

Université de Montréal

Mécanismes pharmacologiques fondamentaux des antagonistes des récepteurs couplés
aux protéines G exprimés en cellules Sf9

par

Jean Labrecque

Pharmacologie

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiæ Doctor (Ph.D.)
en pharmacologie

Février 1999

© Jean Labrecque, 1999



W
4
U58
2000
V.081

Université de Montréal

Mécanismes pharmacologiques fondamentaux des antagonistes des récepteurs couplés
aux protéines G exprimés en cellules 293

par
Jean Labrecque
Pharmacologie
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophie Doctor (Ph.D.)
en pharmacologie



Février 1999

© Jean Labrecque, 1999

Dr Louis Dumont

président

Dr Michael Dennis

directeur

Dr Louis Eric Trudeau

membre du jury

Dr Pierre Falardeau

examineur externe

représentant du doyen

Sommaire

Les récepteurs couplés aux protéines G sont la porte d'entrée de plusieurs signaux hormonaux. L'activation de ses récepteurs par des ligands agonistes induit une cascade métabolique qui implique des transducteurs (protéine G) et des effecteurs (enzymes) qui produiront en fin de compte l'intégration de la réponse physiologique. Plusieurs ligands des récepteurs sont de puissants agents thérapeutiques. L'étude des mécanismes d'action de ces ligands est donc très importante en pharmacologie. Jusqu'à présent le rôle et surtout l'efficacité des ligands agonistes étaient bien établis, alors que les activités des antagonistes demeuraient fortement associées à la présence de l'agoniste pour laquelle l'antagoniste compétitionne l'interaction avec le récepteur. Ce concept est maintenant remis en question avec l'observation de nouvelles propriétés indépendantes de la présence de l'agoniste. Afin de démontrer la validité d'un concept d'une activité des antagonistes indépendante des agonistes, nous avons étudié trois nouvelles propriétés pharmacologiques des antagonistes du récepteur sérotoninergique 5-HT_{2C} de rat exprimés en cellules Sf9. Ces nouvelles activités des antagonistes du récepteur sont : l'activité agoniste inverse, la sous-régulation atypique ainsi que la sensibilisation fonctionnelle de la réponse du récepteur 5-HT_{2C}. Nos résultats indiquent que les antagonistes de ce récepteur inhibent l'activation spontanée du récepteur, réduisent la densité de sites de liaison et sensibilisent la réponse fonctionnelle du récepteur. Les mécanismes associés à la sous-régulation atypique et la sensibilisation fonctionnelle demeurent, cependant, des modèles mathématiques nous permettent de prédire l'action des agonistes et des agonistes inverses (antagonistes). Afin de nous familiariser avec le modèle étendue à complexe ternaire, nous avons également étudié l'effet du précouplage fonctionnel (interaction récepteur/protéine G) sur la liaison des agonistes inverses du récepteur A1 de l'adénosine exprimé en cellules Sf9. Nos résultats suggèrent que les propriétés pharmacologiques des agonistes inverses sont affectées par l'interaction récepteur/protéine G de manière opposée aux agonistes.

Les nouvelles propriétés des antagonistes décrites dans ce manuscrit auront assurément une grande importance dans l'étude du mécanisme d'action et dans le développement de nouveaux agents thérapeutiques.

Liste des tableaux	7
Liste des figures	8
Liste des abréviations anglaises et françaises	9
Remerciements	11
1. 0 AVANT-PROPOS	12
1. 1 Introduction	13
1. 2 LES RÉCEPTEURS	14
1. 2. 1 Historique de la pharmacologie des récepteurs couplés aux protéines G et impact de la biologie moléculaire sur ce domaine d'expertise	17
1. 3 LES RÉCEPTEURS COUPLÉS AUX PROTÉINES G	19
1. 3. 1 La fonction des protéines G et leur rôle dans le couplage avec le récepteur	25
1. 3. 2 Détails du mécanisme de couplage aux protéines G	35
1. 3. 2. 1 Activation des protéines G par l'activité de la nucléotide diphosphate kinase	39
1. 3. 3 Structure des récepteurs couplés aux protéines G	40
1. 3. 3. 1 Assemblage et localisation membranaire des récepteurs	42
1. 3. 3. 2 Modifications post-traductionnelles des récepteurs couplés aux protéines G	43
1. 3. 3. 3 Structure de la sous-unité α	46
1. 3. 3. 4 Structure de la sous-unité $\beta\gamma$	48
1. 3. 4 Régulation des enzymes effecteurs par les sous-unités des protéines G	51
1. 3. 4. 1 Régulation de l'adénylate cyclase	52
1. 3. 4. 2 Régulation de la phospholipase C	53
1. 3. 4. 3 Régulation des canaux ioniques	55

1. 3. 4. 4	Régulation des phosphotyrosines phosphatases et des MAP kinases	57
1. 3. 5	Régulation des fonctions des récepteurs couplés aux protéines G et mécanismes d'atténuation de la réponse	58
1. 3. 5. 1	Élimination du signal extracellulaire	59
1. 3. 5. 2	Désensibilisation, phosphorylation et action des kinases sur les récepteurs couplés aux protéine	60
1. 3. 5. 3	Endocytose, séquestration et resensibilisation des récepteurs couplés aux protéines G	63
1. 3. 5. 4	Sous-régulation typique et atypique des récepteurs couplés aux protéines G	65
1. 4	PRINCIPES PHARMACOLOGIQUES FONDAMENTAUX	69
1. 4. 1	Nature et aspect quantitatif de l'interaction des médicaments et des récepteurs couplés aux protéines G	69
1. 4. 1. 1	Activité agoniste des médicaments	71
1. 4. 1. 2	Activité antagoniste des médicaments	73
1. 4. 1. 3	Activation spontanée et constitutive des récepteurs couplés aux protéines G et activité agoniste inverse des antagonistes	74
1. 4. 2	Les modèles thermodynamiques du couplage aux protéines G	77
1. 4. 2. 1	La forme simplifiée du modèle d'interaction du complexe ternaire	78
1. 4. 2. 2	Le modèle simplifié de transition à deux états (Two-State Models)	81
1. 4. 2. 3	La forme étendue du modèle d'interaction du complexe ternaire	83
1. 4. 2. 4	La forme complète du modèle d'interaction du complexe ternaire étendu et implication du précouplage fonctionnel	86
1. 4. 3	Autres concepts applicables aux modèles allostériques	90
1. 4. 3. 1	L'évidence de la présence de multiples conformations pour les récepteurs couplés aux protéines G	90
1. 4. 3. 2	Dimerisation des récepteurs couplés aux protéines G	91
1. 4. 3. 3	Phénomène de sensibilisation par les antagonistes des récepteurs couplés aux protéines G	92
1. 5	APPROCHE MOLÉCULAIRE DE L'ÉTUDE DU COUPLAGE AUX PROTÉINES G	95
1. 5. 1	Perturbation de la fonction de couplage	95
1. 5. 2	Reconstitution du système de couplage	96

1. 5. 3 Coexpression des composantes de couplage	97
1. 6 MODÈLES EXPÉRIMENTAUX	98
1. 6. 1 Expression des récepteurs en cellules de mammifères	98
1. 6. 2 Expression des récepteurs en cellules d'insectes Sf9	99
1. 7 PHARMACOLOGIE DES RÉCEPTEURS ÉTUDIÉS	102
1. 7. 1 La famille des récepteurs sérotoninergiques	103
1. 7. 1. 1 Historique de la classification des récepteurs sérotoninergiques	103
1. 7. 1. 2 Le récepteur 5-HT _{2C}	106
1. 7. 1. 3 Désordres associés aux récepteurs sérotoninergiques 5-HT ₂	110
1. 7. 2 La famille des récepteurs de l'adénosine	112
1. 7. 2. 1 Pharmacologie et distribution du récepteur A ₁ de l'adénosine	113
1. 7. 2. 2 Exemples thérapeutiques de médicaments agissant sur les récepteurs A ₁ de l'adénosine	115
2. 0 RÉSULTATS	117
2. 0. 1 Le défi scientifique d'étudier les antagonistes des récepteurs couplés aux protéines G	117
2. 0. 1. 1 Méthodologie et progrès techniques	119
2. 0. 1. 2 Hypothèse de travail	121
2. 0. 1. 3 Caractère novateur et originalité du projet de doctorat	122
2. 0. 2 Résumé des trois études présentées	122
2. 0. 2. 1 Premier article	123
2. 0. 2. 2 Deuxième article	172
2. 0. 2. 3 Troisième article	203
3. 0 DISCUSSION	246
3. 1 Résumé des discussions expérimentales	246
3. 1. 1 Premier article	246
3. 1. 2 Deuxième article	249
3. 1. 3 Troisième article	252

3. 2 Implications pharmacologiques des activités des antagonistes des récepteurs couplés aux protéines G	256
3. 2. 1 Les modèles allostériques de l'interaction récepteur/protéine G	257
3. 2. 2 Les propriétés agonistes inverses des antagonistes des récepteurs couplés aux protéines G: implications thérapeutiques et rôle du système d'expression	266
3. 2. 3 Les propriétés de sur-régulation et de sous-régulation atypiques induites par les antagonistes	272
3. 2. 4 La désensibilisation spontanée des récepteurs couplés aux protéines G et la propriété de sensibilisation de la réponse fonctionnelle du récepteur par les antagonistes	276
3. 3 Rôle des antagonistes en tant qu'agents thérapeutiques et leur impact sur le développement de nouveaux médicaments	280
3. 4 Tendances du domaine de recherche	282
4. 0 Conclusion	283
5. 0 Références	286

Liste des tableaux

Introduction

Tableau I	Liste des récepteurs couplés aux protéines G	23
Tableau II	Diversité des sous-unités α des protéines G	28
Tableau III	Effecteurs modulés par $G\beta\gamma$ et par $G\alpha$	32
Tableau IV	Utilisation thérapeutique des médicaments agissant sur les récepteurs de la sérotonine	105
Tableau V	Affinités de différents ligands sur le récepteur 5-HT _{2c}	109

Section 2. 0. 2. 1

Table 1	Pharmacology of 5-HT _{2C} receptor expressed in Sf9	149
Table 2	Binding affinity of [³ H]mesulergine after an apparent loss of 5-HT _{2C} receptor sites expressed in Sf9 cells	150
Table 3	Apparent loss of binding sites induced by antagonists with 5-HT _{2C} receptors expressed in Sf9 cells	151

Section 2. 0. 2. 2

Table 1	Pharmacology of 5-HT _{2C} receptor expressed in Sf9 cells after different antagonists treatments	189
Table 2	Pharmacology of 5-HT _{2C} receptor expressed in Sf9 cells after metergoline treatments	190
Table 3	Binding affinity of 5-HT after apparent loss of sites for 5-HT _{2C} receptors expressed in Sf9 cells	191

Section 2. 0. 2. 3

Table 1	Binding of [³ H]DPCPX to membranes from CHO and Sf9 cells expressing the rat A1 adenosine receptor	227
Table 2	GTP γ S ³⁵ binding results from membranes of CHO-A1 and Sf9-A1 receptor coexpressed with rat $\alpha_{i3}\beta_1\gamma_2$ G proteins subunits	228
Table 3	Competition binding for DPCPX and CPA with [³ H]DPCPX to CHO membranes expressing the rat A1 adenosine receptor	229
Table 4	Ratio of the different A1 Receptor isoforms in CHO cells according to simulations performed with the fully extended ternary model	230

Liste des figures

Introduction et discussion

Figure 1	Les récepteurs couplés aux protéines G	22
Figure 2	Modèle de couplage récepteur/protéines G	38
Figure 3	Structures secondaires des récepteurs couplés aux protéines G	45
Figure 4	Structure du trimère $G\alpha\beta\gamma$	50
Figure 5	Extension du modèle cubique	261

Première publication, section 2. 0. 2. 1

Figure 1	Functional coupling of the rat5-HT _{2c} receptor to endogenous phospholipase C in Sf9 cells	152
Figure 2	Effects of serotonergic antagonist pre-treatments on IPs release in 5-HT _{2C} -expressing Sf9 cells	154
Figure 3	Effects of serotonergic antagonists on IPs release in 5-HT _{2C} -expressing Sf9 cells	156
Figure 4	Correlation of inverse agonist potencies and binding affinities for baculovirus-expressed 5-HT _{2c} receptor	157
Figure 5	Inhibition of inverse agonist activity by spiroxatrine	159
Figure 6	Apparent loss of [³ H]mesulergine binding after antagonist pretreatment in whole cells and membranes	161
Figure 7	Effect of serotonergic antagonists on the apparent loss of [³ H]mesulergine binding sites in 5-HT _{2c} receptor-containing Sf9 membranes after antagonist pretreatment	163
Figure 8	Time dependence of [³ H]mesulergine binding in membranes	165

Deuxième publication, section 2. 0. 2. 2

Figure 1	Effects of serotonergic antagonists on apparent loss of [³ H]mesulergine binding sites in 5-HT _{2C} -containing Sf9 membranes following antagonist pre-treatment	192
Figure 2	Effects of agonist and inverse agonist on IPs release in 5-HT _{2C} -expressing Sf9 cells after various pre-treatments with metergoline	194
Figure 3	Effects of various serotonergic antagonist pre-treatments on IPs release in 5-HT _{2C} -expressing Sf9 cells	195

Troisième publication, section 2. 0. 2. 3

Figure 1	Effect of GTP γ S on [³ H]DPCPX binding on membranes from CHO-A1 cells and Sf9 cells.	231
Figure 2	Competition binding experiments between [³ H]DPCPX and DPCPX or CPA	233
Figure 3	Association and dissociation kinetic for the binding of [³ H]DPCPX on membranes from Sf9 cells infected with A1 receptors and $\alpha_{13}\beta_1\gamma_2$ subunits	234
Figure 4	Functional coupling of the A1 adenosine receptor coexpressed in Sf9 cells with various G proteins or in CHO cells	236
Figure 5	Dose response curves of [³⁵ S]GTP[S] binding for the A1 receptor expressed in CHO cells or in Sf9 cells coexpressed with $G\alpha i3\beta 1\gamma 2$	238
Figure 6	Computer simulation according to the "fully" extended Ternary Complex Model	239

Liste des abréviations anglaises et françaises

5-HT, 5-hydroxytryptamine; **AC**, adénylate cyclase; **AcNPV**, *Autographia californica* nuclear polyhedrosis virus; **ADN** acide déoxyribonucléique; **ARF**, ADP rybosilating factor; **ARN**, acide ribonucléique; **BSA**, bovine serum albumine; **CHA**, N⁶-cyclohexyladénosine; **CHO**, Chinese hamster ovarian cells; **CPA**, N⁶-cyclopentyladénosine; **DAG**, dyacylglicérol, **D. O. I.**, 2,5-Dimétoxy-4-iodoamphétamine hydrobromide; **DPCPX**, 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine; **EC₅₀**, drug potency (*concentration producing 50 % of the maximal response*); **EDTA**, ethylenediaminetetracetic acid; acide éthylènediaminetétracétique; **E_{max}**, maximal drug efficacy; **GDP**, guanosine diphosphate; **GMP**, guanosine monophosphate; **G proteins**, guanine nucleotide-binding regulatory proteins; **GRK**, G proteins receptor kinase; **GTP**, guanosine triphosphate; **GTP γ S**, guanosine 5'-(3-O-thio)triphosphate; **HEPES**, 4-(2-hydroxyethyl)1-piperazineethanesulfonic acid; **IC₅₀**, drug competitive potency (*concentration inhibiting 50 % of agonist activity*); **IPs**, total inositol phosphates; inositoles phosphate totaux; **K_i**, **K_d**, drug affinity constant; **M. O. I.**, multiplicity of infection; **pA₂**, apparent affinity (*deduced from Schild analysis*); **NECA**, 5'-N-éthylcarboxamidoadénosine; **PBS**, phosphate buffered saline; **PCR**, polymerase chaine reaction; **PI3K**, phosphoiositide 3 kinase; **PKA**, protéine kinase A; **PKC**, protéine kinase C; **PLA₂**, phopholypase A₂; **PLC**, phopholypase C; **Protéines G**, protéines régulatrices liant les nucléotides guanylés; **PTH**, hormone parathyroïdienne; **PTX**, toxine pertussis; **RCG**, récepteurs couplés aux protéines G; **RGS**, regulator of G proteins signaling; **RACE**, Rapid Amplification of cDNA ends; **RPIA**, (r)N⁶-phénylisopropyladénosine; **Sf9**, *S. frugiperda* pupal ovarian cells; **SNC**, système nerveux central; **TBS**, Tris buffered saline; **TM**, domaine transmembranaire; **TPCK**, n-tosyl-L-phenylalanine chlorométhyl cétone; **XAC**, xanthine amine congener.

J'aimerais dédier ce manuscrit à deux femmes qui m'ont inspiré dans ma démarche scientifique et personnelle. La première de ces femmes est ma mère Lorraine qui m'a toujours supporté moralement et financièrement dans mes aspirations professionnelles. Sans ses judicieuses interventions, ce projet de doctorat ne se serait probablement jamais concrétisé. Ma mère a également su m'encourager à développer, un aspect de ma personnalité qui est tout aussi important que la logique prônée par la science. Il s'agit de la créativité. C'est grâce à l'équilibre entre les forces créatrices et les forces rationnelles que je tire mon désir de connaître et de comprendre l'univers qui nous entoure. La D^r Annik Fargin est l'autre femme qui a su également m'inspirer par son immense courage devant l'adversité et la maladie. Sa philosophie positive face à la vie m'a incité à continuer malgré les difficultés et les nombreuses frustrations qu'apportent les études supérieures. Son exemple nous enseigne à tous que nos petits "problèmes" ne justifient jamais que l'on s'apitoie sur son sort. Au contact de ces femmes, j'ai réalisé que l'intelligence ne vient pas de ce que l'on sait mais, plutôt, de la façon dont nous gérons ce savoir afin de vivre heureux et en paix avec soi-même et les autres.

Merci Lorraine!

Merci Annik!

Avec la fin de ce projet de doctorat, une étape importante de ma vie vient d'être franchie.

Jean

Remerciements

J'aimerais remercier mon superviseur, le D^r Michael Dennis, pour son support financier et pour la confiance qu'il a su démontrer envers mes travaux de recherche. J'aimerais également remercier tous mes amis et collaborateurs chez BioSignal, plus spécialement le D^r Luc Ménard pour sa rigueur et son enthousiasme scientifique. J'ai beaucoup appris chez BioSignal et je vous remercie tous de m'avoir encouragé. Je tiens aussi à remercier le D^r André De Léan de l'Université de Montréal et le D^r Peter Chidiac pour leurs contributions indispensables à mes travaux de recherche. J'aimerais aussi tout spécialement remercier ma copine Suzanne pour son encouragement, son appui inconditionnel, son aide précieuse dans la rédaction de ce manuscrit ainsi que pour le travail ardu et les sacrifices que nous avons partagés ensemble dans cette aventure.

1. 0 AVANT-PROPOS



“Were this thinking not in the framework of scientific York, it would be considered paranoid. In scientific York, creative thinking demands seeing things not seen previously, or in ways not previously imagined; and this necessitates jumping off from 'normal' positions, and taking risks by departing from reality. The difference between the thinking of the paranoid patient and the scientist comes from the latter's ability and willingness to test out his fantasies or grandiose conceptualizations through the systems of checks and balances science has established and to give up those schemes that are shown not to be valid on the basis of these scientific checks. It is specifically because science provides such a framework of rules and regulations to control and set bounds to paranoid thinking that a scientist can feel comfortable about taking the paranoid leaps. Without this structuring, the threat of such unrealistic, illogical, and even bizarre thinking to overall thought and personality organization in general would be too great to permit the scientist the freedom of such fantasizing.”



Bernice Eiduson

1.1 Introduction

En ce qui a trait à la majeure partie de l'histoire de la pharmacologie des récepteurs, la découverte des molécules-ligands biologiquement actives s'est surtout centrée sur le criblage de produits chimiques basé sur des systèmes pharmacologiques d'origine animale contenant des récepteurs que l'on supposait être similaires à ceux issus des tissus humains. Ce concept de similarité vient principalement du fait que les composés endogènes (neurotransmetteurs) sont souvent les mêmes chez l'animal et l'humain. Il en découle que la reconnaissance de l'unité de liaison de ses substances endogènes (les récepteurs) devrait être assez similaire pour permettre de détecter des activités équivalentes qui feraient le pont entre les observations animales et leurs résultats chez l'humain. La science de la pharmacologie des récepteurs s'est développée autour de cette prémisse.

Aujourd'hui, les progrès de la biologie moléculaire ont grandement réduit notre dépendance envers des systèmes pharmacologiques d'origine animale. Ainsi, la démarche rationnelle vers une correspondance totale du système pharmacologique moléculaire avec le modèle animal, c'est-à-dire le criblage de ligands sur des récepteurs humains, exprimés dans les tissus appropriés et reproduisant des conditions pathologiques, est possible grâce à la biologie moléculaire. Alors que les systèmes d'origine animale sont facilement disponibles et peuvent être considérés comme "physiologiques", la limitation évidente de ces systèmes vient du fait que leurs récepteurs sont des "fac-similés" des récepteurs humains. Ce sont des copies qui ne sont pas toujours conformes à l'original. Une des caractéristiques tissulaire les plus problématiques est leur hétérogénéité cellulaire et leur hétérogénéité en sous-types de récepteurs cellulaires retrouvés dans les tissus. Cette caractéristique leur permettrait ainsi de maximiser la réponse aux multiples signaux extracellulaires. Cependant, cette caractéristique peut également mener à une classification erronée, lors de la mesure de l'effet d'un ligand sur un mélange de sites de liaison présent dans une préparation tissulaire. Pour ces raisons, il devient évident que l'évaluation de nouveaux médicaments se fera préférentiellement sur des cibles humaines (ou équivalentes) bien identifiées. Ces cibles humaines seront plus facile à étudier si elles sont évaluées dans

des conditions où l'on contrôle la nature, l'environnement et la stoechiométrie des éléments qui affectent les propriétés d'un récepteur. La pharmacologie moderne fait donc face au défi d'étudier des cibles moléculaires isolées tout en considérant qu'elles font partie d'un système biologique complexe.

Cet état de fait impose que les frontières propres à chaque discipline des sciences biologiques ne sont plus aussi marquées qu'il y a vingt ou cinquante ans. À l'heure actuelle, la recherche suscite de multiples contraintes expérimentales qui font en sorte que l'on doit être à la fois spécialiste d'un domaine et habile à évoluer dans différents champs d'expertise. C'est avec la volonté d'intégrer de nouvelles techniques pharmacologiques et de développer de nouveaux systèmes que j'ai abordé l'étude des propriétés pharmacologiques des antagonistes des récepteurs couplés aux protéines G. Cette thèse rapporte les résultats de mes efforts dans l'étude des activités des antagonistes et des conditions qui affectent ces activités. J'ai eu la chance d'être témoin et, même, de participer au développement de nouveaux concepts relatifs aux propriétés des antagonistes. L'introduction qui suit présente, au meilleur de mes connaissances, les progrès récents dans le domaine des récepteurs couplés aux protéines G.

1. 2 LES RÉCEPTEURS

Généralités des différents types de récepteurs

Les récepteurs peuvent être considérés comme des détecteurs dans les systèmes de communications chimiques qui coordonnent les différentes fonctions de toutes les cellules du corps humain. Les messages chimiques qui régulent les récepteurs proviennent de substances qui variables tel les hormones circulantes ou les neurotransmetteurs.

L'importance des récepteurs, en tant que cible pharmacologique, est indéniable car plusieurs centaines de médicaments interagissent avec eux. C'est la raison pour laquelle les récepteurs sont les cibles pharmacologiques les plus étudiées.

Les récepteurs sont des entités protéiques généralement localisées au niveau de la membrane plasmique (certains sont nucléaires). Ils peuvent être classifiés en quatre grandes familles selon leur structure moléculaire et la nature de leur signalisation intracellulaire.

Le premier type de récepteurs (type 1) comprend les récepteurs impliqués dans la signalisation rapide des neurotransmetteurs qui sont directement couplés à un canal ionique. Le récepteur nicotinique de l'acétylcholine (nACh), les récepteurs gabergiques, les récepteurs du glutamate de même que les récepteurs 5-HT₃ en sont des exemples. Le prototype le mieux défini de ce type de récepteur-canal (récepteur ionotropique) est le récepteur nicotinique (¹). Ces récepteurs présentent généralement des structures oligomériques formées de différentes sous-unités dont la fonction varie selon la nature de ces sous-unités. Les récepteurs-canaux contrôlent les événements électrochimiques les plus rapides du système nerveux.

Le second type de récepteurs comprend les récepteurs de plusieurs hormones circulantes et des neurotransmetteurs (amines biogéniques et peptides) qui sont couplés à des systèmes effecteurs par l'intermédiaire d'une protéine transductrice, la protéine G. Ce sont des membres de ce type de récepteurs couplés aux protéines G qui sont le sujet d'étude du présent document et dont les particularités pharmacologiques sont traitées plus abondamment dans les sections suivantes. Cependant, aux fins de comparaison, nous pouvons décrire ces récepteurs comme étant des protéines membranaires composées d'une chaîne de 400 à 500 acides aminés formant sept hélices α , constituant sept passages transmembranaires qui composent les régions de plus fortes homologues entre les différents membres de cette famille de récepteurs. Par ailleurs, leur région amino-terminale extracellulaire et carboxi-terminal intracellulaire démontre la plus grande variabilité entre les diverses familles de récepteurs couplés aux protéines G. La structure fonctionnelle de ce type de récepteurs fut, en grande partie, déduite à partir de connaissances acquises sur la structure tridimensionnelle de la bactériorodopsine et de connaissances pharmacologiques déduites du récepteur β adrénergique (pour revue ²). La protéine G est l'intermédiaire biochimique qui permet au signal provenant de la membrane (via le récepteur) de se propager vers les effecteurs intracellulaires qui sont responsables de la production de

seconds messagers. La protéine G est une protéine attachée à la membrane et elle est composée de trois sous-unités ($\alpha\beta\gamma$) formant un trimère. Lorsque le trimère se lie à un récepteur activé par la liaison d'un agoniste, la sous-unité α échange le GDP pour le GTP et se dissocie du dimère $\beta\gamma$. Les deux composantes peuvent alors moduler les activités de différents effecteurs cellulaires. L'activation de l'effecteur se termine lorsque le GTP lié est hydrolysé par l'activité GTPasique intrinsèque de la sous-unité α , permettant ainsi la réassociation avec le dimère $\beta\gamma$ (³). Il existe plusieurs types de protéines G qui interagissent avec différents récepteurs et effecteurs. Nous les aborderons dans les sections 1. 3. 1 et 1. 3. 4.

Les récepteurs tyrosine-kinase (incluant les récepteurs guanylate cyclase) représentent le troisième type de récepteurs pharmacologiques. Ces récepteurs sont très différents des récepteurs couplés aux protéines G, tant au niveau structural qu'au niveau de leurs fonctions biochimiques. Ils modulent les actions de différents facteurs de croissance et de différents peptides comme l'insuline ou les facteurs natriurétiques. Ces récepteurs sont formés d'un large domaine extracellulaire et d'un domaine intracellulaire comprenant le domaine effecteur tyrosine-kinase. Leur signalisation implique généralement la dimérisation du récepteur suivi d'une autophosphorylation de la tyrosine de la région intracellulaire. Ces résidus phosphotyrosine sont des sites accepteurs de protéines régulatrices intracellulaires comprenant un domaine SH2 qui permet le contrôle de multiples fonctions cellulaires incluant la division et la différenciation (⁴).

Le dernier type de récepteurs sont les récepteurs régulant la transcription d'ADN dans la cellule. Les ligands de ces récepteurs incluent les hormones stéroïdiennes, thyroïdiennes ainsi que l'acide rétinoïque et la vitamine D. Ces récepteurs sont des récepteurs nucléaires qui comportent un domaine de liaison de l'ADN (Zinc fingers) relié à des domaines variables de liaison de ligands et de contrôle transcriptionnel. Le domaine de liaison de l'ADN reconnaît des séquences spécifiques d'acides nucléiques activant ainsi la transcription spécifique de certains gènes. Les différents patrons d'activation de gènes observés avec un ligand sont dépendants du type cellulaire et de la nature du ligand. Une multitude de réponses peuvent ainsi être possibles. Généralement, les effets de l'activation de ces récepteurs découlent de l'augmentation de la synthèse protéique, ce qui résulte en

une lente activation de la réponse cellulaire provoquée (⁵). Cette brève description résume les quatre grandes familles de récepteurs. Examinons maintenant de plus près la famille des récepteurs couplés aux protéines G.

1. 2. 1 Historique de la pharmacologie des récepteurs couplés aux protéines G et impact de la biologie moléculaire sur ce domaine d'expertise

Depuis les années 70, la pharmacologie est entrée dans une nouvelle phase, celle des récepteurs couplés aux protéines G. Les récepteurs couplés aux protéines G, qui étaient demeurés uniquement des entités hypothétiques émergent maintenant comme des entités biologiques concrètes grâce à l'utilisation de radioligands qui permirent en même temps de démontrer l'existence de sites de liaison biologique des médicaments. La disponibilité du ligand radioactif liant le récepteur avec une haute affinité rend également possible l'isolation et la purification de ses récepteurs. Les détergents utilisés pour l'extraction de protéines membranaires et les techniques de chromatographie par affinité ont également été utilisées pour absorber et extraire les récepteurs des tissus. Une fois le récepteur isolé et purifié, il fut possible d'analyser la séquence en acides aminés de courts fragments de la ou des protéines formant le récepteur ce qui permit également de déduire la séquence correspondante de l'ARN messenger codant pour le récepteur. C'est à partir de ces nouveaux développements techniques que l'impact de la biologie moléculaire a eu le plus d'influence sur la pharmacologie et sur l'étude des récepteurs couplés aux protéines G.

À partir des séquences déduites du récepteur purifié, des sondes moléculaires d'oligonucléotides peuvent être synthétisées et utilisées pour isoler des séquences en ADN partielles ou entières du gène codant le récepteur. Selon la méthode conventionnelle de clonage par "cDNA", à partir d'une librairie provenant de tissus riches en récepteurs cibles, les gènes présentant une forte homologie de séquence pourront être isolés. Alternativement, une stratégie de clonage par expression fut plus récemment utilisée pour isoler de nouveaux récepteurs sans l'inconvénient et l'ambiguïté du criblage par oligonucléotides. Cette approche met à profit l'utilisation de systèmes d'expression par vecteurs d'expression de cDNA qui permettent la production de protéines recombinantes (le

récepteur faisant partie du grand nombre de protéines produites). Un criblage physiologique ou biochimique permet ultérieurement de détecter les clones possédant le cDNA codant pour le récepteur. Malgré le fait que cette démarche soit laborieuse, elle a permis d'isoler et d'identifier de nouveaux récepteurs sans avoir à les purifier.

Il est également possible d'introduire de l'ADN étranger dans différents types de cellules de mammifères, d'insectes ou de batraciens, soit par transfection de vecteurs d'expression, soit par infection à l'aide de virus recombinants. Ces approches permettent aux pharmacologues de suivre l'apparition du récepteur par la présence du signal de liaison spécifique au récepteur. Elle sont aussi largement utilisées pour étudier les propriétés pharmacologiques de liaison caractéristique du récepteur, ce qui permet d'établir son profil pharmacologique sans les risques de contamination par d'autres types de récepteurs. Cette situation est fréquente dans les tissus qui présentent souvent de multiples sous-types de récepteurs. À l'heure actuelle, les stratégies de clonage des récepteurs misent beaucoup plus sur la chance que sur une approche systématique d'isolation et de clonage à partir de séquences d'oligonucléotides déduites de la protéine purifiée. Les nouvelles stratégies reposent principalement sur le niveau élevé d'homologie de séquence entre différents récepteurs. Les régions de forte homologie (régions des transdomaines) permettent, grâce aux techniques de PCR (Polymerase Chain Reaction) et de RACE (Rapid Amplification of cDNA ends), la réplique de molécules d'ADN contenant cette région de forte homologie. Par cette approche, on recherche des homologies de séquence avec des récepteurs connus. Ces fragments (partiels ou complets) sont alors hybridés avec une librairie de cADN dans l'espoir d'identifier une nouvelle séquence codant pour un nouveau récepteur. Les résultats de cette démarche demeurent, toutefois imprévisibles, cependant, plusieurs récepteurs orphelins (dont l'appartenance à une famille n'a pu être établie) furent clonés à l'aide de cette approche. Cette démarche ouvre ainsi la porte à de nouveaux domaines d'étude des récepteurs couplés aux protéines G.

Il ne fait aucun doute que la pharmacologie a bénéficié et continue toujours de profiter des progrès de la biologie moléculaire. Aujourd'hui, les frontières entre les différentes disciplines des sciences biologiques ne sont plus aussi bien définies qu'il y a vingt ans. C'est pourquoi dans l'état actuel de la science, la biologie moléculaire n'est pas

une fin en elle-même pour le pharmacologue, mais bien plus un puissant outil qui lui permet d'étudier les cibles pharmacologiques (récepteurs, enzymes) qui sont les sites d'action des médicaments. En plus du clonage de récepteurs, la biologie moléculaire a également permis une meilleure compréhension de la relation entre la structure et l'activité de la protéine grâce aux études de mutagenèse dirigée et à l'ingénierie moléculaire de récepteurs chimériques. Le génie génétique appliqué aux récepteurs couplés aux protéines G nous permet d'aborder des études biochimiques exhaustives de ces récepteurs selon une approche moléculaire de leur mécanisme d'action. Les pharmacologues de demain mettront à profit les nouvelles techniques provenant de différents domaines d'expertise dans le but évident de comprendre le mécanisme d'action des médicaments, tant au point de vue physiologique que moléculaire. C'est dans cet esprit d'intégration de nouvelles techniques scientifiques et dans le but d'étudier les mécanismes fondamentaux propres aux récepteurs couplés aux protéines G que le présent manuscrit vous est présenté.

1. 3 LES RÉCEPTEURS COUPLÉS AUX PROTÉINES G

La grande famille des récepteurs couplés aux protéines G comprend les récepteurs les mieux connus et les plus étudiés par les pharmacologues. Ces récepteurs sont impliqués dans la transmission et la modulation d'informations au niveau du système nerveux central et du système endocrinien, ainsi que dans presque toutes les autres fonctions biologiques des organismes supérieurs. On retrouve, ainsi dans la catégorie des récepteurs couplés aux protéines G: les récepteurs muscariniques, sérotoninergiques, adrénergiques, dopaminergiques, purinergiques, aux opiacés et peptides de toutes sortes et plusieurs autres, incluant ceux des chémokines et des récepteurs olfactifs. Jusqu'à présent, des centaines de récepteurs couplés aux protéines G ont été identifiés et/ou clonés, faisant de ce type de protéines membranaires l'une des plus grandes superfamilles impliquées dans la signalisation cellulaire.

On retrouve les récepteurs couplés aux protéines G chez la plupart des eucaryotes, du plus simple organisme unicellulaire comme la levure *S. Cervisiae* jusqu'aux organismes

pluricellulaires complexes. Dans l'organisme humain, les récepteurs couplés aux protéines G sont présents dans à peu près tous les types cellulaires, on les retrouve ainsi dans tous les tissus humains. Par ailleurs, chaque récepteur (sous-type) démontre une certaine spécificité d'expression pour certains tissus ou cellules. Cependant, il est rare qu'un tissu ou type cellulaire possède un seul type de récepteurs. Cette hétérogénéité tissulaire rend parfois difficile l'étude d'un sous-type particulier de récepteur. C'est pourquoi l'expression de récepteurs de sous-type connu dans des systèmes d'expression hétérologues fut mise à profit lors de la dernière décennie. La classification des récepteurs couplés aux protéines G a été établie principalement selon des critères d'homologie génétique ainsi que selon le profil pharmacologique (caractéristiques de liaison) du récepteur. Les récepteurs sont d'abord classés par type de familles puis catégorisés par type de récepteurs puis, finalement, identifiés selon le sous-type du récepteur. Ainsi, le récepteur 5-HT_{2C} fait partie de la famille des récepteurs sérotoninergiques, de type 5-HT₂ (couplage à la phospholipase C) dont le sous-type pharmacologique est 5-HT_{2C}. La nomenclature (sa classification pharmacologique) finale d'un récepteur est déterminée par un comité scientifique qui appuiera sa décision sur la signature pharmacologique opérationnelle du récepteur, sur des considérations transductionnelles du récepteur (couplage à l'effecteur), et selon des particularités structurales propres à ce récepteur. Pour une explication plus détaillée des nuances de la nomenclature des récepteurs couplés aux protéines G, Hoyer et Huphrey (6) présentent une approche intégrative de cette tâche qui est parfois difficile et ambiguë en raison du manque d'informations nécessaire à la classification de certains récepteurs.

Le récepteur couplé aux protéines G est la porte d'entrée par laquelle s'intègrent et convergent de multiples signaux biochimiques (hormones, neurotransmetteurs, etc.) qui produiront, suite à l'activation de la cascade du couplage du récepteur, une réponse cellulaire. La réponse cellulaire ainsi produite peut alors prendre de multiples formes selon le type de cellule et le type du récepteur activé par l'hormone ou le neurotransmetteur. Ces réponses peuvent être aussi simples que la contraction ou la dilatation d'un muscle lisse, en passant par la dépolarisation d'un neurone, et être aussi complexes que la régulation de certains gènes par la cascade des mapkinases (section 1.3.4.4). La figure suivante est une

représentation schématique d'un récepteur couplé aux protéines G. Le tableau I nous rapporte une liste de la plupart des récepteurs connus.

