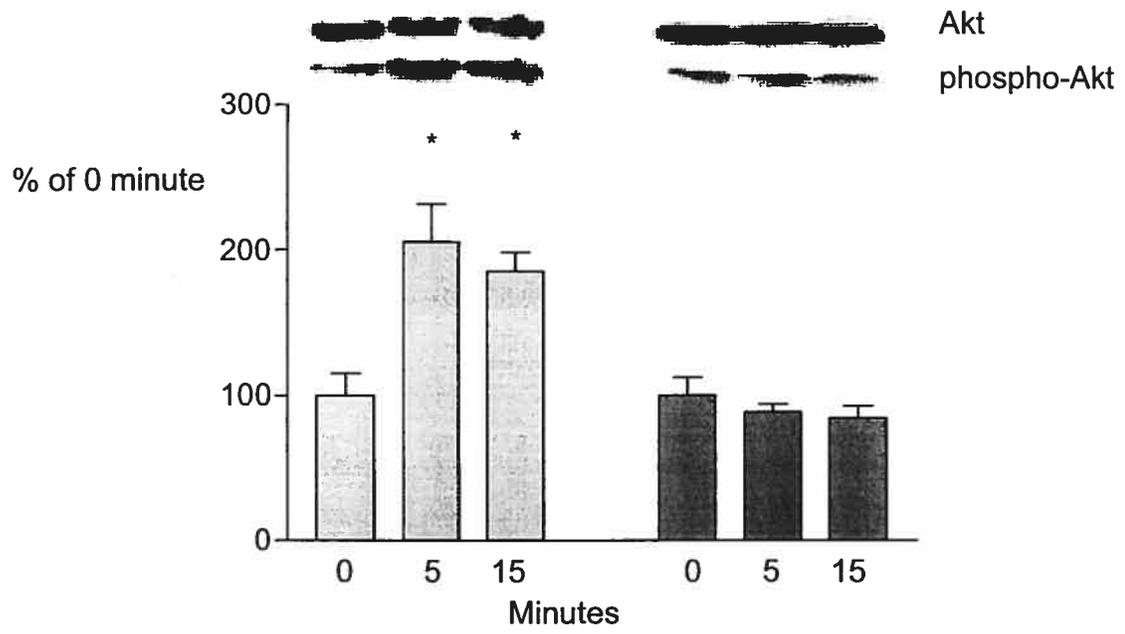


Figure 6



## Chapitre 4

### Discussion

Le présent projet de maîtrise a donc permis d'apporter de nouvelles informations au niveau des mécanismes d'activation de la PI 3-kinase par les  $\beta$ -AR. Dans un premier temps, le projet de recherche a permis de démontrer que les  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -AR stimulés par l'agoniste adrénergique ont la capacité de recruter la PI 3-kinase au niveau membranaire. De plus, les expériences de co-transfection ont permis d'établir que le mécanisme permettant le recrutement membranaire de l'enzyme est dépendant de la GRK2. Bien que les deux sous-types de récepteur adrénergique puissent recruter la PI 3-kinase à la membrane cellulaire, les résultats indiquent qu'uniquement le  $\beta_2$ -AR stimulé par l'agoniste possède la faculté d'activer la PI 3-kinase et ainsi activer PKB/AKT qui entraîne des effets anti-apoptotiques.

Dans un second temps, la construction de chimères  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -AR dont les domaines C-terminaux ont été interchangeés a permis de vérifier l'importance de ces domaines au niveau de l'activation de l'enzyme. Les expériences réalisées à l'aide des constructions chimériques ont permis de démontrer pour la première fois, à notre connaissance, que le domaine C-terminal des récepteurs est important pour le recrutement de protéines membranaires par les sous-unités  $G_{\beta/\gamma}$ . En fait, les résultats démontrent que le domaine C-terminal des  $\beta_2$ -AR possède les déterminants moléculaires nécessaires à l'activation de la PI 3-kinase contrairement au domaine C-terminal du  $\beta_1$ -AR. L'activation de la PI 3-kinase par les  $\beta$ -AR serait donc dépendante du sous-type. Ces données sont supportées par une multitude d'études (Communal et al., 1998 et 1999; Geng et al., 1999; Engelhart et al., 1999; Port et al., 1998 ) qui démontrent le rôle pro-apoptotique des  $\beta_1$ -AR dans des pathologies cardiovasculaires. Tout d'abord, Communal a démontré que la norépinéphrine entraîne la mort des cardiomyocytes en partie par apoptose (Communal et al., 1998). Par la suite, ils ont également démontré que la stimulation des  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -AR provoquait des effets

opposés au niveau de l'apoptose dans les cardiomyocytes (Communal et al., 1998 et 1999) ce qui implique que l'augmentation de l'activité sympathique dans le myocarde contribuerait à la défaillance myocardique et ce via une stimulation des  $\beta_1$ -AR. Cette conclusion est également supportée par des travaux qui ont mis en évidence que la surexpression de  $G_{s\alpha}$  ou du  $\beta_1$ -AR chez des souris transgéniques provoque l'apoptose des cardiomyocytes ce qui entraîne le développement d'une cardiomyopathie (Geng et al., 1999; Engelhart et al., 1999; Port et al., 1998). Dans la même optique, les souris transgéniques surexprimant le  $\beta_2$ -AR ne développent pas de dysfonction myocardique à quatre mois (Rockman et al., 1996). En fait, l'activation de la protéine  $G_i$  par les  $\beta_2$ -AR permet de contrecarrer les effets pro-apoptotiques des  $\beta_1$ -AR (Communal et al., 1999) ce qui implique que les deux sous-types n'activent pas les mêmes effecteurs et par le fait même apporte un support aux conclusions de ce présent mémoire.

Ces études au niveau cardiovasculaire ainsi que les conclusions du présent mémoire suscitent quelques interrogations à savoir pourquoi la PI3-kinase est uniquement activée par les  $\beta_2$ -AR et quelles sont les répercussions sur certaines pathologies cardiovasculaires? Au niveau cardiaque, le  $\beta_1$ -AR est le sous-type qui est majoritairement exprimé (Land et al., 1967). En conditions normales, les  $\beta_1$ -AR sont beaucoup plus exprimés que les  $\beta_2$ -AR au niveau cardiaque avec un ratio de 80:20 (del Monte et al., 1993; Koch et al., 1996). En présence de défaillance cardiaque, situation au cours de laquelle on observe une augmentation du taux de catécholamines, le niveau de  $\beta_1$ -AR diminue contrairement au  $\beta_2$ -AR qui tend à rester stable de façon générale. Dans ces conditions pathologiques, le ratio  $\beta_1$ -AR :  $\beta_2$ -AR observé est de 60% : 40% (del Monte et al., 1993). En considérant nos conclusions, cette observation pourrait suggérer que l'organisme diminue le nombre de récepteur provoquant les effets pro-apoptotiques afin de favoriser l'activation d'une voie de signalisation de survie cellulaire afin de limiter l'apoptose. Par contre, on pourrait s'attendre à ce que l'augmentation du niveau de catécholamines entraîne la désensibilisation des récepteurs et que les  $\beta_2$ -AR soient davantage désensibilisés que les  $\beta_1$ -