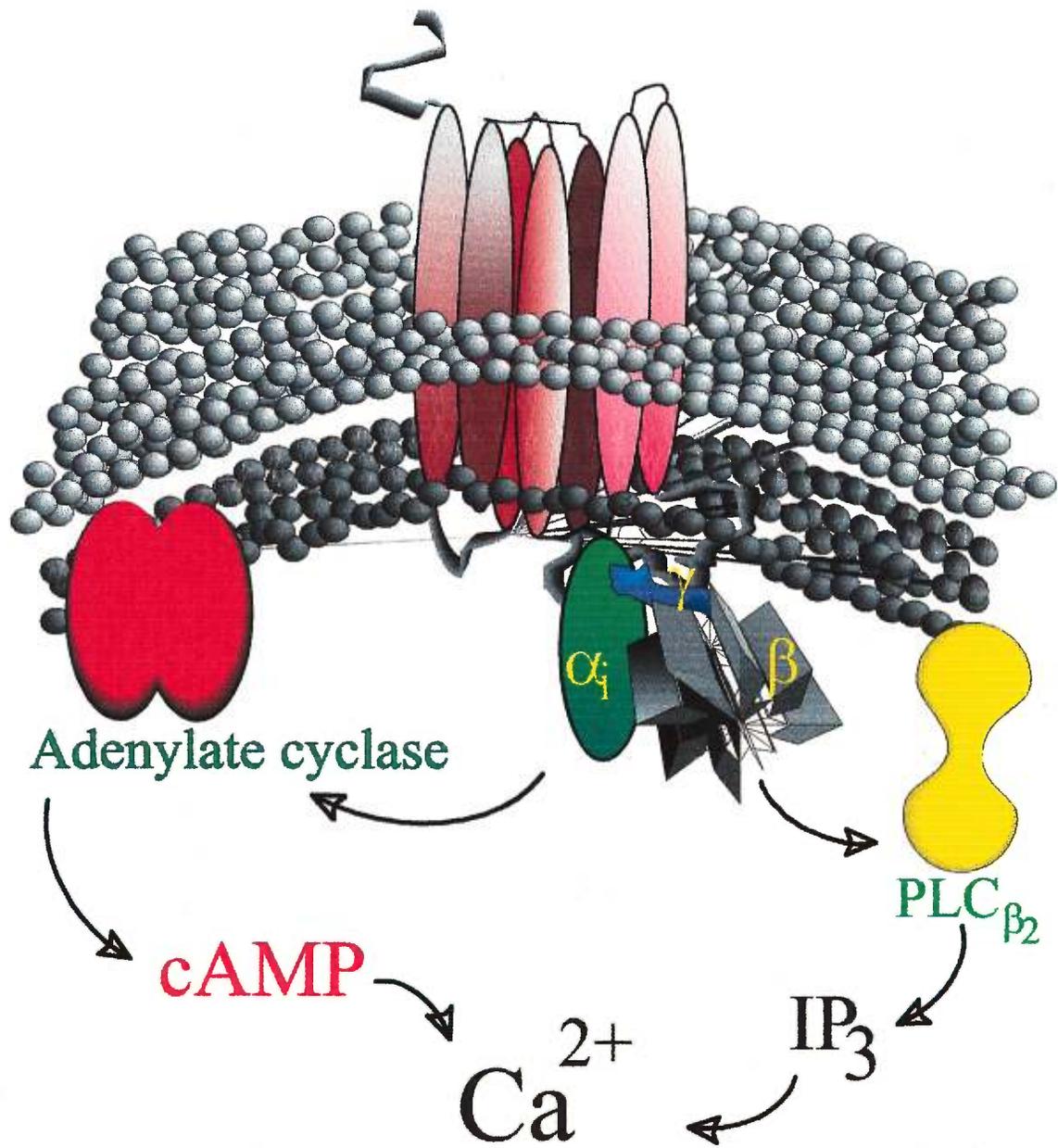


Figure 1. Récepteurs couplés aux protéines G

Tableau I

Liste des récepteurs couplés aux protéines G

Membres		Sous-types		
Acétylcholine	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄ M ₅
Adénosine	A ₁	A _{2a} , A _{2b}	A ₃	
Adrénergique	α_{1A} , α_{1B} , α_{1d}	α_{2a} , α_{2b} , α_{2c}	β_1 , β_2 , β_3	
Angiotensine	AT ₁	AT ₂		
Bombésine	BB ₁ , BB ₂ , bb ₃			
Bradykinine	B ₁	B ₂		
*CGRP	CGRP	amyline	adrénoméduline	gastrine
Ca ²⁺				
Canabinoïde	CB ₁	CB ₂		
Chémokine CC	CCR ₁	CCR ₂	CCR ₃	CCR ₄ CCR5
Chémokine CXC	CXR ₁	CXR ₂	CXR ₃	CXR ₄
Cholecystokinine	CCKa	CCKb		
**CRF	CRF ₁	CRF _{2α} , CRF _{2β}		
Dopamine	D ₁	D ₂ (1 et c)	D ₃	D ₄ , 2 ₃ , 4 ₁ , 4 ₂ , 4 ₃ , 4 ₄ , 4 ₅ , 4 ₆ , 4 ₇ D ₅
Endothéline	ETA	ETB		

1. 3. 1 La fonction des protéines G et leur rôle dans le couplage avec le récepteur

Une unité de transduction pour les récepteurs couplés aux protéines G est composée de trois acteurs: le récepteur, le transducteur (protéine G) et l'effecteur (enzyme ou canal ionique). La cascade métabolique impliquée dans la signalisation des récepteurs couplés aux protéines G peut ainsi être disséquée en trois étapes:

1) Le couplage récepteur/protéine G : Le récepteur est transmembranaire et interagit indirectement avec l'effecteur. Il reçoit d'abord une stimulation extracellulaire (liaison d'agonistes) qui entraînera un changement de conformation et favorisera l'activation de la protéine G, une protéine cytoplasmique associée à la membrane qui transmettra et amplifiera le signal à l'intérieur de la cellule vers un éventuel effecteur. Le récepteur activé par l'agoniste, activera à son tour la protéine G trimérique qui catalysera alors l'échange du GDP pour le GTP sur un site de liaison des nucléotides guanylés sur la sous-unité α des protéines G. Cette étape implique la formation d'un complexe ternaire récepteur/protéine G dont différents modèles seront abordés plus loin à la section 1.4.2. Selon ces modèles, l'activation du récepteur peut soutenir l'activation de plusieurs protéines G, favorisant ainsi une amplification du signal, ou encore, ces protéines peuvent retourner à un état inactif pour subir une nouvelle activation par l'agoniste. Selon ce modèle, la protéine G transductrice représente le niveau intermédiaire de "management" qui intervient pour intégrer l'information venant du récepteur vers les effecteurs.

2) Le couplage protéine G/effecteur : Suite à son activation, la protéine G se dissocie en deux composantes, une sous-unité α -GTP et un dimère $\beta\gamma$. Ces deux composantes pourront moduler les activités des enzymes effecteurs responsables de la production des messagers secondaires. L'effecteur activé, la réponse biologique apparaît. Les changements dans l'activité des effecteurs altèrent le niveau des messagers secondaires intracellulaires qui peuvent ainsi moduler une multitude de processus biochimiques

menant finalement à l'intégration complète de la réponse découlant d'une stimulation du récepteur.

3) La terminaison du signal: Le signal dépendant de la protéine G est transitoire, il se termine grâce à l'activité GTPasique de la sous-unité α qui induit l'hydrolyse du GTP lié en un GDP- α . Sous cette forme, la sous-unité α retourne à son état initial (état de base inactif) en se réassociant avec le dimère $\beta\gamma$.

Dans cette cascade de signalisation, les protéines G sont les premières responsables de l'amplification du signal du récepteur et aussi de l'acheminement de ce signal vers l'effecteur approprié. Les signaux provenant de différents récepteurs peuvent être reçus par une ou plusieurs protéines G pour moduler soit les niveaux d'un unique second messenger ou encore les activités de différents effecteurs. Les signaux de stimulation ou d'inhibition peuvent ainsi être intégrés au niveau du transducteur. Les protéines G se présentent comme des hétérotrimères composées de trois sous-unités, une sous-unité α et un dimère $\beta\gamma$. Les sections suivantes aborderont les rôles fonctionnels des différentes sous-unités des protéines G puisqu'ils sont la pierre angulaire de circuits complexes de réponses aux neurotransmetteurs. C'est pourquoi une large proportion de cette introduction examine la fonction de ces protéines G transductrices.

Les protéines G constituent une famille de protéines homologues de différents sous-types. À l'heure actuelle, entre 15 et 20 protéines ont été identifiées comme étant des protéines G. Les protéines G sont des hétérotrimères constitués de trois sous-unités: une sous-unité α catalytique (39-54kDa), principal modulateur d'effecteurs et un dimère $\beta\gamma$ également modulateur d'effecteurs (β 35-36 kDa) (γ 7-8 kDa). La versatilité de modulation des fonctions complexes de signalisation des protéines G vient des activités distinctes de régulation de leurs sous-unités.

Historiquement, les protéines G ont été identifiées en fonction de l'effecteur et du type de modulation qu'elles entraînent. Leur classification est donc établie en fonction de l'activité modulatrice des différentes sous-unités alpha. Ainsi les Gs (α_s) sont des protéines stimulatrices de l'adénylate cyclase. Un gène α_s code pour 4 variantes

d'épissage ayant des poids moléculaires relatifs variant de 45 à 52kDa (⁷). La contrepartie des Gs sont les protéines Gi qui sont des protéines inhibitrices de l'adénylate cyclase. Elles regroupent des protéines issues de trois gènes distincts, α_{i-1} (41kDa), α_{i-2} (40kDa) et α_{i-3} (41kDa) (⁸). Go est la protéine G la plus abondante dans le cerveau, un seul gène code pour deux variantes d'épissage produisant des protéines de poids moléculaire de 39kDa (^{9,10}). Le ou les effecteurs modulés par α_o ne sont malheureusement, pas aussi évidents que pour Gs et Gi. On associe tout de même à α_o l'inhibition de courant Ca^{2+} dans les neurones et, également, la modulation d'une partie des activités des phospholipases C, plus spécifiquement celles qui sont sensibles à la toxine du pertussis. Par ailleurs, d'autres protéines transductrices tel que G α_q (¹¹), sont avant tout responsable du couplage à la phospholipase C de manière insensible à la toxine du pertussis.

Certaines protéines G démontrent aussi des sélectivités dans leurs localisations d'expression. Golf, une parente très proche de Gs, se retrouve exclusivement au niveau du système olfactif et possède les mêmes activités biochimiques que les autres α_s . Son poids moléculaire est de 45 kDa (¹²). D'autres protéines G appartiennent exclusivement au domaine visuel, il en est ainsi pour les deux transducines (α_t), isolées des bâtonnets ou des cônes (39 et 40 kDa). Elles interagissent avec la phosphodiesterase à GMP cyclique. Il existe également quelques protéines G qui ne sont pas encore bien caractérisées. Une nouvelle α_z/x , de même que trois autres gènes qui lui sont homologues, issus de la réaction d'amplification du produit de la polymérase sur l'ADN génomique (PCR), restent encore sans fonction modulatrice d'effecteurs (^{13,14}). Le tableau II résume la grande diversité de localisation et de fonction rencontrée chez les différentes sous-unité α des protéines G.

Tableau II

Diversité des sous-unités α des protéines G

Sous-unité α	Substrat de	Expression cellulaire	Effecteurs
Gs (court et long)	CTX	ubiquitaire	* AC, * canal Ca^{2+}
Golf	CTX	olfaction	* AC
Gt₁	PTX/CTX	bâtonnets	* cGMP-phosphodiesterase
Gt₂	PTX/CTX	cônes	* cGMP-phosphodiesterase
Ggust	PTX	gustation	?
Gi₁	PTX	Neuronal	* AC, * canal K^+
Gi₂	PTX	ubiquitaire	* AC, * canal K^+
Gi₃	PTX	ubiquitaire	* AC, * canal K^+
Gz		neuronal et autres	* AC, * canal K^+
Go₁	PTX	neuronal et autres	* canal Ca^{2+} , * PLC ?
Go₂		neuronal	* canal Ca^{2+} , * PLC ?
Gq		ubiquitaire	* Phospholipase C β
G₁₁		ubiquitaire	* Phospholipase C β
G₁₄		poumons, reins	* Phospholipase C β
G₁₅		cellules sanguines	* Phospholipase C β
G₁₆		cellules sanguines	* Phospholipase C β
G₁₂		ubiquitaire	?
G₁₃		ubiquitaire	?

CTX, toxine du choléra; PTX, toxine pertussis; AC, adénylate cyclase; PLC, phospholipase C.

Le dimère $\beta\gamma$

Les deux autres sous-unités, β et γ forment un dimère indissociable et ne présentent pas, jusqu'à présent, autant de diversité que les sous-unités α . Néanmoins, il existe cinq sous-unités β clonées, dont deux sont visibles par analyse d'électrophorèse, β_1 (36 kDa) et β_2 (35 kDa) (¹⁵). Neuf sous-unités γ , variant en masse de $\gamma_{1(t)}$ (8 kDa) (¹⁶) à γ_2 (7 kDa) augmentent la complexité de la composition de l'hétérotrimère. Alors, la question suivante se pose sur l'identité propre d'un trimère donné : la multitude de combinaisons formant un trimère est-elle à l'origine de la spécificité de sélectivité pour un récepteur donné? Rien ne nous permet, à l'heure actuelle, d'expliquer la raison de l'énorme diversité des protéines G. Il n'est pas rare qu'à l'intérieur d'une même cellule possédant déjà différents récepteurs, on retrouve plusieurs sous-types de protéines G modulant et régulant de façon concertée les signaux reçus au niveau de la membrane.

Les sous-unités $\beta\gamma$ possèdent des activités régulatrices des effecteurs (voir tableau III). Il en résulte une variété de patrons de régulation qui peuvent provenir de la régulation (par l'une ou l'autre) des sous-unités ou bien par une régulation synergique ou additive des deux sous-unités activées de la protéine G. Le dimère $\beta\gamma$ joue un rôle important de médiateur dans la signalisation d'au moins trois systèmes effecteurs bien caractérisés. Premièrement, $\beta\gamma$ module les activités des canaux potassiques, soit par une action directe sur le canal ou soit par une voie plus controversée qui impliquerait l'activation de PLA_2 et la voie métabolique de l'acide arachidonique. Un second rôle de $\beta\gamma$ comme transducteur du signal provenant du récepteur est associé à l'activation de la phospholipase C qui module la cascade métabolique des phosphoinositoles. Les isoformes $PLC\beta_2$ et $PLC\beta_3$ sont particulièrement sensibles à l'activation par le dimère $\beta\gamma$. Par cette voie d'activation, les $\beta\gamma$ provenant de l'activation de G_i ou G_o modulent les activités sensibles à la PTX associées à la production des seconds messagers inositol phosphate. La troisième réponse fonctionnelle modulée par les dimères $\beta\gamma$ des protéines G est la régulation des différents types d'adénylate cyclase (A. C.). Ainsi, le Type I de A. C. est inhibé par $\beta\gamma$ alors que les types II et IV sont activés par le dimère. La présence

simultanée de α et de $\beta\gamma$ est peut-être également requise pour assurer la fonction physiologique associée à l'adénylate cyclase. Finalement, $\beta\gamma$ est également associé à la régulation et à l'activation de la cascade des "MapKinases" (dépendant et indépendant de Ras) tel que décrit originalement chez la levure (voir section 1. 3. 4. 4). L'activation de cette voie métabolique implique directement les récepteurs couplés aux protéines G dans la signalisation menant à la prolifération cellulaire. Ce mécanisme de couplage demeure, cependant, mal caractérisé puisque le mécanisme d'initiation de la cascade Shc/Grb2/Sos reste mal défini et que d'autres médiateurs protéiques semblent impliquer dans l'activation de Src et dans la régulation de Ras. Il faut aussi inclure dans cette voie régulatrice de $\beta\gamma$ la modulation de la phosphoinositide 3 kinase (PI3K), un enzyme stimulé par les récepteurs couplés aux protéines G qui produit le $PtIns(3,4,5)P_3$ à partir de $PtIns(4,5)P_2$. Cet enzyme semble jouer un rôle majeur dans plusieurs phénomènes cellulaires comme la mitogénèse. On présume que $\beta\gamma$ active PI3K pour initier une cascade qui mène à la phosphorylation de Shc modulant ainsi la formation du complexe effecteur Shc/Grb2/Sos. Le dimère $\beta\gamma$ interagit aussi dans le système visuel avec une protéine de 33kDa, la phosducine. Cette phosphoprotéine (régulée par phosphorylation de sa sérine 72) se lie au dimère $\beta\gamma$ prévenant la réassociation du trimère formant la transducine Gt.

Plusieurs protéines ciblées par $\beta\gamma$ possèdent un large domaine consensus nommé domaine PH, par analogie au domaine retrouvé chez la protéine "pleckstrin" qui est le substrat majeur de la protéine kinase C. Ce domaine PH varie en séquence et peut être multiple ou même discontinu, ce qui le rend difficile à identifier. Ces domaines d'interaction suscitent beaucoup d'intérêt puisqu'ils soulèvent la possibilité que la présence du domaine soit la signature d'une interaction avec $\beta\gamma$. Parmi les protéines possédant un domaine PH, on retrouve la phosducine, les PLC β , ainsi que les GRK (kinases des récepteurs couplés aux protéines G). Les GRK sont d'importants régulateurs des activités de plusieurs récepteurs couplés aux protéines G. Une section leur est consacrée ci-après (voir section 1. 3. 5. 2).

Afin de résumer les différentes cibles effectrices communes à α et $\beta\gamma$, le tableau III présente une liste de quelques effecteurs modulés par ces deux sous-unités.

Tableau III

Effecteurs modulés par G $\beta\gamma$ et par G α

Effecteurs	Effet de G $\beta\gamma$	Effet de G α
Canaux ioniques		
I _{KG}	+, direct	-
GIRK1		
GIRK2,K4	+, direct	
I _{ca} (N, P/Q)	-	
Phospholipases		
PLA ₂	+	
PLC β ₁	+	+
PLC β ₂	++	+
PLC β ₃	+++	+
PLC β ₄	pas d'effet	+
Adénylate cyclases		
		(+/-)
Type I	-	+ (Gs)/- (Gi,o,z)
Type II	+	+ (Gs)
Type III	?	+ (Gs)/ ?(Gi,o)
Type IV	+	+ (Gs)/- (Go)
Type V	pas d'effet	+ (Gs)/- (Gi,o,z)
Type VI	-/+ selon α	+ (Gs)/- (Gi,o)
Type VII	?	+ (Gs)/-?
Type VIII	?	+ (Gs)/-?
Type IX	?	+ ?/-?
Kinases		
GRK	+, direct	
PI3K	+	
Map kinases		
Shc, Raf-1, Ras, Tsk	+	
Sécrétion		
ARF/fusion endosomes	+	
Autres		
Pompe Ca ²⁺	+	
Réponse phéromone de levures	+	

GRK: G proteins-coupled receptor kinases; PI3K:IP₃ dependent protein kinase.

Les modifications post-translacionnelles des protéines G

En plus de jouer un rôle de transducteur, les protéines G sont également le substrat de toxines bactériennes qui modifient de façon covalente les sous-unités α des protéines G (voir tableau II). Ces modifications covalentes ont des répercussions profondes sur l'activité de la protéine G. Deux toxines bactériennes sont responsables du transfert d'un ADP ribose à partir de NADP sur la sous-unité α des protéines G. La première est la toxine du pertussis (IAP) produite par *Bordetella pertussis* à laquelle on associe la plupart des symptômes de la coqueluche, incluant la sensibilisation à l'histamine et l'hypoglycémie. Pour $G\alpha_{i/o}$, la région ciblée par la modification de la toxine est vraisemblablement impliquée dans le contact avec le récepteur ⁽¹⁷⁾. Pour α_i , α_o et α_t , cette région possède la cystéine 347, qui est le site d'ADP-ribosylation par la toxine du pertussis. La toxine modifie la sous-unité α (i,o,t), mais son substrat préférentiel est le trimère $\alpha\beta\gamma$. Cette préférence pour le trimère nous permet d'utiliser la toxine pour déterminer le degré de protéines G activées ou associées à $\beta\gamma$ ⁽¹⁸⁾. L'autre toxine modifiant spécifiquement α_s et α_t est la toxine thermostable du choléra produite par *Vibrio choléra*. Elle modifie l'activité de G_s dans la muqueuse intestinale en élevant les niveaux d'AMP cyclique et favorise ainsi le transport d'eau de la *serosa* vers le lumen dans le petit intestin. L'ADP-ribosylation de G_s augmente la sensibilité aux effets stimulatoires du GTP, présumément en inhibant l'activité GTPasique de α_s , prolongeant par le fait même la demi-vie de la forme active. Il semble que l'ADP-ribosylation par la toxine du choléra entraîne la dissociation du GDP, facilitant ainsi la liaison de GTP et promouvant la protéine G-ADP-rybosilée à se dissocier plus facilement pour donner un dimère $\beta\gamma$ et le α -ADP-ribosylé actif ⁽¹⁹⁾. Contrairement à la toxine pertussis, celle du choléra a besoin d'un "cofacteur" de ribosylation (ARF) afin d'activer sa sous-unité catalytique A_1 , responsable de l'activité ribosyltransférase. L'ARF est elle-même associée à la grande famille des protéines liant les nucléotides guanylés ayant des masses moléculaires variant entre 19 et 20 kDa ⁽²⁰⁾. Le site d'ADP-ribosylation de α_s et α_t est une arginine en position 174 des sous-unités G_s . Le plus grand impact de l'effet de ces

toxines se fait ressentir au niveau du couplage fonctionnel entre le récepteur et la protéine G.

Les protéines G possèdent également des modifications spécifiques de certains acides aminés qui modifient leur capacité de localisation et d'association avec la membrane plasmique. Pour la sous-unité α ($G\alpha_i$), la partie N-terminale subit une addition cotranslationnelle d'un acide myristique (C14:0) sur la position 2, une glycine, après coupure de la méthionine N-terminale. La séquence consensus (MGXXXS) de cette acylation est mal définie, mais elle comprend obligatoirement une glycine en position 2 et elle démontre une préférence pour la position 6 ($G\alpha_i$ et $G\alpha_t$). L'absence de cette modification chez G_i (expression en *E. coli*) entraîne une accumulation cytosolique de la protéine. La présence de cette modification ne peut cependant expliquer la localisation pour les autres sous-types de $G\alpha$. Ainsi, $G\alpha_s$ ne possède pas la séquence MGXXXS et ne subit aucune modification par un acide myristique. Les autres sous-unités α ($G\alpha_{12-16}$) ne possèdent pas non plus la séquence consensus, mais présentent une modification par un acide palmitic d'une cystéine en N-terminale qui pourrait influencer l'ancrage membranaire de α .

Il ne faut pas non plus oublier que le facteur qui influence probablement le plus la localisation des $G\alpha$ est la présence du dimère $\beta\gamma$. Une modification de la sous-unité γ est responsable des propriétés hydrophobes du dimère $\beta\gamma$. La sous-unité γ de la protéine G possède une séquence consensus (domaine CAAX, A=aliphatiques) en C-terminale qui est modifiée par un groupe isoprényle (Farnésyle; C15 ou Géranyle; C20) transféré sur la cystéine suivie du clivage de AAX et d'une carboxyméthylation de la cystéine. Les enzymes responsables de ces modifications sont; la farnésyle transférase qui préfère les acides aliphatiques tels alanine, sérine, glutamine, cystéine ou méthionine et; la géranyle transférase qui préfère une leucine C-terminale. Le blocage de transfert d'un groupement isoprényle chez la sous-unité γ produit un dimère $\beta\gamma$ inactif qui est localisé principalement dans la fraction soluble cellulaire (cytoplasme). L'importance de ces modifications sur le couplage avec les récepteurs vient principalement de leur implication dans la localisation de la protéine G. Toute modification de l'équilibre dynamique qui permet aux protéines G de se retrouver dans le même compartiment cellulaire que le

récepteur a inévitablement des répercussions sur l'efficacité d'un système de signalisation.

1. 3. 2 Détails du mécanisme de couplage aux protéines G

Le rôle des différentes sous-unités des protéines G dans le mécanisme des récepteurs couplés aux protéines G est maintenant beaucoup plus clairement défini. Ainsi, la sous-unité α est celle parmi les trois sous-unités formant la protéine G qui possède la plupart des activités dites catalytiques des protéine G. Elle possède un site de liaison de haute affinité pour les nucléotides guanylés et un des ions divalents comme le magnésium, nécessaire à la formation d' α -GTP activé. Elle a également un site de basse affinité associé à la forme α -GDP, vraisemblablement régulé par le complexe récepteur-agoniste. La sous-unité α possède aussi une activité GTPasique intrinsèque dont le niveau de base de K_{cat} (en l'absence de complexe agoniste-récepteur) est seulement 10 fois supérieur à la constante de dissociation du GDP. La sous-unité α , sous sa forme activée (GTP), est capable de moduler les activités biochimiques de différents effecteurs ⁽²¹⁾.

Le dimère $\beta\gamma$ fut originalement associé à un rôle d'ancrage membranaire du trimère et également à un rôle de régulateur intrinsèque en inhibant l'échange de nucléotides, en favorisant la forme trimérique qui présente une vitesse de dissociation du GDP plus lente que chez α seule. Le dimère $\beta\gamma$ diminue la dissociation du GDP du manière indépendante à la présence du récepteur favorisant ainsi une réduction du bruit de fond intrinsèque au système de couplage au protéine G. Il devient donc une partie importante du mécanisme de couplage par ces activités régulatrices de plusieurs effecteurs (tableau III, ²²) et joue aussi un rôle important en réduisant l'activation spontanée du système en favorisant la forme inactive α GDP de la protéine G, ce qui réduit le bruit de fond du système de couplage aux protéines G. D'autres protéines ont aussi des activités régulatrices de l'activation de α . Ces protéines ont un rôle de GAP (GTPase Activating Proteins) sur la protéine G. En accélérant le taux de la réaction

GTPasique intrinsèque, une GAP réduit la demi-vie active de la sous-unité α inhibant ainsi la signalisation spontanée des protéines G. Ainsi, certains effecteurs comme les isoenzymes β de la phospholipase C augmentent fortement l'activité GTPasique intrinsèque de G α . Par ailleurs, un nouveau groupe de régulateurs putatifs des protéines G a été récemment identifié et caractérisé⁽²³⁾. Ces études ont démontré que le produit du gène GAIP et RGS4 sont des GAP pour la famille des Gi. Ces protéines font partie d'une famille de protéines régulatrices qui comportent la nouvelle séquence consensus de domaine RGS (Regulator of G proteins Signaling). La régulation et les propriétés de ces nouveaux régulateurs de la signalisation par les récepteurs couplés aux protéines G sont encore inconnues. Il est probable que ces nouvelles protéines puissent être des régulateurs importants de la fonction des récepteurs couplés aux protéines G.

Le mécanisme de couplage des protéines G, tel que décrit dans la littérature, est un mécanisme cyclique qui implique la dissociation de la protéine G trimérique en diverses sous-unités. La figure 2 illustre le modèle de couplage des protéines G aux récepteurs. En présence d'un complexe récepteur-agoniste (hormone), le récepteur catalyse l'échange nucléotidique en convertissant le site de liaison des nucléotides de haute affinité, conformation de non-échange, en un site de basse affinité qui permet l'échange. Le GDP est alors dissocié du complexe agoniste/récepteur/protéine G et est échangé pour du GTP normalement en excès dans la cellule. Aux concentrations cellulaires, cette étape est instantanée. Le changement d'affinité de α se traduit également par une diminution d'affinité du trimère pour le complexe agoniste-récepteur entraînant la séparation de la protéine G trimérique. L'échange du GDP pour le GTP nécessite la présence de magnésium comme cofacteur. La présence de GTP dans le site de liaison de α entraîne la dissociation du trimère libérant une sous-unité α^* activée capable d'interagir avec l'effecteur. L'activation de α est transitoire puisque le GTP lié, est hydrolysé par l'activité GTPasique de α pour produire un α -GDP qui ne peut plus moduler les activités de l'effecteur. Le trimère peut alors se reformer et retourner à l'état initial avec un récepteur qui retourne en état de haute affinité pour son agoniste. Le découplage du récepteur au trimère par l'arrivée de GTP entraîne une diminution de l'affinité du

récepteur pour l'agoniste. La figure 2 résume les différentes étapes du cycle de modulation de la réponse à un agoniste pour un système couplé aux protéines G. Les avantages de ce système sont une amplification du signal, une "désactivation" intrinsèque aux protéines G et une pluripotentialité du type de circuit impliqués lors de l'intégration du signal. On pourrait penser que le récepteur ne joue qu'un rôle statique de cofacteur de l'activation de la protéine G, ceci est loin de la réalité puisque autant le récepteur influence les propriétés pharmacologiques de la protéine G, autant la protéine G affecte les propriétés des récepteurs. Ces concepts de l'interaction allostérique entre le récepteur et la protéine G sont discutés plus loin à la section 1. 4. 2.

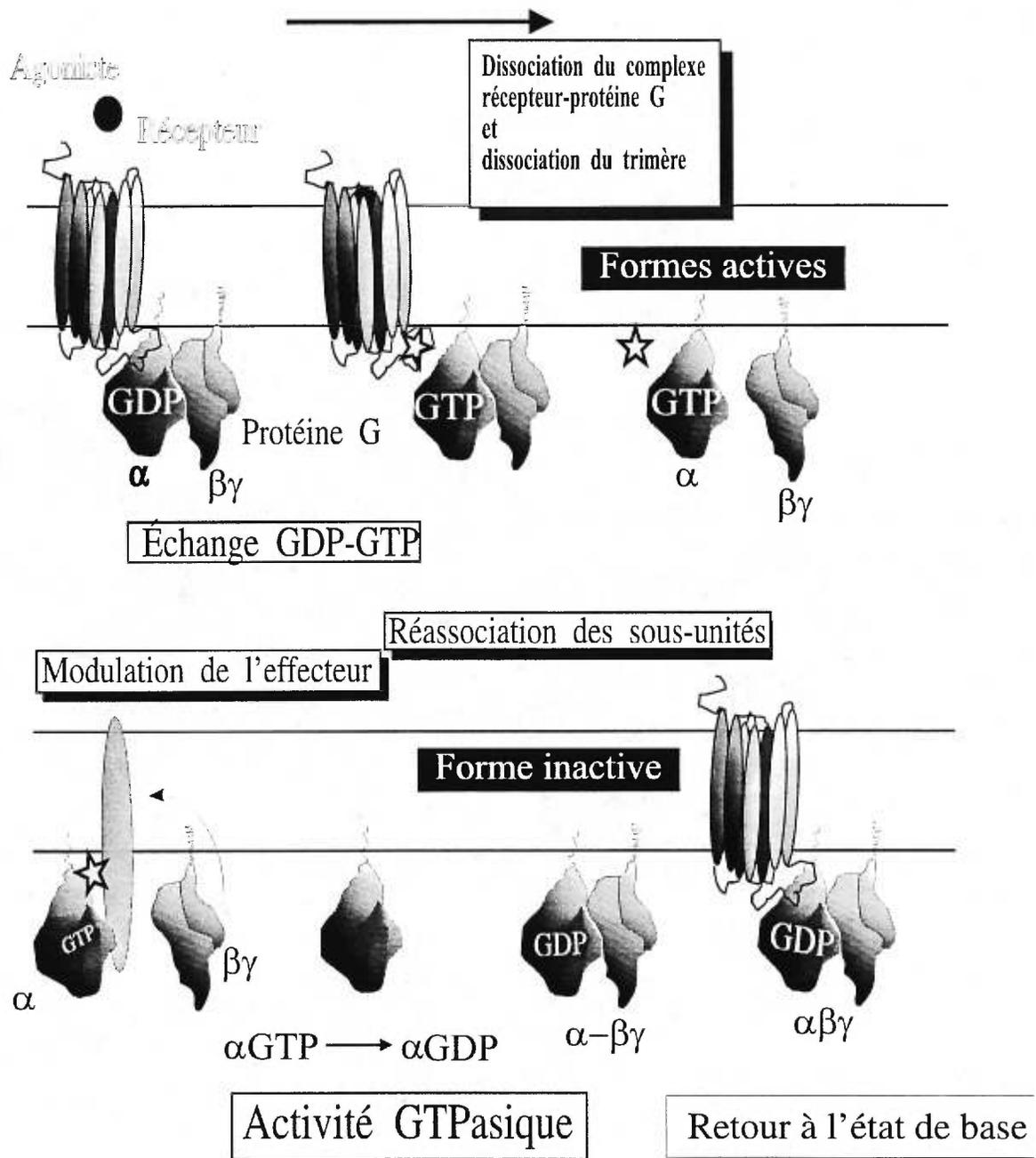


Figure 2. Modèle du couplage récepteur/protéine G

1. 3. 2. 1 Activation des protéines G par l'activité de la nucléotide diphosphate kinase

L'occupation du récepteur par un agoniste est généralement acceptée comme l'événement promoteur de l'échange nucléotidique (GDP pour GTP) qui active la protéine G. Cependant, des études récentes semblent indiquer qu'une transphosphorylation menant à la formation du GTP à partir du GDP et de l'ATP chez la protéine G puisse être un mécanisme alternatif de l'activation des protéines G. Cette transphosphorylation est associée à l'activité de l'enzyme nucléotide diphosphate kinase (NDK) qui produit également une diminution de l'affinité de l'agoniste pour le récepteur et augmente l'activité de certains effecteurs couplés aux protéines G. La démonstration indéniable de l'activité de NDK sur la protéine G demeure, cependant, fragmentaire dans l'état actuel de nos connaissances et son rôle modulateur de l'activité des protéines G reste à prouver ⁽²⁴⁾. Cependant, des preuves plus tangibles suggèrent que la phosphorylation de la sous-unité β et le transfert subséquent du groupement phosphate sur la sous-unité α serait un mécanisme alternatif de l'activation des protéines G par le récepteur ⁽²⁵⁾. Dans des conditions physiologiques normales, ces mécanismes alternatifs de transphosphorylation pourraient peut-être jouer un rôle important afin de maintenir des niveaux de GTP à proximité des sources de sous-unités α . Il est, toutefois, difficile de spéculer sur l'importance que ces mécanismes d'activation alternatifs auront sur la pharmacologie des récepteurs couplés aux protéines G.

Si l'on considère que des centaines de récepteurs couplés aux protéines G interagissent avec un répertoire d'une vingtaine de types de protéines G qui peuvent être composées d'un $G\alpha$ et de multiples combinaisons de dimères $\beta\gamma$, la question de la spécificité de couplage entre le récepteur et la protéine G trimérique suscite un grand intérêt afin de comprendre les mécanismes qui régulent la signalisation cellulaire.

Afin de mieux comprendre le rôle des déterminants structuraux des différentes composantes du système de couplage impliquées dans la spécificité et la sélectivité des différentes voies de signalisation cellulaire, la section suivante présente un survol de la structure de base des récepteurs et de la protéine G en raison de l'imposante quantité de données structurales parues au cours des dernières années.

1. 3. 3 Structure des récepteurs couplés aux protéines G

Les récepteurs couplés aux protéines G appartiennent à la superfamille des protéines membranaires caractérisées par sept passages transmembranaires hydrophobes que l'on soupçonne d'être formés d'hélices α connectées par des jonctions intra et extracellulaires. La partie N-terminale de ces récepteurs à sept passages transmembranaires (TM) est extracellulaire, alors que la partie C-terminale se retrouve généralement dans la région cytoplasmique. De façon générale, l'alignement et la comparaison des séquences des récepteurs clonés nous indiquent que ces régions hydrophobes présentent la plus grande homologie, alors que les autres régions présentent une très grande variabilité. Ce patron d'homologie régionalisée serait possiblement à la base de la sélectivité pour le ligand et pour la protéine G.

La construction et l'expression de récepteurs chimériques et de récepteurs comportants des mutations ponctuelles ont permis l'identification des résidus importants dans la formation de la poche de liaison de ligand (²⁶). Ainsi, les points de contact cruciaux pour les catécholamines et leur site de liaison pour les récepteurs adrénergiques comprendraient une asparagine dans TM3, deux sérines dans TM5 et une phénylalanine

dans TM6. Cette région critique est localisée profondément à l'intérieur de la membrane bilipidique. Cette région n'est cependant peut-être pas exclusive, notamment si l'on considère la liaison de certains peptides qui interagiraient également avec la partie N-terminale et avec certaines régions des jonctions interconnectrices extracellulaires du récepteur. Au sein d'une même famille de récepteurs, il est possible de déterminer les acides aminés homologues qui ont un rôle important dans la liaison de l'agoniste. Par exemple, pour les récepteurs adrénergiques, le groupement carboxylate d'une aspartate du TMIII agirait comme un contre-ion pour l'azote de la catécholamine alors que deux sérines dans TMV interagiraient avec les groupements hydroxyles en position méta et para de l'anneau catéchol. Règle générale, les acides aminés formant le site de liaison putatif des antagonistes est (ou sont) distinct(s) de ceux formant le site de liaison de l'agoniste. Cette légère différence permet une flexibilité dans la réponse du récepteur à la liaison d'un ligand. C'est le cas de l'antagoniste NK1 CP96345 qui interagit avec des acides aminés situés à l'intérieur de la région transmembranaire dans une région qui ne participe pas à la liaison des ligands agonistes endogènes telque la substance P.

La région responsable de l'interaction entre le récepteur et la protéine G trimérique, quand à elle, se situe au niveau de la troisième boucle cytoplasmique (²⁷) qui interagit avec des régions en N et C-terminales de $G\alpha$. Cette région, ainsi que la région C-terminale du récepteur, interagirait également avec le dimère $\beta\gamma$. Les résultats les plus représentatifs de l'implication de cette région dans la spécificité d'interaction avec un type particulier de protéines G nous viennent des études d'activation par le carbacol de récepteurs chimériques M_1 et M_2 pour lesquels on a échangé les régions N-terminales de la troisième boucle cytoplasmique (²⁸). Cette région comprendrait un motif putatif d'interaction récepteur/protéine G comprise dans une région variant entre 14 et 20 acides aminés et possédant deux acides aminés basiques du côté N-terminal et contiendrait également le sous-motif B-B-X-X-B (B=A. A basique, X= acide aminé). La présence d'acides aminés basiques serait également responsable de l'activation des protéines G par les récepteurs autres que les récepteurs à sept passages transmembranaires (Man-6P/IGF-II, ²⁹) et de certaines autres protéines rapportées pour interagir avec les protéines G (protéine b/A4 amyloïde précurseur, APP, ³⁰ mastoparan, ³¹). D'autres régions du

récepteur participent aussi à l'interaction avec la protéine G. Ainsi, la deuxième boucle cytoplasmique et presque toute les parties cytoplasmiques du récepteur ont un rôle important dans l'interaction avec la protéine G. Pour cette raison, il est difficile d'identifier une séquence consensus d'acides aminés conférant la spécificité d'interaction avec la protéine G. Il devient donc difficile de prédire à partir de la séquence primaire en acides aminés avec quel type de protéines G un récepteur orphelin interagira.

1. 3. 3. 1 Assemblage et localisation membranaire des récepteurs

L'assemblage spatial des passages transmembranaires des récepteurs couplés aux protéines G est censé former un arrangement antihoraire (vu de la surface) en une structure circulaire compacte selon l'homologie structurale avec la bactériorhodopsin⁽³²⁾. L'assemblage et le repliement des récepteurs pourraient possiblement découler d'un mécanisme en deux étapes. À la première étape, les hélices alpha des transdomaïnes seraient insérées dans la membrane dans la bonne orientation. À la seconde étape, les hélices interagiraient entre elles pour former la protéine fonctionnelle. Plusieurs nouvelles évidences suggèrent aussi que l'assemblage formant le récepteur pourrait également provenir de plusieurs unités d'assemblage indépendantes. Ces observations nous viennent des études à l'aide des mutants du récepteur V2 de la vasopressine. Ces mutants présentent soit des terminaisons non-sens (produisant des récepteurs tronqués), des changements de cadre de lecture de la troisième boucle ou des deux derniers domaines transmembranaires. Ces mutants présentent, non seulement des capacités de liaison réduites, mais ils démontrent une localisation cellulaire déficiente. Par contre, la coexpression de récepteur mutés dans des domaines différents et complémentaires peuvent restaurer le caractère fonctionnel des deux récepteurs mutants (localisation et activation de second messagers), suggérant que le mécanisme d'assemblage pourrait convenir à un assemblage composé de multiples d'unités⁽³³⁾.

1. 3. 3. 2 Modifications post-traductionnelles des récepteurs couplés aux protéines G

En plus des données structurales sur les récepteurs couplés aux protéines G, la littérature rapporte également beaucoup d'informations sur les modifications post-translacionnelles des récepteurs couplés aux protéines G.

La plupart des récepteurs couplés aux protéines G possèdent une ou deux asparagines, habituellement en N-terminale (extracellulaires) qui sont présentes dans une séquence consensus de patron de glycosylation. Pour la majorité des récepteurs couplés aux protéines G, nous croyons que la glycosylation a peu d'importance pour la liaison du ligand, mais affecterait la distribution et la localisation du récepteur dans la cellule. Une glycosylation déficiente provenant d'une mutation de la thréonine 17 en une méthionine chez la rhodopsine (récepteur visuel) est associée à l'apparition du désordre dégénératif rétinien *retinitis pig-mentosis*, ce qui suggère que la glycosylation des récepteurs joue un rôle important dans certaines pathologies.

On remarque également que la plupart des récepteurs présentent une cystéine sur la première boucle et la seconde boucle extracellulaire. Ces cystéines sont susceptibles de former un pont disulfide important pour l'arrangement tridimensionnel de la structure du récepteur. D'autres cystéines localisées en C-terminale des récepteurs couplés aux protéines G présentent aussi des modifications chimiques. Ces cystéines bien caractérisées pour le récepteur β_2 adrénergique présentent un groupement palmitate attaché via un lien thioester. Ce groupement palmitate serait intercalé dans la membrane lipidique supportant ainsi une conformation à la quatrième boucle cytoplasmique putative.

Les portions intracellulaires du récepteur sont également susceptibles de subir des modifications post-translacionnelles. Ces régions sont riches en sérine et en thréonine que l'on retrouve dans des séquences consensus de signal de phosphorylation pour diverses protéines kinases comme la PKA et la PKC. L'importance de ces modifications sur la régulation des récepteurs couplés aux protéines G est indéniable particulièrement dans les processus de désensibilisation, de séquestration et de sous-régulation des récepteurs (voir

section 1. 3. 5). Les aspects fonctionnels des activités des protéines kinases sur les récepteurs sont abordés plus loin dans le texte.

1. 3. 3. 3 Structure de la sous-unité α

Les différentes sous-unités α varient en taille entre 350 et 395 acides aminés formant une chaîne comprenant cinq régions distinctes (G boxe) qui viennent former la poche de liaison des nucléotides guanylés dans la structure tridimensionnelle de la protéine (³⁴). Les parties amino et carboxy-terminales, ainsi que les régions médianes insérées entre le domaine de liaison démontrent les plus grandes différences d'homologie structurale pour la sous-unité alpha. Sans entrer dans les détails (pour de plus amples informations Birnbaumer et al présentent une revue complète de la structure de la protéine G ; ³⁵), la structure tridimensionnelle (3D) ainsi que les études de mutagenèse nous indiquent que la région C-terminale de la sous-unité α est une région importante pour l'interaction fonctionnelle avec le récepteur et l'effecteur, alors que la région N-terminale serait requise pour l'association avec le dimère $\beta\gamma$. Pour la protéine G trimérique, la partie N-terminale de α forme un segment hélicoïdale qui est stabilisé par des interactions spécifiques avec la structure en hélice particulière de β (décrite plus bas). Cependant, la structure ne permet pas de prédire d'où viennent les spécificités du jumelage particulier d'un α avec un dimère $\beta\gamma$. Les composantes structurales qui déterminent la spécificité d'interaction entre α et $\beta\gamma$ pour former un hétérotrimère particulier demeurent inconnues compte tenu de l'état actuel de nos connaissances sur la structure fonctionnelle des protéines G.

Dans la structure 3D de la sous-unité α , deux domaines majeurs sont apparents: le domaine de liaison du GTP qui ressemble beaucoup à la région équivalente de la structure d'autres protéines liant les nucléotides guanylés tels que p21 ras, et un domaine en forme d'hélice α qui fonctionne possiblement comme un activateur de l'activité GTPasique pour les protéines liant les nucléotides guanylés. La comparaison des structures analogues de la protéine G liant le GDP et celle liant le GTP démontre des régions dites "région switch" pour lesquelles les plus grands changements conformationnels sont observés lors de l'échange nucléotidique du GDP pour le GTP. Les changements de

conformation de cette région seraient également responsables de la dissociation de la sous-unité α du dimère $\beta\gamma$ de la forme liant le GTP. Certains résidus se révèlent également importants pour l'activité GTPasique de la sous-unité α . Ainsi, des résidus arginine et glutamine (position 201 et 227, i. e. Gs long) sont conservés chez toutes les sous-unités α . Ces résidus sont critiques et participent activement à la liaison des nucléotides guanylés. Leur mutation entraîne une réduction de l'activité GTPasique et engendre une activation constitutive de la sous-unité α . Ces mêmes résidus sont également la cible de la toxine du choléra qui provoque également l'activation constitutive de Gs. Par ailleurs, une mutation (H21a) de la glycine adjacente (position 226) prévient l'activation de α par le GTP en bloquant une des "régions switch" de la sous-unité alors que la mutation (unc) en C-terminale de l'arginine en position 389 (de Gs long) entraîne un découplage fonctionnel entre le récepteur et la protéine G. Dans cette même région, certaines sous-unités α possèdent un résidu cystéine qui est le substrat de la toxine pertussis qui catalyse son ADP ribosylation et entraîne aussi un découplage du récepteur.

Malgré la présente théorie du mécanisme d'activation des protéines G selon laquelle la forme GDP- α est associée à $\beta\gamma$ pour former l'hétérotrimère $\alpha\beta\gamma$, des analyses cristallographiques de GDP- α 1 suggèrent la formation de complexes multimériques de la sous-unité α 1 formant un arrangement tête (N-terminale) à queue (C-terminale) de plusieurs dizaines de sous-unités α juxtaposées⁽³⁶⁾. La purification de $G\alpha_{12}$ à partir de cerveaux de rats fournit également des évidences qui supportent aussi l'existence de complexes multimériques de sous-unités α sans, toutefois, proposer la fonction biologique de ces multimères⁽³⁷⁾. On pourrait aisément croire que la sous-unité α de par ses fonctions catalytiques et ses capacités d'interaction avec les récepteurs, les effecteurs et les dimères $\beta\gamma$ et, de par la flexibilité de sa structure 3D, présente la plus grande versatilité structurale d'interaction des sous-unités pour former la protéine G trimérique. Il n'en est rien, puisque la résolution de la structure tridimensionnelle du trimère $\alpha\beta\gamma$ démontre clairement que le dimère $\beta\gamma$ possède un arrangement structural en forme de spirale qui lui procurerait de multiples sites d'interaction protéine/protéine. Les protéines possédant cet arrangement structural auraient la caractéristique commune de faire partie

d'un assemblage macromoléculaire pluripotentielle (multiples activités pour une seule protéine). Cet arrangement indique une capacité d'interaction avec de multiples protéines.

1. 3. 3. 4 Structure de la sous-unité $\beta\gamma$

Si on regarde de plus près la structure de β , on remarque qu'elle est composée de deux régions présentant de grandes différences structurales: un segment amino-terminal formant une hélice α de 20 a.a. et le reste de la protéine qui forme un motif reproduit sept fois, soit un arrangement hélicoïdal en forme de spirale. Cet arrangement rigide de la structure de β composé de sept répétitions de β "strand" antiparallèle forme une structure caractéristique nommée "WD-40 repeat" qui s'organise en forme de spirale. La structure en hélice est maintenue par un "velcro moléculaire" formé par le septième segment de la spirale. Le rôle précis de chacun des segments "WD-40" de la spirale reste mal défini. Cependant, il semble que certains segments interagissent spécifiquement avec γ (segment V et VI) qui forme une interaction "coil-coil" avec la région N-terminale de la sous-unité β . Cet arrangement particulier de la région N-terminale des deux peptides confère aux dimères $\beta\gamma$ sa très grande stabilité qui ne peut être dissociée qu'en présence d'agents dénaturants. La surface d'interaction avec α est asymétrique et beaucoup plus limitée que celle interagissant avec γ , faisant uniquement contact avec les résidus externes des segments I, II et III de la spirale, tandis que la région "switch II" de α se positionne au-dessus du tunnel formé par les pales de l'hélice en forme de spirale adoptée par la sous-unité β . La structure de γ présente, en plus de sa structure "coil-coil", une hélice α en C-terminal qui interagit avec une portion des segments VI et VII de la spirale de β . Une autre observation importante pour bien comprendre le rôle de β dans le dimère $\beta\gamma$ est que le dimère ne change pas de conformation lorsque α est absent. Cette observation combinée au fait que α est reconnue pour bloquer la capacité du dimère à interagir avec l'effecteur, suggère que le site d'interaction avec $G\alpha$ et l'effecteur sont à proximité, sans toutefois exclure la possibilité que le site d'interaction avec certains effecteurs soit

localisé ailleurs sur le peptide (N-terminal interagit avec N-terminal du canal potassique GIRK1).

En réfléchissant bien sur la structure particulière de β , structure qui semble lui procurer la capacité d'interaction et de régulation des activités de multiples protéines, on en vient inévitablement à s'interroger sur les déterminants moléculaires de la régulation des différents effecteurs, non seulement par $\beta\gamma$, mais également par la sous-unité α . Bien que brièvement abordé ultérieurement, ce sujet demeure très complexe et nos besoins de comprendre cette spécificité d'interaction ne fait pas partie de mon projet de doctorat. Pour sa part, mon projet nécessite une approche plus globale de l'interaction récepteur/protéine G afin de bien identifier le rôle des récepteurs dans la modulation des activités des enzymes ou des canaux effecteurs. Cependant, il est à prévoir que ce domaine de recherche aura un impact important sur la pharmacologie des récepteurs couplés aux protéines G. Il devient maintenant de plus en plus important, de bien comprendre qu'elles sont les voies métaboliques (toutes les voies) impliquées dans la l'activation de la réponse à la liaison d'un agoniste ou d'un signal endogène. Cette information permettra peut-être d'élucider le mécanisme d'action thérapeutique de certains médicaments.

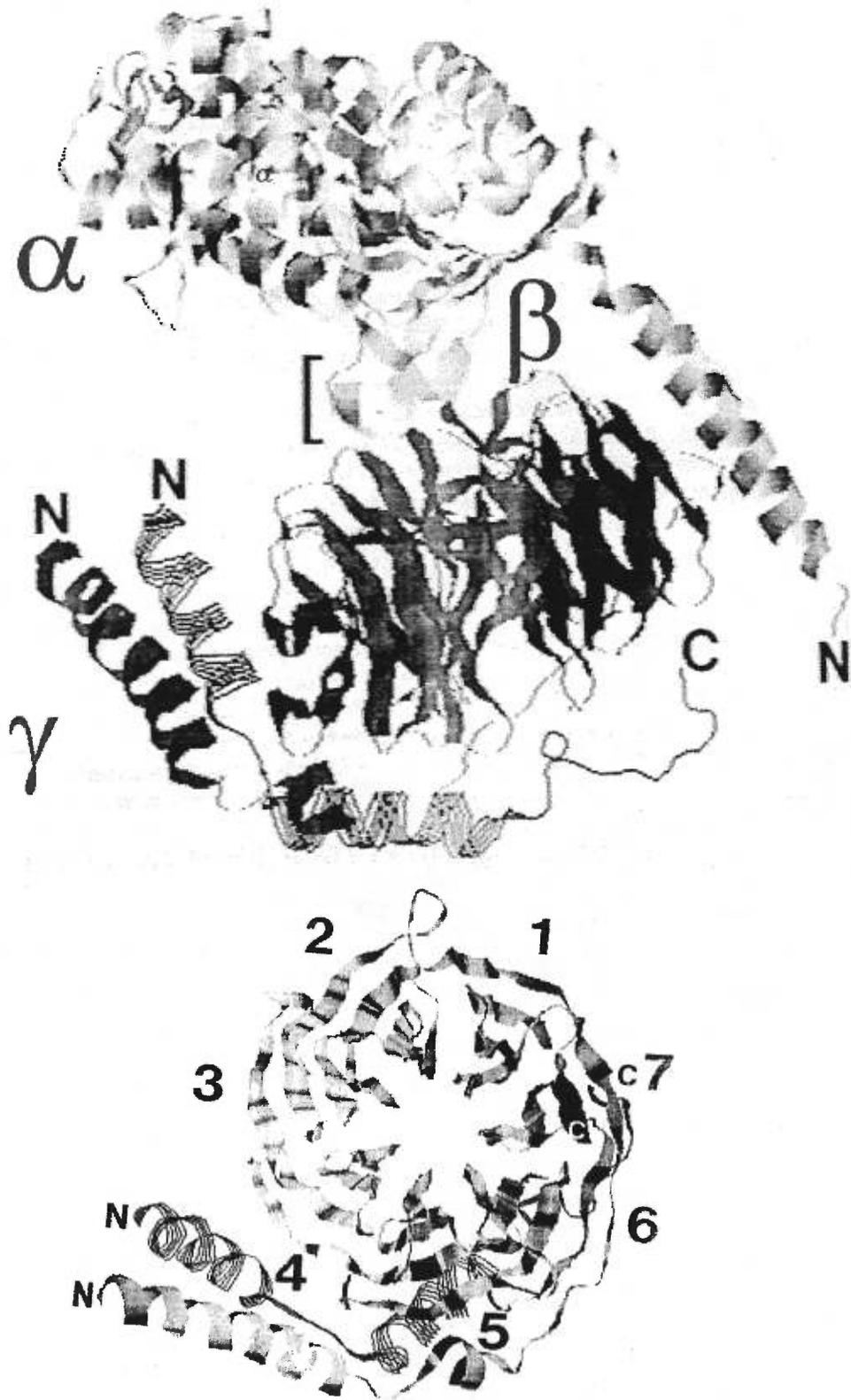


Figure 4 Structure du trimère $G\alpha\beta\gamma$

1. 3. 4 Régulation des enzymes effecteurs par les sous-unités des protéines G

Depuis les dix dernières années, nos connaissances sur le rôle de $G\beta\gamma$ et de $G\alpha$ dans la signalisation cellulaire ont beaucoup progressées. En plus de toutes les activités modulatrices des différents effecteurs par les $G\alpha$, nous venons d'énoncer que $G\beta\gamma$ module et interagit directement avec des canaux potassiques, des phospholipases C, des adénylate cyclases et plusieurs autres effecteurs (Tableau III). Ces effecteurs contrôlent des paramètres cellulaires cruciaux tels que le potentiel membranaire, le niveau de Ca^{2+} cytosolique et les activités biochimiques associées à une multitude de kinases.

Par ailleurs, nos connaissances actuelles nous indiquent que les récepteurs qui modulent des réponses similaires du point de vue fonctionnel, dans un tissu donné, convergent fréquemment vers les mêmes protéines G et les mêmes effecteurs intégrant ainsi l'information provenant de différents signaux. C'est le cas des cellules myéloïdes pour lesquelles plusieurs récepteurs des chémokines convergent pour inhiber une classe unique d'adénylate cyclase (³⁸). Les cellules ont également développé des voies de couplage divergentes afin de canaliser un signal d'entrée vers diverses réponses cellulaires. L'activation d'une seule protéine G peut alors donner suite à deux cheminements du signal, l'un par la sous-unité α et l'autre par le dimère $\beta\gamma$. C'est le cas pour plusieurs récepteurs couplés à G_i/o qui inhibent à la fois l'adénylate cyclase et stimulent la phospholipase C: récepteurs muscariniques M_2 et M_4 , 5-HT_{1A}, 5-HT_{1D α} , dopamine D_2 , somatostatine $SS1$ et les récepteurs adrénergiques $\alpha_2C_{10,4,2}$ (³⁹). Dans plusieurs cellules, on peut alors observer une cascade multiple provenant de la modulation de différents effecteurs, par exemple, l'inhibition de AC (via $G\alpha_i$ et ou $\beta\gamma$), l'activation du courant K^+ (via $\beta\gamma$) et l'inhibition des canaux Ca^{2+} voltage dépendant. Une autre facette de cette propriété des voies de signalisation et de la promiscuité de l'interaction récepteur/protéine G qui est très importante dans le cas de protéines G_{15} et G_{16} (PTX insensible) capables d'interagir avec plusieurs types de récepteurs qui sont reconnus pour être couplés via une protéine de type G_i , G_s ou même G_q (⁴⁰). Il est donc

important d'aborder ici le rôle de différents effecteurs impliqués dans la production de la réponse qui fait suite à l'activation du récepteur par l'agoniste. Dans cette section, une attention toute particulière est portée aux mécanismes de régulation de l'adénylate cyclase et de la phospholipase C puisque que ces deux effecteurs sont des composantes majeures des systèmes de couplage qui sont décrits dans la partie résultats de ce manuscrit.

1. 3. 4. 1 Régulation de l'adénylate cyclase

La régulation hormonale de l'adénylate cyclase, la protéine membranaire qui catalyse la synthèse de l'AMP cyclique, implique l'interaction de plusieurs protéines impliquées dans l'intégration du signal extracellulaire vers la production intracellulaire de seconds messagers et, en fin de compte, de la réponse cellulaire appropriée (transcription, contraction musculaire, mitogénèse et activité des canaux ioniques). L'adénylate cyclase est souvent le facteur final commun à l'intégration de plusieurs signaux provenant de différents réseaux de signalisation. La stimulation de l'adénylate cyclase survient après l'interaction avec $G_{\alpha s}$ alors que l'interaction avec $G_{\alpha i}$ module l'inhibition de cet enzyme membranaire.

En plus de la modulation par G_{α} , l'adénylate cyclase est également régulée par le dimère $\beta\gamma$, tel que décrit préalablement (voir tableau III), alors que certaines adénylates cyclases sont en même temps régulées par la Ca^{2+} calmoduline. Pour de plus amples informations, se référer à (41). Toutes les formes d'adénylates cyclases sont sensibles à l'activation par le diterpène forskoline et toutes sont inhibées par la 3'-AMP et par des analogues de l'adénosine. Neuf différentes isoenzymes ont été identifiées (Type I à IX). Tous les sous-types d'adénylate cyclases présentent une topologie commune constituée de deux répétitions de six domaines transmembranaires arrangés en tandem grâce à une longue boucle cytoplasmique. Les deux domaines C et N-terminal intracellulaires sont nécessaires à l'activité de l'enzyme (voir figure 3). Les domaines cytoplasmiques de la protéine présentent le plus d'homologie de séquence entre les différents sous-types. Cette région correspondrait au même régions que celle qui est responsable des propriétés

catalytiques de la guanylate cyclase, l'enzyme impliqué dans la synthèse de GMP cyclique. La complexité amenée par les différences de régulation des différents sous-types d'adénylate cyclases (soit par $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha i}$, $G_{\alpha z}$, PKC, PKA, $G\beta\gamma$ et Ca^{2+} /calmoduline), présume des mécanismes de régulation parfois convergents pour l'activation de A.C ou, parfois divergents selon les voies de régulation impliquées. L'importance physiologique de cette intégration des voies activatrices et des voies inhibitrices de l'activité de l'adénylate cyclase est bien démontrée chez les muscle lisses. On retrouve chez ce type musculaire des récepteurs α_2 adrénergiques (couplés à G_i) et des récepteurs β_2 adrénergiques (couplés à G_s). L'activation par les catecholamines circulantes (épinéphrine et norépinéphrine) produira une contraction via les α_2 alors qu'une relaxation musculaire apparaît après l'activation des récepteurs β_2 . Cette multiplicité dans la régulation de cette famille d'effecteur montre combien que la simple voie de production de l'AMP cyclique est beaucoup plus complexe que la simple cascade d'activation récepteur, protéine G et effecteur. Dans cette optique, la multiplicité des sous-types de protéines G ajoutée aux sous-types d'adénylate cyclases illustre bien la complexité de la régulation des effecteurs par les récepteurs couplés aux protéines G.

1. 3. 4. 2 Régulation de la phospholipase C

Les différents types de phospholipases C (PLC) jouent des rôles importants dans la signalisation cellulaire en modulant les actions de plusieurs hormones, neurotransmetteurs et facteurs de croissance. L'activation des PLC entraîne l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP_2) membranaire produisant l'inositol,4,5-triphosphate (IP_3) et le diacylglycérol (DAG), deux seconds messagers cellulaires. L' IP_3 se lie à des récepteurs intracellulaires, ce qui entraîne une mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire, alors que parallèlement le DAG module les activités de plusieurs membres de la famille des protéines kinase C (PKC). Deux mécanismes sont à la base de l'activation des PLC. Le premier implique plusieurs types de protéines G qui activent directement la PLC soit par G_{α} ou par $G\beta\gamma$. Pour la famille de G_q (G_q , G_{11} , G_{14-16}),

c'est $G\alpha$ qui active les isoenzymes PLC- β . Par contre, pour la famille G_o et G_i , l'activation est dépendante de $G\beta\gamma$. Plusieurs récepteurs modulent les activités des PLC- β . Parmi eux, on retrouve les récepteurs muscariniques, adrénergiques, dopaminergiques, sérotoninergiques et plusieurs récepteurs peptidergiques. Le second mécanisme d'activation des PLC implique l'activité de tyrosine kinase des récepteurs des facteurs de croissance. Cette voie d'activation des PLC étant hors du sujet du présent manuscrit, elle ne sera pas couverte par l'auteur.

Les phospholipases C présentent une grande diversité de catégories et sous-types d'enzymes qui peuvent être classées en PLC- β , PLC- γ et PLC- δ selon leur homologie de séquence. La catégorie PLC- β , celle qui est associée aux récepteurs couplés aux protéines G, comporte quatre sous-type: PLC β_1 , β_2 , β_3 et β_4 . Cette sous-famille de PLC est la seule modulée par l'activation de récepteurs couplés aux protéines G. Les PLC- β_1 , PLC- β_3 , PLC- β_4 et PLC- β_2 (de façon moins importante) sont activés par les sous-unités de la famille $G\alpha_q$ (PTX insensible). Les PLC- β_2 et PLC- β_3 sont également sensibles à l'activation par le dimère $\beta\gamma$. Les dimères $\beta\gamma$ provenant des substrats PTX sensibles (G_i - G_o) contribuent aussi à moduler les activités des PLC- β dans certains types cellulaires. Ainsi, il est possible qu'un récepteur module l'inhibition des activités de l'adénylate cyclase et module également l'activation des PLC- β . Au niveau structural de la PLC- β_1 (la mieux caractérisée), on a identifié un "domaine PH" en N-terminale. Cette région est présumément responsable de l'interaction avec $\beta\gamma$ alors que la région C-terminale serait impliquée dans l'interaction avec $G\alpha_q$. Chez $G\alpha_q$, de courtes régions dans la troisième hélice α et dans la partie adjacente au quatrième "feuillet β " sont requises pour l'interaction avec la PLC. Cette région est située près de la "switch région III", une région subissant un changement conformationnel important lorsque la sous-unité α est activée par l'échange du GDP par le GTP. Cet arrangement particulier pourrait également expliquer l'activité GAP (GTPase activating protein) de la PLC sur le $G\alpha_q$ activé (⁴²).

L'importance de l'intégration du signal d'activation de la voie métabolique des PLC est bien démontrée par l'action de l'Angiotensine II (Ang II), l'hormone circulante principale provenant du métabolisme rénin-angiotensin. Cette hormone exerce une double

action sur le système cardio-vasculaire en agissant à la fois sur la régulation de la concentration de sodium et par son effet sur le tonus vasculaire (Hypertension). Jusqu'à présent, il semble que la plupart des activités de l'Ang II soit moduler par deux sous-types de récepteur couplés aux protéines G (AT1, AT2). L'activation de ces récepteurs par Ang II active la PLC via une $G\alpha_q$ et mène à la production d'inositol triphosphate et de diacylglycerol. Ces processus mènent ultimement a une augmentation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} et à une modulation de l'activité de protéine kinase C (PKC).

L'activation de cette voie PLC/PKC semble être la première étape de la réponse physiologique à l'AngII, celle-ci provoque ainsi une vasoconstriction importante et une augmentation des contractions of cardiaques.

D'autres familles de phospholipases sont aussi couplées directement ou indirectement à la voie de signalisation des récepteurs couplés aux protéines G. C'est le cas de la phospholipase D (PLD) qui présente une modulation importante par l'activation de la PKC qui résulte de l'activation de G_i ou G_q (⁴³). La phospholipase A_2 (PLA_2) est un autre enzyme hydrolytique des composantes membranaires qui a été rapporté comme étant modulé par les récepteurs couplés aux protéines G. La PLA_2 hydrolyse le lien 2-acyl ester des phospholipides membranaires pour générer des acides gras libres et des lysophospholipides. L'acide arachidonique est le plus important produit de l'hydrolyse des acides gras et il est le précurseur de la cascade métabolique des eicosanoïdes. Cette grande diversité d'enzymes hydrolytiques modulés par la protéine G nous suggère que la membrane plasmique est, non seulement une enveloppe physique où baigne les protéines membranaires, mais aussi un réservoir de matières premières servant à la production de seconds messagers. La membrane plasmique participe physiquement et chimiquement à l'élaboration des réseaux de signalisation.

1. 3. 4. 3 Régulation des canaux ioniques

Les canaux ioniques sont des effecteurs importants impliqués dans la transmission rapide de signaux. Certains de ces canaux sont régulés par les protéines G (⁴⁴). Ceci fut

démontré pour l'activation des "G proteins gated inward rectifier channels" (I_{KAch} , GIRK1/CIR, GIRK1/GIRK2) (⁴⁵) et pour l'inhibition des canaux calciques de type N et P/Q (⁴⁶). Cette activation des canaux potassiques fut la première évidence du rôle fonctionnel de $G\beta\gamma$ au lieu du rôle de $G\alpha(i/o)$ qui inhibe l'activation de I_{KAch} (⁴⁷). Le canal GIRK1 interagit avec CIR pour former le canal I_{KAch} lui-même régulé par les protéines G. Par ailleurs, plusieurs neurotransmetteurs associés aux protéines G inhibent les canaux Ca^{2+} N et P/Q (⁴⁸). L'activation des récepteurs couplés aux protéines G induit une cascade dans la transmission du signal qui incite le récepteur-canal à adopter une conformation réfractaire dans laquelle le canal s'ouvre moins souvent pendant la dépolarisation (canaux Ca^{2+} N et P/Q).

L'exemple le plus probant de l'importance physiologique de la régulation des canaux ioniques régulés par les protéines G vient probablement du rôle des GIRK dans l'activité physiologique du nerf vague. L'activation du nerf vague ralentit le rythme cardiaque en hyperpolarisant les cellules "pacemaker" de l'atrium via un relâchement d'acétylcholine. Cette hyperpolarisation est la conséquence de l'ouverture d'un GIRK (canal potassique) suite à la modulation produite par une sous-unité $\beta\gamma$ provenant de l'activation de récepteur cholinergique (M_2).

Pour le moment, il n'est pas encore clairement démontré comment $G\beta\gamma$ interagit avec les canaux Ca^{2+} . Cependant, les canaux calciques comportent un domaine putatif d'interaction avec le dimère $\beta\gamma$ (QXXXER) mais l'importance de cette région demeure encore spéculative (⁴⁹). Depuis les dix dernières années, nos connaissances sur le rôle de $G\beta\gamma$ dans la transduction de signaux ont évolué du simple rôle d'ancrage et de régulateur de $G\alpha$ vers la démonstration de son interaction et modulation de plusieurs effecteurs incluant les canaux ioniques. En plus de ces effecteurs, le dimère $\beta\gamma$ semble également impliqué dans les mécanismes de régulation du cycle cellulaire via les MAP kinases.

1. 3. 4. 4 Régulation des phosphotyrosines phosphatases et des MAP kinases

Chez les cellules de mammifères, la croissance cellulaire est contrôlée par les récepteurs tyrosine kinases et par les récepteurs couplés aux protéines G. Dans la cascade mieux définie des tyrosine kinases, les récepteurs liant un ligand agoniste favorisent leur propre autophosphorylation et/ou procède à la phosphorylation des tyrosines sur des protéines qui présentent une grande affinité de liaison pour un domaine SH2. Ces domaines SH2 (et SH3) modulent l'interaction entre les récepteurs phosphorylés sur leur tyrosine et des protéines adaptatrices (Shc, Grb2 et Sos), résultant en une activation dépendante de Ras de la cascade des MAP kinases. Ces kinases, démontrent des propriétés mytogéniques et induisent la phosphorylation et l'activation de facteurs de transcription nucléaire qui sont impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire. Les premières évidences moléculaires de l'implication des protéines G dans le cycle cellulaire nous proviennent de la génétique de la levure *Saccharomices cerevisiae* (⁵⁰). Chez la levure, les sous-unités $\beta\gamma$ homologues (STE4, STE18) sont responsables de la signalisation et de l'activation d'une cascade de kinases (STE11, STE7, FUS/, KSS) alors que la sous-unité α agit comme régulateur négatif (⁵¹).

On rapporte également de plus en plus d'observations qui impliquent les récepteurs couplés aux protéines G dans la régulation du cycle cellulaire des mammifères. Les protéines G sensibles et insensibles au PTX seraient ainsi capables d'initier la cascade des MAP kinases (⁵² pour résumé). Certains systèmes insensibles à PTX activeraient une voie alternative des MAP kinases par l'entremise de la PKC via une cascade indépendante de Ras (⁵³) alors que les voies sensibles à PTX utilisent G $\beta\gamma$ pour activer une voie de signalisation des MAP kinases associées à un système dépendant de Ras (⁵⁴). Une explication plausible abordée précédemment est que G $\beta\gamma$ utilise la même voie d'activation des MAP kinases que celle activée par les récepteurs tyrosine kinase qui n'ont pas d'activité intrinsèque de tyrosine kinase. Ces récepteurs recrutent des membres de la famille Src (kinases, Lck, Fyn et cSrc). Cependant, selon mes connaissances

actuelles, il appert que le mécanisme par lequel $G\beta\gamma$ module la formation du complexe Shc/Grb2/Sos ainsi que la manière dont ce complexe stimule Ras et la cascade des MAP kinases soient mal caractérisés. L'activation des MAP kinases par $G\beta\gamma$ pourrait potentiellement être le rôle le plus important du dimère $\beta\gamma$, impliquant directement les récepteurs couplés aux protéines G dans la régulation du cycle cellulaire et dans plusieurs pathologies comme le cancer.

Nous avons couvert les grandes lignes des mécanismes d'activation de la signalisation des récepteurs jusqu'aux effecteurs. Ces mécanismes sont complexes, mais ils sont de mieux en mieux définis. Cependant, un domaine encore peu caractérisé pour la plupart des récepteurs couplés aux protéines G, sauf exception du récepteur β_2 adrénergique, est la régulation de cette signalisation. Dans les sections qui suivent, nous aborderons les mécanismes de régulation des récepteurs couplés aux protéines G. Ces mécanismes sont très importants car ils influencent directement la durée et l'intensité d'action des médicaments agonistes.

1. 3. 5 Régulation des fonctions des récepteurs couplés aux protéines G et mécanismes d'atténuation de la réponse

Pour la plupart des cellules, les réponses cellulaires aux agonistes sont rapidement atténuées afin de prévenir une trop grande ou une trop longue activation qui pourrait affecter l'homéostasie cellulaire en prévenant la répétition successive de la réponse aux agonistes. Comme pour beaucoup de processus biologiques importants, plusieurs mécanismes parallèles et redondants sont impliqués dans le contrôle de la réponse cellulaire. Pour cette raison, les mécanismes d'atténuation des signaux impliquent à la fois les récepteurs, les protéines G et plusieurs étapes ultérieures du mécanisme de couplage.

Le premier des processus impliqués dans la terminaison d'un signal est l'élimination des agonistes du milieu extracellulaire, soit par des mécanismes de captation

par des transporteurs (recapture, “uptake”) ou soit par une dégradation enzymatique de l’agoniste. Le second processus d’atténuation implique la désensibilisation des récepteurs survenant lors de courtes expositions à l’agoniste. Cette étape est une conséquence du découplage fonctionnel du récepteur et de la protéine G. L’élimination des récepteurs de haute affinité de l’agoniste de la surface membranaire par des mécanismes d’endocytose contribue à la désensibilisation et la terminaison du signal par un troisième processus également observé à court terme. Finalement, de plus longues expositions à l’agoniste induisent une série de processus de régulation à la baisse (sous-régulation) qui provoquent une diminution du nombre de récepteurs fonctionnels exprimés chez la cellule (⁵⁵). Tous ces mécanismes sont importants puisqu’ils déterminent l’habileté et la capacité d’un système à répondre à la présence de molécule agoniste. On doit également constater que la régulation de la réponse des récepteurs couplés aux protéines G est un processus qui nécessite une étroite coordination entre l’activation du récepteur, la désensibilisation de la réponse et la resensibilisation du récepteur. Afin de mieux comprendre la complexité de ce processus de régulation des récepteurs couplés aux protéines G, une description plus approfondie de ces mécanismes est présentée aux sections suivantes.

1. 3. 5. 1 Élimination du signal extracellulaire

Plusieurs processus contribuent à l’élimination des hormones et neurotransmetteurs du milieu extracellulaire permettant ainsi une diminution du signal, l’importance de ces processus varie selon la nature de l’agoniste. Par exemple, la recapture des neurotransmetteurs par des transporteurs est l’un des mécanismes d’élimination des agonistes le plus répandu. Il permet de prévenir efficacement de nouvelles stimulations et permet également de récupérer l’agoniste si celui-ci est réintroduit dans sa zone d’origine. Il existe plusieurs types de transporteurs qui sont classés selon leur homologie de séquence, leur dépendance ionique et le substrat transporté. Par exemple, les transporteurs des monoamines (sérotonine, dopamine, etc.) ont besoin de Na⁺ (gradient transmembranaire) et du Cl⁻ pour leur activité. Certaines

médicaments psychoactive (i. e. fluoxétine = Prozac) exercent leur effet en inhibant un transporteur, dans ce cas-ci celui de la sérotonine, prolongeant ainsi l'action de l'agoniste activateur.

Pour certains neurotransmetteurs (acétylcholine) et certains peptides, la dégradation extracellulaire est le mécanisme prépondérant de leur élimination. L'acétylcholinestérase, un enzyme localisé dans la fente synaptique est responsable de la dégradation du neurotransmetteur acétylcholine en acétate et en choline qui est récupéré par le neurone qui l'utilise de nouveau dans la synthèse du neurotransmetteur. Les peptides sont dégradés différemment et plus lentement par une famille d'enzyme protéolytiques spécialisées, ce qui peut expliquer en partie leur longue durée d'action. Le prototype le mieux connu de ces enzymes est l'endopeptidase neutre (NEP; EC 3. 4. 24. 11: selon la nomenclature enzymatique) qui dégrade une grande variété de substrats (substance P, facteur de relâchement de la gastrine, enképhaline, neurokinine somatostatine, cholecystokinine et bradykinine) qui possèdent des résidus hydrophobes (Phe, Leu, Val, Tyr, Trp). Ces deux mécanismes d'atténuation du signal constituent le premier niveau de contrôle dans la régulation de l'entrée des signaux cellulaires.

1. 3. 5. 2 Désensibilisation, phosphorylation et action des kinases sur les récepteurs couplés aux protéines G

La deuxième ligne de défense que la cellule a élaboré pour faire face à une surstimulation par les agonistes se situe au niveau du récepteur même, c'est la désensibilisation de la réponse à l'agoniste qui en est le principal élément régulateur. La désensibilisation de la réponse des récepteurs couplés aux protéines G est la conséquence de plusieurs phénomènes qui, en association, amènent une réduction de l'efficacité ou une perte totale de la réponse à l'agoniste (activation de la cascade métabolique des protéines G). Le plus rapide (seconde à minute) et le plus prédominant de ces phénomènes est la phosphorylation des récepteurs qui survient suite à l'activation de protéine kinases dépendantes des messagers secondaires (protéine kinase A, PKA et protéines kinases C,

désensibilisation homologue qui est produite par l'activation du même récepteur alors que la désensibilisation hétérologue survient suite à l'activation d'un autre type de récepteur. L'effet prédominant des phosphorylations qui mène à une désensibilisation est la perte du couplage fonctionnel entre le récepteur et la protéine G, ce qui prévient l'activation subséquente par l'agoniste. La phosphorylation des protéines et la régulation de ce procédé (incluant les phosphatases) est possiblement le mécanisme de régulation le plus répandu dans la cellule. On estime que plus de 10 % de tous les types de protéines seraient régulés par ce type de modification.

Pour les récepteurs couplés aux protéines G, la désensibilisation par les kinases régulées par les second messagers, fut le premier mode de régulation observé. La PKA qui est reconnue pour moduler la phosphorylation et la désensibilisation homologue du récepteur β_2 adrénergique (⁵⁶) migre de la fraction cytosolique vers la fraction membranaire suite à l'exposition aux agonistes et à la production de niveaux élevés de cAMP. Une autre kinase, la PKC subit elle aussi une relocalisation du cytosol vers différentes fractions cellulaires suite à son activation par le diacylglycérol. Cependant, cette translocation nécessite un site d'ancrage (RACK) pour la translocation des PKC activées du cytosol vers différentes fractions cellulaires. Un de ces sites d'ancrage est un homologue de la sous-unité β des protéines G. Grâce à ce site d'ancrage, la PKC cible son activité vers la désensibilisation des récepteurs couplés aux protéines G (⁵⁷). Les récepteurs couplés aux protéines G qui sont le substrat de la PKC incluent : le récepteur M_1 muscarinique, A_1 de l'angiotensine II, le récepteur 5-HT_{2C} de même que plusieurs autres récepteurs. Les kinases régulées par les messagers secondaires peuvent participer indirectement à la désensibilisation des récepteurs en régulant directement les activités de d'autres kinases. Par exemple, pour les cellules T périphériques humaines, l'activation de la PKC augmente la régulation ("up-regulate") des GRKs (⁵⁸). Cette observation suggère que les PKC peuvent affecter le niveau d'expression des GRKs pour produire une désensibilisation de l'activité des agonistes longtemps après leur activation initiale. Les PKC peuvent aussi phosphoryler, entre autres, les protéines G (Gz), parmi de multiples autres protéines impliquées dans la signalisation membranaire. Ils est donc possible que les kinases agissent aussi en aval du récepteur pour induire un découplage fonctionnel.

L'action des GRK est beaucoup mieux définie que celle des kinases régulées par les messagers secondaires qui, eux, modifient des centaines de classes de protéines. Les GRK modulent spécifiquement la désensibilisation homologue des récepteurs en conformation(s) active(s). Pour pouvoir désensibiliser le récepteur actif, la GRK doit aussi être localisée à la membrane plasmique comme pour les autres kinases. Pour favoriser cette localisation à la membrane, les GRKs (1-3) utilisent les propriétés hydrophobes des sous-unités $\beta\gamma$ grâce à une région C-terminale de 125 résidus (PH domaine) qui interagit avec le dimère $\beta\gamma$ qui lui sert d'ancrage membranaire. Puisque les dimères $\beta\gamma$ libres sont en plus grande concentration dans la région où les récepteurs sont activés, le mécanisme de translocation vient lui aussi favoriser la désensibilisation préférentielle des récepteurs en forme(s) active(s). GRK5 fait exception et ne présente pas de translocation puisqu'elle est déjà localisée dans le compartiment membranaire alors que la translocation de GRK6 et GRK4 dépend principalement d'une palmitoylation d'un résidu cystéine présent en C-terminal de ces GRKs. La sélectivité et la spécificité de substrats des GRKs demeurent mal définies, mêmes si celles-ci présentent une distribution tissulaire assez différentes. Parmi les récepteurs phosphorylés par les GRKs, on retrouve des récepteurs couplés à Gs (β_2 adrénergique), couplés à Gi (α_2 adrénergiques) et des récepteurs couplés à Gq ($M_{1,3,5}$ et NK1). L'absence de séquence consensus pour définir les sites de phosphorylation spécifiques aux GRKs rend difficile l'identification des sites d'interaction et de phosphorylation sur le récepteur. Il est même possible que la structure tridimensionnelle du récepteur soit plus importante que l'arrangement séquentiel de certains résidus susceptibles d'être modifiés par une activité protéine kinase. Une autre difficulté inhérente à l'identification de sites d'action spécifiques aux GRKs vient du fait qu'un récepteur peut être régulé de manière différente selon le type cellulaire étudié (peut-être en raison de différentes combinaisons de PKC et GRKs). Les GRKs possèdent également des cofacteurs au niveau fonctionnel, ce sont les arrestines. Deux arrestines (β -arrestines 1, 2) ont été identifiées pour leur capacité à prévenir l'activation du récepteur β_2 adrénergique par les agonistes. Ces arrestines se lient aux récepteurs phosphorylés et interfèrent présumément avec l'interaction récepteur/protéine G. Cette activité est synergique uniquement avec l'activité des GRKs,

ce qui implique l'arrestine dans un rôle unique de désensibilisation homologue des récepteurs. Les arrestines présentent une large distribution ce qui suggère qu'elles sont possiblement impliquées dans la régulation de plusieurs types de récepteurs.

Certains récepteurs couplés aux protéines G sont aussi régulés par des modifications au niveau des cystéines situées en C-terminales. La palmitoylation de ces résidus favorise la formation d'une quatrième boucle cytoplasmique du récepteur. Cette modification labile est réversible. L'absence de palmitoylation favorise la régulation du récepteur β_2 adrénergique par la PKA, favorisant de la même façon la désensibilisation du récepteur. La régulation dynamique de ce processus pour le récepteur β_2 adrénergique peut donc influencer grandement la désensibilisation du récepteur. Cette régulation via la palmitoylation n'est pas un mécanisme universel puisque la délétion de la cystéine modifiée par palmitoylation pour le récepteur α_2 adrénergique n'affecte pas la désensibilisation à l'agoniste de ce récepteur. Cependant, des perturbations de l'interrelation dynamique des différentes composantes palmitoylées du système de signalisation (protéine G, récepteur et GRK6) pourraient contribuer indirectement à la désensibilisation du système.