AR. En fait, puisque ces deux sous-types de récepteurs possèdent des patrons de désensibilisation distincts, on pourrait penser que le  $\beta_2$ -AR soit internalisé puis recyclé rapidement au niveau membranaire contrairement au  $\beta_1$ -AR qui serait plus lent à internaliser et peut-être davantage soumis à la régulation négative. Il a été observé que l'ARNm du  $\beta_1$ -AR soit diminué de 50% dans la défaillance cardiovasculaire (Koch et al., 1996). Ceci permettrait donc d'expliquer les différences au niveau de la désensibilisation et de la densité relative de ces récepteurs.

En plus de la perte de densité des récepteurs, la défaillance cardiovasculaire entraîne une perte de fonction des récepteurs. En fait, il a été démontré que le taux de GRK2 est particulièrement élevé au niveau d'échantillons tissulaires provenant de ventricules gauches de cœurs défaillants humains (Koch et al., 1996). Cette augmentation de la quantité de GRK2 dans la défaillance contribue au découplage fonctionnel des  $\beta$ -AR. Dans un même ordre d'idées, le recrutement de la PI3-kinase au niveau membranaire par les  $\beta$ -AR stimulés s'effectue via la protéine GRK2. Ceci implique que la défaillance cardiaque entraînerait une augmentation du taux de PI3-kinase à la membrane cellulaire, ce qui favoriserait des effets anti-apoptotiques dans les cellules cardiaques défaillantes. Par le fait même, les cardiomyocytes tenteraient de contrecarrer l'effet pro-apoptotique des  $\beta_1$ -AR à divers niveaux, c'est-à-dire non seulement en diminuant le nombre de récepteurs, mais également en augmentant le taux de PI 3-kinase au niveau membranaire.

Dans la même optique, il a été démontré que le niveau de protéine  $G_{i\alpha}$  augmente dans le myocarde défaillant. L'augmentation de la protéine  $G_{i\alpha}$  serait causée par une augmentation de la transcription génique en réponse à l'excès de catécholamines circulantes (Bohm et al., 1994). L'augmentation transcriptionnelle de la protéine  $G_{i\alpha}$ , qui est activée par les  $\beta_2$ -AR, provoque une inhibition de l'adénylate cyclase ce qui entraîne une faible production d'AMPc, qui favorise l'apoptose via l'activation de PKA (Bohm et al., 1994). Par le fait même, l'augmentation de la protéine  $G_{i\alpha}$  permet de protéger les

cardiomyocytes et représenterait un autre niveau de régulation permettant également de contrecarrer les effets pro-apoptotiques.

Les  $\beta_2$ -AR ne sont pas les seuls GPCR pouvant activer la protéine  $G_i$  dans les cardiomyocytes défaillants. En effet, les récepteurs muscariniques M2 peuvent également activer la protéine  $G_i$  et ainsi entraîner des effets anti-apoptotiques. Dans cet optique, il serait donc envisageable de développer une stratégie thérapeutique pouvant aller à l'encontre d'une stimulation  $\beta_1$ -AR soit en favorisant le couplage des  $\beta_2$ -AR d'avec la protéine  $G_i$  ou via une stimulation des récepteurs M2 par un agoniste muscarinique. Bien que cette avenue thérapeutique permettrait donc de diminuer voire d'éliminer l'apoptose dans les cardiomyocytes défaillants, l'activation des récepteurs muscariniques M2 dans la défaillance cardiaque entraîne une bradycardie ce qui n'est pas souhaitable.

Il a été démontré que la PI 3-kinase pouvait être activée par d'autres récepteurs appartenant à la famille des GPCR dont les récepteurs  $D_2$  de la dopamine (Missale et al., 1998, Venugopalan et al., 2003). Cette activation de la PI 3-kinase et éventuellement d'AKT par les récepteurs  $D_2$  nécessite une transactivation d'un récepteur à activité tyrosine kinase, l'« epidermal growth factor receptor » (EGFR). Cette transactivation est dépendante de la protéine c-SRC qui est activée par la protéine G du récepteur  $D_2$  de la dopamine (Venugopalan et al., 2003). Comme le  $\beta_2$ -AR peut interagir avec c-SRC, il serait intéressant de déterminer si ce mécanisme pourrait être impliqué dans l'activation de la PI3-kinase par les  $\beta_2$ -AR. D'ailleurs, de plus en plus d'évidences semblent démontrer qu'il y a des régulations croisées entre les voies de signalisation des récepteurs à activité tyrosine kinase et les GPCR (Waters et al., 2005). En fait, les GPCR stimulés par un agoniste ont la capacité d'activer des protéines tyrosines kinases comme c-SRC via les sous-unités  $G\beta/\gamma$  ce qui entraîne une transactivation des récepteurs à activité tyrosine kinase. Cette hypothèse de l'activation de PI 3-kinase par la stimulation des  $\beta_2$ -AR nécessite d'autres études pour confirmer cette voie.

Sachant que les  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -AR ont la capacité de former des homodimères ainsi que des hétérodimères, on pourrait s'interroger à savoir l'effet de la formation de tels dimères sur l'apoptose, puisque la formation de dimères modifie l'affinité entre le ligand et le récepteur ainsi que l'internalisation des récepteurs par rapport aux récepteurs monomériques (Lavoie et al., 2003; Hébert et al., 1998). Ceci pourrait également impliquer que l'apoptose soit modifiée par la dimérisation puisqu'elle est engendrée uniquement par les  $\beta_1$ -AR. Tel que mentionné précédemment, le ratio  $\beta_1$ -AR :  $\beta_2$ -AR est de 80% : 20% dans les cardiomyocytes normaux (del Monte et al., 1993; Koch et al., 1996). Ceci laisse supposer que les homodimères  $\beta_1$ -AR sont majoritaires dans les cardiomyocytes normaux contrairement aux hétérodimères  $\beta_1$ - $\beta_2$ -AR et aux homodimères  $\beta_2$ -AR qui devraient être minoritaires, puisque le taux de  $\beta_2$ -AR est plus faible dans les cardiomyocytes. Dans un même ordre d'idées, si le niveau de  $\beta_1$ -AR est supérieur au niveau de  $\beta_2$ -AR on pourrait s'attendre à observer de l'apoptose. La défaillance cardiovasculaire entraîne une diminution du nombre de  $\beta_1$ -AR ce qui laisse supposer que la formation d'homodimères  $\beta_1$ -AR soit diminuée et ainsi favoriser la formation des hétérodimères  $\beta_1$ - $\beta_2$ -AR. L'augmentation du taux des hétérodimères pourrait entraîner des changements au niveau de la signalisation des  $\beta$ -AR et donc de l'apoptose. En fait, ceci pourrait représenter un autre mécanisme permettant aux cellules cardiaques de modifier l'activation de la PI3-kinase et, par le fait même, de moduler des effets au niveau de l'apoptose en conditions pathologiques. Par contre, il serait intéressant de déterminer les conséquences d'une augmentation de l'hétérodimérisation sur l'apoptose dans les cardiomyocytes défaillants.