1. 3. 5. 3 Endocytose, séquestration et resensibilisation des récepteurs couplés aux protéines G

La capacité de réponse d'un système de signalisation est directement dépendante de la présence et de la quantité de récepteurs localisés dans la membrane plasmique. Pour cette raison, les processus dynamiques de distribution cellulaire, d'endocytose et de séquestration des récepteurs couplés aux protéines G jouent un rôle important dans les mécanismes régulant la désensibilisation. La voie métabolique prédominante dans l'internalisation des récepteurs couplés aux protéines G dépendante de l'agoniste, implique des mécanismes d'endocytose impliquant la clathrine. Le récepteur β_2 adrénergique, NK-1 et même le récepteur à la thrombine sont internalisés via des "clathrin coated pits". Un mécanisme dépendant des caveoline serait également impliqué dans l'internalisation des

récepteurs β_2 adrénergique, ETa endothéline et CCK_A (⁵⁹). Lors de l'endocytose du récepteur, le complexe récepteur/ligand découplé de la protéine G est internalisé par l'interaction avec la clathrine pour former des vésicules qui perdent rapidement la clathrine pour devenir des endosomes. Lors de la séquestration des récepteurs dans ces endosomes, qui ne sont plus en contact avec la membrane plasmique, l'acidification du milieu favorise la dissociation du ligand. Des phosphatases endosomales peuvent également déphosphoryler le récepteur le libérant ainsi de son interaction avec la β -arrestine. Le récepteur serait par la suite recyclé vers la membrane plasmique par un mécanisme encore méconnu.

Dans le processus d'endocytose, la β -arrestine jouerait un rôle dynamique en fonctionnant comme une molécule "adaptatrice" en recrutant des protéines cellulaires impliquées dans l'internalisation des récepteurs. La dynamine est une protéine qui interagit avec β -arrestine. Celle-ci permet d'augmenter l'endocytose du récepteur (⁶⁰). Il est important de spécifier que plusieurs évidences suggèrent que la phosphorylation dépendante de la PKA ou des GRK n'est pas essentielle à la séquestration du récepteur, mais qu'elle en augmente l'efficacité. Certains récepteurs couplés aux protéines G posséderaient des motifs riches en tyrosine dans le TMVII (Asn-Pro-XXX-Tyr) qui seraient vraisemblablement impliqués dans la coordination du processus d'endocytose. Malheureusement, ces observations demeurent trop spéculatives pour en tirer une conclusion. Une question plus importante sur la séquestration des récepteurs se pose: Comment la liaison d'agonistes induit-elle l'internalisation des récepteurs? La réponse demeure encore hypothétique, mais on propose que la liaison d'agonistes induit un changement conformationnel ou une modification du récepteur (phosphorylation?) qui pourrait exposer des motifs de reconnaissance de l'endocytose ou des régions susceptibles d'interagir avec des protéines impliquées dans le processus d'endocytose. L'activation des protéines G et la production de messagers secondaires pourraient être les éléments déclencheurs de l'endocytose. Cependant, des antagonistes des récepteurs CCK_A exprimés en cellules induisent l'internalisation du récepteur (⁶¹). Comme on ignore si ces antagonistes sont des agonistes inverses (propriété de stabilisation de la forme inactive, voir section 1. 4. 1. 3) on ne peut spéculer sur la forme internalisée de ce récepteur. Il est

possible que cette propriété des antagonistes CCK soit indépendante de l'agonisme inverse mais soit plutôt un reflet de la sous-régulation atypique qui sera décrite à la section suivante. La possibilité que la forme active et la forme internalisée soit la même n'est pas encore clairement établie. Une explication alternative pourrait être que les domaines impliqués dans l'internalisation et le couplage aux protéines G sont rapprochés mais distincts. En réduisant le nombre de récepteurs de haute affinité capables d'interagir au niveau de la membrane avec les hormones, les neurotransmetteurs et les agonistes de toute nature, l'endocytose induite par l'occupation des agonistes contribue possiblement à la désensibilisation de la réponse du système de couplage. Il est important de noter que le blocage de ce processus ne prévient pas la désensibilisation du récepteur. Seul la présence d'inhibiteurs des kinases démontre l'importance de l'internalisation du récepteur sur la désensibilisation de la réponse. L'endocytose fait donc partie d'un ensemble de mesures de réduction du signal. Le processus d'endocytose me semble avoir un rôle beaucoup plus significatif dans le processus de resensibilisation de certains récepteurs comme le β_2 adrénergique et le récepteur NK-1. Il est donc possible que l'internalisation contribue plus au retour du signal qu'à son atténuation.

1. 3. 5. 4 Sous-régulation typique et atypique des récepteurs couplés aux protéines G

Le processus classique (typique) de sous-régulation est caractérisé par une perte de récepteurs observée suite à l'exposition prolongée aux agonistes. Du point de vue physiologique, on peut facilement envisager qu'il est assez rare qu'un récepteur soit exposé continuellement aux hormones ou aux neurotransmetteurs qui sont habituellement éliminés du milieu extracellulaire par plusieurs mécanismes. Cependant, certaines pathologies pourraient favoriser des sécrétions hormonales accrues exposant le récepteur de façon chronique à des doses élevées d'agonistes. La sous-régulation d'une population de récepteurs sera particulièrement importante dans les protocoles thérapeutiques impliquant une administration à long terme d'agonistes. Dans ces circonstances, il n'est pas rare d'observer de sérieux problèmes de tolérance ou de tachyphylaxie qui limite l'utilisation prolongée de certains médicaments.

Les processus impliqués dans la sous-régulation sont beaucoup moins connus que ceux impliqués dans la désensibilisation. On reconnaît toutefois, que deux mécanismes, la dégradation et la réduction de synthèse du récepteur, sont à la base des phénomènes de sous-régulation observés après une exposition chronique pour les récepteurs couplés aux protéines G. Le récepteur pour lequel le processus de sous-régulation est le mieux décrit est le récepteur β_2 adrénergique. Pour le récepteur β_2 adrénergique, au moins deux voies de signalisation contribuent à la sous-régulation du récepteur. Premièrement, un processus qui est indépendant de la PKA mais dépendant de la présence d'agoniste et deuxièmement un processus hétérologue dépendant de la PKA. Les processus indépendants de la PKA sont maintenant connus pour être dépendants des GRK et ils ne seraient pas impliqués dans la dégradation des récepteurs couplés aux protéines G. La migration des endosomes contenant des récepteurs internalisés vers des lysosomes de dégradation demeure un mécanisme spéculatif de la dégradation des récepteurs couplés aux protéines G. Il est également proposé que des mécanismes de protéolyse associés à l'ubiquitine soient impliqués dans la dégradation des récepteurs. Il est à considérer que ces observations ont été rapportées uniquement pour le récepteur Ste2p chez la levure. Il est donc impossible d'appliquer ou de généraliser ce processus aux autres récepteurs couplés aux protéines G.

Le deuxième aspect important de la sous-régulation des récepteurs est associé à une diminution de la synthèse du récepteur. Cette diminution pourrait provenir d'une réduction de la transcription du gène ou d'un événement posttranscriptionnel qui déstabiliserait l'ARN messager. La déstabilisation de l'ARN messager serait le principal responsable de la réduction du message codant pour les récepteurs suivant les longues expositions à des agonistes. Ce mécanisme est prévalent pour le récepteur β_2 adrénergique, de la thrombine, endothéline ETB1 et pour le récepteur muscarinique M_1 . Il est donc possible que plusieurs autres récepteurs soient régulés de la même manière. Par ailleurs, pour le récepteur β_2 adrénergique, la déstabilisation de l'ARNm est intimement dépendante des niveaux de AMPc et de l'activation de la PKA qui impliquerait la phosphorylation d'un facteur impliqué dans la dégradation sélective du ARNm. Ce facteur de régulation correspond aux activités d'une protéine de 35 kDa qui

se lie au ARNm codant pour le récepteur β_2 adrénergique pour produire une importante sous-régulation du récepteur (⁶²). La plupart des études pharmacologiques étant focalisées sur les étapes initiales de la régulation de la signalisation, peu d'informations sont disponibles sur les effets à long terme des traitements avec les agonistes. Ces effets sont, néanmoins, très importants en raison de la tolérance développée lors de certains traitements chroniques; ce qui limite leur utilisation thérapeutique.

Bien que la sous-régulation soit typiquement associée à la perte de sites induite par les agonistes, des observations suggèrent que les antagonistes induisent aussi une diminution du nombre de récepteurs. Cette sous-régulation désignée atypique est particulièrement importante pour les antagonistes neuroleptiques qui induisent une diminution significative des récepteurs de type 5-HT₂ (A et C) lors de traitements chroniques chez le rat (section 2. 0. 2. 1 ⁶²⁻⁶⁴). Ce phénomène atypique pourrait être important si l'on considère que les antipsychotiques ont une phase latente avant d'avoir une activité. Les antipsychotiques sont prescrits en régime d'administration chronique, ce qui implique possiblement un mécanisme d'adaptation à long terme de la régulation des récepteurs par l'activité des antagonistes. J'utilise, ici, le terme "activité" pour les antagonistes afin d'introduire la notion que les antagonistes possèdent eux aussi une activité intrinsèque qui affecte directement l'activité du récepteur. Cette hypothèse sera étudiée plus longuement dans cette introduction. Chez le rat, le traitement chronique aux antagonistes sérotoninergiques induit une réduction de la densité de récepteurs 5-HT_{2C} au niveau du plexus choroïdien après plusieurs jours (^{63, 64, 65}), alors que pour les cellules Sf9 exprimant le récepteur 5-HT_{2C} du rat, le phénomène est observé après quelques minutes avec certains antagonistes sérotoninergiques (voir section 2. 0. 2. 1). Malgré cette différence, la sous-régulation observée *in vitro* en cellules d'insectes est identique aux observations *in vivo* chez le rat. Les résultats de l'étude de la sous-régulation atypique en cellules Sf9 font partie des observations présentées et discutées dans ce manuscrit. Le mécanisme de sous-régulation atypique est inconnu. Jusqu'à présent, aucun modèle cellulaire n'était disponible pour examiner *in vitro* ce phénomène inusité des antagonistes sérotoninergiques. Ce phénomène de sous-régulation atypique ne peut être expliqué par les mécanismes classiques de sous-régulation associés aux traitements chroniques avec

les agonistes. Il s'agit d'un phénomène encore mal connu dont les implications fonctionnelles sont discutées en détail à la section "discussion" de ce manuscrit.

Par ailleurs, en plus d'être régulée par différents processus, la réponse d'un système biologique est modulée par la liaison du ligand avec le récepteur. La nature du ligand lié, ainsi que son affinité pour le récepteur auront donc une grande influence sur la réponse et sur les mécanismes qui régulent cette réponse. Examinons plus en détail les principes pharmacologiques associés aux mécanismes impliqués dans l'interaction ligand/récepteur/protéine G.

1. 4 PRINCIPES PHARMACOLOGIQUES FONDAMENTAUX

Afin de bien saisir l'importance des propriétés des ligands sur la régulation de la réponse cellulaire, étudions quelques principes fondamentaux qui caractérisent la nature pharmacologique des ligands des récepteurs couplés aux protéines G. Dans les sections suivantes, nous nous pencherons sur les connaissances actuelles des notions d'affinité, de puissance et d'efficacité des ligands.

1. 4. 1 Nature et aspect quantitatif de l'interaction des médicaments et des récepteurs couplés aux protéines G

Depuis l'avènement des radioligands, le désir de quantification des capacités d'interaction des médicaments avec leur site d'action, en l'occurrence le récepteur, a pris un très grand essor. Cette nouvelle technique nous a permis de caractériser et d'identifier la plupart des membres de la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G. D'après la loi d'action de masse et son application à l'interaction récepteur/ligand décrit par l'équation de Langmuire, il est possible de décrire mathématiquement et quantitativement l'interaction entre un récepteur et un ligand (médicament).

$$pa = \left(\frac{xa / Ka}{xa / Ka + 1} \right); Ka \text{ (affinité pour le récepteur), } pa \text{ (fraction occupée), } xa$$

(concentration de ligand *a*)

Cette équation démontre la relation entre la concentration du ligand et son niveau d'occupation du récepteur et se présente graphiquement sous la forme d'une hyperbole rectangulaire. La plupart des activités pharmacologiques des médicament répondent selon des processus saturables pouvant être représentés par ce genre d'équation. Selon cette équation, plus l'affinité du ligand est élevée, plus faible sera sa concentration pour

saturer les sites de liaison. Le même principe est applicable lorsque deux ou plusieurs ligands compétitionnent pour le même site, chacun affectant l'affinité apparente de l'autre.

Ainsi pour des ligands compétitifs, on retrouve: $p_a = \left(\frac{x_a / K_a}{x_a / K_a + x_b / K_b + 1} \right); K_b$
(affinité du ligand b).

L'importance de pouvoir quantifier et caractériser les constantes mathématiques d'un processus pharmacologique est mise en évidence lorsqu'on doit comparer différents ligands ou lorsqu'on veut établir le profil pharmacologique d'un récepteur. Le profil pharmacologique d'un récepteur est en quelque sorte sa signature pharmacologique qui nous permet de l'identifier et de le classer selon son affinité pour les ligands. Le besoin de classification s'applique aussi aux ligands.

Les récepteurs sont, cependant, bien plus que de simples sites de liaison caractérisés par leur affinité pour certains ligands puisqu'ils interagissent physiquement avec des protéines G transductrices qui transmettent le signal de liaison vers une réponse fonctionnelle dans la cellule ou le tissu. Tel que décrit précédemment, la signalisation des récepteurs couplés aux protéines G implique une interaction allostérique réciproque des différentes composantes de l'unité de signalisation. Cette propriété fait que les ligands qui interfèrent ou engendrent ces interactions affectent directement la réponse fonctionnelle.

Dans cette optique, si l'on considère que les récepteurs sont la porte d'entrée de la signalisation de plusieurs voies métaboliques, cela implique que nous devrions également considérer que l'efficacité des ligands découle de la modulation de l'activité des récepteurs par l'agoniste, mais aussi des paramètres biochimiques caractéristiques du système étudié (stoechiométrie et nature des composantes de signalisation). Le concept d'efficacité est un paramètre fondamental de l'analyse de l'action des ligands sur les récepteurs. Cette efficacité peut être un facteur déterminant de la capacité thérapeutique de certains composés. Cet aspect de l'activité des médicaments est habituellement

caractérisé par des tests fonctionnels qui permettent de mesurer l'activation d'une cascade enzymatique par le récepteur liant le ligand. La mesure des activités des effecteurs (mesure des messagers secondaires) est certainement la plus répandue des approches de mesure fonctionnelle utilisées de nos jours. On retrouve deux grandes catégories de ligands avec des efficacités multiples qui varient des agonistes jusqu'aux antagonistes. Les ligands démontrent également une puissance (EC_{50}) pour une réponse donnée, qui correspond à la concentration effective de ligands pour obtenir 50 % de la réponse maximale. Cette propriété dépend elle aussi du ligand et du système pharmacologique étudiés (récepteur et type cellulaire). Une section importante de la discussion aborde plus en détail les implications de la nature du système biologique sur la puissance et l'efficacité du ligand (voir section 3. 2).

1. 4. 1. 1 Activité agoniste des médicaments

Les agonistes sont des ligands qui imitent l'action du transmetteur naturel en se liant au même site de liaison et en activant la protéine G. Cela a pour effet de moduler la signalisation vers une réponse fonctionnelle. Selon les systèmes d'expression étudiés, en présence d'un couplage entre le récepteur et la protéine G, il serait possible de démontrer deux composantes ou sites de liaison pour les agonistes. En présence d'analogues non hydrolysables du GTP (activateur de la protéine G), le site de haute affinité de liaison disparaît et seul le site de basse affinité demeure. Une telle observation suggère qu'un couplage physique existe entre le récepteur et la protéine G puisque le découplage produit par le GTP γ S entraîne une diminution de l'affinité du récepteur pour l'agoniste. Par ailleurs, l'évidence d'un couplage fonctionnel entre le récepteur et la protéine G est démontrée principalement par l'activité des agonistes lors de tests fonctionnels de mesure de messagers secondaires ou de toute autre réponse. L'activation de la réponse fonctionnelle d'un récepteur ne fonctionne pas selon un mode de tout ou rien, mais plutôt selon une réponse graduelle qui génère des courbes dose-réponse où l'on observe une amplitude (E_{max}) et une puissance de la réponse (EC_{50}). Donc, on observe que durant la mesure de l'activité fonctionnelle, différents agonistes peuvent démontrer différentes

amplitudes de réponse dans un même système. Cette propriété que l'on nomme efficacité est partiellement indépendante de leur affinité de liaison, mais elle est dépendante de l'activité intrinsèque (positive) du ligand qui lui permet d'activer ou de promouvoir la conformation active du récepteur. Par contre, la puissance (EC_{50}) de différents agonistes sont directement dépendante de leur affinité pour le récepteur d'un même système biologique. Cette dépendance vient du fait que la fraction occupée par l'agoniste correspond généralement à une fraction activable équivalente du signal de sortie. Il y a, cependant, plusieurs exceptions où l'on observe que des concentrations saturantes de ligands ne produisent que des réponses partielles. Ceci nous indique que l'occupation du récepteur (affinité) ne peut être le seul paramètre déterminant la puissance du ligand.

Selon les principes que nous étudierons plus loin dans les modèles allostériques de l'interaction récepteur/protéine G on peut classer les ligands selon leur efficacité (section 1. 4. 2). On retrouve ainsi des agonistes purs ($\alpha > 1$) qui présentent une réponse maximale et des ligands moins efficaces qui présentent une réponse partielle (agoniste partiel, $1 < \alpha > 0$). Si certains agonistes possèdent une faible efficacité, d'autres ligands sont complètement inactifs dans un système donné. C'est ainsi que les antagonistes furent traditionnellement considérés comme possédant aucune activité intrinsèque, c'est-à-dire qu'ils occupent le site de liaison sans affecter l'activité de couplage. Cette notion désuète soutenait que l'activité des antagonistes était uniquement dépendante de la présence de l'agoniste, puisqu'ils devaient agir uniquement en compétition avec l'agoniste pour le site de liaison. Ces ligands sont maintenant considérés comme des antagonistes neutres ($\alpha = 0$). Une autre classe d'antagonistes, les agonistes inverses ($\alpha = -1$) est examinée à la section 1. 4. 1. 3.

1. 4. 1. 2 Activité antagoniste des médicaments

On répertorie plusieurs catégories d'antagonistes qui inhibent l'activité des agonistes, comme par exemple les antagonistes chimiques qui interagissent chimiquement avec l'agoniste, physiologiques i.e. deux agents ayant des effets sur des systèmes opposés, pharmacocinétiques i.e des agents affectant l'absorption, le métabolisme etc., non compétitifs i.e inhibition via un autre site et finalement, les antagonistes compétitifs i.e interaction sur le même site de liaison. Généralement, lorsqu'on parle d'antagonistes pharmacologiques des récepteurs couplés aux protéines G, on réfère à cette dernière catégorie d'antagonistes. Bien que les antagonistes furent longtemps considérés comme étant dépourvus d'activité intrinsèque ($\alpha > 0$), nous savons maintenant que ceux-ci peuvent présenter une activité inverse à celle des agonistes.

Cette activité, dites agoniste inverse, correspond à la capacité de certains antagonistes à inhiber l'activité spontanée d'un récepteur. Dans ce nouveau concept, les ligands ne sont plus délimités par les notions rigides d'agonistes ou d'antagonistes, mais plutôt selon l'idée d'une gamme d'efficacité qui va de l'agoniste pure jusqu'à l'agoniste inverse en passant par les agonistes partiels et par les antagonistes neutres (antagonistes classiques). Cette manière de concevoir les ligands est intimement liée au concept de conformations multiples des récepteurs couplés aux protéines G, tel que suggéré par les nouvelles observations de récepteurs démontrant des activités spontanées en l'absence de ligands. Malgré le fait qu'il est encore difficile, voir impossible, de prédire si un ligand sera un agoniste, un antagoniste ou un agoniste inverse en se basant sur sa structure, différents modèles thermodynamiques nous permettent maintenant de modéliser l'action des ligands sur l'activation de la signalisation, ce qui nous permet de mieux comprendre comment les différents types de ligands influencent les activités des récepteurs (voir section 1.4.2.1).

1. 4. 1. 3 Activation spontanée et constitutive des récepteurs couplés aux protéines G et activité agoniste inverse des antagonistes

Avant d'aborder les modèles thermodynamiques d'interaction récepteur/protéine G, il me semble important d'introduire le sujet en présentant les diverses notions d'activation spontanée et constitutive des récepteurs couplés aux protéines G. Ce nouveau concept est à l'origine du changement de perception du rôle des antagonistes des récepteurs couplés aux protéines G.

Il est reconnu que pour les récepteurs couplés aux protéines G (**RCG**), la transduction du signal cellulaire dépend de la liaison sélective d'un ligand et du changement conformationnel du récepteur qui permet le couplage fonctionnel et l'activation de la protéine G. D'autre part, dans des conditions normales, le couplage entre le récepteur et la protéine G est sous le contrôle étroit de la modulation du récepteur activé par un agoniste.

Cependant, certaines mutations spécifiques du récepteur viennent perturber ce contrôle et provoquent une activation constitutive du récepteur (^{66, 67}). Dans ces circonstances, même en l'absence d'agoniste, le récepteur provoque l'activation soutenue de la protéine G et, en bout de ligne, de l'effecteur enzymatique. Ces mutations des récepteurs sont responsables de certaines pathologies génétiques (⁶⁸). Par exemple, une mutation (TM6, Asp₅₇₈-Gly₅₇₈) du récepteur de l'hormone lutéinisante est responsable du syndrome de puberté précoce chez le jeune garçon. Cette anomalie cause une hyperplasie et une production précoce de testostérone (⁶⁹). L'expression de ce récepteur muté dans des cellules de mammifères démontre que ce récepteur induit une augmentation significative de l'activité basale de l'adénylate cyclase (AC). Le niveau amplifié d'AMP cyclique dû à l'activation constitutive du récepteur est responsable des symptômes de la maladie. De plus, une mutation à la position 296 (Lys) dans le septième passage transmembranaire de la rhodopsine, active ce récepteur impliqué dans la vision, empêchant la liaison du rétinol. Ce dérèglement entraîne une dégénérescence progressive de la rétine (⁷⁰). De telles mutations ne sont pas toujours pathologiques. Chez la souris, des mutations de la première et deuxième boucle cytoplasmique du récepteur de la MSH

induisent une activation constitutive par le récepteur. Cette mutation provoque chez l'animal un changement de phénotype (la couleur de son pelage) dû à une synthèse accrue de mélanine (⁷¹).

Par ailleurs, les études de mutagenèse dirigée ont permis de montrer que des mutations ponctuelles peuvent provoquer des activations constitutives de certains RCG. Principalement, les mutations ciblées contre la troisième boucle cytoplasmique du récepteur α_{1B} adrénergique ont démontré que la substitution de trois acides aminés confère une activité constitutive au récepteur (⁷²). Des études similaires de mutagenèse ont aussi démontré que le remplacement des acides aminés aux positions 266 à 272 (position équivalente au α_{1B} adrénergique) du récepteur β_2 adrénergique (stimule AC), induit une activation constitutive de ce récepteur exprimé dans les cellules COS-7 et/ou CHO (⁷³). De manière similaire, une mutation équivalente du résidu en position 373 (Thr) du récepteur α_2 adrénergique (inhibe AC), provoque une inhibition de l'adénylate cyclase qui est indépendante de la présence d'agoniste (⁷⁴). Dans la même région, une mutation sérine 312 --> lysine 312 du récepteur 5-HT_{2c} produit un état d'affinité élevé pour les agonistes et un couplage spontané aux protéines G en l'absence d'agonistes (⁷⁵).

Toujours dans la région de la troisième boucle cytoplasmique, la permutation de l'alanine en position 293 du récepteur α_{1B} adrénergique par n'importe laquelle des substitutions des 19 autres acides aminés provoque l'activation constitutive du récepteur (⁷⁶). Plusieurs évidences nous indiquent que cette région est directement impliquée dans l'interaction du récepteur avec la protéine G (⁷⁷). On a pu démontrer que des peptides synthétiques correspondant à de courts segments de la troisième et quatrième boucle cytoplasmique activent les protéines G purifiées, impliquant ces régions du récepteur dans l'activation de la protéine G.

Ces évidences structurales des mutations constitutives de la troisième boucle cytoplasmique suggèrent qu'une fonction importante du reste de la structure du récepteur natif est de contraindre cette région dans une conformation qui prévient une interaction constitutive avec les régions modulatrices de la protéine G. La forme inactive du récepteur devrait ainsi rendre inaccessible les acides aminés responsables de l'activation de la protéine G, alors que le récepteur activé adopterait une conformation qui expose la

séquence activatrice des protéines G, initiant ainsi la réponse cellulaire. Un aspect intrigant du point de vue de la sélectivité d'efficacité conformationnelle est soulevé par les études de mutation faites avec le récepteur α_{1B} adrénergique. Cette curiosité vient du fait que tous les mutants (Ala 293-X) démontrent une affinité accrue pour l'agoniste (épinéphrine) comparativement aux antagonistes. Cette observation nous indique que la mutation contraint le récepteur à un état qui imite la conformation active du récepteur et qui démontre spécifiquement une affinité accrue pour les agonistes distincts de ceux des antagonistes. Des résultats équivalents avec des mutants constitutivement actifs du récepteur β_2 adrénergique indiquent que ces récepteurs sont aussi constitutivement désensibilisés et phosphorylés (β ARK). Cette observation suggère que la conformation du récepteur ayant subi une mutation, est équivalente à la conformation active d'un récepteur natif puisqu'elle démontre les mêmes caractéristiques biochimiques de régulation (⁷⁸). Même si ces mutations favorisent une transition vers la conformation active, le changement conformationnel imposé par ces mutations n'est pas rigide ni irréversible puisque les agonistes inverses peuvent inhiber leur activité spontanée. Selon cette nouvelle interprétation, l'équilibre entre la conformation inactive (contraint) et la conformation active (relaxé) sera déterminé principalement par l'activité intrinsèque du ligand.

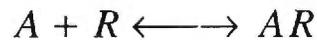
Des observations récentes appliquent ce concept aux récepteurs natifs, en rapportant que certains antagonistes des RCG possèdent une activité intrinsèque négative, démontrant de cette façon une activité agoniste inverse chez des récepteurs natifs n'ayant pas subi de mutation (^{79, 80, 81, 82, 83, 84, 85}). Cette activité agoniste inverse se manifeste expérimentalement par une baisse du niveau basal de la modulation de l'activité GTPasique d'une protéine G ou d'un enzyme effecteur. Parmi les récepteurs spontanément actifs, on observe à l'aide de systèmes d'expression hétérologues, des récepteurs qui sont exprimés à haute densité tel que: β_2 adrénergique(⁸⁴), α_2 adrénergique(⁸⁰) 5-HT_{2C} (^{82, 83}) D1 et D5 dopaminergique (⁷⁹). On retrouve, de la même façon, une activation spontanée du récepteur endogène B₂ de la bradykinine exprimé naturellement dans des cellules de mammifères (⁷⁸). Bien que plusieurs études aient démontré ce phénomène d'activation spontanée avec les récepteurs natifs exprimés en

cellules de mammifères ou présents dans des tissus (⁷⁸⁻⁸⁴), les analyses pharmacologiques détaillées ont été fréquemment limitées par le faible niveau d'activation spontanée des récepteurs. Les niveaux élevés des récepteurs exprimés de certains systèmes d'expression facilitent l'observation du phénomène puisqu'ils permettent une élévation du niveau basal de signalisation du, à la présence du nombre élevé de récepteurs spontanément actifs (⁸²⁻⁸⁴). Un modèle physiologique de surexpression de récepteur spontanément actif existe. Celui-ci fut développé à partir de souris transgéniques exprimant 200 fois le niveau normal de récepteur β_2 adrénergique démontre que le coeur de l'animal fonctionne comme s'il était stimulé au maximum en l'absence d'agoniste. Dans l'optique que des pathologies puissent être provoquées par des récepteurs constitutivement actifs, les activités agonistes inverses des antagonistes des RCG pourront s'avérer importantes du point de vue thérapeutique. De pareils modèles physiologiques seront peut-être utiles afin de caractériser le large éventail des propriétés pharmacologiques et thérapeutiques des médicaments. L'abondance d'évidences de nouveaux récepteurs spontanément actifs démontre bien qu'il ne s'agit pas uniquement d'un artéfact des systèmes d'expression hétérologues, mais plutôt d'un principe fondamental aux RCG qui nous force à repenser notre perception des activités des antagonistes et des concepts classiques d'interaction ligand/récepteur. Les sections résultats et discussion abordent également d'autres aspects du phénomène d'agonisme inverse.

1. 4. 2 Les modèles thermodynamiques du couplage aux protéines G

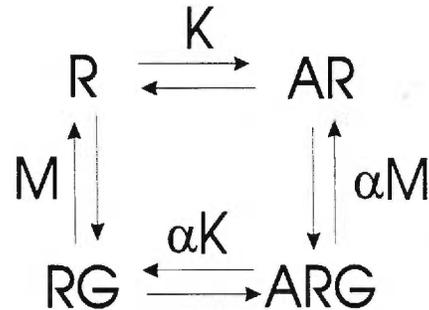
À la lumière des nouvelles observations de l'inhibition par les agonistes inverses de l'activité spontanée des RCGs, je présente, dans cette section, le cheminement évolutif des différents modèles thermodynamiques bi-moléculaires qui furent proposés pour expliquer les différentes propriétés des ligands des récepteurs couplés aux protéines G, tout en m'attardant sur leur implication pratique en ce qui a trait à la pharmacologie des antagonistes. Cependant, je ne m'attarderai pas sur les modèles plus anciens comme le modèle classique de Ariens qui permet difficilement l'interprétation des propriétés

agoniste inverses des ligands, mais qui reste, tout de même, valide pour expliquer les propriétés classiques des antagonistes compétitifs (⁸⁶).



1. 4. 2. 1 La forme simplifiée du modèle d'interaction du complexe ternaire

Le modèle classique d'Ariens ne permet pas d'expliquer les différentes propriétés des agonistes et des antagonistes des récepteurs couplés aux protéines G tel qu'observés dans les préparations membranaires (i. e. l'effet des protéines G



sur la liaison des ligands). Un modèle allostérique de récepteurs possédant deux sites de liaison, un pour le ligand et un pour la protéine G, fut proposé par De Léan et al pour expliquer les propriétés de liaison des agonistes (⁸⁷). Dans ce modèle, seule la forme agoniste-récepteur/protéine G est active et responsable de la réponse. Par souci de simplification, la description et les développements mathématiques des différents modèles allostériques présentés tiennent compte que le ligand présent est un agoniste. Néanmoins, ce genre de descriptions mathématiques est également applicable aux antagonistes (neutres ou agonistes inverses) tel que décrits par Costa et al (⁸⁸). Le modèle ternaire simplifié peut ainsi être défini en fonction de la constante K_{min} qui représente le niveau de faible affinité pour l'agoniste A pour un récepteur découplé R:

$$K_{min} = K = \frac{[AR]}{[A] \cdot [R]} \quad [1]$$

A représente l'agoniste libre, R la concentration de récepteurs vacants et K_{max} la constante qui définit le site de haute affinité de l'agoniste A pour le récepteur couplé à la protéine G, RG:

$$K_{\max} = \alpha K = \frac{[ARG]}{[A] \cdot [RG]} \quad [2]$$

Le niveau "spontané" de précouplage (interaction R-G, il n'est pas question, ici, d'isomérisation spontanée) défini par la constante M détermine dans ce modèle le niveau agoniste-indépendant de base du complexe RG :

$$M = \frac{[RG]}{[R] \cdot [G]} \quad [3]$$

G représente les protéines G découplées. Dans le modèle, la liaison d'agonistes favorise le couplage récepteur/protéine G en augmentant par le facteur α la constante de couplage M (résultant en αM)

$$\alpha M = \frac{[ARG]}{[AR] \cdot [G]} \quad [4]$$

La constante α détermine la capacité d'un agoniste à promouvoir le couplage entre le récepteur et la protéine G . Cette constante α détermine l'efficacité de l'agoniste ($\alpha > 1$) selon l'hypothèse que la forme couplée du récepteur correspond au stimulus pharmacologique qui produit l'activation de l'effecteur. Cette constante sera neutre ($\alpha = 1$) pour un antagoniste qui favorise le niveau basal de couplage avec les protéines G . Par contre, si cette constante est inférieure à l'unité ($\alpha < 1$), l'antagoniste présente, alors, une activité agoniste inverse qui réduit le niveau de couplage du récepteur tout en réduisant le niveau basal d'activité du système de couplage. Lors d'un excès des protéines G , la constante d'affinité de l'agoniste s'apparente à K_{app} :

$$K_{app} = \frac{K_{\min} + K_{\max} \cdot M \cdot G}{1 + M \cdot G} \quad [5]$$

Cette constante d'affinité apparente aura une valeur entre K_{min} et K_{max} selon le niveau relatif de G (protéines G) et le niveau de précouplage défini par la constante M . Lorsque le niveau de protéines G est limitant (i. e. seulement une fraction des récepteurs est précouplée), les isothermes de liaison des agonistes peuvent être complexes et présenter deux affinités apparentes correspondant aux formes du récepteur, soient la forme découplée AR et la forme couplée ARG . Le niveau total B de récepteurs liant l'agoniste (i. e. AR and ARG) est alors exprimé par:

$$B = \frac{K_{app} \cdot A \cdot R_{tot}}{1 + K_{app} \cdot A} \quad [6]$$

Cette équation correspond à un isotherme de liaison à composante simple avec K_{app} comme constante d'affinité. Le nombre total de formes couplées C du récepteur (i. e. RG et ARG) peut être obtenu par:

$$C = \frac{M \cdot G \cdot (1 + K_{max} \cdot A) \cdot R_{tot}}{(1 + M \cdot G) \cdot (1 + K_{app} \cdot A)} \quad [7]$$

Implicitement, le modèle proposé admet que les formes couplées C du récepteur sont proportionnelles à l'activation de l'effecteur. En se basant sur ce critère, il est alors possible de considérer une courbe dose-réponse du nombre de formes couplées C (= activation de l'effecteur) en fonction de la concentration de l'agoniste A . Une telle courbe augmentera à partir du niveau basal C_{min} en l'absence de ligand :

$$C_{min} = \frac{M \cdot G \cdot R_{tot}}{1 + M \cdot G} \quad [8]$$

jusqu'au niveau maximum C_{max} lorsque la concentration est maximale :

$$C_{max} = \frac{M \cdot G \cdot K_{max} \cdot R_{tot}}{(1 + M \cdot G) \cdot K_{app}} \quad [9]$$

La puissance de l'agoniste (ED_{50}) correspondant à la concentration qui induit la moitié de la réponse maximale à mi-chemin entre C_{min} et C_{max} et s'apparente à :

$$ED_{50} = \frac{1}{K_{app}} \quad [10]$$

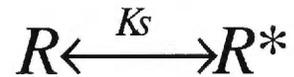
si la concentration de protéines G découplées demeure constante.

Le modèle classique de complexe ternaire tel que décrit sous sa forme simplifiée permet d'expliquer certaines propriétés des agonistes des récepteurs couplés aux protéines G et fournit ainsi une explication quant aux différences d'efficacité intrinsèque des agonistes (agoniste partiel). Cependant, sous cette forme, le modèle ne nous permet pas d'expliquer les propriétés de certains mutants constitutivement actifs des récepteurs couplés aux protéines G. Alors que le niveau basal élevé d'activité des mutants pouvait être partiellement expliqué par une augmentation du couplage spontané et par la présence d'une constante de précouplage M élevée, la capacité de ces mutants à retenir une liaison à haute affinité en l'absence ou en présence de protéines G suggérait une nouvelle formulation où le récepteur peut spontanément s'isomériser en une forme active, même en l'absence de la protéine G.

1. 4. 2. 2 Le modèle simplifié de transition à deux états (Two-State Models)

Puisqu'il est difficile de réconcilier les résultats obtenus avec les agonistes inverses et le modèle classique de signalisation qui stipule que le complexe ternaire agoniste/récepteur/protéine G est la seule forme active du récepteur, on doit soumettre une nouvelle hypothèse. Cette hypothèse est basée sur la présence d'un équilibre dynamique entre les conformations actives et inactives et elle est également à la base du modèle simplifié à deux états (Two-State Model, TSM⁸⁹). Ce modèle largement simplifié, fut repris par Chidiac et al⁽⁸⁴⁾ pour expliquer l'effet des agonistes inverses sur l'allostérie des récepteurs spontanément actifs. Le modèle ne s'encombre pas de l'influence de protéines auxiliaires comme les protéines G. Il est donc plus facile à conceptualiser et sert ici à introduire les concepts soulevés par les modèles permettant aux récepteurs de s'isomériser spontanément entre des conformations actives et inactives.

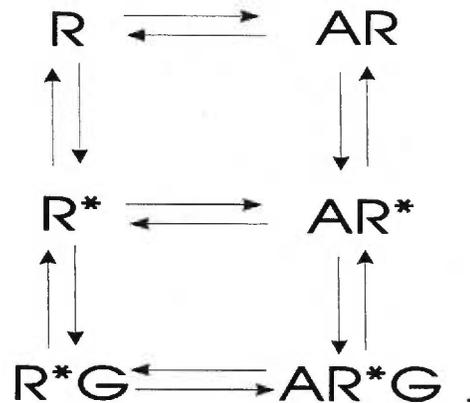
Conformément au TSM, un récepteur spontanément actif adopte de façon spontanée soit une conformation inactive R, soit une conformation active R* avec un équilibre de transition spontanée entre ces deux états déterminé par la constante $K_s = ([R]/[R^*])$.



À la base de ce modèle, nous retrouvons la notion fondamentale selon laquelle la réponse biochimique de l'interaction ligand/récepteur est déterminée par la préférence relative d'un ligand pour la forme R ou la forme R* du récepteur. Selon ce modèle, sous des conditions normales, la conformation inactive prédomine, ce qui favorise l'apparition d'un signal mesurable. Dans les systèmes exprimant des niveaux élevés de récepteurs, l'élévation (dépendante du récepteur) du niveau basal serait le reflet de cette isomérisation spontanée qui permet ainsi à suffisamment de formes actives (indépendante de l'agoniste) d'élever le niveau basal. En se liant préférentiellement et en favorisant la forme inactive, un agoniste inverse inhibe cette isomérisation spontanée et abaisse le niveau basal de l'activité de signalisation du récepteur alors que l'agoniste favorise la forme active et augmente le niveau basal de signalisation. Un antagoniste neutre dans ce modèle ne peut discriminer entre ces deux conformations et n'aura aucun effet sur le signal produit. Ce modèle quoique facile à comprendre, peut cependant difficilement expliquer l'influence de la protéine G sur la liaison du ligand. On doit donc faire appel aux concepts soulevés par le premier modèle à complexe ternaire et les intégrer aux concepts d'isoformes actifs et inactifs des récepteurs couplés aux protéines G.

1. 4. 2. 3 La forme étendue du modèle d'interaction du complexe ternaire

Une première extension du modèle allostérique classique qui intègre les concepts supportés par le modèle à deux états proposé par Chidiac et al (⁸⁴) fut proposée par Samama et al (⁹⁰) pour expliquer les propriétés des récepteurs β_2 -adrénergiques couplés aux protéines G de type Gs en se basant sur les résultats obtenus avec des mutants constitutivement actifs. Ce modèle fut décrit comme étant la forme étendue du modèle à complexe ternaire (Extended Ternary Complex Model, **ETCM**) qui permet d'expliquer l'isomérisation spontanée de certains récepteurs couplés aux protéines G.



Ce prolongement des principes établis des mécanismes de couplage reconnaît deux nouveaux concepts de l'action des récepteurs. Le premier concept est que le récepteur (**R**) existe en équilibre entre deux conformations: R et R*. On stipule, cependant, qu'il y a une contrainte structurale de R qui fait que seule R* puisse interagir avec la protéine G (**G**). Le processus d'activation comporterait alors deux étapes distinctes: la conversion de R en R* et ensuite, l'interaction de R* avec G. Le deuxième concept est que la liaison du ligand (**A**, un agoniste pour faciliter l'explication) influence les deux étapes de l'activation: i. e. en facilitant la conversion de R vers R* et en stabilisant le complexe quaternaire formé d'un R* lié à un agoniste et interagissant avec G. La différence majeure propre au nouveau modèle allostérique est dans la définition de

l'efficacité moléculaire de l'action d'un ligand, qui ne dépend plus uniquement de la capacité de L à stabiliser le complexe RG, mais également de la capacité de L à se lier au récepteur pour influencer son isomérisation en R*. Un autre concept, divergent de l'ancien mécanisme, découle de l'activité du récepteur en l'absence de ligand qui est alors déterminé, à la fois par l'affinité de R* pour G (suivant la nature du récepteur et la protéine G) et par la fraction (ratio) du nombre de récepteurs capables d'interagir avec G. Ce ratio dépend alors implicitement de l'importance de l'équilibre intrinsèque d'isomérisation (R-R*) du récepteur. C'est cette constante d'isomérisation que l'on croit altérée par les mutations constitutives de la troisième boucle cytoplasmique des récepteurs et qui détermine le niveau d'activité spontanée d'un récepteur natif.

Le récepteur adopte spontanément l'une ou l'autre des conformations en l'absence de ligand. Plus le récepteur s'isomérisise facilement en passant d'un état à l'autre, plus il induit une activation spontanée du mécanisme de signalisation cellulaire. Selon les modèles proposés, cette nouvelle interprétation des mécanismes d'occupation des récepteurs, mène au rejet des concepts classiques associés aux agonistes et antagonistes qui perdent ainsi leur signification unipolaire traditionnelle. Ces concepts désuets sont maintenant remplacés par les principes selon lesquels les effets des ligands sont gouvernés par leur occupation sélective des différentes conformations du récepteur et par le nombre, mais surtout par le ratio relatif de chacune des conformations dans un système donné. De cette manière les effets activateurs des agonistes seraient dus à une prévalence (affinité accrue) pour la conformation active du récepteur. Ce type d'occupation augmente alors la proportion de la conformation du récepteur qui active la protéine G. Par contre, les effets de l'antagoniste peuvent être négatifs ou neutres selon les ligands et selon le système (voir discussion). Les ligands qui favorisent la conformation inactive démontrent une activité agoniste inverse qui est à l'opposé des actions des agonistes. En présence d'un agoniste, ces deux types d'antagonistes paraissent inhibiteurs en compétitionnant l'agoniste pour l'occupation du récepteur. D'autre part, conformément aux concepts des modèles proposés, différents agonistes inverses peuvent présenter des différences d'efficacité pour un même récepteur spontanément actif, à la manière des agonistes qui peuvent avoir des activités partielles ou absolues selon le système étudié.

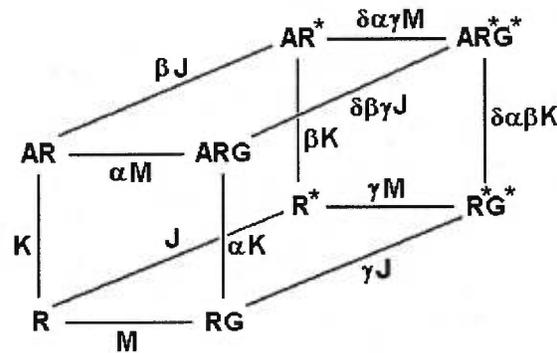
Par exemple, pour le récepteur 5-HT_{2C} exprimé en baculovirus, certains agonistes inverses auront des efficacités maximales, comme la miansérine, alors que d'autres ligands comme la spiroxatine seront inactifs ou plutôt neutres, tout en compétitionnant à la fois avec l'activation par l'agoniste (5-HT) et pour l'inhibition du niveau basal par un agoniste inverse (miansérine⁸²). En théorie, ces antagonistes neutres possèdent une activité intrinsèque nulle. Cette propriété des antagonistes neutres provient de leur affinité équivalente pour les deux conformations du récepteur spontanément actif qui fait que ces antagonistes correspondent réellement à la notion classique de l'antagoniste compétitif sans activité intrinsèque. On peut donc s'attendre à retrouver pour les ligands des RCG un véritable continuum d'activités qui s'étend des agonistes absolus en passant par les antagonistes neutres jusqu'aux agonistes inverses absolus.

Cependant, même si cette forme étendue du modèle d'interaction du complexe ternaire nous permet d'expliquer les propriétés fonctionnelles des récepteurs à faible niveau basal d'activation, le modèle peut difficilement expliquer les particularités des récepteurs démontrant une forte affinité pour la protéine G (surtout rapporté pour G_i ou G_o) puisque le modèle impose que la forme couplée du récepteur est nécessairement active, ce qui ne laisse aucune opportunité aux agonistes d'outrepasser cette limite. Cependant, il n'y a aucune raison, ni observation qui suggère que la forme R*G ne puisse se relaxer en forme RG ou que R interagisse spontanément avec G (avec une faible affinité). Cette limitation du modèle étendu de Samama et al (⁹⁰) ne permettant pas de prédire les propriétés pharmacologiques d'un système ou d'un précouplage fonctionnel suggère une forme inactive couplée du récepteur (RG) tel que décrit dans les résultats et la discussion du présent manuscrit (section 2. 0. 2. 3 et 3. 1. 3).

1. 4. 2. 4 La forme complète du modèle d'interaction du complexe ternaire étendu et implication du précouplage fonctionnel

Afin de formaliser toutes les interactions allostériques possibles qui peuvent exister entre le récepteur et la protéine G, une forme plus intégrative du modèle allostérique étendu doit donc être proposée pour expliquer les propriétés des systèmes pharmacologiques pour lesquels le précouplage fonctionnel est important. La notion de précouplage fonctionnel fait référence aux propriétés particulières des systèmes biologiques où l'on présume une grande affinité entre la protéine G et le récepteur (^{91, 92, 93, 94, 95, 96}). Par exemple, les récepteurs CGRP de cerveau de rat solubilisé lient le peptide ¹²⁵ICGRP avec une bonne affinité. Cependant, le traitement des récepteurs solubles avec un anticorps anti G α s suivi de centrifugation induit la perte de liaison de l'agoniste du surnageant (⁹⁷). Cette observation suggère que les récepteurs CGRP sont majoritairement couplés même en l'absence d'agonistes. Plus récemment, d'autres évidences provenant du récepteur δ opioïde nous indiquent que l'activité agoniste inverse de certains de leurs antagonistes est dépendante de la présence de protéines G fonctionnelles. Ces nouvelles observations suggèrent qu'un précouplage fonctionnel existe pour les formes couplées actives RG* et possiblement pour les formes couplées inactives RG du récepteur (⁹⁸). Un modèle étendu capable d'expliquer les propriétés de précouplage des systèmes de signalisation des récepteurs couplés aux protéines G fut décrite en détail par Weiss et *al* (⁹⁹). Ce modèle peut être qualifié d'intégratif parce qu'il comprend les concepts de liaison (Ariens ³²), de couplage (De Léan et *al* ³³) et d'activation spontanée (Chidiac et *al* ³⁵ et Samama et *al* ⁹⁰) soulevés dans les sections précédentes. Ce modèle cubique intégratif possède une caractéristique de plus que le modèle de Samama et al. Il permet à la protéine G d'interagir avec le récepteur, que celui-ci soit dans un état actif ou inactif. L'implication de cette propriété du modèle est, qu'en l'absence de ligand, l'effet premier de l'activation du récepteur est de changer l'affinité du récepteur pour la protéine G (pour Samama, l'affinité intrinsèque entre G pour R inactif est nulle). Contrairement à la forme

simple du modèle étendu, la forme intégrale du modèle ternaire supporte un précouplage spontané de la forme inactive du récepteur R selon une constante de couplage M et permet un niveau plus élevé de couplage de la forme active R^* selon une constante γM . Par ailleurs, l'activation du récepteur et de la protéine G est explicitement démontrée comme étant un processus concerté menant à la formation du complexe couplé R^*G^* . Pour compléter le modèle cubique, une constante δ est ajoutée pour permettre l'intégration de phénomènes synergiques où la liaison d'agoniste et la présence de la protéine G influencent l'activation du récepteur menant à la forme AR^*G^* . Dans ce nouveau modèle intégratif, les constantes α , β , γ , δ et J contribuent à déterminer la proportion de récepteurs actifs et inactifs en présence ou en l'absence de ligands.



$$J = \frac{R^*}{R} \quad \beta J = \frac{AR^*}{AR} \quad \gamma J = \frac{R^*G^*}{RG} \quad \delta \beta \gamma J = \frac{AR^*G^*}{ARG} \quad [17]$$

Alors que les constantes M , J et γ sont des paramètres dépendants du récepteur, les constantes α , β , δ and K dépendent du ligand présent. Afin de simplifier l'interprétation mathématique de certains phénomènes présentés dans la section Résultat, la forme complète étendue du modèle ternaire peut être démontrée comme étant mathématiquement équivalente à la forme originale du modèle ternaire ⁽⁸²⁾ en considérant les équivalences suivantes pour les récepteurs libres R , la constante de précouplage M , la constante d'efficacité intrinsèque du ligand α et les limitations dues aux constantes d'affinité pour le récepteur K_{min} and K_{max} :

$$R' = R + R^* = R \cdot (1 + J) \quad [18]$$

$$M' = M \left(\frac{1 + \gamma J}{1 + J} \right) \quad [19]$$

$$\alpha' = \alpha \left(\frac{1 + J}{1 + \beta J} \right) \left(\frac{1 + \delta \beta \gamma J}{1 + \gamma J} \right) \quad [20]$$

$$K'_{\min} = K \left(\frac{1 + \beta J}{1 + J} \right) \quad [21]$$

$$K'_{\max} = \alpha K \left(\frac{1 + \delta \beta \gamma J}{1 + \gamma J} \right) = \alpha' \cdot K'_{\min} \quad [22]$$

À partir de l'équation 19, on remarque que les constantes M , J et γ déterminent le niveau de précouplage fonctionnel du récepteur, correspondant ainsi au paramètre M' du modèle original. L'équation 21 nous démontre que les constantes K , J et β déterminent l'affinité du ligand pour la forme découplée du récepteur caractérisé par K'_{\min} . L'efficacité du ligand à promouvoir le couplage avec la protéine G représentée par l'équation 20. Celle-ci est dépendante des constantes J , α , β , γ et δ . Le niveau de forme active C^* et de forme couplée (R^*G^* et AR^*G^*) est déduit selon:

$$C^* = \left(\frac{\gamma J}{1 + \gamma J} \right) \cdot \left(\frac{M' \cdot G}{1 + M' \cdot G} \right) \cdot \left(\frac{1 + \delta \alpha \beta K F}{1 + K'_{app} \cdot F} \right) \cdot R \quad [23]$$

Une courbe dose-réponse correspondant à la sommation des formes actives et couplées du récepteur variera selon C^*_{\min} en l'absence de ligand (dans le cas illustré, un agoniste):

$$C^*_{\min} = \left(\frac{\gamma J}{1 + \gamma J} \right) \cdot \left(\frac{M' \cdot G}{1 + M' \cdot G} \right) \cdot R \quad [24]$$

Jusqu'à C^*_{max} , lorsque la concentration de ligand (i. e. agoniste) atteint des concentrations sursaturantes :

$$C^*_{max} = \left(\frac{\gamma J}{1 + \gamma J} \right) \cdot \left(\frac{M \cdot G}{1 + M \cdot G} \right) \cdot \left(\frac{\delta \alpha \beta K}{K'_{app}} \right) \cdot R \quad [25]$$

Alors que la puissance (ED_{50}) du ligand à engendrer la forme couplée et active du récepteur C^* est déterminée approximativement par:

$$ED_{50} = \frac{1}{K'_{app}} \quad [26]$$

Ces simplifications mathématiques décrites par le docteur André De Léan (communication personnelle) nous permettent de simuler les propriétés pharmacologiques de liaison de ligand, pour la plupart des récepteurs couplés aux protéines G. Selon mon opinion, seule une approche intégrative peut permettre d'expliquer simplement les phénomènes pharmacologiques des récepteurs couplés aux protéines G. Ces approches fournissent un modèle du mécanisme de couplage des récepteurs couplés aux protéines G qui est applicable à la réalité expérimentale. C'est donc à partir de ce modèle étendu établi en collaboration avec le docteur André De Léan, qu'une partie des résultats présentés ont été analysés à l'aide d'un simulateur informatique conçu pour EXCEL (rapporté à la section 2. 0. 2. 3). Le principal avantage d'utiliser ce modèle est qu'il nous permet de simuler et de prédire l'effet des ligands sur le complexe récepteur/protéine G de même que l'effet du complexe sur la liaison des ligands. L'interprétation des résultats obtenus avec ce modèle allostérique à multiples conformations présenté à la section Discussion de ce manuscrit vous permettra de mieux comprendre l'importance d'un tel modèle dans la compréhension des mécanismes moléculaires qui sont à la base des activités des récepteurs couplés aux protéines G (section 3. 1. 3 et 3. 2. 1).

1. 4. 3 Autres concepts applicables aux modèles allostériques

Les modèles du complexe ternaire qui viennent d'être présentés suggèrent que les récepteurs couplés aux protéines G peuvent adopter plusieurs conformations. D'autres résultats confirment cette hypothèse.

1. 4. 3. 1 L'évidence de la présence de multiples conformations pour les récepteurs couplés aux protéines G

D'autres scénarios de modèles thermodynamiques ont été proposés pour expliquer certains résultats observés avec la rhodopsine (récepteur de la perception visuelle). Ces modèles décrivent la transition des conformations du récepteur selon un mode comprenant de multiples isoformes actives de ce récepteur couplé aux protéines G (¹⁰⁰). On rapporte que pour les membranes de disques rétiniens lors de l'absorption de photons, la rhodopsine se transforme (changement structural) en adoptant différents intermédiaires conformationnels pour stabiliser la forme fonctionnelle métarhodopsine II (MétaII). En plus de la forme Méta II, les formes Méta IIa et Méta IIb seraient également présentes. Ces différentes formes de Méta II suggèrent que les domaines cytoplasmiques actifs et inactifs coexistent simultanément, ce qui nous indique une certaine indépendance au niveau de la conformation entre la liaison du rétinol (le ligand) et le domaine d'interaction avec la protéine G. Ce concept de conformations multiples coexistantes est également suggéré par le fait que le 11-cis-rétinal (un agoniste inverse) et la transducine (protéine G) se lient au récepteur en même temps. Cependant, seul la forme Méta IIb interagit de manière fonctionnelle avec la transducine pour produire une réponse. Le modèle prévoit, alors, qu'un ligand puisse induire différentes conformations actives (R* ou R**) qui possèdent des habiletés distinctes d'interaction avec différentes protéines G. À supposer que différentes conformations des récepteurs puissent présenter des préférences pour interagir avec certaines protéines G, on peut alors émettre le corollaire que différents agonistes puissent stabiliser la formation de complexes ternaires spécifiques présentant ainsi des efficacités et des sélectivités différentes pour l'activation de certaines protéines G (pour plus de détail, vous référer à la discussion de la section 3. 2).

En accord avec cette dernière hypothèse, des observations démontrent que le récepteur PACAP I exprimé en cellules LLC-PK1 est stimulé, à la fois, par les peptides agonistes PACAP-38 et PACAP-27. Pourtant, le peptide PACAP-27 se révèle être beaucoup plus puissant à stimuler la formation de cAMP, alors que le PACAP-38 est plus puissant à stimuler la production d'inositol polyphosphate (¹⁰¹). Cette préférence fonctionnelle pour une protéine G suggère que la liaison de différents agonistes dans certains cas, est typique à un complexe récepteur/protéine G particulier et que la conformation induite au niveau du complexe récepteur/protéine G prédétermine la fonction sélective d'un agoniste ou sa puissance dans un système donné.

Il y a également d'autres évidences qui démontrent que le récepteur peut adopter différentes conformations et démontrer des cinétiques de liaison complexe pour un système dans lequel les protéines G sont absentes. Par exemple, les récepteurs muscariniques solubilisés et dont on a extrait les protéines G démontrent tout de même des courbes biphasiques de liaison d'oxotrémorine (un agoniste). Ces résultats peuvent être interprétés avec un modèle tétravalent de récepteurs oligomériques qui implique différentes conformations indépendantes de la protéine G (¹⁰²). De nouvelles informations seront nécessaires afin de bien valider ce modèle oligomérique d'interaction récepteur/récepteur.

1. 4. 3. 2 Dimérisation des récepteurs couplés aux protéines G

En plus de la possibilité de conformations multiples, on spécule que le domaine C-terminal et le domaine N-terminal des récepteurs interagissent entre eux pour former des dimères fonctionnels. Des études avec des chimères du récepteur α_2 -adrénergique et du récepteur muscarinique M_3 ont démontré que l'interaction intermoléculaire entre récepteurs existe (¹⁰³). Un domaine impliqué dans la dimérisation du récepteur β_2 adrénergique a été identifié dans la région TM6 du récepteur. L'implication fonctionnelle de la dimérisation de ce récepteur fut démontrée par l'observation d'un peptide dérivé de ce domaine qui induit une inhibition de la dimérisation ainsi qu'une inhibition de

l'activation de l'adénylate cyclase par les agonistes (¹⁰⁴). L'interconversion des récepteurs couplés aux protéines G entre la forme monomérique et la forme dimérique serait vraisemblablement un phénomène important pour l'activité des récepteurs. Ce phénomène n'est pas uniquement l'apanage du récepteur β_2 adrénergique, puisque l'on rapporte la dimérisation pour les récepteurs dopaminergiques (¹⁰⁵, ¹⁰⁶), les récepteurs de la gonadotrophine (¹⁰⁷), les récepteurs muscariniques (¹⁰⁸) et plusieurs autres récepteurs couplés aux protéines G. Pour le récepteur β_2 adrénergique, il semblerait que la forme dimérique du récepteur soit associée à la forme active de ce récepteur, alors que les agonistes inverses favorisent la forme monomérique qui serait la forme inactive. En contraste avec ces observations, le récepteur δ des opioïdes, la forme active (liant l'agoniste) serait associée à la forme monomérique (la forme internalisée) alors que la forme inactive serait dimérique (¹⁰⁹). Bien que contradictoires au niveau fonctionnel, ces évidences supportent la notion que les récepteurs couplés aux protéines G forment des dimères. Les mécanismes dynamiques qui gouvernent cette oligomérisation et son rôle sur l'activité des récepteurs demeurent malheureusement inconnus. Bien que très intéressant, ce nouveau phénomène reste encore à être caractérisé et généralisé aux autres membres de la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G afin que nous puissions tirer des conclusions sur le rôle physiologique de ce phénomène.

1. 4. 3. 3 Phénomène de sensibilisation par les antagonistes des récepteurs couplés aux protéines G

Nous avons vu précédemment, que les antagonistes possédaient, en plus de leur activité agoniste inverse, la capacité d'induire une sous-régulation atypique caractérisée par la perte de sites de liaison en présence d'antagoniste. En plus de ces phénomènes inusités, j'ai personnellement observé au cours de mes recherches, des phénomènes de sensibilisation propres à l'action des antagonistes. Cette sensibilisation par des traitements aux antagonistes permet d'augmenter significativement la réponse fonctionnelle du récepteur 5-HT_{2C} exprimé en cellules Sf9 (cellules d'insectes).

Contrairement aux comportements classiques compétitifs, certains antagonistes sérotoninergiques (voir section 2. 0. 2. 1) et antagonistes AT₁ (angiotensine) présentent une propriété de sensibilisation du récepteur nommé "Augmentative Antagonism" (¹¹⁰). Concrètement, pour ces deux récepteurs, le prétraitement aux antagonistes induit un changement persistant dans la fonction du récepteur qui induit une transition d'un système de couplage peu efficace vers un système présentant une réponse largement augmentée. Bien que le mécanisme fonctionnel de ce phénomène inusité demeure inconnu, ses implications au point vue fonctionnel et thérapeutique nous permettent de spéculer que certains antagonistes pourraient être mis à profit pour augmenter la capacité de signalisation d'un système défectueux ou présentant une réponse désensibilisée (atténuée).

Par ailleurs, ce phénomène de sensibilisation induit par les antagonistes fut interprété selon plusieurs modèles simplifiés. Parmi ceux-ci, on retrouve un modèle basé sur la présence d'un ligand qui altère directement le couplage fonctionnel du récepteur (¹¹¹), un modèle comprenant une combinaison complexe du modèle ternaire simple et d'un site allostérique (¹¹²) et également une forme alternative du modèle à deux états où l'on retrouve des récepteurs existant soit sous une forme activable, soit sous une forme réfractaire inactive. Dans ce dernier cas, ces formes sont accessibles uniquement via un hémieuillibre (transition lente) qui détermine la persistance du phénomène et la propriété du phénomène. Nous étudierons de façon plus approfondie les implications de cette nouvelle activité de sensibilisation induite par les antagonistes dans la section discussion, cependant, il me semble important de rapporter ici certaines de mes observations afin de bien cerner les concepts associés à ce phénomène. La première observation d'importance est que le phénomène de sensibilisation induit par l'antagoniste est persistant même après le départ de ce dernier. L'absence de sensibilisation induite par l'agoniste inverse méthysergide suggère que le phénomène n'est pas uniquement dépendant de la capacité de stabilisation de la forme inactive induite par le ligand. Cet état de chose qui suggère que la sensibilisation ne résulte pas de l'inhibition réversible de cette transition vers une forme active même si les récepteurs sont spontanément désensibilisés par une activation spontanée de l'activité des kinases endogènes. Mes résultats suggèrent aussi que la

capacité des antagonistes à induire une sensibilisation de la réponse fonctionnelle du récepteur et une sous-régulation atypique (perte de sites de liaison) ne peut être démontrée comme étant deux caractéristiques indépendantes des antagonistes. Bien que ce phénomène demeure encore énigmatique, il est intéressant de constater que la sensibilisation induit une augmentation du niveau basal à plus faible concentration que l'augmentation de la réponse agoniste-dépendante, cela est toujours consistant avec mon interprétation du modèle ternaire étendu tel que décrit dans ce manuscrit.

Il est cependant clair que les nouvelles propriétés des ligands nous ramènent à la question fondamentale à savoir quels sont les déterminants moléculaires qui régulent l'interaction récepteur/protéine G et quels seront leurs effets sur les propriétés d'un ligand?

1. 5 APPROCHE MOLÉCULAIRE DE L'ÉTUDE DU COUPLAGE AUX PROTÉINES G

Les progrès récents en biologie moléculaire et en biochimie mettent à notre disposition plusieurs approches permettant l'étude de l'interaction entre le récepteur et la protéine G. Ces techniques nous permettent d'aborder la complexité de la régulation des récepteurs couplés aux protéines G et d'être à même de définir l'identité moléculaire des protéines impliquées dans la signalisation. Certaines protéines pourront aussi servir à quantifier l'importance de cette interaction. C'est ce qui détermine en bout de ligne la réponse du système. Voici quelques applications pratiques de ces techniques.

1. 5. 1 Perturbation de la fonction de couplage

Une approche très répandue pour étudier l'interaction récepteur/protéine G est l'utilisation d'anticorps dirigés contre la région C-terminale des sous-unités α des protéines pour interférer avec la régulation agoniste-dépendante des effecteurs et la formation du complexe RG (site de haute affinité pour les agonistes). Cette approche a principalement permis l'identification des protéines G impliquées dans la sélectivité de couplage pour un récepteur. Cette même approche a été utilisée pour co-immunoprécipiter la protéine G et le récepteur (¹¹³). L'utilisation d'ADN antisens complémentaire à la séquence codante d'une protéine G étudiée permet aussi, dans certains cas, d'établir la spécificité de l'interaction R/G. Cette approche est toutefois encore assez limitée puisque la capacité cellulaire d'adaptation permet à l'organisme de modifier l'expression d'autres protéines G afin de maintenir l'homéostasie cellulaire perturbé par l'antisens introduit pour bloquer une fonction cellulaire propre à une sous-type de protéine G (¹¹⁴).

Il est également possible d'utiliser l'ADP-ribosylation covalente de la cystéine libre des G α i pour déstabiliser et démontrer l'interaction avec le récepteur. Les G α i en l'absence de sous-unité $\beta\gamma$, étant partiellement réfractaires à la modification par la PTX, il est donc possible de suivre l'activation de celles-ci avec un substrat marqué au ^{32}P (¹¹⁵). Toutes ces approches biochimiques présentent des limites qui font que ces méthodes d'études sont plutôt qualitatives que quantitatives. Cependant, on doit tout de même les considérer lorsqu'on adresse la question de spécificité d'interaction entre R/G.

1. 5. 2 Reconstitution du système de couplage

La reconstitution des composantes de couplage dans une membrane lipidique synthétique constituait certainement l'une des approches les plus populaires dans l'esprit des biochimistes des années 80. Cette approche nécessite la purification des différentes composantes et leur réinsertion dans des liposomes constitués d'un savant mélange de phospholipides. La disponibilité des protéines purifiées et les difficultés techniques limitent grandement les interprétations qui pourraient en découler. Ainsi, cela rend difficile la comparaison de l'efficacité des reconstitutions avec les différentes protéines G. Par contre, il est possible de montrer une certaine prévalence ou préférence du récepteur pour une famille de protéines G (¹¹⁶). La purification des protéines G et la réinsertion de celles-ci dans des membranes contenant les récepteurs d'intérêt constituerait une approche alternative de cette technique. Cette approche fut mise à profit pour reconstituer le couplage fonctionnel du récepteur A₁ de l'adénosine exprimé dans les cellules d'insectes Sf9 (¹¹⁷). La réinsertion dans les membranes nécessite généralement un excès de protéines G par rapport aux récepteurs présents. Cette limitation de l'accessibilité des protéines G purifiées peut malheureusement limiter l'interprétation de certains résultats.

1. 5. 3 Coexpression des composantes de couplage

La coexpression des composantes (récepteurs et protéines G trimériques) d'un système de signalisation cellulaire est une alternative intéressante aux stratégies de reconstitution. Cette approche simplifie les manipulations et permet une plus grande disponibilité du matériel biologique pour les études pharmacologiques. La coexpression peut se faire dans divers systèmes d'expression. Néanmoins, l'expérience tend à démontrer que l'expression en cellules Sf9 semble bien adaptée pour l'expression modulaire des récepteurs et des protéines G.

Le fait que ces cellules possèdent peu de récepteurs endogènes couplés aux protéines G endogènes d'insectes est un avantage particulier pour l'étude des RCG. Par ailleurs, ces protéines G endogènes démontrent parfois un couplage fonctionnel déficient (¹¹²) avec le récepteur recombinant exprimé en Sf9, alors que pour d'autres récepteurs, les récepteurs exogènes sont parfaitement couplés aux protéines G endogènes (Chidiac et al ⁸⁴). En jouant sur ces caractéristiques de l'environnement cellulaire Sf9, on peut minimiser les artefacts provenant de la contamination par les composantes endogènes aux cellules Sf9. De plus, l'expression de protéines G exogènes de mammifères en cellules Sf9 permet la production de protéines qui sont généralement fonctionnelles (^{118, 119}). Parmi les récepteurs qui ont mis à profit la modularité de la coexpression en cellules Sf9, on retrouve le récepteur 5-HT_{1A} (¹²⁰), dopamine D₂ (¹²¹) et le récepteur A₁ de l'adénosine (section 2. 0. 2. 3). Cette capacité de pouvoir rapidement comparer différentes combinaisons de sous-unités de protéines G est, à mon avis l'un des plus grands avantages de l'expression en cellules Sf9.

Du point de vue expérimental, la présence d'un couplage fonctionnel entre le récepteur et la protéine G peut être démontrée par la restitution d'un site de haute affinité (sensible au GTPγS) des agonistes en présence ou en l'absence de protéines G exogènes coexprimées. Il est également possible de démontrer le couplage fonctionnel en démontrant l'activation de l'effecteur ciblé par la protéine G, ou alternativement en montrant la modulation par le récepteur de la liaison (échange) de ³⁵SGTPγS sur la protéine G couplée. Bien qu'il soit assez facile de démontrer la spécificité d'interaction pour le récepteur des différentes familles de protéines G (Gi vs Gs), il est beaucoup plus difficile de discriminer les protéines G faisant partie d'un même groupe (αi1 vs αi2 vs

α3). Cette discrimination devra être basée sur la comparaison de systèmes équivalents démontrant des niveaux d'expression relativement similaires afin de ne pas introduire des artefacts lors de l'expression hétérologue. Seule la comparaison de la puissance et de l'efficacité d'une série d'agonistes pourra alors ébaucher la base sur laquelle s'appuiera notre interprétation de la sélectivité préférentielle envers un sous-type particulier de protéines G trimériques.

1. 6 MODÈLES EXPÉRIMENTAUX

L'importance de développer des modèles pharmacologiques qui sont appropriés à l'étude des phénomènes concernés ne fait aucun doute. Différents avantages et inconvénients sont inhérents aux systèmes pharmacologiques étudiés. Afin de discuter des qualités des divers modèles utilisés dans mes études, j'aborde ici brièvement les implications au niveau pratique de l'utilisation des différents systèmes d'expression qui furent utilisés pour développer les modèles expérimentaux servant à l'étude des récepteurs couplés aux protéines G.

1. 6. 1 Expression des récepteurs en cellules de mammifères

De façon générale, l'expression dans les cellules de mammifères est rendue possible par l'introduction, à l'intérieur des cellules, d'ADN complémentaire (ADNc) codant pour la protéine désirée. Cette ADN est inséré dans un vecteur de transfert qui contient des régions promotrices, lesquelles favoriseront l'expression hétérologue de la protéine recombinante. L'ADNc peut être introduit dans la cellule de façon permanente ou de façon transitoire (Adénovirus, Vaccinia). Généralement, les cellules "transfectées" n'entrent pas dans un cycle "lytique". À prime abord, les systèmes d'expression dans les cellules de mammifères, semblent les mieux adaptés parce qu'ils sont plus près des conditions normales (naturelles) de l'environnement cellulaire lors de la synthèse

protéique. De plus, comme il s'agit de cellules de mammifères, les modifications post-translacionnelles y sont généralement adéquates (^{122, 123, 124, 125}).

Qu'il s'agisse du récepteur ou de la protéine G, le désavantage de ces systèmes est souvent inhérent à leur faible niveau d'expression de protéines recombinantes, mais cela n'est pas toujours le cas (voir l'article de la section 2. 0. 2. 3). Par ailleurs, la culture à grande échelle de certains types de cellules de mammifères présente des difficultés accrues. Cependant, c'est surtout la présence d'une multitude de protéines G endogènes non caractérisées qui devient problématique pour le genre d'analyses rapportées dans le présent manuscrit. L'utilisation d'un système implicitement homologue au modèle animal augmente la probabilité que des protéines natives contaminent inévitablement le "bassin" de protéines recombinantes. Il est tout de même possible de minimiser ce problème en caractérisant préalablement la lignée cellulaire afin de déterminer, lors de l'étude de la protéine recombinante, si les protéines endogènes sont problématiques.

1. 6. 2 Expression des récepteurs en cellules d'insectes Sf9

Fréquemment, les conditions physiologiques d'un système pharmacologique "naturel" sont trop peu caractérisées pour pouvoir servir à établir les conditions initiales d'un système recombinant. Il faut alors, faire preuve d'imagination et envisager les différents scénarios qui pourraient reproduire en partie, l'activité "naturelle" des composés pharmacologiques testés. À mon avis, la meilleure approche alternative à l'utilisation des lignées cellulaires de mammifères est l'utilisation d'un système différent mais plus flexible que le modèle expérimental "natif" (modèle animal). Cette flexibilité devra, cependant, permettre de reproduire plusieurs variantes du système équivalent au modèle "natif". Le système d'expression baculovirus/cellules d'insectes Sf9 possède certaines des qualités nécessaires à la production de protéines recombinantes fonctionnelles. Ce système fut mis à profit avec succès pour l'expression d'une multitude de récepteurs et de protéines G recombinantes (la compagnie BioSignal en produit plus de 30 types). Dans

ce système, on infecte des cellules de lépidoptères en culture, les cellules Sf9, avec des virus recombinants contenant le gène d'intérêt. Il s'agit d'une infection qui entraîne la production de protéines recombinantes de façon progressive, jusqu'à 96 heures post-infection, ce qui entraîne ultimement la lyse des cellules. Les baculovirus *Autographa californica* (AcMNPV) possèdent un ADN génomique circulaire à double brin. Leur capsid nucléaire est fabriqué dans le noyau des cellules d'insectes infectées (¹²⁶). Le capsid acquiert subséquentement une membrane plasmique, soit par bourgeonnement de la membrane plasmique, soit par une synthèse au niveau même du noyau (¹²⁷). Ces virus ont la capacité d'infecter des cellules de lépidoptères (high 5, Sf9) qui poussent aussi bien à confluence qu'en suspension, à 27°C dans un milieu reconstitué avec ou sans sérum.

La méthode de production de virus recombinants se résume comme suit. On clone (insert) d'abord le gène dans un vecteur de transfert qui possède des séquences homologues à un gène viral à forte expression (polyhidrine ou P-10). Ensuite, on prépare et isole de grandes quantités de ce plasmide (*E. coli*). Puis, en parallèle on prépare de l'ADN viral. L'étape suivante consiste à faire une cotransfection de l'ADN viral et de l'ADN plasmidique contenant le gène d'intérêt dans les cellules Sf9. Il se produira alors un événement peu fréquent, la recombinaison entre le gène d'intérêt du plasmide et le gène de la polyhidrine du virus de type sauvage (insertion du plasmide dans l'ADN viral) (dans 0.01 % des cas). Comme il s'agit d'un phénomène très rare, il faut faire le criblage des virus recombinants. Les virus recombinants ne possèdent pas les corps d'inclusion formés par l'accumulation de polyhidrine dans les cellules infectées. Alors, une sélection visuelle permet d'isoler les plaques d'infection ne possédant pas la polyhidrine (i.e. possédant le gène recombinant). Alternativement, des vecteurs de transfert possédant le gène de la β -galactosidase sont utilisés pour faciliter le criblage des virus recombinants. Des passages successifs, combinés à des criblages permettent de purifier les virus recombinants. On amplifiera le titre d'infection par les virus (concentration des particules virales) pour accumuler des quantités suffisantes de virus pour confirmer la nature du virus isolé. La confirmation de l'identité du virus se fera par un dosage biochimique sélectif pour la protéine recombinante (analyse par Western, dosage enzymatique, dosage pharmacologique, etc.).

Ce système a l'avantage de produire la protéine recombinante en grande quantité et d'y insérer des modifications "post-translotionnelles" adéquates. La culture des cellules Sf9 peut facilement être adaptée pour la culture à grande échelle. Les cellules d'insectes peuvent même être adaptées à la culture en bioréacteur. Le système est suffisamment polyvalent pour produire des mutants assez facilement. Il est également possible de faire des coinfections de cellules avec plus d'un virus afin de produire des protéines composées de plus d'une sous-unité ou de produire les composantes de base d'un système de signalisation (récepteurs et protéines G trimériques). Le désavantage principal de ce système est qu'il est encore peu caractérisé et souvent mal accepté comme alternative adéquate à l'expression en cellules de mammifères. Lors de la caractérisation de l'expression d'une protéine recombinante, une grande partie du travail consiste, malheureusement, à caractériser sa localisation, ses modifications et ses fonctions, puis généralement, de les comparer avec les résultats obtenus lors de l'expression en cellules de mammifères. Ce travail devient souvent fastidieux, mais il est nécessaire. Le criblage ou "targetting" des protéines vers les bons compartiments cellulaires est fréquemment déficient dans les systèmes exprimant de grandes quantités de protéines recombinantes. Il est impossible de prédire la localisation de la protéine recombinante pendant une infection virale des cellules Sf9. Il est donc possible qu'une "surexpression" causée par le système d'expression sature les voies normales de modification et de transport des protéines ce qui entraîne souvent qu'une fraction des protéines recombinantes se retrouve non fonctionnelle dans un compartiment cellulaire inadéquat. Le manque de caractérisation des cellules Sf9 amène aussi une incertitude sur la nature des protéines G endogènes aux cellules d'insectes ce qui présente un danger de contamination du "bassin" des protéines recombinantes par des protéines G endogènes. Lors de la coexpression de différentes protéines recombinantes, il est également très difficile de contrôler avec certitude la stoechiométrie de chacune des protéines recombinantes produites. Une limitation du nombre maximale de coinfections pourrait également exister pour les cellules Sf9, mais à ma connaissance, aucune donnée expérimentale n'a pu démontrer concrètement l'ampleur de cette limitation. Malgré certaines contraintes, les cellules Sf9 demeurent un environnement adéquat pour l'expression de récepteur couplés aux

protéines G, tels que les récepteurs 5-HT_{2C} et A₁ de l'adénosine étudiés dans ce manuscrit. Cette propriété des cellules Sf9 est également démontrée par plusieurs autres études démontrant l'expression d'autres récepteurs couplés aux protéines G dans les cellules Sf9^(128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142).

1. 7 PHARMACOLOGIE DES RÉCEPTEURS ÉTUDIÉS

L'objectif principal de la démarche scientifique sur laquelle s'appuie mon projet de doctorat n'est pas d'élargir mes connaissances propres à un système d'expression, à un récepteur spécifique ou même à une famille de récepteurs, mais il est d'élucider et d'étudier différentes propriétés pharmacologiques qui s'appliquent aux antagonistes des récepteurs couplés aux protéines G. Je me suis donc concentré sur les propriétés des ligands plutôt que sur celles des systèmes biologiques. Mon étude est donc orientée vers les mécanismes fondamentaux de l'action des antagonistes. À cette fin, mes recherches ont tiré profit d'études portant sur différents récepteurs exprimés dans différents systèmes d'expression. Afin de bien comprendre l'implication thérapeutique et fonctionnelle des modèles pharmacologiques développés, on doit également aborder quelques notions de la pharmacologie du récepteur 5-HT_{2C} de la sérotonine et du récepteur A₁ de l'adénosine, principaux récepteurs étudiés dans le cadre de ce projet de doctorat.

1. 7. 1 La famille des récepteurs sérotoninergiques

La 5-hydroxytryptamine (5-HT) fut découverte en 1948, lorsque l'identité de la substance vasoconstrictrice provenant de la coagulation du sang fut identifiée. Pour cette raison, cette substance fut appelée sérotonine. La sérotonine est présente dans le sang et dans le SNC, où elle agit comme neurotransmetteur. La 5-HT provient de la biosynthèse dont le précurseur est le tryptophan et dont la dégradation oxydative par les monoamines oxydases forme l'acide 5-hydroxyindoleacétique (5-HIAA) qui est excrété dans les urines. La sérotonine agit a de multiple fonction physiologique, notamment au niveau de : la motilité gastro-intestinale (muscle lisse), la contraction des muscles lisses, la constriction vasculaire (directe et innervation sympathique), l'agrégation plaquettaire, la stimulation des terminaisons périphériques nociceptives, l'excitation ou l'inhibition des neurones du SNC (en fonction des régions) et de l'augmentation de la perméabilité vasculaire. Au niveau pathophysiologique, les désordres associés à la 5-HT et à ses récepteurs, on retrouve notamment; la migraine, la dépression, l'anxiété ainsi que les désordres du sommeil.