## Conclusion

En conclusion, le projet de recherche du présent ouvrage a permis non seulement de déterminer que l'activation de la PI 3-kinase par les  $\beta$ -AR est dépendante du sous-type, mais également d'identifier la région du récepteur qui comporte les déterminants moléculaires nécessaires à l'activation de l'enzyme.

La première partie de ce projet de recherche a permis de démontrer que le  $\beta_2$ -AR a la capacité d'activer la PI 3-kinase contrairement au  $\beta_1$ -AR et ce malgré la présence d'une grande homologie de séquence entre les deux sous-types de récepteurs. La seconde partie du projet a permis de mettre en évidence que le domaine C-terminal du  $\beta_2$ -AR comporte les déterminants moléculaires nécessaires à l'activation de la PI 3-kinase. Pour la première fois, il a été démontré que le domaine C-terminal est important dans le recrutement par les protéines  $G_{\beta/\gamma}$ .

Dans un même ordre d'idées, il serait maintenant envisageable de déterminer les résidus du domaine C-terminal des  $\beta_2$ -AR qui sont impliqués dans l'activation de la PI 3-kinase. De plus, il serait intéressant d'évaluer si d'autres régions du  $\beta_2$ -AR sont impliquées dans l'activation de l'enzyme. Entre autre, il serait possible que la troisième boucle intracellulaire soit impliquée dans l'activation de la PI 3-kinase, puisque cette région est déterminante pour le couplage du récepteur d'avec sa protéine G.



## Bibliographie

- Alewijnse, A.E., Timmerman, H., Jacobs, E.H., Smit, M.J., Roovers E., Cotecchia, S. et Leurs R. (2000) The effect of Mutations in the DRY Motif on the Constitutive Activity and Structural Instability of the Histamine H<sub>2</sub> Receptor. *Mol Pharmacol.* **57**, 890-898.
- Alexander, S.P.H., Mathie A. et Peters, J.A. (2001) Nomenclature supplement, *Trends in Pharmacol. Sc.* **12th Edition**, p.17.
- Anger, S., Salahpour, A., Hilaiet, S., Chelsky, D., Dennis, M. et Bouvier M. (2000) Detection of  $\beta_2$ -adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfert (BRET). *Proc. Nat. Acad. Sci.* **97**, 3684-3689.
- Arnis, S., Fahmy, K., Hofmann, K.P. et Sakmar, T.P. (1994) A Conserved Carboxylic Acid Group Mediates Light-dependent Proton Uptake and Signaling by Rhodopsin. *J. Biol. Chem.* **269**, 23879-23881.
- Barak, L.S., Warabo, K., Feng, X., Caron, M.G. et Kwatra, M.M. (1999) Real-time Visualization of the Cellular Redistribution of G Protein-coupled Receptor Kinase 2 and  $\beta$ -Arrestin 2 during Homologous Desensitization of the Substance P Receptor. *J. Biol. Chem.* **274**, 7565-7569.
- Benovic, J.L., Pike, L.J., Cerione, R.A., Staniszewski, C., Yoshimasa, T., Codina, J., Caron, M.G. et Lefkowitz, R.J. (1985) Phosphorylation of the Mammalian  $\beta$ -Adrenergic Receptor by Cyclic AMP-dependent Protein Kinase. *J. Biol. Chem.* **260**, 7094-7101.
- Benovic, J.L., Bouvier M., Caron, M.G. et Lefkowitz, R.J. (1988) Regulation of adenylyl cyclase-coupled b-adrenergic receptors. *Ann. Rev. Cell. Biol.* **4**, 405-428.
- Bigary, J., Deterre, P., Pfister, C. et Chabre, M. (1987) Complexes of Aluminium or beryllium act on G-proteins as reversibly bound analogues of the  $\gamma$ -phosphate of GTP. *EMBO J.* **6**, 2907-2913.

- Blackmer, T., Larsen, E.C., Takahashi, M., Martin, T.F.J., Alfor, S et Hamm, H.E. (2001) G Protein  $\beta\gamma$  Subunit-Mediated Presynaptic Inhibition: Regulation of Exocytotic Fusion Downstream of  $\text{Ca}^{2+}$  Entry. *Science* **292**, 293-297.
- Blin, N., Yun, J. et Wess, J. (1995) Mapping of single amino acid residues required for selective activation of  $\text{Gq}_{11}$  by the m3 muscarinic acetylcholine receptor. *J. Biol. Chem.* **270**, 17741-17748.
- Bockaert, J. et Pin, J-P. (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors : an evolutionary success. *EMBO J*, **18**, 1723-1729.
- Bockaert J., et Pin, J-P. (1998) Utiliser un récepteur couplé aux protéines G pour communiquer,. Un succès évolutif. *Acad. Sci. Paris, Science de la vie* **321**, 529-551.
- Böhm, M., Eschenhagen, T., Gierschik, P., Larisch, K., Lensche, H., Mende, U., Schmitz, W., Schnabel, P., Scholz, H., Steinfath, M. et Erdmann, E. (1994) Radioimmunochemical Quantification of  $\text{Gi}\alpha$  in Right and Left Ventricles from Patients with Ischamic and Dilated Cardiomyopathy and Predominant Left Ventricular Failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **26**, 133-149.
- Böhm, S.K., Grady, E.F. et Bunnett, N.W. (1997) Regulatory mechanisms that modulate signalling by G-protein-coupled receptors. *Biochem. J.* **322**, 1-18.
- Bristow, M.R., Prot, J.D. et Kelly, R.A., (1994) *Treatment of heart failure : pharmacologic methods : In Braunwald Heart disease : A textbook of cardiovascular medicine 6th edition.*
- Bristow, M.R. (2000) What Type of [beta]-Blocker Should Be Used to Treat Chronic Heart Failure? *Circulation* **102** : 484-486.
- Calzada, B.C. et Artinano, A.A. (2001) Alpha-adrenoceptor subtypes. *Pharmacol. Res.* **44**, 195-208.
- Cantrell, D.A. (2001) Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways. *J. Cell Sc.* **114**, 1439-1445.
- Chesley, A., Lundberg, M.S., Asai, T., Xiao, R-P., Ohtani, S., Lakatta, E.G., Crow, M.T. (2000) The  $\beta_2$ -Adrenergic Receptor Delivers an Antiapoptotic Signal to Cardiac