1. 7. 1. 1 Historique de la classification des récepteurs sérotoninergiques

La première classification des récepteurs de la sérotonine fut proposée par Gaddum et Hameed en 1954. Cette classification consistait en deux types de récepteurs : les récepteurs de type M (contractions antagonisées par la morphine) et de type D (contractions antagonisées par dibenzylène). Cette première classification fut rapidement désuète avec l'apparition de récepteurs ne pouvant être catégorisés comme M ou D. Avec l'apparition des premiers radioligands dans les années 70, on a pu distinguer deux sous types, 5-HT₁ et 5-HT₂. Cependant, avec l'avènement de nouveaux récepteurs identifiés par les techniques de biologie moléculaire, le besoin d'une terminologie uniforme devenait impérieux. C'est ainsi que fut acceptée en 1994, la nomenclature universelle

maintenant en vigueur. Les récepteurs de la sérotonine sont ainsi divisés en quatre grandes classes (5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃ et 5-HT₄) subdivisées en sous-type : A, B, C, D, E ou F ainsi que certains recombinants moins bien caractérisés (5-HT_{1e}, 5-HT_{1f}, 5-HT_{5a}, 5-HT₆, 5-HT₇). Les récepteurs sérotonergiques sont classés principalement en fonction de leur réponse fonctionnelle, selon l'activation de la protéine G et de son effecteur et, en second lieu, selon leur homologie de séquence et leur profil pharmacologique. Tous les sous-types de la classe des 5-HT₁ sont couplés négativement à l'adénylate cyclase et se retrouvent dans le SNC (sauf 5-HT_{1d}, vaisseaux) alors que les 5-HT₂ se retrouvent en périphérie comme dans le SNC où ils sont couplés à la phospholipase C et à l'activation de la protéine kinase C via le métabolisme des phosphoinositols. Par ailleurs, les récepteurs 5-HT₄, 5-HT₆, 5-HT₇ se retrouvent principalement dans le système nerveux entérique (associé au système gastro-intestinal) et aussi dans le SNC où ils sont couplés positivement à l'adénylate cyclase. Le récepteur 5-HT₃ fait exception puisqu'il fait partie intégrante d'un canal cationique et qu'il n'est donc pas un récepteur couplé aux protéines G.

Depuis les dix dernières années, la recherche pharmacologique dans le domaine sérotoninergique a été grandement stimulée par l'avènement de molécules puissantes et sélectives pour les récepteurs de la sérotonine. L'utilisation thérapeutique de quelques agonistes et antagonistes sérotoninergiques est présentée au tableau IV (¹⁴³).

Tableau IV

Utilisation thérapeutique des médicaments agissant sur les récepteurs de la sérotonine

Médicaments	Maladies	Statut
5-HT_{1A} (agonistes partiel)		
Buspirone	Anxiété	Mise en marché
Ipsapirone	Anxiété	Phase 3
Gepirone	Anxiété	Phase 3
Urapidil	Hypertension	Phase 3
WAY 100135 (antagonistes)	Anxiété	Phase 2-3
5-HT_{1D} (antagonistes)		
Sumatriptan	Migraine	Mise en marché
Naratriptan	Migraine	Phase 3
BW311C	Migraine	Phase 3
MK0462	Migraine	Phase 2-3
GR127935	Dépression	Préclinique
5-HT_{2A} (antagonistes)		
Kétansérine	Hypertension	Mise en marché
Ritansérine	Anxiété, psychose	Phase 3
Respéridone	Sommeil	Phase 3
Méthysergide	Migraine	Mise en marché
Pizotifen	Migraine	Mise en marché
5-HT_{2C} (antagonistes)		
SB 200646	Anorexie, boulimie	Préclinique
SB 200646	Migraine	Préclinique
5-HT₃		
Ondansetron	Antinausée (radiation)	Mise en marché
Ondansetron	Psychose	Phase 2
Granisetron	Antinausée (radiation)	Mise en marché
Tropisetron	Antinausée (radiation)	Mise en marché
	Migraine	Inefficace
Alosetron	Dépendance (narcotique)	Préclinique
	Schizophrénie	Phase 2
	Troubles de la mémoire	Phase 2
5-HT₄ (agonistes)		
Cisapride	Mobilité gastrique	Mise en marché
Renzapride	Mobilité gastrique	Phase 3
SC 49518	Mobilité gastrique	Préclinique
5-HT₄ (antagonistes)		
GR 125487	Syndrome d'irritation intestinale	Préclinique
SB 207710	Arythmie cardiaque	Préclinique

GRK: G proteins-coupled receptor kinases; PI3K:IP₃ dependent protein kinase.

1. 7. 1. 2 Le récepteur 5-HT_{2C}

Parmi les différents sous-types de récepteurs de la 5-hydroxytryptamine (5-HT), mon attention s'est surtout portée sur l'étude du récepteur 5-HT_{2C} de rat. Les premières évidences pharmacologiques du récepteur 5-HT_{2C} (anciennement 5-HT_{1C}) ont été rapportées par Pazos et al (¹⁴⁴) dans le plexus choroïdien de porc en 1984. Ces sites de liaison au [³H]5-HT étaient compétitionnés par le méthysergide et la miansérine alors que plusieurs autres ligands sélectifs aux récepteurs 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} ou 5-HT_{2A} étaient inactifs. Ce nouveau récepteur fut nommé 5-HT_{1C}, puis ensuite renommé 5-HT_{2C} en raison de son couplage préférentiel pour la phospholipase C. Il a été proposé depuis, que les récepteurs 5-HT_{2C} localisés dans le plexus choroïdien étaient impliqués dans le contrôle du volume et de la composition du liquide céphalorachidien (¹⁴⁵). Bien que le plexus choroïdien soit la région du SNC qui présente la plus grande densité de récepteurs 5-HT_{2C} (jusqu'à 3 pmol/mg de protéines membranaires), des sites de liaison sont également présents dans plusieurs autres régions du cerveau (pré- et post-synaptiques) telle que: la substantia noire, le globus pallidus, l'hippocampe, le cortex frontal, le tubercule olfactif et le raphé (¹⁴⁶). L'administration d'agonistes sélectifs du récepteur 5-HT_{2C} (mCPP et TFMPP) influence la locomotion, l'appétit et les comportements liés à la nourriture, la température corporelle, la sécrétion hormonale et produit des effets anxiogéniques (^{147, 148}).

Le clonage du récepteur fut d'abord initié par l'utilisation d'une nouvelle approche de clonage par expression chez les oocytes de *Xenopus laevis*. Cette nouvelle stratégie de déplétion d'hybrides permit d'identifier un clone codant pour une partie du récepteur 5-HT_{2C} de souris (¹⁴⁹). Par la suite, le gène complet fut isolé à partir d'une librairie d'ADN complémentaire provenant du cerveau de souris (¹⁵⁰). À la même époque, à partir d'une librairie fractionnée provenant du cerveau de rats, Julius et *col* ont cloné le récepteur 5-HT_{2C} de rat (¹⁵¹). Le gène codant pour le récepteur 5-HT_{2C} comprend trois introns dont deux sont situés dans la même région que ceux retrouvés dans le gène du récepteur 5-HT_{2A} et un intron additionnel faisant partie de la région N-terminale du récepteur. La plus grande homologie de séquence est avec le récepteur 5-HT_{2A} (78 %,

trans-domaine). Le gène humain (HTR2C) localisé en position chromosomale Xq24 présente une substitution Cys 23-Ser 23 chez 13 % de la population sans, toutefois, affecter la réponse de ce récepteur (¹⁵²). La séquence du récepteur comporte 458 acides aminés avec une masse moléculaire putative estimée à 51 kD. Deux sites de glycosylation (Asn39, Asn204) et un site (cys 309) disponible pour la modification par un acide palmitique sont présents. Cependant, cette observation basée sur la séquence en acides aminés n'a pas été démontrée par des données expérimentales de mutagenèse dirigée. En plus de ces régions, la troisième boucle cytoplasmique (71 a. a) et la partie carboxi-terminale (29 a. a) du récepteur contiennent des sites potentiels de phosphorylation, i. e. quatre des 12 derniers acides aminés du C-terminal sont des sérines (¹³⁰). Ces régions pourraient jouer un rôle important dans la désensibilisation du récepteur (¹⁵³).

Les récepteurs 5-HT_{2C} sont principalement impliqués dans le métabolisme et la dégradation des phosphatidyl-inositols (production d'inositol phosphate, IP) via l'activation de la phospholipase C. La production d'IP₃ comme messenger secondaire par le récepteur 5-HT_{2C} exprimé chez les oocytes active également l'ouverture d'un canal chlore (sensible au Ca²⁺) via une protéine kinase (dépendante du calcium et de l'activation de la calmoduline) et inhibe un canal potassique (insensible au Ca²⁺ (¹⁵⁴)). Outre cela, le récepteur peut aussi moduler indirectement la production de GMP cyclique par activation de la cascade impliquant la phospholipase A₂ (¹⁵⁵) et induire la translocation de la PKC α du cytosol vers la membrane, selon un mécanisme Ca²⁺ dépendant (¹⁵⁶). Les mécanismes de régulation du récepteur par les composés exogènes ou endogènes sont mal définis et complexes si l'on considère l'effet des antagonistes sur le récepteur. Par exemple, la production d'ARN messenger suivant le traitement avec différents antagonistes du 5-HT_{2C} est soit inchangée ou légèrement augmentée par ces traitements (miansérine) (¹⁵⁷) alors que le nombre de sites de liaison est clairement diminué lors des traitements chroniques (⁶¹⁻⁶³). Cette diminution du nombre de sites de liaison 5-HT_{2C} fait référence au phénomène de sous-régulation atypique discutée, dans ce manuscrit (section 1. 3. 5. 4, 2. 0. 2. 1, 2. 0. 2. 2 et 3. 0. 2. 2). En plus de cette particularité inusitée du récepteur, celui-ci démontre une activation spontanée lorsqu'il est

exprimé à haut niveau en cellules NIH-3T3⁽⁸³⁾ ou en cellules Sf9 (section 2. 0. 2. 1). Cette activité spontanée est inhibée par certains antagonistes sérotoninergiques démontrant ainsi l'activité agoniste inverse de ces antagonistes (section 1. 4. 1. 3, 2. 0. 2. 1, 2. 0. 2. 2, 3. 0. 2. 1). Des observations faites lors de l'expression du récepteur chez les cellules NIH-3T3 suggèrent que l'activation du récepteur peut démontrer un potentiel de proto-oncogène⁽¹⁵⁸⁾ en induisant la formation de foci cellulaires qui peuvent produire des tumeurs malignes chez la souris. Cependant, pour les cellules neuronales, l'activation du récepteur ne mène pas à la prolifération cellulaire dans des conditions normales. L'environnement cellulaire semble donc un facteur important pour que le récepteur démontre des propriétés proto-oncogéniques.

La pharmacopée des ligands du récepteur 5-HT_{2c} est surtout riche en antagonistes bien que quelques agonistes sélectifs existent (DOI). Malheureusement, la plupart des ligands 5-HT_{2c} possédant une activité thérapeutique présentent souvent de bonnes affinités pour d'autres sous-types de récepteurs sérotoninergiques (particulièrement 5-HT_{2a}) où mme pour des récepteurs dopaminergiques (Clozapine). Il est donc difficile d'associer l'activité thérapeutique d'un ligand avec son affinité pour le récepteur 5-HT_{2c}. La pharmacologie de ce récepteur est résumée au tableau IV. Cette diversité permet une comparaison détaillée des propriétés pharmacologiques des différents antagonistes du récepteur 5-HT_{2c}. La grande disponibilité de ligands antagonistes sélectifs est également responsable du choix de ce récepteur pour l'étude des propriétés fonctionnelles des antagonistes des récepteurs couplés aux protéines G.

Tableau IV

Affinités de différents ligands sur le récepteur 5-HT_{2c}

ligands	affinités pKi
Haute affinité	
Méteergoline (agoniste inverse)	9. 20
Méthysergide (agoniste inverse)	9. 12
Ritansérine (agoniste inverse)	8. 89
Mésulergine (agoniste inverse)	8. 70
Miansérine (agoniste inverse)	8. 63
d-LSD (agoniste partiel ?)	8. 30
SCH 23390	8. 30
Méthiothépine (agoniste inverse)	8. 00
DOI (agoniste)	8. 19
DOB (agoniste)	7. 87
Bonne affinité	
Loxapine (agoniste inverse)	8. 02
Kétansérine (agoniste inverse)	7. 69
Clozapine (agoniste inverse)	7. 62
Chlorpromazine (agoniste inverse)	7. 57
Risperidone	7. 50
5-HT (agoniste)	7. 50
Faible affinité	
Nan-190	6. 22
Sipiperone	5. 92
Spiroxitrine (antagoniste neutre)	5. 17

Du point de vue structural, peu de données expérimentales spécifiques au récepteur 5-HT_{2C} sont disponibles pour établir une relation entre la structure d'un ligand et son activité pharmacologique. Cependant, les données structurales provenant du mutant Arg 195 Gln du récepteur 5-HT_{2c} humain nous indiquent que cette arginine, qui est conservée pour la plupart des récepteurs des amines biogènes, contribue à la haute affinité de la liaison de la sérotonine (¹⁵⁹). Pour la liaison des antagonistes, les données structurales nous proviennent du récepteur chimérique 5-HT_{2a/2c}. Cette chimère nous permet de dire que des déterminants importants de la liaison sélective des antagonistes (kétansérine en particulier) sont localisés dans l'hélice 3 transmembranaire et dans la partie C-terminale (incluant hélice 6 et 7) du récepteur (¹⁶⁰). Le seul modèle moléculaire dynamique de l'interaction entre des ligands sérotoninergiques et le récepteur 5-HT_{2C} est basé sur l'arrangement probable du récepteur qui fut proposé par Kristiansen et al (¹⁶¹). Néanmoins, ce modèle théorique ne permet pas encore d'établir la "cartographie" spécifique des différentes régions du récepteur.

1. 7. 1. 3 Désordres associés aux récepteurs sérotoninergiques 5-HT₂

Le rôle des inhibiteurs de la recapture de la sérotonine (floxétine), de même que celui de plusieurs ligands des récepteurs de la sérotonine, sont maintenant bien établis dans le traitement de l'anxiété (¹⁶²). Le ligand sérotoninergique le plus efficace dans le traitement de la dépression est l'agoniste partiel 5-HT_{1A} buspirone, mais celui-ci n'est pas efficace pour contrôler la phase anxieuse de la dépression, ce qui en limite son utilisation clinique dans le traitement de la dépression nerveuse. D'autre part, des résultats préliminaires suggèrent que certains antagonistes 5-HT₂ (ritansérine) peuvent avoir des effets bénéfiques dans des cas d'anxiété. Certains antagonistes 5-HT₂ sont également des agents anti-migraine (méthysergide, pizotifen, ergotamine) alors que d'autres antagonistes sont inefficaces dans le traitement de la migraine (kétansérine, ritansérine, miansérine, méthiothépine, métergoline). Cette ambiguïté d'activité rend difficile l'attribution et l'interprétation du rôle d'un récepteur sérotoninergique à des activités thérapeutiques particulières. Par ailleurs, depuis les quinze dernières années, on porte beaucoup d'intérêt

au rôle de la sérotonine dans la pathogénèse de la schizophrénie. Ceci est supporté en partie par l'efficacité de la ritansérine à améliorer les symptômes négatifs de la schizophrénie (replie sur-soi-même, isolement social etc.) et à diminuer certains des effets extrapyramidaux (dyskinésie tardive) découlant du traitement à l'halopéridol. De plus, le neuroleptique atypique, clozapine, qui est utilisé chez les patients réfractaires à l'halopéridol, présente une bonne affinité pour les récepteurs 5-HT_{2a} et 5-HT_{2c}. Cependant, la clozapine présente aussi une grande affinité pour les récepteurs dopaminergiques (D₄) et α adrénergiques. Les seules évidences cliniques de l'implication des récepteurs 5-HT₂ viennent du fait que chez les patients schizophrènes, on observe une diminution du nombre de récepteurs 5-HT₂ dans le cortex alors que dans le striatum, on observe une augmentation des récepteurs 5-HT_{1a}. Il est, néanmoins, difficile d'établir que cette différence ne provienne pas de changements adaptatifs au traitement avec les neuroleptiques ou encore qu'elle provienne d'un développement anormal de la structure neuronale des cerveaux de schizophrènes (¹⁶³). Par ailleurs, chez le rat, le traitement chronique avec la clozapine induit une sous-régulation du récepteur 5-HT_{2c} présent dans le cerveau (¹⁶⁴) alors que d'autres neuroleptiques classiques (halopéridole) sont sans effet sur l'expression du récepteur (⁵⁵).

L'implication physiopathologique du récepteur 5-HT_{2c} reste encore à être démontrée, principalement, parce que le nombre d'agonistes sélectifs pour le récepteur 5-HT_{2c} est limité. Il devient donc important de développer des systèmes pharmacologiques bien caractérisés permettant à la fois de cribler des ligands sélectifs, qu'il s'agisse de ligands agonistes ou antagonistes, et de mesurer toutes leurs activités fonctionnelles afin de pouvoir comparer leur efficacité *in vitro* et leur potentiel thérapeutique.

1. 7. 2 La famille des récepteurs de l'adénosine

En plus de leur rôle dans le métabolisme énergétique, les purines, spécialement l'adénosine et ses dérivés, produisent un grand nombre d'effets pharmacologiques (pour revue ¹⁶⁵). L'ATP fonctionne comme un neurotransmetteur (cotransmetteur) dans plusieurs jonctions neuro-effectrices périphériques et agit comme un médiateur qui inhibe certains canaux potassiques. L'ATP agit principalement sur le canal ionique P_{2x} qui peut être responsable des réponses synaptiques rapides.

Des récepteurs distincts existent pour l'adénosine. En périphérie, les principaux effets de l'adénosine sont la vasodilatation, la bronchoconstriction, l'immunosuppression, l'inhibition de l'agrégation plaquettaire, la dépression cardiaque, la stimulation nociceptive des voies afférentes et l'inhibition de la sécrétion de neurotransmetteurs et d'hormones circulantes. Dans le SNC, l'adénosine exerce des effets dépresseurs pré- et post-synaptiques, réduisant l'activité motrice, déprimant la respiration, induisant le sommeil et réduisant l'anxiété. Plusieurs des effets thérapeutiques des méthyl-xanthines (théophylline, caféine, etc...), tel la stimulation du SNC, la diurèse et la bronchodilatation, proviendraient possiblement de leur activité antagoniste au niveau des récepteurs de l'adénosine.

Plusieurs récepteurs couplés à un canal ionique peuvent lier les dérivés nucléotidiques de l'adénosine (P_{2x} , P_{2z} et P_{2t}) mais nous nous en tiendrons aux récepteurs couplés aux protéines G ($A_{1,2a,2b,3}$, P_{2y} et P_{2u}).

La famille des récepteurs de l'adénosine couplés aux protéines G se divise en trois types pharmacologiques chez lesquels on retrouve des sous-types A ou B. Les types A_1 et A_3 sont principalement impliqués dans l'inhibition de l'adénylate cyclase alors que le type A_2 stimule l'adénylate cyclase. Bien que les récepteurs de l'adénosine soient connus pharmacologiquement depuis longtemps, l'identification moléculaire par clonage génétique de ces récepteurs a débuté avec l'identification d'un ADN complémentaire "orphelin" codant pour RDC7 et RDC8 (¹⁶⁶). Ces deux gènes furent exprimés en cellules de mammifères et finalement identifiés en fonction de leur profil pharmacologique

comme étant respectivement le récepteur A₁AR (¹⁶⁷) et A_{2a}AR (¹⁶⁸) de chien. Les autres membres de la famille provenant de différentes espèces furent également clonés, par la suite, à partir de la séquence de RDC7 et RDC8 (¹²⁶).

1. 7. 2. 1 Pharmacologie et distribution du récepteur A₁ de l'adénosine

Les récepteurs A₁ sont largement distribués dans plusieurs tissus périphériques tel que : le coeur, les tissus adipeux, les reins, l'estomac et le pancréas où ils jouent principalement un rôle inhibiteur. Ils sont présents dans le SNC, spécialement dans le cortex frontal, l'hippocampe, le cervelet, le thalamus et le striatum. Les voies effectrices prédominantes modulées par le récepteur A₁ sont l'inhibition de l'adénylate cyclase et des canaux Ca²⁺ (dépendant du potentiel membranaire), et l'activation de canaux K⁺ (¹⁶⁹) via une protéine G sensible à la toxine pertussis (Gi/Go). Un couplage à la PLC (possiblement via βγ) est aussi rapporté mais sans être bien défini et variant selon les systèmes (^{170, 171}).

Le gène codant pour le récepteur A₁ (chien), comporte 326 acides aminés (328 pour le lapin) avec une masse moléculaire putative prédite de 36 kD. Le niveau d'homologie de séquence entre le A₁ et les autres membres de la famille est de 87 % ou 92 % si l'on considère respectivement le récepteur en entier ou les transdomaines. Les récepteurs A₁ possèdent deux sites de glycosylation (Asn 148 et Asn 159) ainsi que deux cystéines pouvant former un pont disulfide (Cys80-Cys169) et un site de palmitoylation en Cys 309. Le récepteur comporte également un résidu aspartate dans le TMII qui serait possiblement impliqué dans la sensibilité au sodium du récepteur et deux histidines (His 272, 251) qui seraient impliquées dans la liaison des agonistes et des antagonistes (¹⁷²). En plus de ces régions, 11 acides aminés de la seconde boucle extracellulaire ont été démontrés par la chimère A₁/A₃ comme étant impliqués dans la reconnaissance des agonistes et des antagonistes (¹⁷³). Le clone génomique humain codant pour le récepteur A₁ démontre une régulation génétique différente des autres récepteurs couplés aux protéines G (¹⁷⁴). Un épissage alternatif de l'exon 4 régulerait le niveau relatif d'expression tissulaire du récepteur.

Plusieurs caractéristiques pharmacologiques sont propres au récepteur A₁. Premièrement, malgré plus de 90 % d'homologie inter-espèce, les différents clones du récepteur A₁, provenant de plusieurs espèces, présentent des différences au niveau de la liaison des agonistes. Cette différence est particulièrement remarquable pour les agonistes substitués en N⁶ (¹⁷⁵). Par exemple, l'ordre de puissance du A₁ de boeuf est : R-PIA > S-PIA > NECA alors que celui du rat est R-PIA > NECA > S-PIA. Les affinités de liaison des antagonistes sont équivalentes pour les différents clones de A₁ (espèces). Par ailleurs, la capacité de liaison des antagonistes est augmentée par les analogues non hydrolysables du GTP de façon opposée à la liaison des agonistes (section 2. 0. 2. 3). Cette sensibilité au GTPγS fut proposée comme étant une évidence de l'activité intrinsèque négative des antagonistes A₁. Toutefois, la seule évidence d'activité agoniste inverse d'un antagoniste A₁ (XAC) provient de systèmes reconstitués à partir de protéines purifiées pour lesquelles la contamination par des agonistes reste problématique (¹⁷⁶). Dans cette étude, l'antagoniste "[³H]xanthine amine congener (XAC)" se lie de façon préférentielle aux récepteurs libres de protéines G de cerveau (bovin), un système dans lequel le récepteur est couplé de façon spontanée au récepteur (¹⁷⁷). Dans ce manuscrit, la section 2. 0. 2. 3 rapporte des résultats démontrant clairement les activités agonistes inverses de plusieurs antagonistes A₁.

Comme pour la plupart des récepteurs couplés aux protéines G, les récepteurs A₁ sont régulés par différents processus biochimiques qui ont été décrits à la section 1. 3. 5. L'exposition prolongée aux agonistes du récepteur A₁ des adipocytes produit une perte de récepteurs, une diminution de l'expression de G α i et un découplage du récepteur (¹⁷⁸). Par ailleurs, l'exposition à court terme à des agonistes induit aussi une désensibilisation du récepteur A₁, exprimé chez les cellules DDT1 MF-2. Cette désensibilisation est indépendante de l'action des GRK (section 1. 3. 5. 2) sur les protéines G, mais implique plutôt la phosphorylation du récepteur (¹⁷⁹).

1. 7. 2. 2 Exemples thérapeutiques de médicaments agissant sur les récepteurs A₁ de l'adénosine

Un des rôles thérapeutiques reconnus de l'adénosine et de ses dérivés est de fournir une protection au myocarde durant les épisodes ischémiques ou lors d'infarctus (¹⁸⁰). Cependant, le mécanisme protecteur de ces agonistes est mal défini. On propose que l'activation de protéines kinases C et la production de protéines de stress biologique ("heat shock") sont des médiateurs possibles de cet effet. Pour ce qui est des antagonistes A₁, principalement les dérivés xanthines (théophylline), leur principale application thérapeutique consiste en une thérapie de remplacement des bronchodilatateurs pour contrôler l'asthme. Cependant, leur mécanisme d'action n'est pas connu et pourrait impliquer l'inhibition de la production de GMPcyclique ou l'inhibition des phosphodiésterases (élévation du cAMP). Une confusion existe à propos du mécanisme d'action thérapeutique des ligands du récepteur A₁. Cette confusion vient du fait que les effets d'une dose ponctuelle aïgue peuvent être diamétralement opposés aux effets des ligands administrés chroniquement (¹⁸¹). Dans l'arsenal thérapeutique, les effets des ligand A₁ sur les crises épileptiques semblent varier selon le régime utilisé. Ainsi, si l'administration de doses ponctuelles d'agonistes A₁ améliore l'état épileptique et que l'administration d'antagonistes produit des effets pro-convulsifs, en régime chronique, les effets de ces deux types de ligands sont à l'opposé de leurs effets en dose ponctuelle. Cette complexité de la réponse thérapeutique des ligands A₁, qui semble dépendante de la durée des traitements, peut entraîner des conséquences délétères pour le patient. Il est probable que l'exposition prolongée des récepteurs A₁ à différents types de ligands induit différents types d'adaptation selon la classe de ligands. Cette différence au niveau de l'adaptation dans la population de récepteurs A₁ devrait avoir une grande importance dans le développement de nouveaux agents anticonvulsifs, de stimulants cognitifs et dans le traitement préventif de l'infarctus du myocarde.

A priori, aucune évidence thérapeutique n'associe les récepteurs A₁ aux récepteurs 5-HT_{2c}. Cependant, ces deux récepteurs présentent certaines similitudes fonctionnelles si l'on considère premièrement, que leurs ligands possèdent des activités agonistes inverses

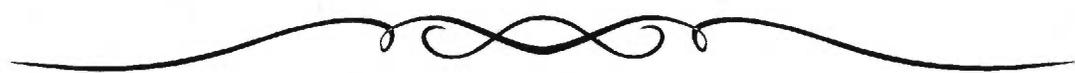
et en second lieu que leurs ligands ont possiblement des modes d'action différents selon le régime utilisé (chronique versus aigu). Cette relation peut être fortuite et reste à être démontrée. Néanmoins, mes recherches suggèrent que les différents modes d'action des antagonistes des récepteurs couplés aux protéines G, selon la méthode de traitement utilisée, soulèvent des questions fondamentales sur le véritable rôle thérapeutique des antagonistes et sur les mécanismes impliqués dans leur activité thérapeutique. Il est donc évident que les récepteurs 5-HT_{2C} et A₁ sont des modèles pharmacologiques importants dans l'étude des fonctions des récepteurs couplés aux protéines G.

2. 0 RÉSULTATS

Les résultats expérimentaux de mes études doctorales sont présentés ici sous forme d'articles scientifiques dont un ayant paru dans le journal *Molecular Pharmacology* en 1995 (premier article) et deux autres qui ont également été soumis aux fins de publication dans ce journal. Par ailleurs, plusieurs autres résultats expérimentaux obtenus lors de mes recherches ne figurent pas dans cette section. Ces résultats sont préliminaires et ne permettent pas une interprétation constructive menant à une discussion sur les nouveaux phénomènes pharmacologiques des antagonistes des récepteurs couplés aux protéines G. Par souci de simplification, les articles sont présentés sous leur format d'origine en anglais. Cependant, un résumé de ces articles présente l'essentiel des résultats.

2. 0. 1 Le défi scientifique d'étudier les antagonistes des récepteurs couplés aux protéines G

Plus nos connaissances du domaine de la pharmacologie des récepteurs couplés aux protéines G évoluent, moins les anciens modèles nous permettent de prédire et de comprendre les systèmes biologiques. À partir de ce précepte, nous pouvons énoncer ceci :



“Aristotle could have avoided the mistake of thinking that women have fewer teeth than men, by the simple device of asking Mrs. Aristotle to keep her mouth open while he counted.”



Bertrand Russell (1872–1970), British philosopher, mathematician. *Unpopular Essays*, “An Outline of Intellectual Rubbish” (1950).

Cette citation humoristique de Bertrand Russell est représentative de mon opinion des concepts désuets décrivant le rôle des antagonistes des récepteurs couplés aux protéines G. Le rôle classique de l'antagoniste compétitif conventionnel qui n'a aucune activité indépendante de l'action de l'agoniste n'est désormais plus approprié étant donné l'état actuel de nos connaissances. Des évidences suggérant que les antagonistes possèdent leur propre activité intrinsèque ont été présentées dans l'introduction (section 1. 3. 5. 4, 1. 4. 1. 3 et 1. 4. 3. 3). Plusieurs activités des antagonistes suggèrent même des propriétés contraires à celles des agonistes (section 1. 4. 1. 3). Il s'agit des propriétés agonistes inverses des antagonistes.

Dans ce contexte: *si l'antagoniste devient l'image miroir de l'agoniste; ceci suggère que les propriétés macroscopiques des antagonistes devront affecter l'interaction avec la protéine G et moduler de façon opposée la réponse d'un système.*

Cette hypothèse de départ de mon projet de doctorat fut appliquée à différents systèmes pharmacologiques (5-HT_{2C} et A₁) qui m'ont permis de caractériser les propriétés des antagonistes en absence d'agonistes. Ma démarche scientifique fait appel aux nouveaux concepts d'agonisme inverse, de sous-régulation atypique, de sensibilisation induite par les antagonistes et de l'influence du précouplage fonctionnel entre le récepteur et la protéine G sur la liaison des antagonistes. C'est la convergence des évidences démontrant l'existence de propriétés spécifiques aux antagonistes qui m'ont permis de définir dans ce manuscrit le rôle fonctionnel des antagonistes des récepteurs couplés aux protéines G. Le défi scientifique principal de mon projet de doctorat fut, dans un premier temps, de développer des systèmes pharmacologiques qui permettent de mesurer ces activités indépendantes de la présence des agonistes et dans un deuxième temps, de comparer ces activités afin d'établir un modèle rationnel pour expliquer le ou les rôles des antagonistes dans la régulation des récepteurs couplés aux protéines G.

2. 0. 1. 1 Méthodologie et progrès techniques

L'étude des récepteurs couplés aux protéines G implique une méthodologie rigoureuse qui tire profit des systèmes d'expression hétérologues en évitant certaines incertitudes propres à l'utilisation de préparations tissulaires. Les tissus présentent souvent des populations non homogènes de sous-types de récepteurs et de protéines G, ce qui rend difficile l'interprétation des résultats. L'approche idéale à ce problème est d'utiliser un système modulaire qui permet de choisir les composantes des systèmes de couplage, ce qui nous permet de connaître leur identité moléculaire et d'isoler la contribution de chacune à la transmission du signal. Le système d'expression en cellules d'insecte Sf9/baculovirus possède, en plus de cette caractéristique modulaire d'expression, plusieurs avantages qui ont été préalablement abordés (section 1. 6. 2). Ces caractéristiques ont été exploitées afin de développer des systèmes pharmacologiques qui, tout en respectant les propriétés pharmacologiques tissulaires, offraient une flexibilité accrue permettant de tester différentes hypothèses de travail.

Le développement du modèle d'expression en cellules Sf9 du récepteur 5-HT_{2C} et du récepteur A₁ de l'adénosine a permis trois améliorations majeures de l'étude des antagonistes:

- 1) L'expression à haut niveau du récepteur (27 pmol/mg, 5-HT_{2C}, 2 pmol/mg, A₁) favorise l'apparition d'un niveau d'activation élevée du récepteur; ce qui reflète la transition spontanée du récepteur vers une forme active. Cette caractéristique du système permet de mesurer l'inhibition de cette activation spontanée par l'action des agonistes inverses.
- 2) L'expression en cellules Sf9 du récepteur 5-HT_{2c} permet, pour la première fois, de reproduire *in vitro* l'activité atypique de sous-régulation rapportée *in vivo* pour les traitements chroniques avec des antagonistes neuroleptiques.
- 3) Seul la coexpression du récepteur et de protéines G exogènes permet de reconstituer une unité fonctionnelle de couplage pour le récepteur A₁ de l'adénosine en cellules Sf9. Cette caractéristique du système Sf9 a permis d'isoler l'effet de la protéine G sur la liaison des agonistes et des antagonistes du récepteur A₁.

Des progrès techniques ont aussi été accomplis au cours de ce projet de doctorat. Ces progrès ont permis d'établir de nouvelles stratégies pour mesurer les activités fonctionnelles des antagonistes. Ces développements techniques sont: la mesure de l'activité agoniste inverse en cellules Sf9, l'utilisation *in vitro* des récepteurs exprimés en cellules Sf9 pour mesurer une perte rapide de site (sous-régulation) en présence d'antagonistes, l'utilisation du système Sf9 pour mesurer l'effet de sensibilisation fonctionnelle du prétraitement aux antagonistes et l'utilisation de la stratégie de coexpression de protéines G exogènes aux cellules Sf9 pour reconstituer un système de couplage fonctionnel. J'ai également développé des outils pharmacologiques permettant la mesure et la modélisation de ces nouvelles activités. Ces outils sont : l'utilisation de la stimulation récepteur-dépendante de liaison de $GTP\gamma S^{35}$ sur la protéine G et de l'activation de la PLC endogène aux cellules Sf9 pour mesurer l'activité des ligands et le développement d'une simplification mathématique du modèle du complexe ternaire étendu (décrit à la section 1.4.2.4) d'interaction récepteur/protéine G permettant de simuler les observations expérimentales et de prédire les comportements des ligands dans différentes conditions. Certains de ces progrès techniques font partie de brevets qui sont maintenant la propriété de BioSignal. Ces dosages sont à la base de l'ensemble des tests fonctionnels qui m'ont permis de mesurer l'activité d'un ligand et d'en prédire les propriétés pharmacologiques. La plupart des dosages pharmacologiques présentés dans ce manuscrit ont été développés et mis au point spécifiquement pour me permettre d'étudier le mécanisme d'action des antagonistes.

2. 0. 1. 2 Hypothèse de travail

L'hypothèse originale de l'activité fonctionnelle des antagonistes telle que mentionnée préalablement (à la section 2. 0. 1) est difficile à soutenir sans aborder directement chacune des propriétés spécifiques aux antagonistes. Cependant, une approche qui se limite à examiner séparément chaque activité des antagonistes est trop restrictive pour permettre de les comparer et de justifier qu'elles soient issues de propriétés distinctes des antagonistes. Pour cette raison, l'hypothèse de départ fut segmentée en trois hypothèses de travail qui ont été abordées dans les trois études présentées dans ce manuscrit. Ces trois hypothèses sont les suivantes :

Première étude: *L'activité agoniste inverse des antagonistes du récepteur 5-HT_{2C} exprimé en cellules Sf9, est une propriété pharmacologique distincte de l'activité de sous-régulation atypique induite par ces mêmes ligands.*

Deuxième étude: *L'activité de sensibilisation de la réponse fonctionnelle induite par des prétraitements aux antagonistes 5-HT_{2C}, mesurée chez les cellules Sf9, est une propriété distincte de l'activité agoniste inverse et de la sous-régulation atypique produite par certains ligands sérotoninergiques.*

Troisième étude: *La sensibilité aux analogues non hydrolysables du GTP de la liaison des antagonistes du récepteur A₁ de l'adénosine est le reflet de l'activité agoniste inverse de ces ligands.*

2. 0. 1. 3 Caractère novateur et originalité du projet de doctorat

Les résultats présentés dans ce manuscrit sont parmi les premières évidences qui démontrent que les antagonistes possèdent de multiples propriétés fonctionnelles. Mes travaux ont la particularité de faire l'étude comparative de ces activités, d'en établir le profil pharmacologique et de soulever de nouvelles hypothèses qui ouvrent de nouveaux champs d'activités jusqu'à maintenant demeurés inconnus pour les antagonistes des récepteurs couplés aux protéines G.

L'originalité de mes études doctorales est qu'elles démontrent, par une approche pharmacologique, et non pas par une approche strictement biochimique, l'importance de l'effet des antagonistes sur le couplage fonctionnel entre le récepteur et la protéine G. Si je qualifie de pharmacologique, ma démarche scientifique sur l'étude des antagonistes, c'est parce que j'adresse non seulement les concepts macromoléculaires qui affectent l'action des ligands, mais aussi parce que je cherche également à établir les relations qui existent entre ces concepts et les différentes activités des ligands. Comprendre la façon dont un ligand agit, c'est comprendre la manière par laquelle celui-ci affecte la réponse d'un système et c'est intégrer les propriétés du ligand ou du système à la base de cette réponse. La compréhension des mécanismes fondamentaux affectant l'activité des ligands continue d'être, selon moi, parmi l'une des démarches les plus importantes de la pharmacologie moderne.

2. 0. 2 Résumé des trois études présentées

Afin de faciliter la transition vers les résultats expérimentaux, je présente ici mes trois études en soulevant observations préliminaires et les problèmes qui ont suscité notre intérêt à étudier des nouveaux phénomènes pharmacologiques propres aux antagonistes des récepteurs couplés aux protéines G.

2. 0. 2. 1 Premier article

Activité agoniste inverse et sous-régulation atypique des ligands sérotoninergiques.

Les antagonistes sérotoninergiques inhibent de façon différentielle l'activité spontanée et la perte de capacité de liaison du récepteur de la 5-hydroxytryptamine de type 2C chez les cellules Sf9

Préambule

L'expression à haut niveau du récepteur β_2 adrénergique chez les cellules Sf9 avait permis à Chidiac et al (⁸⁴) de démontrer l'activation spontanée du récepteur et de mesurer l'activité agoniste inverse des antagonistes adrénergiques sans faire appel à des mutations engendrant l'activation constitutive du récepteur. Cette approche semblait mieux adaptée aux contraintes des modèles pharmacologiques puisqu'elle minimisait le risque que les mutations "constitutives" affectent directement la constante d'isomérisation "J" du récepteur ou induisent une conformation active différente de celle du récepteur natif. Cette approche d'expression en cellules Sf9 fut appliquée au récepteur 5-HT_{2C} de rat. Ce modèle pharmacologique équivalant aux modèles tissulaires me permet de mesurer facilement l'activité agoniste inverse des antagonistes sérotoninergiques du récepteur 5-HT_{2C}. Par ailleurs, au même moment où je terminais mon étude sur l'agonisme inverse des ligands 5-HT_{2C}, Barker et al (⁸⁴) publiaient la même approche scientifique en exprimant le récepteur 5-HT_{2C} dans les cellules NIH-3T3. Cette étude présente des résultats qui sont similaires à mes résultats d'inhibition de l'activation basale spontanée du récepteur (agonisme inverse). Bien qu'ils démontrent des résultats qui confirment mes observations d'inhibition de l'activation spontanée du récepteur par les antagonistes, les auteurs extrapolent leur interprétation et tirent des conclusions sur le phénomène d'agonisme inverse chez les cellules NIH 3T3 avec lesquelles mes résultats

ne concordent pas. Les auteurs concluent que les propriétés agonistes inverses de la miansérine permettent d'expliquer la sous-régulation atypique observée *in vivo* (décrit à la section 1.3.5.4) lors de traitements chroniques avec la miansérine. Cette hypothèse que la propriété agoniste inverse explique la sous-régulation atypique du récepteur me semblait difficile à supporter avec leurs résultats expérimentaux limités puisqu'ils n'ont pas su démontrer la présence de sous-régulation atypique dans leur cellule NIH 3T3 alors que des cultures de cellules du plexus choroïdien, exprimant le récepteur, présentent une sous-régulation atypique en présence de miansérine. Seul un système pharmacologique possédant les deux phénomènes pouvait clairement déterminer si ces deux phénomènes (agonisme inverse et sous-régulation atypique) découlent de propriétés communes.

Résumé du premier article

Article publié dans Molecular pharmacology, volume 48:150-159 (1995).