- Myocytes Through Gi-Dependent Coupling to Phosphatidylinositol 3'-Kinase. *Circ Res.* **87**, 1172-1179.
- Cheung, A.H., Huang, R-R.C., Graziano, M.P. et Strader, C.D. (1991) Specific activation of G<sub>s</sub> by synthetic peptides corresponding to an intracellular loop of the  $\beta$ -adrenergic receptor. *FEBS* **279**, 277-280.
- Claing, A., Laporte, S.A., Caron, M.G. et Lefkowitz, R.J. (2002) Endocytosis of G protein-coupled receptors : roles of G protein-coupled receptor kinases and b-arrestin proteins. *Prog. Neurobio.* **66**, 61-79.
- Clapham, D.E. (1996) The G protein nanomachine. *Nature* **379**, 297-299.
- Clapham, D.E. et Nerr, E.J. (1997) G protein  $\beta\gamma$  subunits. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **37**, 167-203.
- Communal, C., Singh, K., Pimentel, D.R. et Colucci, W.S. (1998) Norepinephrine Stimulates Apoptosis in Adult Rat Ventricular Myocytes by Activation of the beta-Adrenergic Pathway. *Circ.* **98**, 1329-1334.
- Communal, C., Singh, K., Sawyer, D.B. et Colucci, W.S. (1999) Opposing Effects of  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -Adrenergic Receptors on Cardiac Myocyte Apoptosis Role of a Pertussis Toxin-Sensitive G Protein. *Circ.* **100**, 2210-2212.
- Communal, C., Colucci, W.S. et Singh, K. (2000) P38 Mitogen-activated Protein Kinase Pathway Protects Adult Rat Ventricular Myocytes against b-Adrenergic Receptor-stimulated Apoptosis. *J. Biol. Chem.* **275**, 19395-19400.
- Condorelli, G., Drusco, A., Stassi, G., Bellacosa, A., Roncarati, R., Iaccarino, G., Russo, M.A., Gu, Y., Dalton, N., Chung, C., Latronico, M., Napoli, C., Sadoshima, J., Croce, C.M. et Ross, J.Jr. (2002) Akt induces enhanced myocardial contractility and cell size *in vivo* in transgenic mice *PNAS.* **99**, 12333- 12338.
- Conklin, B.R., et Bourne, H. (1993) Structural Element of G $\alpha$  Subunits That Interact with G $\beta\gamma$ , Receptors, and Effectors. *Cell* **73**, 631-641.

- Corvera, S., D'Arrigo, A. et Stenmark, H. (1999) Phosphoinositides in membrane traffic. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **11**, 460-465.
- Daaka, Y., Luttrell, L.M. et Lefkowitz, R.J. (1997) Switching of the coupling of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* **390**, 88-91.
- Daaka, Y., Luttrell, L.M., Ahn, S., Della Rocca, G.J., Ferguson, S.S.G., Caron, M.G. et Lefkowitz, R.J. (1998) Essential Role for G Protein-coupled Receptor Endocytosis in the Activation of Mitogen-activated Protein kinase. *J. Biol. Chem.* **273**, 685-688.
- DeBurman, S.K., Ptasienski, J., Boetticher, E., Lomasney, J.W., Benovic, J.L. et Hosey M.M. (1995) Lipid-mediated Regulation of G Protein-coupled Receptor Kinase 2 and 3. *J. Biol. Chem.* **270**, 5742-5747.
- del Monte, F., Kaumann, A.J., Poole-Wilson, P.A., Wynne, D.G., Pepper, J. et Harding, S.E. (1993) Cellular Physiology: Coexistence of Functioning Beta sub 1- and Beta Sub 2 –Adrenoceptors in Single Myocytes From Human Ventricule. *Circ.* **88**, 854-863.
- Dohlman, H.G., Caron, M.G., Strader, C.D., Amlaiky, N. et Lefkowitz, R.J. (1988) Identification and sequence of a binding site peptide of the beta2-adrenergic receptor. *Biochem.* **27**, 1813-1817.
- Dohlman, H.G., Caron, M.G., Deblasi, A., Frielle, T. et Lefkowitz, R.J. (1990) Role of Extracellular Disulfide-Bonded Cysteines in the Ligand Binding Function of the  $\beta_2$ -Adrenergic Receptor. *Biochem.* **29**, 2335-2342.
- Dixon, R.A.F., Sigal, I.S., Candelore, M.R., Register, R.B., Scattergood, W., Rands, E et Strader, C.D. (1987) Structural features required for ligand to the  $\beta$ -adrenergic receptor. *EMBO J.* **6**, 3269-3275.
- Dixon, R.A.F., Sigal, I., Rands, E., Register, B.R., Candelor, M.R., Blake, A.D. et Strader, C.D. (1987b) Ligand binding to the  $\beta$ -adrenergic receptor involves its rhodopsin-like core. *Nature* **326**, 73-76.

- Engelhart, S., Hein, L., Wiesmann, F. et Lohse, M.J. (1999) Progressive hypertrophy and heart failure in  $\beta_1$ -adrenergic receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 7059-7064.
- Frank, T.F. et Cantley, L.C. (1997) A Bad kinase makes good. *Nature*, **390**, 116-177.
- Frielle, T., Kobilka, B., Lefkowitz, R.J. et Caron, M.G. (1988) Human  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -adrenergic receptors : structurally and functionally related receptors derived from distinct genes. *Trends neurosci.* **11**, 321-324.
- Frielle, T., Daniel, K.W., Caron, M.G. et Lefkowitz, R.J. (1988b) Structural basis of  $\beta$ -adrenergic receptor subtype specificity studied with chimeric  $\beta_1/\beta_2$ -adrenergic receptors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **85**, 9494-9498.
- Gaidarov, I., Krupnick, J.G., Falck, J.R., Benovic, J.L. et Keen, J.H. (1999) Arrestin function in G protein-coupled receptor endocytosis requires phosphoinositide binding. *EMBO J.* **18**, 871-881.
- Geng Y., Ishikawa Y., Vatner, D.E., Wagner, T.E., Bishop, S.P., Vatner, S.F. et Homcy, C.J. (1999) Apoptosis of cardiac myocytes in  $\alpha_1$  transgenic mice. *Circ. Res.* **84**, 34-42.
- Gilman, A.G. (1987) G Proteins: Transducers of Receptors-Generated Signals. *Ann. Rev. Biochem.* **56**, 615-649.
- Goldfien, A. (2001) Adrenal Medulla in *Basic and Clinical Endocrinology*, sixth edition, USA :Lange Medical Books, p.399-421.
- Goodman, O.B., Krupnick, J.G., Santini, F., Gurevich, V.V., Penn, R.B., Gagnon, A.W., Keen, J.H. et Benovic, J.L. (1996)  $\beta$ -Arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor. *Nature* **383**, 447-450.
- Green, S.A. et Liggett, S.B. (1994) A Proline-rich Region of the Third Intracellular Loop Imparts Phenotypic  $\beta_1$ - Versus  $\beta_2$ -Adrenergic Receptor Coupling and sequestration. *J. Biol. Chem.* **269**, 26215-26219.

- Gudermann, T., Schöneberg, T. et Schultz, G. (1997) Functional and structural complexity of signal transduction via G-protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* **20**, 399-427.
- Hall, R.A., Premont, R.T., Chow, C.W., Blitzer, 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) The beta2-adrenergic receptor interacts with the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchanger regulatory factor to control Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange. *Nature.* **392**, 626-630.
- Hallak, H., Muszbek, L., Laposata, M., Belmonte, E., Brass, L.F. et Manning D.R. (1994) Covalent binding of arachidonate to G protein alpha subunits of human platelets. *J. Biol. Chem.* **269**, 4713-4716.
- Harris, P. (1983) Origins of congestive cardiac failure. *Cardiovasc. Res.* **17**, 440-445.
- Hausdorff, W.P., Bouvier, M., O'Dowd, B.F., Irons, G.P. et Lefkowitz, R.J. (1989) Phosphorylation Sites on Two Domains of the  $\beta_2$ -Adrenergic Receptor Are Involved in Distinct Pathways of Receptor Desensitization. *J. Biol. Chem.* **264**, 12657-12665.
- Hébert, T.E. et Bouvier, M. (1998) Structural and functional aspects of G protein-coupled receptor oligomerization. *Biochem. Cell. Biol.* **76**, 1-11.
- Higgins, J.B. et Casey P.J. (1994) *In vitro* Processing of Recombinant G Protein  $\gamma$  Subunits Requirements for Assembly of an Active  $\beta\gamma$  Complex. *J. Biol. Chem.* **269**, 9067-9073.
- Hisatomi O., Matsuda, S., Satoh, T., Kotaka, S., Imanish, Y. et Tokunaga, F. (1998) A novel subtype of G-protein-coupled receptor kinase, GRK7, in teleost cone photoreceptors. *FEBS Lett.* **424**, 159-164.
- Hohenegger, M., Mitterauer, T., Voss, T., Nanoff, C. et Freissmuth, M. (1996) Thiophosphorylation of the G protein beta subunit in human platelet membranes: evidence against a direct phosphate transfer reaction to G alpha subunits. *Mol. Pharm.* **49**, 73-80.

- Hu, L.A., Chen, W., Martin, N.P., Whalen, E.J., Premont, R. et Lefkowitz, R.J. (2003) GIPC interacts with the  $\beta_1$ -adrenergic receptor and regulates  $\beta_1$ -adrenergic receptor mediated ERK activation. *J. Biol. Chem.* **278**, 26295-26301.
- Kaye, D.M., Lefkovits, J., Jennings, G.L., Bergin, P. et Broughton, A. (1995) Adverse consequences of high sympathetic nervous activity in human heart. *J. Am. Coll. Cardiol.* **26**, 1257-1263.
- Kaumann, A.J. (1997) Four  $\beta$ -adrenoceptor subtypes in the mammalian heart. *Trends Pharmacol. Sci.* **18**, 70-76.
- Kisselev, O., Ermolaeva, M. et Gautam, N. (1995) Efficient Interaction with a Receptor Requires a Specific Type of Prenyl Group on the G Protein  $\gamma$  Subunit. *J. Biol. Chem.* **270**, 25356-25358.
- Kim, C.M., Dion, S.B. et Benovic, J.L. (1993) Mechanism of  $\beta$ -Adrenergic Receptor Kinase Activation by G Proteins. *J. Biol. Chem.* **268**, 15412-15418.
- Kizaki, K., Momozaki, M., Akatsuka, K., Fujimori, Y., Uchide, T., Temma, K. et Hara, Y. Impaired Gene Expression of  $\beta_1$ -Adrenergic Receptor, but Not Stimulatory G-Protein  $G_{\alpha}$ , in Rat Ventricular Myocardium Treated with Isoproterenol. *Biol. Pharm. Bull.* **27**, 1130-1132.
- Kohout, T.A. et Lefkowitz, R.J. (2003) Regulation of G protein-Coupled Receptor Kinases and Arrestins During Receptor Desensitization. *Mol. Pharm.* **63**, 9-18.
- Lambright, D.G., Noel, J.P., Hamm, H.E. et Sigler, P.B. (1994) The 1.8Å crystal structure of transducin  $\alpha$ -GDP: Structural determinants for activation of the  $\alpha$ -subunit of a heterotrimeric G protein. *Nature* **369**, 621-628.
- Lambright, D.G., Sondek, J., Bohm, A., Skiba, N.P., Hamm, H.E. et Sigler P. (1996) The 2.0Å crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature* **379**, 311-39.0
- Lands, A.M., Arnold, A., McAulief, Luduena, F.P. et Brown, T.G. (1967) Differentiation of Receptor Systems activated by Sympathomimetic Amines. *Nature*, **214**, 597-598.
- Lavoie, C. et Hébert, T.E. (2003) Pharmacological characterization of putative  $\beta_1$ - $\beta_2$ -adrenergic receptor heterodimers. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **81**, 186-195.