Les activités des antagonistes sérotoninergiques en tant qu'agonistes inverses du récepteur 5-HT_{2C} de rat ont été comparées avec leur puissance à promouvoir la "sous-régulation" atypique du récepteur lors de l'expression dans les cellules d'insectes avec le système baculovirus / Sf9. L'expression en cellules Sf9 génère des niveaux élevés de récepteurs 5-HT_{2C} (jusqu'à 10⁶ récepteurs/cellule, 27 pmol/mg de protéines membranaires) qui démontrent un couplage fonctionnel avec la protéine G endogène impliquée dans le métabolisme des phosphatidyl-inositol (IP₃) chez les cellules Sf9 via un métabolisme insensible à la toxine pertussis. Les récepteurs exprimés démontrent une activation spontanée de la production d'inositol phosphate qui fut inhibée selon un mode dose-dépendante par des antagonistes sérotoninergiques, selon des activités qui sont constantes avec l'agonisme inverse. La puissance des antagonistes comme agonistes inverses est bien corrélée par leur affinité respective de liaison déterminée par des études compétitives de liaison mesurées pour des préparations membranaires. L'inhibition maximale de l'activation spontanée du récepteur s'élève jusqu'à un maximum de plus de 32 % pour la miansérine, le meilleur agoniste inverse, alors que d'autres antagonistes comme la spiroxatrine n'ont aucun effet sur le niveau basal d'activation spontanée du récepteur. Ces résultats suggèrent que les antagonistes 5-HT_{2C} possèdent des efficacités

distinctes qui sont le reflet de leur différence d'activité intrinsèque. Le traitement des cellules Sf9 ou de leur préparations membranaires contenant le récepteur 5-HT_{2C} avec des antagonistes, suivi d'un lavage du ligand résiduel, résulte en une diminution (jusqu'à 90 % de déplétion de sites de liaison) du nombre de sites de liaison pour la [³H]mésulergine et le [³H]5-HT, sans aucun effet sur l'affinité de la [³H]mésulergine. Cette diminution de la capacité de liaison du récepteur est irréversible et indépendante de la présence du ligand résiduel aux traitements mais n'est pas observé avec les agonistes. Cet effet des antagonistes observé en membranes était dépendant de la dose, mais son ordre de puissance était significativement différent de l'ordre de puissance agoniste inverse; suggérant ainsi que ces deux effets sont le reflet de deux propriétés distinctes des antagonistes du récepteur 5-HT_{2C}. Les propriétés relatives d'induction d'une perte de sites de liaison observée *in vitro* en cellules Sf9 démontrent une bonne corrélation avec les habilités des mêmes antagonistes à promouvoir *in vivo* une sous-régulation atypique du récepteur 5-HT_{2C} suite à des traitements chroniques; suggérant ainsi que ces deux phénomènes font partie du même processus pharmacologique.

Serotonergic Antagonists Differentially Inhibit Spontaneous Activity and Decrease Ligand Binding Capacity of the Rat 5-HT_{2C} Receptor in Sf9 Cells.

Jean Labrecque^{1,2}, Annick Fargin², Michel Bouvier³, Peter Chidiac^{1,3} and Michael Dennis^{1,4}.

¹ BioSignal Inc. 1744 William St. , Montreal (Quebec) Canada, H3J-1R4.

Departments of ²Pharmacology and ³Biochemistry, University of Montreal, B. P. 6128, Succ. Centre ville, Montreal, Quebec, Canada, H3C-3J7.

⁴ To whom correspondence should be addressed.

This investigation was supported in part by the Medical Research Council of Canada (grants MT-11215 and MT-11582).

Running title: *Inverse agonism and downregulation of the 5-HT_{2C} receptor.*

Key words: 5-HT_{2C} receptor, antipsychotic drugs, inverse agonism, downregulation, baculovirus.

SUMMARY

The activities of serotonergic antagonists as inverse agonists at the rat 5-HT_{2C} serotonin receptor were compared with their potencies in promoting receptor "downregulation" following expression of the recombinant receptor in the baculovirus/Sf9 insect cell system. Baculovirus expression yielded high levels of 5-HT_{2C} receptor (up to 10⁶ receptors/cell) which was functionally coupled to polyphosphoinoside turnover in Sf9 cells through a pertussis toxin-insensitive pathway. The expressed receptor exhibited spontaneous activation of inositol phosphate production which was inhibited in a dose-dependent manner by serotonergic antagonists, consistent with inverse agonist activity. The potencies of antagonists as inverse agonists correlated with their respective binding affinities determined in competition binding studies on membrane preparations. The maximal inhibition of spontaneous activity ranged from 32 % inhibition for miansérine to no effect for spiroxatrine, indicating that antagonists differ in their intrinsic inverse efficacy. Treatment of intact Sf9 cells or membranes containing the 5-HT_{2C} receptor with antagonists, followed by washout of residual drug, resulted in a decrease (up to 90 %) in the number of binding sites for [³H]mesulergine and [³H]5-HT, with no change in the affinity for [³H]mesulergine. The decrease in binding was irreversible, was not due to the presence of residual antagonist, and was not observed following treatment with agonists. This effect of antagonists in membranes was dose-dependent, but the rank order of potency was clearly different from that for inverse agonist activity, indicating that two effects reflect distinct actions of antagonists on the 5-HT_{2C} receptor. The relative abilities of antagonists to produce loss of binding showed a good correlation with their reported abilities to "downregulate" 5-HT₂ receptors *in vivo* following chronic treatment, suggesting that these actions reflect the same underlying process.

INTRODUCTION

Serotonin (5-hydroxytryptamine or 5-HT) acts as neurotransmitter and circulating hormone to control a wide variety of physiological processes. The diverse functions of 5-HT are mediated by multiple 5-HT receptor subtypes (1). With the exception of the 5-HT₃ receptors which are ligand-gated ion channels, the serotonin receptors are members of the G protein-coupled receptor superfamily, and functions *via* trimeric G proteins to modulate the activities of various cellular effectors, including adenylate cyclase and phospholipase C (2).

The 5-HT₂ receptors include three subtypes (5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} and 5-HT_{2C}) which activate polyphosphoinositide turnover *via* a pertussis toxin-insensitive G protein. The 2A and 2C subtypes are widely distributed in brain, the 5-HT_{2C} receptor (formerly named 5-HT_{1C}) being particularly abundant in choroid plexus from which the corresponding cDNA was originally cloned (3). While the physiological roles of the 5-HT₂ receptors are poorly understood, the pharmacology of the 2A and 2C subtypes has received considerable attention due to the demonstrated therapeutic efficacy of selective antagonists as antidepressant and antipsychotic agents (4,5).

A notable feature of antagonist action at the 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors is that certain antagonists, when administered chronically to rats, produce a decrease in receptor levels in various brain regions, as measured by radioligand binding. This loss of binding upon prolonged antagonist treatment has been termed "atypical downregulation", reflecting the general view that agonists normally downregulate whereas antagonists upregulate receptor numbers. It has been proposed that this atypical action of antagonists represents an adaptive response which could underlie the therapeutic efficacy of serotonergic antagonists (4, 5). The mechanism by which antagonists exert this effect is unclear.

A recent study provided evidence that serotonergic antagonists exhibit inverse agonist activity at the recombinant 5-HT_{2C} receptor expressed in a mammalian cell line. (6, 7). The ability of antagonists to inhibit the spontaneous, agonist-independent receptor activity has been observed for numerous G protein-coupled receptors (8-13) and may represent a general property of antagonist action on members of this receptor family. Comparison of the effects of two antagonists on spontaneous activity of the recombinant 5-HT_{2C} receptor with their abilities to reduce receptor numbers in primary cultures of choroid plexus lead to the proposal (6) that inverse agonist activity was directly correlated with “atypical downregulation” of 5-HT_{2C} receptors by antagonists *in vivo*.

In an effort to further investigate the possible relation between inverse agonism and “atypical downregulation”, we have analyzed the effects of serotonergic antagonists on spontaneous activity and receptor numbers for the rat 5-HT_{2C} receptor expressed in the baculovirus-insect cell system. The results show that the baculovirus-expressed 5-HT_{2C} receptor mediates agonist-stimulated release of inositol phosphates (IPs) in intact Sf9 cells, and exhibits elevated spontaneous activity which is inhibited by antagonists possessing inverse agonist activity. Furthermore, pre-treatment of intact cells or membrane preparations with antagonists, but not with agonists, resulted in a dose-dependent decrease in the binding capacity for [³H]mesulergine and [³H]5-HT. The rank order of potency for this effect was clearly different from that for inverse agonist activity, but showed a striking correlation with the reported abilities of the antagonists to promote “atypical downregulation” of 5-HT_{2C} receptors *in vivo*. Comparison of these two effects of antagonists on the baculovirus-expressed 5-HT_{2C} receptor clearly indicate that inverse agonist activity and the ability to promote loss of receptor binding capacity represent distinct actions of antagonists, and that drugs can selectively target one or the other action. Part of this work has been presented previously (14).

MATERIALS AND METHODS

Reagents. Buffer chemicals and protease inhibitors were purchased from Sigma, and cell culture media from Gibco/BRL. Unlabeled ligands were supplied by Research Biochemicals International, with the exception of RU24969, which was a gift from Roussel Uclaf. [³H]mesulergine (78-82 Ci/mM) was purchased from Amersham and [³H]myo-inositol (10-20 Ci/mM) was purchased from NEN-Dupont. The ion exchange resin AG 1 X-8 was supplied by Bio-Rad.

The recombinant baculovirus used for expression of the rat 5-HT_{2C} receptor was provided by the Biotechnology Research Institute of Montreal. The virus was constructed using a synthetic DNA fragment encoding the rat 5-HT_{2C} receptor, based on the published sequence of the cloned cDNA from choroid plexus (3). The synthetic cDNA was prepared and its sequence verified by Allelix Biopharmaceuticals. The cDNA was inserted into the IpDC-126 baculovirus transfer vector and a recombinant baculovirus was produced and purified as previously described (15).

Cell culture and receptor expression. Sf9 cells were cultured in 50 ml batches in 250 ml shaker flasks at 27°C in Sf-900 II serum free medium containing 50 µg/ml of gentamicin sulfate. Cells were grown to a density of 3x10⁶ cells/ml and infected with the 5-HT_{2C} recombinant baculovirus, or with wild type AcNPV baculovirus, at a multiplicity of infection (m. o. i.) of 2. Viral stocks for infections were in Grace's insect medium containing 5 % fetal bovine serum (Hyclone), and were added to cultures at a dilution of approximately 1:20 upon infection. The infected cells were maintained in culture for various periods and used for analysis of ligand binding and measurement of IPs production as described below.

Radioligand binding assays. For the estimation of total receptor numbers in intact Sf9 cells, the cells were pelleted by low-speed centrifugation (3 min at 800 RPM in Sorvall

H6000A rotor), followed by resuspension in PBS and recentrifugation, and resuspended in either PBS or binding buffer (50 mM Tris/HCl, pH 7.4, 15 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 0.1 % ascorbic acid, 5 µg/ml leupeptine, 10 µg/ml aprotinin, 20 µg/ml benzamidine, 50 µg/ml TPCK and 50 µg/ml trypsin inhibitor). Cell viability after washing was estimated at 60-70 % by trypan blue exclusion. Aliquots of 10,000 cells were incubated for 1 hr at 27°C in a final volume of 540 µl containing 20 nM of [³H]mesulergine. Incubations were terminated by vacuum filtration over GF/C filters and washing with binding buffer at 4°C. Bound radioactivity was measured on filters impregnated with MeltiLex™ melt-on scintillant using a Wallac MicroBeta counter. Non-specific binding was estimated in parallel incubations containing 10 µM mianserin or metergoline.

For analysis of ligand binding to membrane preparations, cultures were harvested at 48 hr postinfection, lysed and a membrane pellet was prepared as previously described (16) and stored at -80°C. Protein concentrations were determined by the nitrocellulose amido black method (17). Membranes were thawed on ice and resuspended in binding buffer by homogenization in a Potter homogenizer. The membranes (5 µg) were incubated with [³H]mesulergine for 1 hr at 27°C in a final volume of 540 µl, and the assays terminated as described above for intact cells. Saturation binding assays yielded a K_d for [³H]mesulergine of 2 nM, and competition binding assays with unlabeled drugs were carried out with 3 nM [³H]mesulergine (Table 1).

Analysis of binding kinetics. Time course association experiments with [³H]mesulergine were carried out by measuring [³H]mesulergine bound at different times following addition of radioligand as described above (see also figure legends). Dissociation experiments were performed by incubating membranes for 60 min at 27°C with [³H]mesulergine at a concentration of 20 nM or 500 nM (see Results). The labeled membranes were then centrifuged (2 min at 12000 rpm in a microfuge) and resuspended in a 1000 fold excess of either binding buffer alone or buffer containing unlabeled drugs

(see Results). The diluted membranes were then incubated at 27°C and aliquots were collected in triplicate with a 30cc syringe and vacuum filtered over 24 mm GF/C filters using a millipore 1225 sampling manifold. Bound radioactivity was measured on the filters by scintillation counting in 1 ml of Hi-load LKB scintillation cocktail. Control membranes were processed in parallel to assess stability.

Inositol phosphate production. Growing cell cultures (1×10^6 cells/ml) were prelabeled for 24 hr with 1 μ Ci/ml [3 H]myo-inositol prior to infection, and the labeled cells were then transferred to 50 ml shaker flasks for infection. Assays (n=2 or 3 as indicated) were started by addition of labeled cells (2.5×10^5 to 10×10^5 cells/well) to a 96-well deepwell plate (Beckman) containing the drugs to be tested, followed by immediate mixing. The cells were then incubated for 20 min at 27°C in a shaking incubator, and the incubations stopped by addition of perchloric acid. Total [3 H]-labeled IPs (total inositol polyphosphate) were measured by scintillation counting following isolation by anion exchange chromatography on AG 1 X-8 resin, as previously described (18).

Effect of drug pre-treatment on [3 H]mesulergine binding. Infected Sf9 cell cultures were treated with antagonists by adding drugs directly to the culture medium 12 hr before cell harvest. Cells from cultures treated in triplicate were then quickly washed in culture medium to remove unbound ligands. Before measuring total [3 H]mesulergine binding, dissociation of bound ligand was induced by diluting the cells (1:500) in PBS/Grace buffer (PBS supplemented with 26 g/L sucrose, 0.7 g/L dextrose, 4.1 g/L KCl, 1.36 g/L MgSO₄ and 1.01 g/L) and washing the cells in the same buffer for three 60 min cycles at 27°C. Cells were then resuspended in binding buffer and receptor levels were determined as described above with 10 nM [3 H]mesulergine.

Drug pre-treatments on membranes were initiated by transferring 500 μ L of membranes in binding buffer (i. e. 200 μ g/assay per replicate of drug treatment) to polypropylene

tubes (containing 5-HT ligands) and incubating for 60 min at 27 °C. Treatments were stopped by centrifuging membranes at 4000 rpm for 10 min in a Sorvall H6000A rotor. Membranes were extensively washed as described above for whole cells, resuspended in binding buffer (10 µg/assay), and the total and non-specific binding of 10 nM [³H]mesulergine measured in triplicate.

Analysis of Data. The binding of [³H]mesulergine (saturation experiments) and the inhibition of [³H]mesulergine binding by unlabeled serotonergic ligands were analyzed in terms of a single class of binding sites using the computer program LIGAND (19). Data from three independent binding experiments were fitted individually and the affinities presented for [³H]mesulergine (K_d) and other ligands (K_i) represent as the average values (± SEM) from 3 sets of data. Dose-response data for IPs and antagonist-induced decreases in [³H]mesulergine binding capacity were scaled taking values measured in the absence of added ligand as 100 %. The scaled data were analyzed according to a 4 parameter logistic equation analogous to the Hill equation (ALLFIT; A. DeLean, Department of Pharmacology, Université de Montréal or INPLOT; GraphPad Software, SanDiego CA). For the decrease in [³H]mesulergine binding with each ligand, 3-4 sets of data were fitted simultaneously using ALLFIT with the slope factor set equal to 1. Further details are described in Tables and figure legends. Maximal inverse agonist activities measured for each drug tested were compared statistically by a two tailed t test ($\alpha = 0.05$).

RESULTS

Expression of functional 5-HT_{2C} receptor in Sf9 insect cells. A baculovirus encoding the rat 5-HT_{2C} receptor was used to express the recombinant receptor in cultures of Sf9 insect cells. Receptor levels, as measured in whole cells by the binding of [³H]mesulergine (10 nM), increased with time after infection to reach approximately 1 million sites per cell at 72 hr postinfection (Fig. 1). The ability of the expressed 5-HT_{2C} receptor to modulate endogenous phospholipase C activity in intact Sf9 cells was assessed by measuring the production of total IPs over 20 min as described in Materials and Methods. The levels of intracellular IPs at different times postinfection and under various pharmacological treatments are presented in Fig. 1. The basal level of IPs production increased over the time course of the infection, and at 38 hr postinfection were roughly double that at 20 hr. Basal IPs production dramatically decreased at 72 hr, reaching levels comparable to those observed for cells infected with wild-type baculovirus (data not shown). This loss of activity at 72 hr, the point of highest receptor expression, paralleled a drop in cell viability (to under 10 %), consistent with a generalized loss of cell function at late stages of the viral infection.

As shown in Fig. 1, the natural agonist 5-HT was able to stimulate IPs production in whole cells expressing the 5-HT_{2C} receptor; the response to 5-HT, however, varied over the course of the infection. At 20 hr and 38 hr postinfection, 5-HT stimulated IPs production by 30 % and 13 %, respectively, over basal activity measured at the same time point. The response to 5-HT was completely inhibited by the antagonist mianserin (10 μM). The agonist had no effect on basal IPs release at 12 hr postinfection, when there was little or no receptor expression (Fig. 1), nor in cells infected with wild-type virus (data not shown). The response to 5-HT was lost at 72 hr, in parallel with the drop in basal activity.

The concentration dependence of the stimulation of IPs production by the serotonergic agonists 5-HT, D. O. I. and RU24959 was studied in whole cells at 20 hr postinfection

(Fig. 2). The rank order of potency for the agonists was 5-HT = D. O. I. > RU24959 (see legend Fig. 2.). While D. O. I. and 5-HT stimulated IPs production to equal extents (approximately 30 % stimulation), RU24959 acted as a partial agonist of the response (12 % stimulation). Treatment of the cells with pertussis toxin (up to 100 ng/ml) for 24 hr preceding measurement of IPs production did not alter the stimulatory effect of 5-HT (data not shown).

The antagonist mianserin, in addition to blocking the stimulatory effect of 5-HT, also produced an inhibition of basal IPs production in the absence of added agonist. The extent of this inhibition varied, from 20 % at 20 hr postinfection to roughly 40 % inhibition at 38 hr. Mianserin had no effect on basal levels of IPs production at 12 hr or 72 hr postinfection. These results suggest that the baculovirus-expressed 5-HT_{2C} receptor exhibits spontaneous, agonist-independent activity which can be inhibited by the antagonist mianserin. Mianserin thus appears to act as an inverse agonist at the 5-HT_{2C} receptor, in agreement with a previous report (6).

Analysis of inverse agonist activity. The pharmacology of a series of serotonergic antagonists on the 5-HT_{2C} receptor in Sf9 cells was examined in binding studies using membranes prepared from Sf9 cells at 48 hr postinfection. Saturation binding experiments on these membranes with [³H]mesulergine gave a receptor concentration of 27 pmol/mg protein and an affinity (K_D) of 2 nM. The binding affinities for the antagonists (Table 1), as determined in competition binding assays, showed the following rank order: metergoline > methysergide > ritanserin > mesulergine = mianserin > ketanserin = clozapine > spiperone > spiroxatrine. All of the antagonists appeared to bind to a single class of sites (Hill coefficients indistinguishable from 1). These results are in good agreement with those reported for the binding of antagonists to the rat 5-HT_{2C} receptor present in choroid plexus (20 for review) or expressed in mammalian cells (6, 21-23).

The effects of the antagonists on basal IPs production, analyzed in whole cells at 38 hr postinfection, are shown in Fig. 3. All of the antagonists tested, with the exception of spiroxatrine, produced a dose-dependent inhibition of IPs production. The EC₅₀ values for inhibition by the various antagonists (Table 1) showed the same rank order as for binding affinities, and an excellent correlation ($r^2=0.97$) was observed between the two parameters (Fig. 4). The maximal inhibition varied depending on the antagonist, ranging from 32 % for mianserin, to no effect for spiroxatrine at concentrations up to 500 μ M (100-fold over its binding affinity). The rank order for maximal inhibition was: mianserin > metergoline \geq ritanserin \geq methysergide \geq clozapine \geq spiperone \geq mesulergine \geq ketanserin. This clearly differs from the rank order observed for inhibitory potency and binding affinity for this series of antagonists. These findings suggest that the different antagonists show varying degrees of inverse efficacy, with spiroxatrine acting as a “neutral” antagonist at the 5-HT_{2C} receptor in this system.

In an effort to further analyze the inverse agonist effect, and to assess the possibility that the inhibitory effect of antagonists was due to the presence of agonist (i. e. 5-HT) in the medium, additional experiments were performed using the apparently neutral antagonist spiroxatrine. As shown in Fig. 5A, spiroxatrine inhibited 5-HT-stimulated IPs production in whole cells (analyzed at 20 hr postinfection) in a manner expected for competition for the occupancy of a common site. The IC₅₀ for this effect (9 μ M) was in good agreement with the affinity of spiroxatrine measured in binding studies (6.8 μ M). Spiroxatrine also blocked the inhibitory effect of mianserin on basal IPs production (Fig. 5B). Increasing concentrations of spiroxatrine produced a rightward shift in the dose-response curve for mianserin inhibition, consistent with the view that the two ligands bind to a common site. Analysis of the spiroxatrine data was carried out according to Schild and Arunlakshana (24) (inset to Fig. 5B). The potency (pA_2) of spiroxatrine in reversing mianserin inhibition, as calculated from the Schild plot, was 5 μ M, a value which agrees well with those obtained for spiroxatrine inhibition of mesulergine binding and inhibition 5-HT-stimulated IPs production (Table 1). Spiroxatrine thus appears to

inhibit the binding of both 5-HT and mianserin and thereby inhibit their respective effects on IP_s production. These results are not consistent with the interpretation that the inhibition of basal activity by antagonists is due to the presence of agonist during the assay, but rather support the view that the baculovirus-expressed 5-HT_{2C} receptor exhibits spontaneous activity which is inhibited by antagonists possessing inverse agonist activity.

Apparent “downregulation” of the 5-HT_{2C} receptor by antagonists. Serotonergic antagonists have been shown to promote the “downregulation” of 5-HT_{2C} receptors in rat brain following chronic treatments *in vivo* (25-31). This effect of antagonists on 5-HT_{2C} receptor numbers has been reported to occur in primary cultures of choroid plexus, but not in a transfected mammalian cell line expressing the cloned receptor (6). It was thus of interest to examine whether antagonist treatments could alter the level of binding sites for the baculovirus-expressed 5-HT_{2C} receptor.

Initial experiments were carried out by treating intact Sf9 cells expressing the 5-HT_{2C} receptor (at 38 hr postinfection) for 12 hr with high concentrations (100 μM) of various drugs added to the culture medium. The drugs were then washed out as described in Materials and Methods and the effect of pre-treatment on receptor levels was determined by measuring the binding of [³H]mesulergine (10 nM) in the standard filtration assay. As shown in Fig. 6 (shaded bars), antagonist treatment resulted in decreases in [³H]mesulergine binding, with the extent of the decrease varying from over 90 % for metergoline and ritanserin to little or no decrease for spiperone. The agonists 5-HT and D. O. I produced no significant change in the level of binding. When these experiments were carried out using membrane preparations (Fig. 6, solid bars), essentially the same profile of drug effects on the level of [³H]mesulergine binding was observed as in whole cells. For certain antagonists, particularly mesulergine and clozapine, the magnitude of the decrease in binding sites was somewhat greater in membranes than in whole cells, but the rank order for loss of sites was the same in cells and in membranes.

The loss of [^3H]mesulergine binding sites induced by antagonists was characterized in greater detail in membrane preparations. As shown in Fig. 7, pre-treatment with varying concentrations of the different antagonists, followed by extensive washing to remove bound antagonist, produced dose-dependent decreases in [^3H]mesulergine binding. The potencies (see below) of the antagonists in reducing the binding of [^3H]mesulergine varied over several orders of magnitude, with metergoline being the most potent and spiperone having no effect at concentrations up to 1 mM. Treatment of membranes with 10 nM metergoline resulted in equivalent decreases (approximately 90 %) in the binding of [^3H]mesulergine (10 nM) and [^3H]-5-HT (350 nM) (data not shown), indicating that the binding of antagonists and agonists were equally effected by antagonist pre-treatment.

To test the possibility that the loss of sites was not simply due to residual antagonist remaining bound to the receptor after the wash, membranes were treated with either mianserin (1 μM), ritanserin (10 nM) or metergoline (10 nM), washed, and saturation binding was performed with [^3H]mesulergine. As shown in Table 2, the antagonists produced marked decreases in the B_{max} values, but did not alter the apparent affinity of [^3H]mesulergine except for ritanserin treatment which slightly increased the K_d estimate. This result suggests that the reduction in the number of [^3H]mesulergine binding sites for mianserin and metergoline is not due to residual antagonist reversibly bound to the receptor, however some residual ritanserin may have been present after the wash treatment .

The possibility of an artifact due to residual antagonist was also addressed by analyzing the association-dissociation of [^3H]mesulergine, an antagonist which itself causes a decrease in binding sites (see Fig. 7). The time course of association of 20 nM [^3H]mesulergine, measured in membranes by filtration at different time points after radioligand addition, exhibited first-order kinetics to reach a steady state within 60 min at

27°C (Fig. 8 top curve). In parallel experiments, membranes were incubated for 60 min with [³H]mesulergine at 500 nM, a concentration sufficient to cause a >50 % reduction in binding sites (c. f. Fig 7). In the latter experiments, dissociation of the bound [³H]mesulergine was then initiated by centrifuging the membranes and resuspending them in a large volume of buffer (1x10⁵-fold the original incubation volume), and residual bound ligand was measured at various times using a filtration assay (see Legend to Fig. 8). As shown in Fig. 8, approximately 95 % of the bound [³H]mesulergine had dissociated from the membranes following a 2 hr incubation at 27°C (t_{1/2} = 40 min). When these membranes were then tested for their ability to bind 10 nM [³H]mesulergine, the total binding was reduced by approximately 60 % compared to control membranes (i. e. no mesulergine pre-treatment) processed in parallel, consistent with the effect of 500 nM unlabeled mesulergine (ca Fig. 7). These results clearly demonstrate that the ability of mesulergine (and presumably the other antagonists) to reduce the number of binding sites is not due to residual ligand occupying the receptor, since the lost binding sites were not recovered even after dissociation of over 95 % of the bound mesulergine.

In order to determine whether the loss of sites produced by antagonist treatment was a reversible process, intact cells or membranes were treated with metergoline (10 nM), washed according to the standard protocol and incubated for up to 24 hr in the absence of added drug. Analysis of [³H]mesulergine binding following such treatments showed no recovery of binding sites, while control samples (i. e. no metergoline pre-treatment) processed in parallel exhibited only a slight decrease in [³H]mesulergine binding (data not shown). The loss of sites for the baculovirus-expressed 5-HT_{2C} receptor following antagonist treatment thus appears to be irreversible under the conditions examined here.

Lack of correlation between inverse agonism and loss of binding sites. The dose-response curves for loss of binding sites following agonist pre-treatment (Fig. 7) were analyzed (see Table 2) to generate EC₅₀ values (i. e. concentration producing a 50 %

decrease in binding) for the series of antagonists. The results (Table 3) provided the following rank order of potency for loss of sites: metergoline > ritanserin \geq mesulergine > clozapine > mianserin > spiroxatrine \geq ketanserin >> methysergide. This clearly differs from the rank order determined for binding affinity and inverse agonist activity (cf. Table 1). Comparison of the EC₅₀ values for inverse agonism vs. loss of binding sites (Table 3) indicates that certain antagonists (metergoline and spiroxatrine) were highly selective in decreasing binding sites, while others (methysergide, ketanserin and spiperone) were selective in inhibiting spontaneous receptor activity. While the antagonists showed a wide range of potencies in reducing the level of binding sites, the results in Fig. 7 suggest that the maximal reduction was the same (ca. 90 % loss of sites) for all of the antagonists, although the effects of spiroxatrine and methysergide appeared to be incomplete at the highest concentrations used. This contrasts with the results for inverse agonism (Fig. 3 and Table 1), which indicated that the maximal inhibition of spontaneous receptor activity varied depending on the antagonist. The present findings thus strongly suggest that the inverse agonist activity and reduction of binding sites represent distinct actions of serotonergic antagonists on the 5-HT_{2C} receptor.

DISCUSSION

The antagonist pharmacology of the 5-HT_{2C} receptor is an area of considerable interest due to its potential therapeutic relevance to the action of antipsychotic drugs. Studies using a variety of model systems, including intact animals, primary cultures and mammalian expression systems have provided evidence that serotonergic antagonists exert multiple actions on the 5-HT_{2C} receptor. In addition to inhibiting receptor activation by 5-HT, antagonists have been reported to inhibit spontaneous activity of the recombinant receptor in 3T3 cells (6,7) and to promote “downregulation” of the 5-HT_{2C} receptor in rat brain *in vivo* (25-31) and in choroid plexus *in vitro* (6). The present study provides the first detailed comparison of these different modes of antagonist action in a single system based on the expression of the cloned 5-HT_{2C} receptor in the baculovirus-insect cell system.

The results of this study show that the infection of Sf9 cells with recombinant baculovirus encoding the 5-HT_{2C} receptor leads to the expression of functional receptors capable of regulating intracellular levels of inositol phosphates. The levels of 5-HT_{2C} receptor expression observed in the Sf9/baculovirus system (ca. 1 million sites per cell in intact cells and 27 pmol/mg protein in membrane preparations) are roughly 20-fold higher than the native receptor in rat choroid plexus (25) and over 5-fold the level reported for NIH-3T3 cells expressing the recombinant receptor (6). As is observed with mammalian systems expressing either native or recombinant 5-HT_{2C} receptors, the baculovirus-expressed 5-HT_{2C} receptor activates polyphosphoinositide hydrolysis in response to serotonergic agonists via a pertussis toxin-insensitive pathway. This is consistent with results of previous studies (32, 33) which indicate that Sf9 cells possess a Gq-like G protein, an endogenous phospholipase C and Ca²⁺ signaling mechanisms which are amenable to activation by mammalian G protein-coupled receptors. The potencies of 5-HT and D. O. I in stimulating IPs production in Sf9 cells expressing the 5-HT_{2C} receptor (19 nM and 100 nM, respectively) were comparable to those reported for choroid plexus polyphosphoinositide hydrolysis (30, 31). The maximal level of stimulation of IPs

production in these experiments (30 % over basal at 20 hr postinfection), however, was considerably less than that observed in either choroid plexus (ca. 400 % stimulation) (30, 31) or NIH-3T3 cells (ca. 200 % stimulation) (6). The low response to agonists of the baculovirus-expressed receptor in this study could conceivably reflect partial incompatibility between the mammalian receptor and the insect G protein-effector relay. Alternatively, poor responsiveness to agonists could be a consequence of the high levels of receptors produced in this system. Agonist-independent effector activation by 5-HT_{2C} (Fig. 1) and β_2 adrenergic receptors (8) in Sf9 cells increases with the level of receptor expression, and it follows that inhibitory feedback mechanisms may alter the activity of intracellular components involved in second messenger production and/or metabolism.

Agonist-independent increases in IPs in Sf9 cells expressing the 5-HT_{2C} receptor (Figure 1) indicate that the receptor is spontaneously active when expressed in this system. Spontaneous activity appeared to reach a maximum approximately 38 hr postinfection, and was inhibited by a variety of 5-HT_{2C} antagonists. These observations confirm similar findings with the 5-HT_{2C} receptor expressed in NIH-3T3 cells (6,7). An excellent correlation was observed in the present study between binding affinity of these antagonists and their potency (EC₅₀) as inverse agonists. The results further show that 5-HT_{2C} inverse agonists display a range of intrinsic activities in Sf9 cells (Table 1), as observed for the β_2 adrenergic receptor expressed in Sf9 and mammalian cells (8), as well as for the δ opioid receptor (13) and the α_2 adrenergic receptor (11). These findings are consistent with the idea that intrinsic activity can vary among inverse agonists at a particular G protein-coupled receptor, similar to the range of activities typically exhibited by full and partial agonists. In contrast, results reported for the 5-HT_{2C} receptor in NIH-3T3 cells (6,7) suggested that antagonists either fully inhibit or else are without effect on spontaneous receptor activity in that system. In addition, methysergide was reported to behave as a neutral antagonist at the 5-HT_{2C} receptor in the mammalian cell line, but was clearly an efficacious inverse agonist in the Sf9 cells. Other ligands assayed in both Sf9

and NIH-3T3 cells (ketanserin, spiperone, mesulergine, mianserin, and metergoline) inhibited spontaneous 5-HT_{2C} receptor activity in both systems. The reason for the apparent discrepancy in methysergide activity in the two cell lines is unclear.

There is increasing evidence that inverse agonism is a general phenomenon at G protein-coupled receptors. In addition to the 5-HT_{2C} receptor, the inhibition of spontaneous activity has been observed with recombinant β_2 -adrenergic (8), α_2 -adrenergic (11) and D₁ dopaminergic (9) receptors expressed from cloned cDNAs in cultured cell lines, the δ opioid receptor NG108 cells (13) and the M₂ muscarinic (12), and B₂ bradykinin (10) receptors in tissue-derived receptor preparations. In these reports, most of the antagonists studied appear to negatively regulate the activity of the receptor, with relatively few being devoid of intrinsic activity (i. e. , “neutral” ligands). The results of these studies support the general view that G protein-coupled receptors can assume inactive and active states, with the net effect of a given ligand being determined by its relative binding preference for the available states of the receptor.

A major finding of the present study is the demonstration that treatment of intact Sf9 cells or membranes containing the baculovirus-expressed 5-HT_{2C} receptor with serotonergic antagonists, followed by removal of the drug by extensive washing, resulted in a loss of binding capacity for both the antagonist [³H]mesulergine and the agonist [³H]5-HT. Several observations strongly suggest that this action of antagonists in Sf9 cells is related to the ability of these drugs to decrease the level of 5-HT_{2C} receptors in various brain regions following chronic administration *in vivo* (25-31). There was a striking correspondence between the relative abilities of antagonists to promote such “atypical downregulation” of 5-HT_{2C} receptors *in vivo*, and the potencies of the same antagonists in decreasing [³H]mesulergine binding to the baculovirus-expressed 5-HT_{2C} receptor. While quantitative comparisons are complicated by the nature of *in vivo* experiments (variations in treatment regimens in different studies, lack of knowledge on drug concentrations in tissues), the ligands exhibiting the highest potencies in reducing sites in

Sf9 cell membranes (metergoline, ritanserin and mesulergine) were the same ones which produced the greatest decrease in 5-HT_{2C} receptor levels following *in vivo* treatments (25). Similarly, antagonists such as mianserin, ketaserin and clozapine, which produced a lesser but demonstrable effect on receptor levels *in vivo* (25-28), showed intermediate potencies on the baculovirus-expressed receptor, while spiperone seems to be without effect on receptor levels in either system (25).

Another common feature of the antagonist effect on 5-HT_{2C} receptor levels *in vivo* and in Sf9 cells was the apparent dose-dependence of this action. This was clearly evident for the baculovirus-expressed receptor in membranes in the present study, and has been reported for the effect of clozapine on 5-HT_{2C} receptor numbers in choroid plexus following chronic treatment of rats (26). Finally, results from *in vivo* studies indicate that the reduction in 5-HT_{2C} receptor number by antagonist treatment is irreversible, the recovery of sites following cessation of treatment requiring synthesis of new receptors. Experiments performed with metergoline in the present study failed to detect recovery of lost binding sites in membranes or intact cells up to 24 hr after removal of the antagonist, consistent with an irreversible loss of receptor binding capacity.

One obvious difference in the action of antagonists in reducing the numbers of 5-HT_{2C} receptors *in vivo* and in Sf9 cells was the time course of this effect. For the most potent antagonists, the maximal effect in membranes from Sf9 cells (ca. 90 % loss of sites) was reached within 1 hour of treatment; similar decreases were observed following 24 hr treatment of intact Sf9 cells (the only time point examined in this study). In contrast, the same drugs generally required several days of repeated administration to produce comparable effects in brain regions (25, 26, 28, 29) or in primary cultures of choroid plexus (6, 30). One possible interpretation of this difference is that the ability of antagonists to promote loss of binding capacity of the 5-HT_{2C} receptor depends on the cellular context. The observation that NIH-3T3 cells expressing the cloned 5-HT_{2C} receptor do not show reduced receptor numbers following prolonged antagonist

treatments (6) tends to support this view. The rapid time course for antagonist-promoted receptor loss of the 5-HT_{2C} receptor in Sf9 cells observed in the present study, and the fact that this process could be reproduced in membrane preparations, indicate that the baculovirus-Sf9 insect cell system is particularly permissive for this action of antagonists. Whether this is due to the high levels of receptor expression in this system, the presence or absence of other proteins regulating this process, or to physicochemical properties of the insect cell membrane bilayer, remains to be determined. The striking parallels observed between the action of antagonists in reducing 5-HT_{2C} receptor numbers *in vivo* and in Sf9 cells, however, strongly suggest that the two phenomena reflect the same underlying process.

The biochemical mechanism leading to the reduction in receptor numbers following antagonist treatments are obscure. Studies of the *in vivo* effect, including quantification of residual antagonist in brain tissue (26) and measurement of radioligand affinity following “downregulation” (25, 26, 28, 29), suggested that the reduction in binding sites was not due to occupation of receptors by residual drug. This possible artifact clearly can be ruled out for the effect of antagonists in Sf9 cell membranes, since: 1) the apparent dissociation constant for [³H]mesulergine was not increased following treatments with three different antagonists which produced significant reductions in the number of binding sites (up to 90 % for metergoline); and 2) the loss of binding sites produced by treatment with isotopically-diluted [³H]mesulergine persisted following removal of 95 % of the bound [³H]mesulergine, as quantified in dissociation experiments. The results thus support the view that the loss of binding sites reflects a decrease in receptor number in response to antagonist treatment, rather than continued occupation of the receptor by drug. The present findings are also consistent with previous studies, using primary cultures of choroid plexus epithelial cells, which demonstrated that antagonists exert this effect through a direct action on receptor-expressing cells, and that loss of binding sites does not involve changes in receptor mRNA levels (6).

It was proposed recently (6), that the ability of antagonists to decrease 5-HT_{2C} receptor number was directly correlated with their inverse agonist activities. This suggestion was based on studies showing that mianserin, an inverse agonist at the 5-HT_{2C} receptor in NIH-3T3 cells, promoted loss of binding sites in cultured choroid plexus cells, whereas bromo-LSD, a neutral antagonist in NIH-3T3 cells, had no effect on receptor numbers in choroid plexus. Unfortunately, that study did not permit direct comparison of antagonist actions on the 5-HT_{2C} receptor in the same cellular system, since choroid plexus did not exhibit antagonist-inhibited spontaneous receptor activity, and NIH-3T3 cells did not show antagonist-induced "downregulation" of the 5-HT_{2C} receptor. The inability to detect the two effects of antagonists in the same model system could indicate that they occur through distinct mechanisms.

The results of the present study, in which antagonist potencies for inhibition of spontaneous receptor activity and loss of binding capacity were directly compared for the baculovirus-expressed 5-HT_{2C} receptor, suggest that the two effects may reflect distinct actions of antagonists. While most of the antagonists tested were able to elicit both types of response, the rank orders of potency were clearly different for the two effects, with certain antagonists showing a high degree of selectivity for one or the other action (see Table 3). Furthermore, while inverse agonist activity was directly correlated with receptor occupancy (Fig. 4), this did not appear to be the case for the decrease in receptor numbers produced by antagonist treatments. As shown in Table 3, treatment of 5-HT_{2C} receptor-containing membranes with antagonists at concentrations ten times their respective binding affinities (sufficient to occupy over 90 % of the available sites at equilibrium) produced decreases in [³H]mesulergine binding ranging from no effect (methysergide, mianserin and spiperone) to the loss of approximately 80 % of binding sites (metergoline). The results suggest that the antagonists differs with respect to their propensities to reduce receptor number.