- Lefkowitz, R.J. (1998) G Protein-coupled Receptors III. New roles for receptor kinases and  $\beta$ -arrestins in receptor signaling and desensitization. *J. Biol. Chem.* **273**, 18677-18680.
- Legault, F., Rouleau, J.L., Junneau, C., Rose, C. et Rakusan K. (1990) Functional and morphological characteristics of compensated and decompensated cardiac hypertrophy in dogs with chronic infrarenal aorto-caval fistulas. *Circ Res.* **66**, 846-859.
- Lemmon, M.A., Ferguson, K.M. et Abrams, C. (2002) Pleckstrin homology domains and the cytoskeleton. *FEBS Letters* **513**, 71-76.
- Leslie, N.R. et Downes, C.P. (2002) PTEN : The down side of PI 3-kinase signalling. *Cell. Sign.* **14**, 285-295.
- Liang, W., Austin, S., Hoang, Q. et Fishman, P.H. (2003) Resistance of the Human  $\beta_1$ -Adrenergic Receptor to Agonist-mediated Down-regulation Role of the C terminus in determining  $\beta$ -subtype degradation. *J. Biol. Chem.* **278**, 39773-39781.
- Liggett, S.B., Caron, M.G. et Lefkowitz, R.J. (1991) Coupling of a Mutated Form of the Human  $\beta_2$ -Adrenergic Receptor to Gi and Gs. *J. Biol. Chem.* **266**, 4816-4821.
- Lohse, M.J. (1993) Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization. *Biochem. Biophys. Acta.* **1179**, 171-188.
- Lohse, M.J. (1995) G-Protein-Coupled Receptor Kinases and the Heart. *Trends Cardiovasc. Med.* **5**, 63-68.
- Luttrell, L.M., Daaka, Y., Della Rocca, G.J. et Lefkowitz, R.J. (1997) G Protein-coupled Receptors Mediate Two Functionally distinct Pathways of Tyrosine Phosphorylation in Rat 1a Fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **272**, 31648-31656.
- Luttrell, L.M. et Lefkowitz, R.J. (2002) The role of  $\beta$ -Arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptors signals. *J. Cell. Sc.* **115**, 455-465.
- Marchese, A., Chen, C., Kim, Y-M. et Benovic, J. (2003) The ins and outs of G protein-coupled receptor trafficking. *TiBS* **28**, 369-376.

- Markou, T., Hadzopoulou-Cladaras, M. et Lazou, A. (2004) Phenylephrine induces activation of CREB in adult rat cardiac myocytes through MSK1 and PKA signaling pathway. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **37**, 1001-1011.
- Metra, M. Giubbini, R., Nodari, S., Boldi, E. Modena, M.G. et Dei Cas L. (2000) Differential effects of beta-blockers in patients with heart failure A prospective, randomized, double-blind comparison of the long term effects of metoprolol versus carvedilol. *Circulation* **102**, 546-551.
- Milburn, C.C., Deak, M., Kelly, S.M., Price, N.C., Alessi, D.R. et van Aalten, D.M. (2003) Binding of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate to the pleckstrin homology domain of protein kinase B induces a conformational change. *Biochem. J.* **375**, 531-538.
- Milligan, G., Ramsay, D., Pascal, G. et Carrillo, J.J. (2003) GPCR dimerisation. *Life Sci.* **74**, 181-188.
- Missale, C., Nash, R.S., Robinson, S., Jaber, M. et Caron, M.G. (1998) Dopamine Receptors : From Structure to Function. *Physiol. Reviews* **78**, 189-225.
- Müller, F.U., Boknik, P., Knapp, J., Linck, B., Lüss, H., Neumann, J. et Schmitz., W. (2001) Activation and inactivation of cAMP-response element-mediated gene transcription in cardiac myocytes. *Cardiol. Res.* **52**, 95-102.
- Naga Prasad, S.V., Barak, L.S., Rapacciuolo, A., Caron. M.G. et Rockman, H.A. (2001) Agonist-dependent Recruitment of Phosphoinositide 3-kinase to the Membrane by  $\beta$ -Adrenergic Receptor Kinase 1. *J. Biol. Chem.* **276**, 18953-18959.
- Naga Prasad, S.V., Laporte, S.A., Chamberlain, D., Caron, M.G., Barak, L. et Rockman, H.A. (2002) Phosphoinositide 3-kinase regulates  $\beta$ 2-adrenergic receptor endocytosis by AP-2 recruitment to the receptor/ $\beta$ -arrestin complexe. *J. Cell Biol.* **158**, 563-575.
- Nagatomo, T., Ohnuk, T., Masji, I. Ahmed, M. et Nakamura, T. (2001)  $\beta$ -Adrenoceptors: Three-Dimensional Structures and Binding Sites for Ligands. *Jpn. J. Pharmacol.* **87**, 7-13.

- Neer, E.J. (1995) Heterotrimeric G Proteins: Organizers of Transmembrane Signals. *Cell* **80**, 249-257.
- Neer, E.J. et Smith, T.F. (1996) G protein heterodimers: New structures propel new questions. *Cell* **84**, 175-178.
- Noel, J.P., Hamm, H.E. et Sigler, P.B. (1993) The 2.2Å crystal structure of transducin- $\alpha$  complexed with GTP $\gamma$ S. *Nature* **366**, 654-663.
- Nürnberg, B., Gudermann, T. et Schultz, G. (1995) Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. *J. Mol. Med.* **73**, 123-132.
- O'Dowd, B.F., Hnatowich, M., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. et Bouvier, M. (1989) Palmitoylation of the human  $\beta_2$ -Adrenergic Receptor. *J. Biol. Chem.* **264**, 7564-7569.
- Oldenhof, J., Vickery, R., Anafi, M., Oak, J., Ray, A., Schoots, O., Pawson, T., Zastrow, M. V. et Van Tol, H.H.M. (1998) SH3 Binding Domains in the Dopamine D4 Receptor. *Biochem.* **37**, 15726-15736.
- Opie, L.H. (1998) *The Heart, physiology from Cell to Circulation*, USA, Library of Congress, third edition., p.173-207.
- Perry, S.J., Baillie, G.S., Kohout, T.A., McPhee, I., Magiera, M.M., Ang, K.L., Miller, W.E., McLean, A.J., Conti, M., Houslay, M.D. et Lefkowitz, R.J. (2002) Targeting of Cyclic AMP Degradation to  $\beta_2$ -Adrenergic Receptors by  $\beta$ -Arrestins. *Science*, **298**, 834-836.
- Pitcher, J.A., Inglese, J., Higgins, J.B., Arriza, J.L., Casey, P.J., Kim, C., Benovic, J.L., Kwatra, M.M., Caron, M.G. et Lefkowitz, R.J. (1992) Role of  $\beta\gamma$  Subunits of G Proteins in Targeting the  $\beta$ -Adrenergic Receptor Kinase to Membrane-Bound Receptors. *Science*, **257**, 1264-1267.
- Pitcher, J.A., Touhara, K., Payne, E.S. et Lefkowitz, R.J. (1995) Pleckstrin Homology Domain-mediated Membrane Association and Activation of the  $\beta$ -Adrenergic Receptor kinase Requires Coordinate Interaction with  $G_{\beta\gamma}$  Subunits and lipid. *J. Biol. Chem.* **270**, 11707-11710.

- Pitcher, J.A., Freedman, N.J. et Lefkowitz, R.J. (1998) G protein-coupled receptor kinases. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 653-692.
- Plante, E., Lachance, D., Gaudreau, M., Drolet, M-C., Roussel, E., Arsenault, M. et Couet, J. (2004) Effectiveness of  $\beta$ -blockade in Experimental Chronic Aortic Regurgitation. *Circ.* **110**, 1477-1483.
- Post, S.R., Hammon, K. et Insel, P. (1999)  $\beta$ -adrenergic receptors and receptor signaling in heart failure. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **39**, 343-360.
- Port, J.D., Weinberger, H.D., Bisognano, J.D., Knudson, O.A., Bohlmeyer, T.J., Pende, A. et Bristow M.R. (1998) Echocardiographic and histopathological characterization of young and old transgenic mice over-expressing the human  $\beta_1$ -adrenergic receptor. *J. AM. Coll. Cardiol.* **31**, 177A Abstract.
- Qanbar, R. et Bouvier, M. (2003) Role of palmitoylation/depalmitoylation reactions in G-protein-coupled receptor function. *Pharmacol. Thr.* **97**, 1-33.
- Rameh, L.E. et Cantley, L.C. (1999) The Role of Phosphoinositide 3-Kinase Lipid Products in Cell Function. *J. Biol. Chem.* **274**, 8347-8350.
- Rapacciuolo, A., Suvarna, S., Barki-Harrington, L., Luttrell, L.M., Cong, M., Lefkowitz, R.J. et 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.
- Rasmussen, S.G.F., Jensen, A.D., Liapakis, G., Ghanouni, P., Javitch, J.A. et Gether, U. (1999) Mutation of a Highly Conserved Aspartic Acid in the  $\beta_2$  Adrenergic Receptor: Constitutive Activation, Structural Instability, and conformational Rearrangement of Transmembrane Segment 6. *Mol. Pharmacol.* **56**, 175-184.
- Rens-Domiano, S. et Hamm, H.E. (1995) Structural and Functional relationships of heterotrimeric G-proteins. *FASEB* **9**, 1059-1066.
- Rockman, H.A., Hamilton, R.A., Jones, L.R., Milano, C.A., Mao, L. et Lefkowitz, R.J. (1996) Enhanced myocardial relaxation in vivo in transgenic mice overexpressing

- the  $\beta_2$ -adrenergic receptor is associated with reduced phospholamban protein. *J. Clin. Invest.* **97**, 1618-1623.
- Rousseau, G., Nantel, F. et Bouvier M. (1996) Distinct Receptor Domains Determine Subtype-Specific Coupling and Desensitization Phenotypes for Human  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -Adrenergic Receptors. *Mol. Pharm.* **49**, 752-760.
- Ruffolo, R.R. Jr. (ed) (1991)  $\beta$ -Adrenoceptors : Molecular Biology, Biochemistry and Pharmacology. *Prog Basic Clin Pharmacol.* Basel, Karger, **7**, p.105-172.
- Scheer, A., Costa, T., Fanelli, F., De Benedetti, P., Mhaouty-Kodja, S., Abuin, L., Nenniger-Tosato, M. et Cotecchia, S. (2000) Mutation Analysis of the Highly Conserved Arginine within the Glu/Asp-Arg-Tyr Motif of the  $\alpha_{1b}$ -adrenergic Receptor: Effects on receptor Isomerization and Activation. *Mol Pharmacol.* **57**, 219-231.
- Shenoy, S.K. et Lefkowitz, R.J. (2003) Multifaceted roles of  $\beta$ -arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling. *Biochem. J.* **375**, 503-515.
- Shiina, T., Kawasaki, A., Nagao, T. et Kurose, H. (2000) Interaction with  $\beta$ -Arrestin Determines the Difference in Internalization Behaviour between  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -Adrenergic Receptors. *J. Biol. Chem.* **275**, 29082-29090.
- Shiina, T., Nagao, T. et Kurose, H. (2001) Low affinity of  $\beta_1$ -adrenergic receptor for  $\beta$ -arrestins explains the resistance to agonist-induced internalization. *Life Sc.* **68**, 2251-2257.
- Shioi, T., Kang, P.M., Douglas, P.S., Hampe, J., Yballe, C.M., Lawitts, J., Cantley, L.C. et Izumo, S. (2000) The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice. *EMBO J.* **19**, 2537-2548.
- Shioi, T., McMullen, J.R., Kang, P.M., Douglas, P.S., Obata, T., Franke, T.F., Cantley, L.C. et Izumo, S. (2002) Akt/protein kinase B promotes organ growth in transgenic mice. *Mol Cell Biol.* **22**, 2799-809.

- Simon, H.I., Strathmann, M.P. et Gautam, N. (1991) Diversity of G Protein in Signal Transduction. *Science*. **252**, 802-808.
- Simonds, W.F., Butrynski, J.E., Gautam, N., Unson, C.G. et Spiegel, A.M. (1991) G-protein  $\beta\gamma$  Dimers Membrane Targeting Requires Subunit Coexpression and Intact  $\gamma$  C-A-A-X Domain. *J. Biol. Chem.* **266**, 5363-5366.
- Siri, F.M. (1988) Sympathetic changes during development of cardiac hypertrophy in aortic-constricted rats. *Am. J. Physiol.* **255**, H452-H457.
- Sondek, J., Lambright, D.G., Noel, J.P., Hamm, H.E. et Sigler, P.B. (1994) GTPase mechanism of G proteins from the 1.7-Å crystal structure of transducin  $\alpha$ -GDP- $\text{AlF}_4^-$ . *Nature* **372**, 276-279.
- Strosberg, A.D. (1993) Structure, function, and regulation of adrenergic receptors. *Prot Sci*, **2**, 1198-1209.
- Strader, C.D., Dixon, R.A.F., Cheung, A.H., Candelor, M.R., Blake, A.D. et Sigal, I.S. (1987) Mutations that uncouple the  $\beta$ -adrenergic receptor from Gs and increase agonist affinity. *J. Biol. Chem.* **262**, 16439-16443.
- Strader, C.D., Sigal, I.S., Blake, A.D., Cheung, A.H., Register, B.R., Rands, E., Zemcik, B.A., Candelor, M.R. et Dixon, R.A.F. (1987b) The carboxyl Terminus of the Hamster  $\beta$ -Adrenergic Receptor Expressed in Mouse L Cells Is not Required for Receptor Sequestration. *Cell* **49**, 855-863.
- Strader, C.D., Candelor, M.R., Hill, W.S., Sigal, I.S. et Dixon, R.A.F. (1989) Identification of Two Serine Residues Involved in Agonist Activation of the  $\beta$ -Adrenergic Receptor. *J. Biol. Chem.* **264**, 13572-13578.
- Strader, C.D. et Dixon, R.A.F. (1992) Chapter 3: Genetic Analysis of the  $\beta$ -adrenergic Receptor, *Molecular Biology of G-Protein-coupled Receptors*. Mark R. Brann editor, U.S.A. p.62-75.
- Sugden, P.H. (2003) Ras, AKT, and Mechanotransduction in the Cardiac Myocyte. *Circ. Res.* **93**, 1179-1192.

- Suzuki, T., Nguyen, C.T., Nantel, F., Bonin, M., Valiquette, M., Frielle, T. et Bouvier M. (1992) Distinct regulation of  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -adrenergic receptors in Chinese hamster fibroblast : functionality and regulation of the expressed receptors. *Mol. Pharmacol.* **33**, 133-139.
- Swedberg, K., Eneroth, P., Kjekshus, J. et Wilhelmsen, L. (1990) Hormones regulating cardiovascular function in patients with severe congestive hearth failure and their relation to mortality. *Cir.* **82**, 1730-1736.
- Tang, Y., Hu, L.A., Miller, W.E., Ringstad, N., Hall, R.A., Pitcher, J. et DeCamilli, P. (1999). Identification of the endophilins (SH3p4/p8/p13) as novel binding partners for the  $\beta_1$ -adrenergic receptor. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **96**, 12559-12564.
- Terman, B.I. et Insel, P.A. (1988) Use of 1-deoxymannojirimycin to show that complex oligosaccharides regulate cellular distribution of the alpha 1-adrenergic receptor glycoprotein in BC3H1 muscle cells. *Mol Pharmacol.* **34**, 8-14.
- Vanhaesebroeck, B. et Waterfield, M.D. (1999) Signaling by Distinct Classes of Phosphoinositide 3-kinases. *Exp. Cell Res.* **253**, 239-254.
- Vanhaesebroeck, B. et Alessi, D.R. (2000) The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem. J.* **346**, 561-576.
- Vanhaesebroeck, B., Leever, S.J., Ahmadi, K., Timms, J., Katso, R., Driscoll, Woscholski, R., Parker, P.J. et Waterfield, M.D. (2001) Synthesis and Function of 3-phosphorylated Inositol Lipids. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 535-602.
- Venugopalan, D.N. et Sealfon, S.C. (2003) Agonist-specific Transactivation of Phosphoinositide 3-Kinase Signaling Pathway Mediated by the Dopamine  $D_2$  Receptor. *J. Biol. Chem.* **278**, 47053-47061.
- Wakatsuki, T., Schlessinger, J. et Elson L.E. (2004) The biochemical response of the hearthto hypertension and exercise. *Trends Biochem. Sc.* **29**, 609-617.
- Wall, M.A., Coleman, D.E., Lee, E., Iñiguez-Lluhi, J.A., Posner, B.A., Gilman, A.G. et Sprang, S.R. (1995) The Structure of the G Protein Heterotrimer  $G_{i\alpha 1}\beta_1\gamma_2$ . *Cell* **83**, 1047-1058.

- Wallukat, G. (2002) The  $\beta$ -Adrenergic Receptor. *Herz*. **27**, 683-690.
- Waters, C.M., Connell, M.C., Pyne, S. et Pyne, N.J. (2005) c-SRC is involved in regulating signal transmission from PDGF $\beta$  receptor-GPCR(s) complexes in mammalian cells. *Cell. Sign.* **17**, 263-277.
- Wedegaertner, P.B., Chu, D.H., Wilson, P.T., Lewis M.J. et Bourne, H.R. (1993) Palmitoylation is required for signalling functions and membrane attachment of Gq alpha and Gs alpha. *J. Biol. Chem.* **268**, 25001-25008.
- Wedegaertner, P.B., Wilson, P.T. et Bourne, H.R. (1995) Lipid Modifications of Trimeric G Proteins. *J. Biol. Chem.* **270**, 503-506.
- Weiss, E.R., Raman, D., Shirakawa, S., Ducceschi, M.H., Bertram, P.T., Wong, F., Kraft, T. et Osawa, S. (1998) The cloning of GRK7, a candidate Cone Opsin Kinase, from Cone-and Rod-Dominant Mammalian Retinas. *Mol. Vis.* **4**, 27-34.
- Wess, J. (1997) G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition. *FASEB J.* **11**, 346-354.
- Wess, J. (1998) Molecular basis of receptor/G-Protein-Coupling Selectivity. *Pharmacol. Ther.* **80**, 231-264.
- Wieland, T., Nürnberg, B., Ulibarri, I., Kaldenberg, S.S., Schultz, G. et Jakobs K.H. (1993) Guanine Nucleotide-specific Phosphate Transfert by Guanine Nucleotide-binding Regulatory Protein  $\beta$ -Subunits. *J. Biol. Chem.* **268**, 18111-18118.
- Wong, S.K-F., Slaughter, C., Ruono, A.E. et Ross, E.M. (1988) The catecholamine binding site of the beta-adrenergic receptor is formed by juxtaposed membrane-spanning domains. *J. Biol. Chem.* **263**, 7925-7928.
- Wong, S.K.-F., Parker, E.M., et Ross, E.M. (1990) Chimeric muscarinic cholinergic:  $\beta$ -adrenergic receptors that activate Gs in response to muscarinic agonists. *J. Biol. Chem.* **265**, 6219-6224.
- Wong, S.K-F. et Ross, E.M. (1994) Chimeric muscarinic cholinergic:  $\beta$ -adrenergic receptors that are functionally promiscuous among G proteins. *J. Biol. Chem.* **269**, 18968-18976.

- Xiao, R-P., Lakatta, E.G. (1995) Functional coupling of the beta 2-adrenoceptor to a pertussis toxin-sensitive G protein in cardiac myocytes. *Mol. Pharm.* **47**, 322-329.
- Xiao, R-P., Cheng, H., Zhou, Y-Y., Kuschel, M. et Lakatta, E.G. (1999) Recent Advances in Cardiac  $\beta_2$ -Adrenergic Signal Transduction. *Circ Res.* **85**, 1092-1100.
- Zamah, A.M., Delahunty, M., Luttrell, L.M. et Lefkowitz, R.J. (2002) Protein Kinase A-mediated Phosphorylation of the  $\beta_2$ -Adrenergic Receptor Regulates Its Coupling to Gs and Gi. *J. Biol. Chem.* **277**, 31249-31256.
- Zaugg, M., Xu, W.X., Lucchinetti, E., Shafiq, S.A., Jamali, N.Z. et Siddiqui, M.A.Q. (2000)  $\beta$ -Adrenergic Receptor Subtypes Differentially Affect Apoptosis in Adult Rat Ventricular Myocytes. *Circ.* **102**, 344-350.
- Zhang, J., Ferguson, S.S.G, Barak, L.S., Ménard, L. et Caron, M.G. (1996) Dynamin and  $\beta$ -Arrestin Reveal Distinct Mechanisms for G protein-coupled Receptor Internalization. *J. Biol. Chem.* **271**, 18302-18305.
- Zhou, X-M., PAK, M., Wang, Z. et Fishman, P.H. (1995) Differences in desensitization between human  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -adrenergic receptors stably expressed in transfected hamster cells. *Cell. Signal.* **7**, 207-217.