The action of serotonergic antagonists in reducing the numbers of 5-HT_{2C} receptors shows similarities with the better-characterized phenomenon of agonist-induced receptor downregulation. In the case of the β_2 -adrenergic receptor, continued exposure to high concentrations of agonist results in a reduction in the number of receptors through a process believed to involve internalization of agonist-receptor complexes and subsequent proteolysis in lysosomes (see 34 for review). While it is difficult to conceive that such a process could be occurring in Sf9 cell membrane preparations containing the 5-HT_{2C} receptor, a recent study (35) has provided evidence that internalization of the β_2 -adrenergic receptor may involve an initial agonist-induced rearrangement of receptors at the cell surface. Whether the action of antagonists on the 5-HT_{2C} receptor observed in the present study reflects such a pre-internalization event is an intriguing question for further work.

The present findings underline important questions regarding the mechanism of action of antagonists as therapeutic agents. According to the "classical" view, antagonists act by blocking the stimulatory effect of the endogenous transmitter, but have no direct actions themselves. The growing literature on inverse agonism at G protein-coupled receptors raises the possibility that antagonists may exert effects through inhibition of spontaneous receptor activity. The relative contribution of this mode of action *in vivo* will obviously depend on the occurrence of spontaneously active receptors. While such spontaneous activity has been detected in tissue preparations (10, 12) and is likely to be of significance in the case of receptor mutants showing constitutive activity (36), further studies are required to establish the potential therapeutic relevance of inverse agonism. The ability of antagonists to promote a reduction in receptor number, as characterized in the present study for the 5-HT_{2C} receptor, would appear to represent a third mechanism of antagonist action. "Atypical downregulation" by antagonists has been described for both the 5-HT_{2C} and 5-HT_{2A} receptors, and numerous authors have proposed that this effect of antagonists may underlie the therapeutic effects of certain antipsychotic and antidepressant drugs (see 4, 5 for review). The list of antagonists found to promote loss of binding for the

baculovirus-expressed 5-HT_{2C} receptor in the present study includes drugs in current therapeutic use, namely the antipsychotic clozapine and the antidepressant mianserin. It will be interesting to determine whether other G protein-coupled receptors, such as the 5-HT_{2A} receptor, show similar antagonist profiles when expressed in insect cells. It is tempting to speculate that the activity profiles of receptor antagonists on baculovirus-expressed receptors, particularly the selectivity for inverse agonism vs. receptor “downregulation”, could provide a useful index for ranking the therapeutic potential of new drug candidates.

TABLE I. Pharmacology of 5-HT_{2C} receptor expressed in Sf9 cells.

Results are expressed as mean \pm SE for at least 3 experiments and maximal activity represent the % of IPs inhibition induced (from Fig 3). Antagonist binding affinity were measured in membranes expressing 5-HT_{2C} receptors (48 hr postinfection) whereas IPs responses activity were measured in whole cells (38 hr postinfection) as described in methods.

Antagonists	Binding parameters		IPs responses	
	(-)pKi	(-)pEC ₅₀	hill coefficient	Maximal activity % inhibition
Metergoline	9.22 \pm 0.10	8.81 \pm 0.20	0.7 \pm 0.2	26.3 \pm 3.5
Methysergide	9.12 \pm 0.05	7.95 \pm 0.36	0.9 \pm 0.2	21.1 \pm 4.0
Ritanserin	8.89 \pm 0.10	7.75 \pm 0.36	0.8 \pm 0.2	23.4 \pm 4.3
Mianserin	8.63 \pm 0.05	7.45 \pm 0.24	0.9 \pm 0.2	32.2 \pm 2.6
Mesulergine	8.70 \pm 0.05	7.35 \pm 0.46	0.5 \pm 0.2	17.6 \pm 3.6
Ketanserin	7.69 \pm 0.02	6.70 \pm 0.21	1.2 \pm 0.4	16.0 \pm 3.6
Clozapine	7.62 \pm 0.20	6.76 \pm 0.36	1.0 \pm 0.1	20.0 \pm 2.0
Spiperone	5.92 \pm 0.10	5.08 \pm 0.41	1.2 \pm 0.3	20.0 \pm 2.7
spiroxatrine**	5.17 \pm 0.08	5.04 \pm 0.99		-2.0 \pm 2.0

** Spiroxatrine does not induce an effect on PI turnover (Fig. 3.), but compete with 5-HT activation, (-)pIC₅₀ = 5.04 (Fig. 5.).

TABLE II. Apparent loss of binding sites induced by antagonists of 5-HT_{2C} receptors expressed in Sf9 cells.

Residual binding sites were estimated in membranes (from 48 hr post-infected cells) pre-treated for 60 min with drugs at different concentration and extensively washed prior to the binding analysis as described in methods. Non specific binding was determined with 10 μM mianserin competition binding. Antagonist potency (EC₅₀ ± SE) for inducing apparent loss of site were reported from Fig. 7.

Apparent loss of [³ H]mesulergine binding sites			
Antagonists	(-)pEC ₅₀	**Effect at 10X Ki	*Selectivity ratio
Metergoline	10.25 ± 0.12	79 ± 7	0.036
Methysergide	> 3	0	> 1E6
Ritanserin	8.42 ± 0.16	49 ± 15	0.32
Mianserin	5.60 ± 0.15	0	72.6
Mesulergine	7.98 ± 0.09	38 ± 7	0.23
Ketanserin	4.45 ± 0.07	2 ± 5	176
Clozapine	6.05 ± 0.16	10 ± 7	5.1
Spiperone	nd	0	> 1E6
Spiroxatrine	4.64 ± 0.03	35 ± 5	< 1E-5

*Relative selectivity: (EC₅₀ loss of binding / EC₅₀ inverse agonism (Table I)). Values < 1 = Selective for site depletion, values > 1 = selective for inverse agonism. **The loss of [³H]mesulergine binding from antagonists occupancy at 10X Ki were extrapolated from Fig. 7.

TABLE III. Receptor affinity for [³H]mesulergine after apparent loss of sites for 5-HT_{2C} receptors expressed in Sf9 cells.

Mesulergine binding affinity (Kd) and binding density (Bmax) were measured on membranes (from 48 hr post-infected cells) pre-incubated for 60 min with drugs and extensively washed prior to the saturation binding analysis as described in methods. Results from antagonists treatment of membranes were determined from 3 independent experiments with mean values and SEM calculated from separate estimates fitted with Ligand program.

[³H]mesulergine binding parameters

Drug treatments	*Kd nM	**Bmax pmol/mg	% control
Control	2.1 ± 1.2	22.0 ± 2.0	100 ± 9
mianserin (1µM)	3.8 ± 2.2	14.5 ± 2.0	66 ± 9
Metergoline (10nM)	2.0 ± 0.6	2.9 ± 1.1	12 ± 6
ritanserin (10nM)	7.6 ± 3.0	5.55 ± 3.0	25 ± 12

ANOVA test was performed on Kd estimates for control and drug treated membranes ($\alpha = 0.001$, $P = 0.012$)
 ANOVA test was performed on Bmax estimates rejected null hypothesis ($\alpha = 0.001$, $P < 0.001$). One tail
 Dunnett's test ($H_0: \mu_{\text{control}} > \mu_{\text{drug}}$, $\alpha = 0.05$) was used to compare drug Bmax with control.

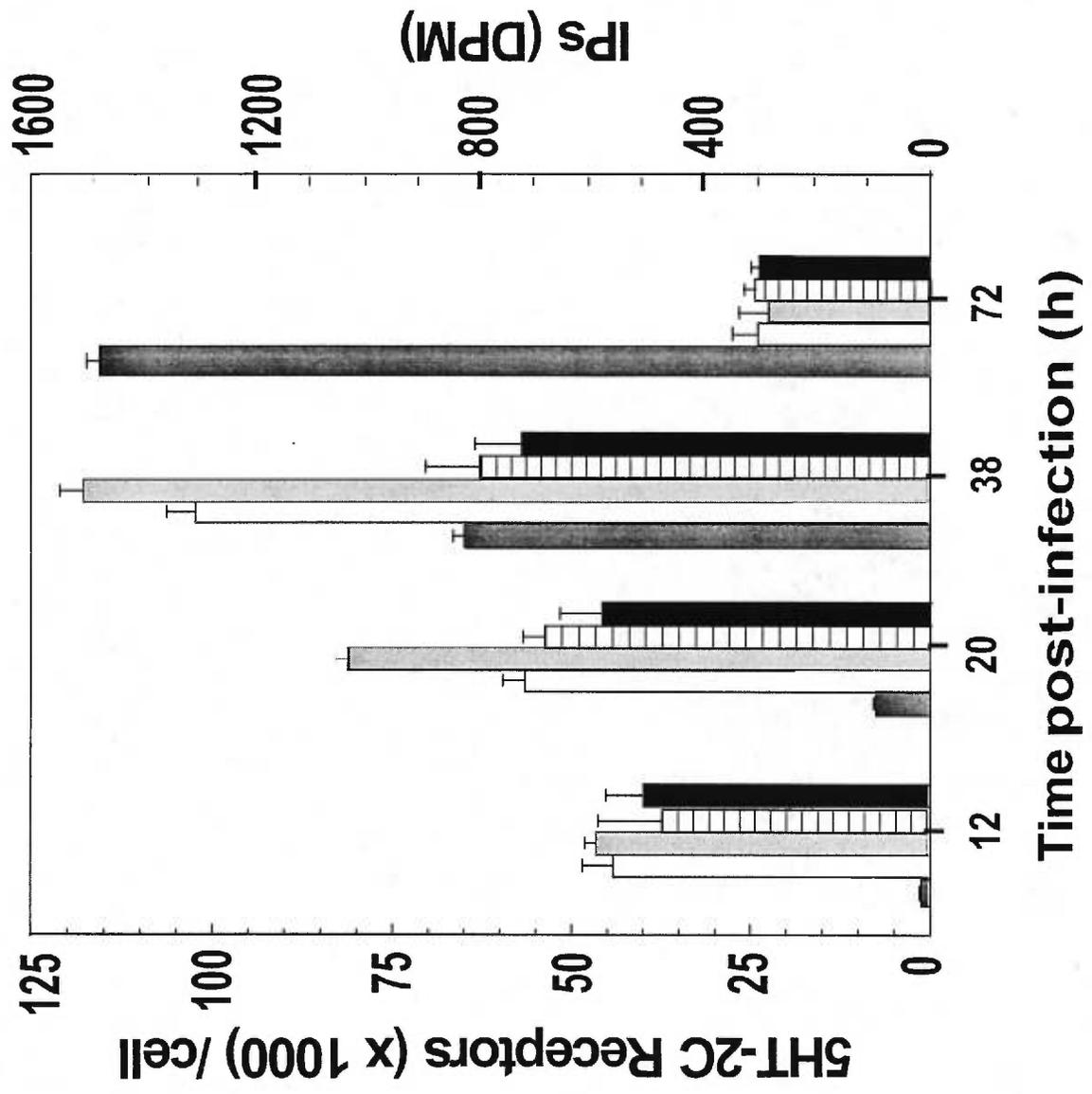


Fig. 1. Functional coupling of the rat 5HT_{2C} receptor to endogenous Sf9 cells phospholipase C. [³H]myo-inositol labeled Sf9 cells (1 μCi/ml) were infected with baculovirus encoding the 5HT-2C receptor. IPs release and [³H]mesulergine binding were measured in whole cells at 12 hr, 20 hr, 38 hr and 72 hr post-infection. IPs levels were measured in cells that were incubated 20 min in media (Sf-900II/20 mM LiCl), without the addition of drugs (*open bars*), with 1 μM 5HT (*gray bars*), with both 1 μM 5HT and 10 μM mianserin (*hatched bars*), or with 10 μM mianserin alone (*black bars*). Receptor density per cell was measured (*speckled bars*): 4.6x10²±100 receptors/cells, 7.4x10³±339, 6.5x10⁴±1785, 11.5x10⁴±1800 at respectively, 12 hr, 20 hr, 38 hr and 72 hr post-infection. In cells infected with wild type virus, IPs levels were not affected by serotonergic drugs and no specific [³H]mesulergine binding was detected.

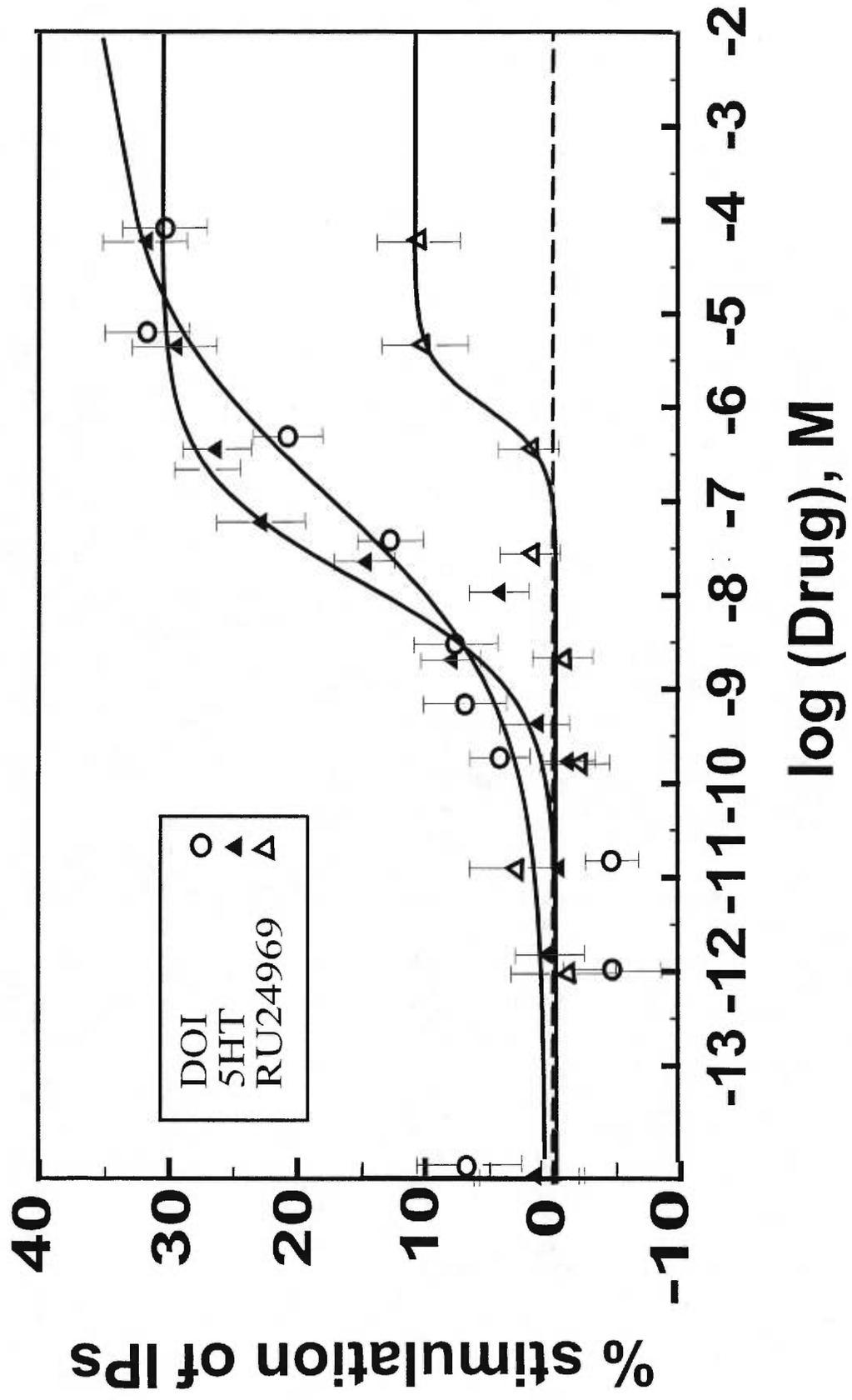


Fig. 2. Effects of serotonergic agonists on IP_s release in 5HT_{2C} receptor-expressing Sf9 cells. [³H]myo-inositol labeled Sf9 cells (1 μCi/ml) were infected with baculovirus encoding the 5HT_{2C} receptor and IP_s levels were measured in whole cells at the agonist concentrations indicated on the abscissa. Data represent averaged values for % of IP_s level, with basal levels taken as 100%, for the following drugs: DOI. (□), 5HT (♦) and RU24959 (✕). Curves were fitted and generated by INPLOT as described in methods. The EC₅₀ estimates and corresponding slope factor (Hill coefficient) were: 5HT; 0.02 μM (1.2), DOI; 0.1 μM (0.7), and RU24959; 1.3 μM (1.3).

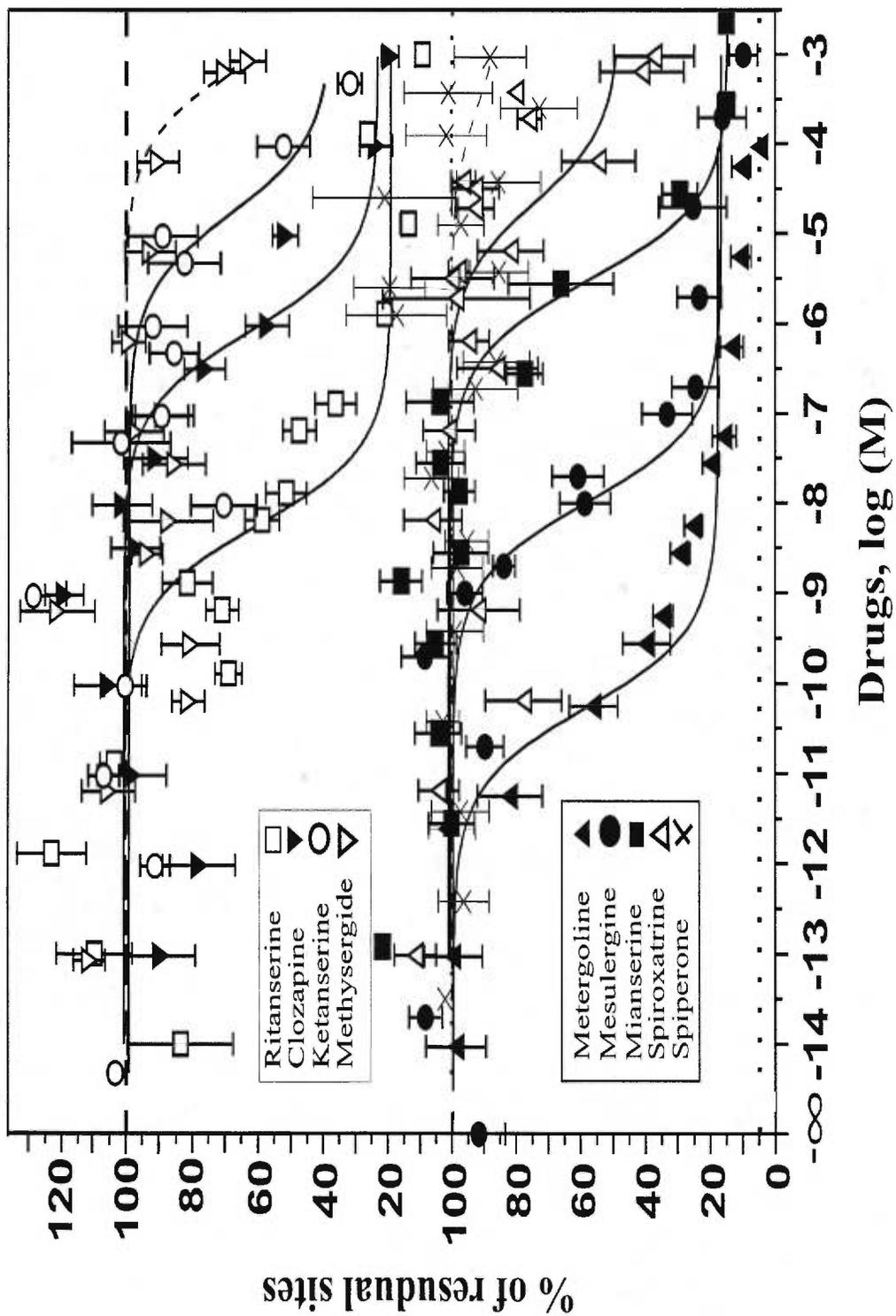


Fig. 3. Effects of serotonergic antagonists on IPs release in 5HT_{2C} receptor-expressing Sf9 cells. Sf9 cells labeled with myo-[³H]inositol were infected for 38 hr by 5HT_{2C} baculovirus and IPs in whole cells in the presence of various serotonergic antagonists. Data are representative of three independent assays and basal levels of IPs release were taken as 100%. The point shown represent the averaged scale data. Upper panel: Spiperone (■), ketanserin (●), clozapine (□), methysergide (♦), metergoline (●). Lower panel: Mesulergine (●), ritanserin (■), mianserin (♦), spiroxatrine (●). EC₅₀ estimates are reported in Table I with the corresponding slope factor (Hill coefficient). Spiroxatrine had no effect on basal IPs levels at 20h, 38h or 48h post infection (not shown).

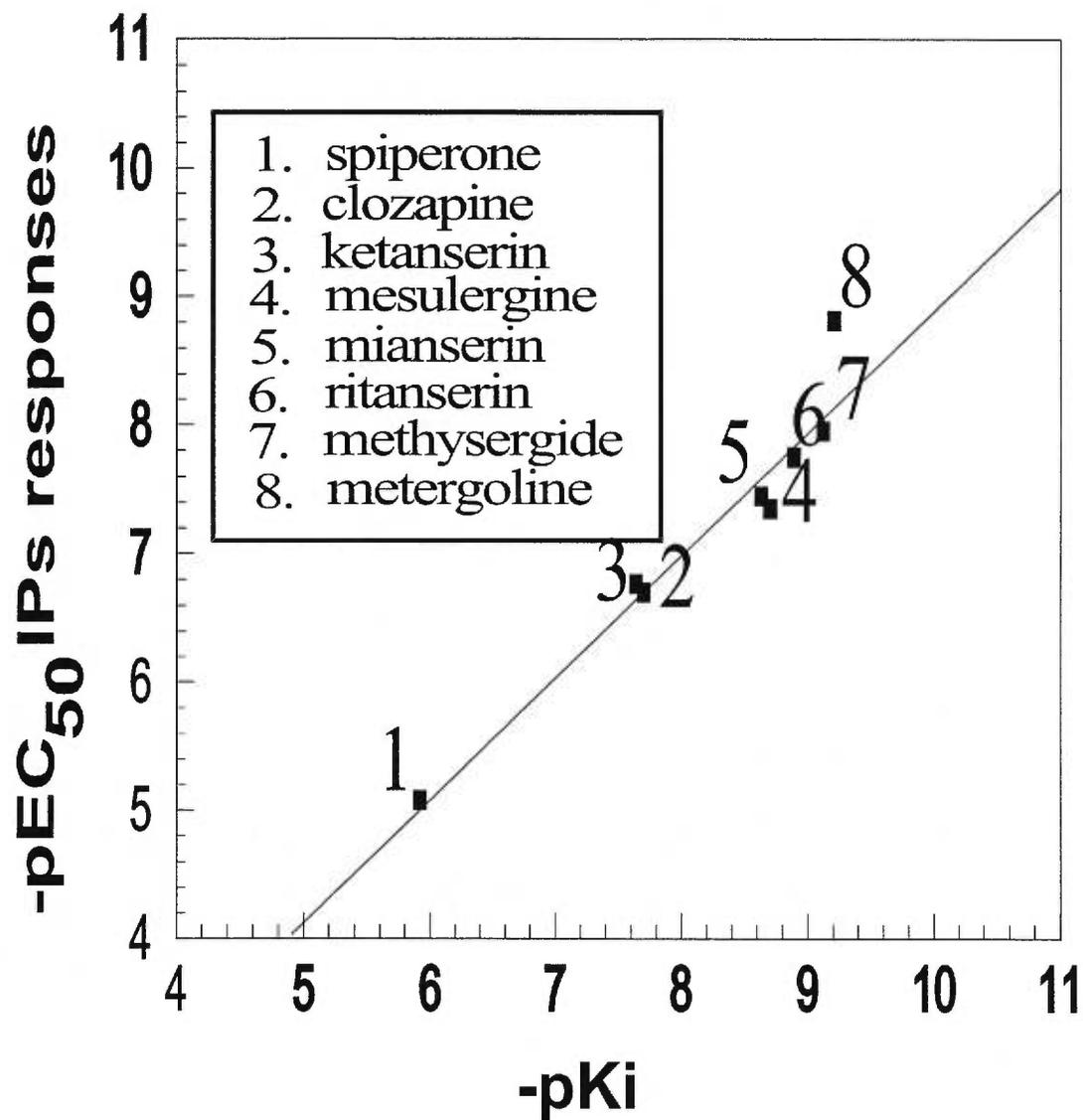
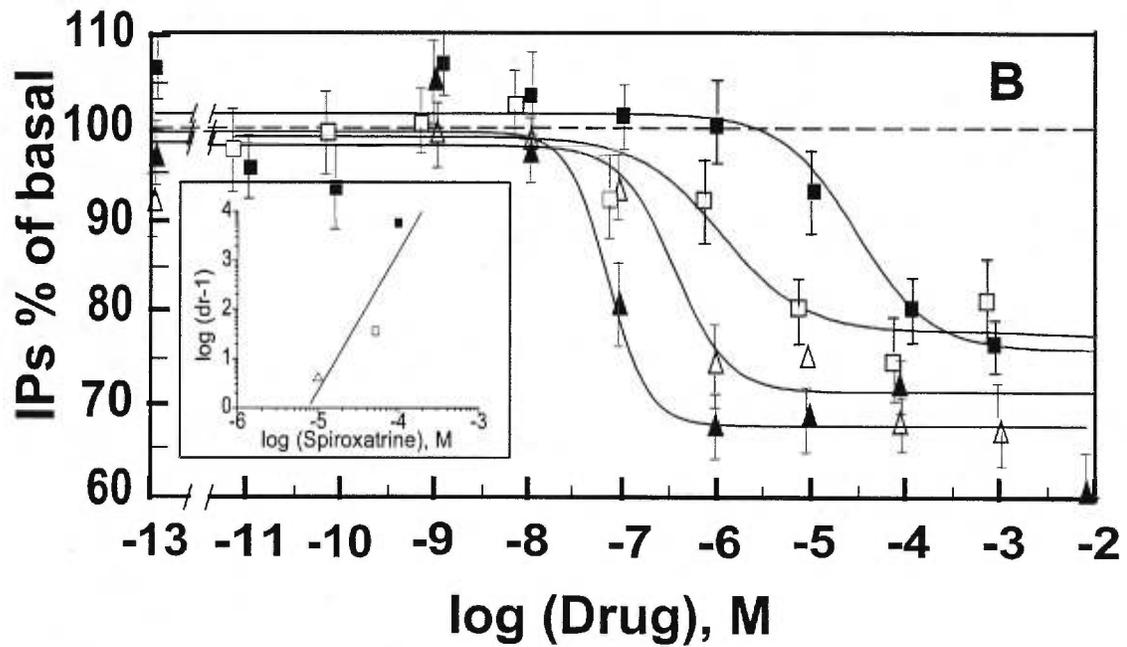
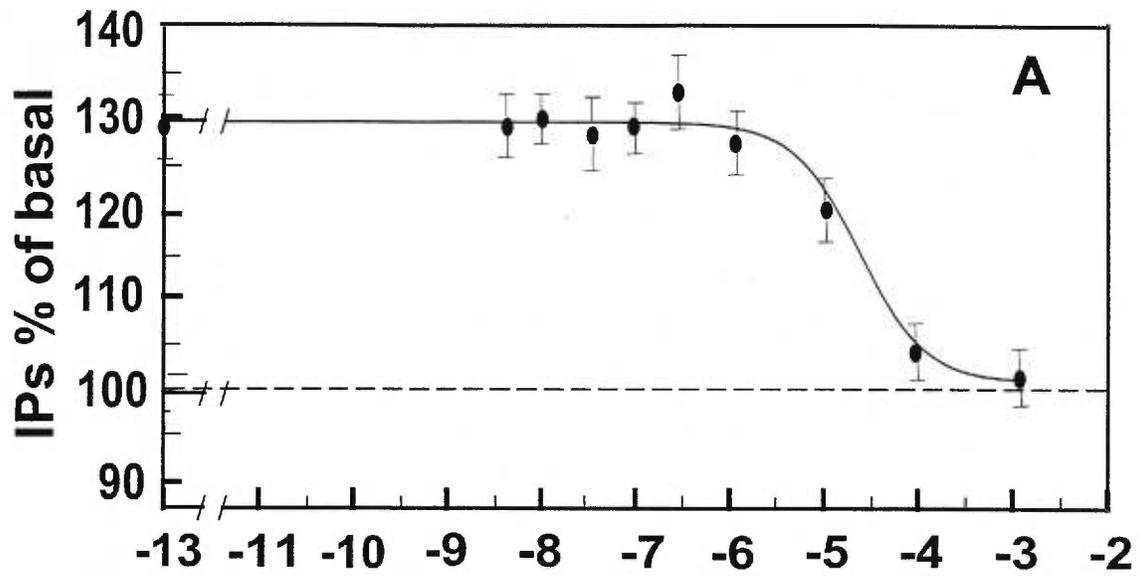


Fig.4. Correlation of inverse agonists potency vs. binding affinity in Sf9 system. A linear regression was performed between binding affinity values (pKi) and inhibitory potency (pEC₅₀). Inverse agonists (1) spiperone, 2) clozapine, 3) ketanserin, 4) mesulergine, 5) mianserin, 6) methysergide, 7) metergoline). displayed a correlation between receptor affinity (pKi) and their potency to inhibit spontaneous receptor activation ($r^2 = 0.93$ slope = 0.96 $p < 0.0001$). Spiroxitrine was not included in the linear regression because it lacked inverse agonist activity in Sf9 cells.



Drug (1E - 4 M)

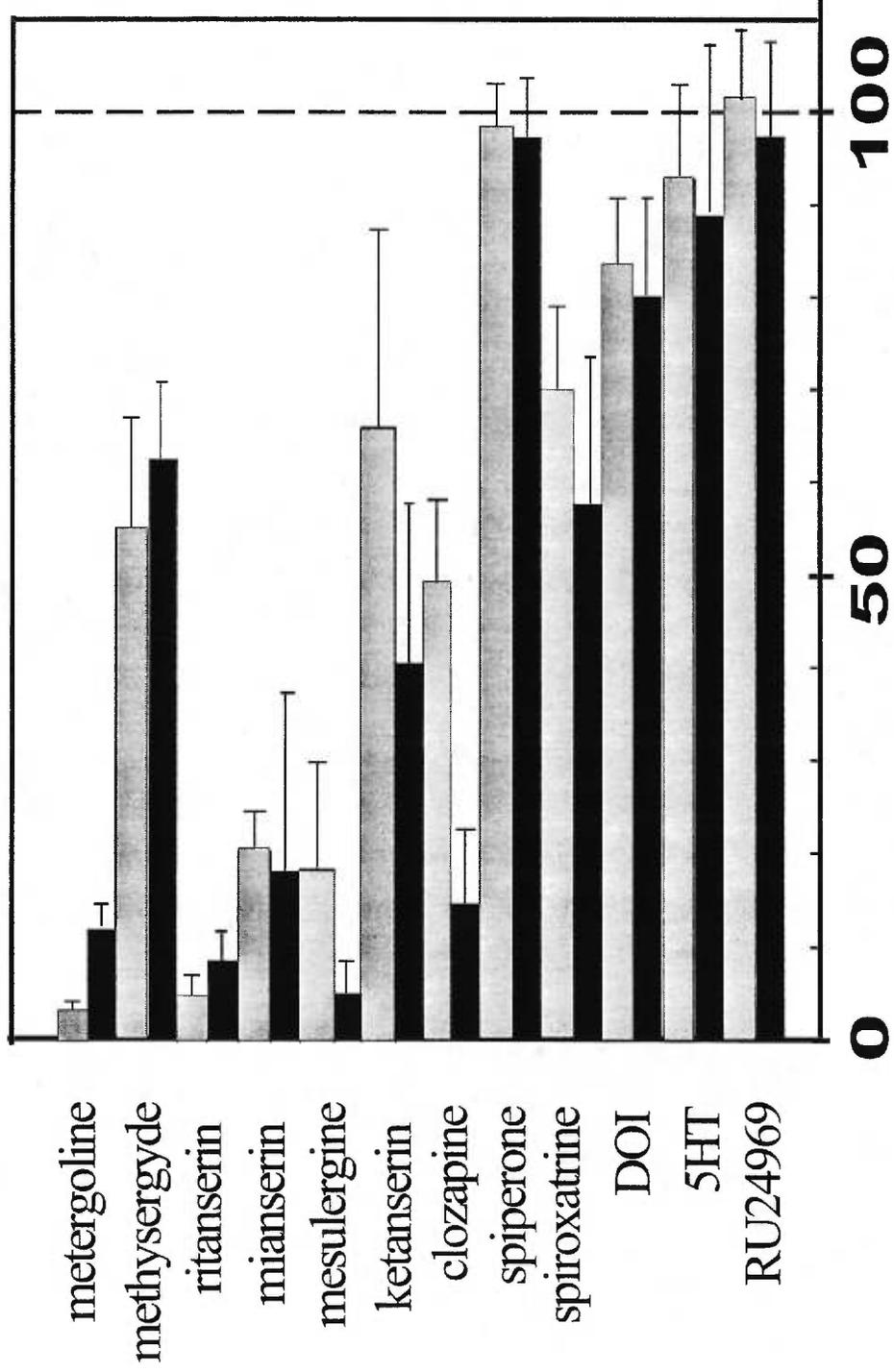


Fig.6. Apparent loss of [³H]mesulergine binding following antagonists pre-treatment in whole cells and membranes. Sf9 cells infected for 38hr with 5HT_{2C} virus, were treated with the ligands indicated up to 48 hr post infection (12 h treatment) at 100 μM. After this treatment, cells were washed extensively (see methods) and [³H]mesulergine binding was measured (*gray bars*). In similar experiments, membranes from untreated 5HT_{2C}-expressing Sf9 cells (48h post-infection) were treated with drugs (100 μM) for 1h in binding buffer as described in methods, followed by extensive washing and [³H]mesulergine binding (10 nM) (*black bars*). Results represent average of the scaled values (±SEM) for three independent experiments. Data and the point shown were scaled taking the level of [³H]mesulergine binding in the control samples as 100%.

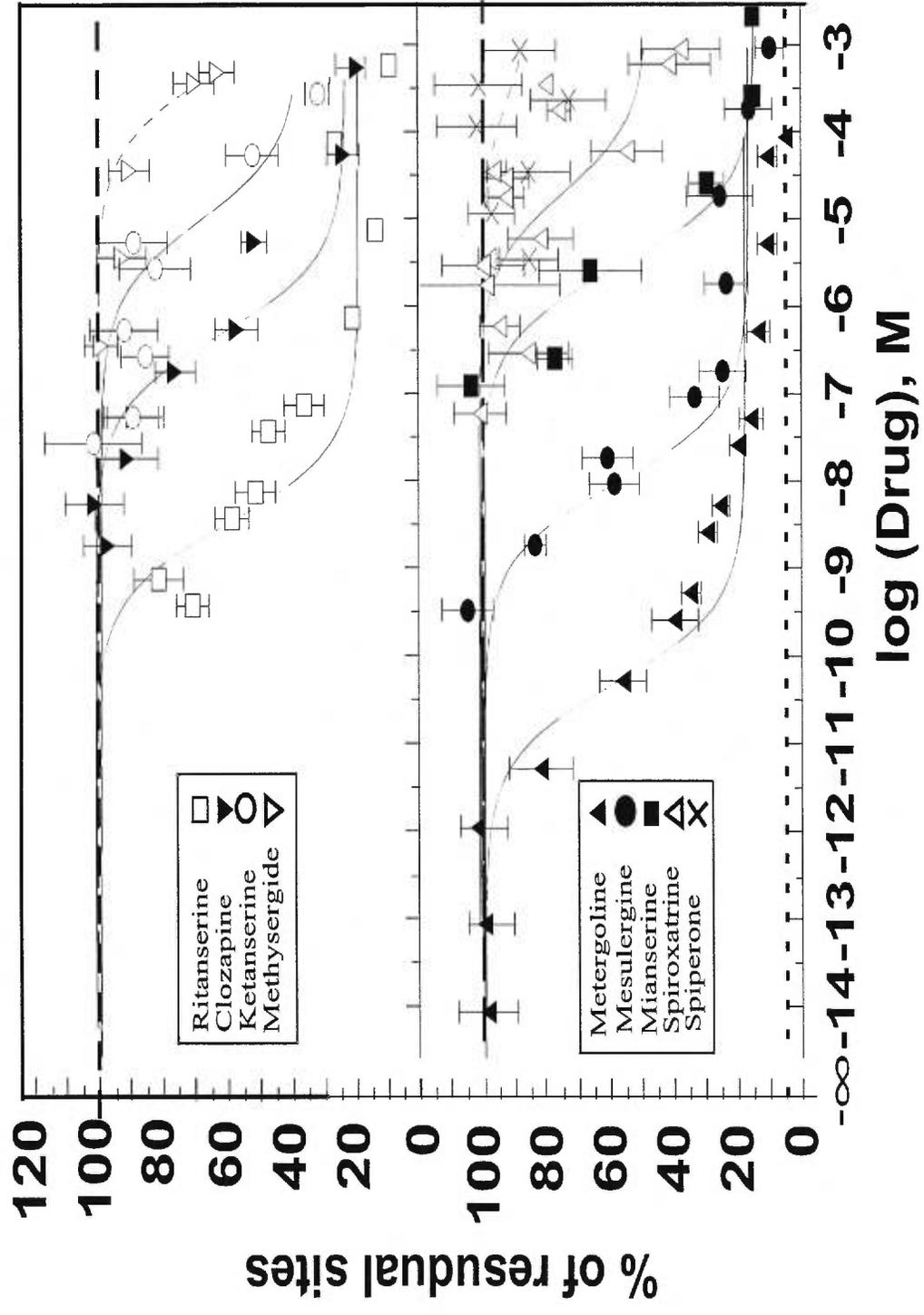


Fig.7. **Effects of serotonergic antagonists on apparent loss of [³H]mesulergine binding site in 5HT_{2C}-receptor-containing SF9 membranes following antagonist pre-treatment.** Membranes prepared from SF9 cells infected for 48 hr where treated with 5HT_{2C} antagonists for 1 hr before an extensive dissociation protocol as described in methods. Treated and control membranes were washed extensively in parallel and then incubated with [³H]mesulergine (10 nM) to determine the relative residual binding after drug treatment. Upper panel: ritanserin (●), clozapine (◆), ketanserin (□), methysergide (▽). Lower panel: metergoline (♦), mesulergine (●), mianserin (■), spiroxatrine (⌘), spiperone(⊞). For each ligand, data from three independent experiments were analyzed simultaneously assuming a common values for EC₅₀ (see table II), with Y_x⊞ and Y_x⊞⊞ unconstrained. The curves and averaged points (n = 3) shown were derived from a representative experiment obtained on the same day with all drugs tested in parallel on the same membranes. Values from the representative set of data were scaled taking the fitted values of Y_{x-o} as 100 %, and the point shown represents the averages of the scaled data (± SEM). Each curve was generated using the fitted values of EC₅₀, with Y_x⊞ set to 100% and Y_x⊞⊞ set to the average of [((Y_x⊞⊞ / Y_x⊞) * 100%)]. For clarity, points corresponding to concentration < (EC₅₀/1000) were omitted from the figure. Values for EC₅₀ are reported in Table II.

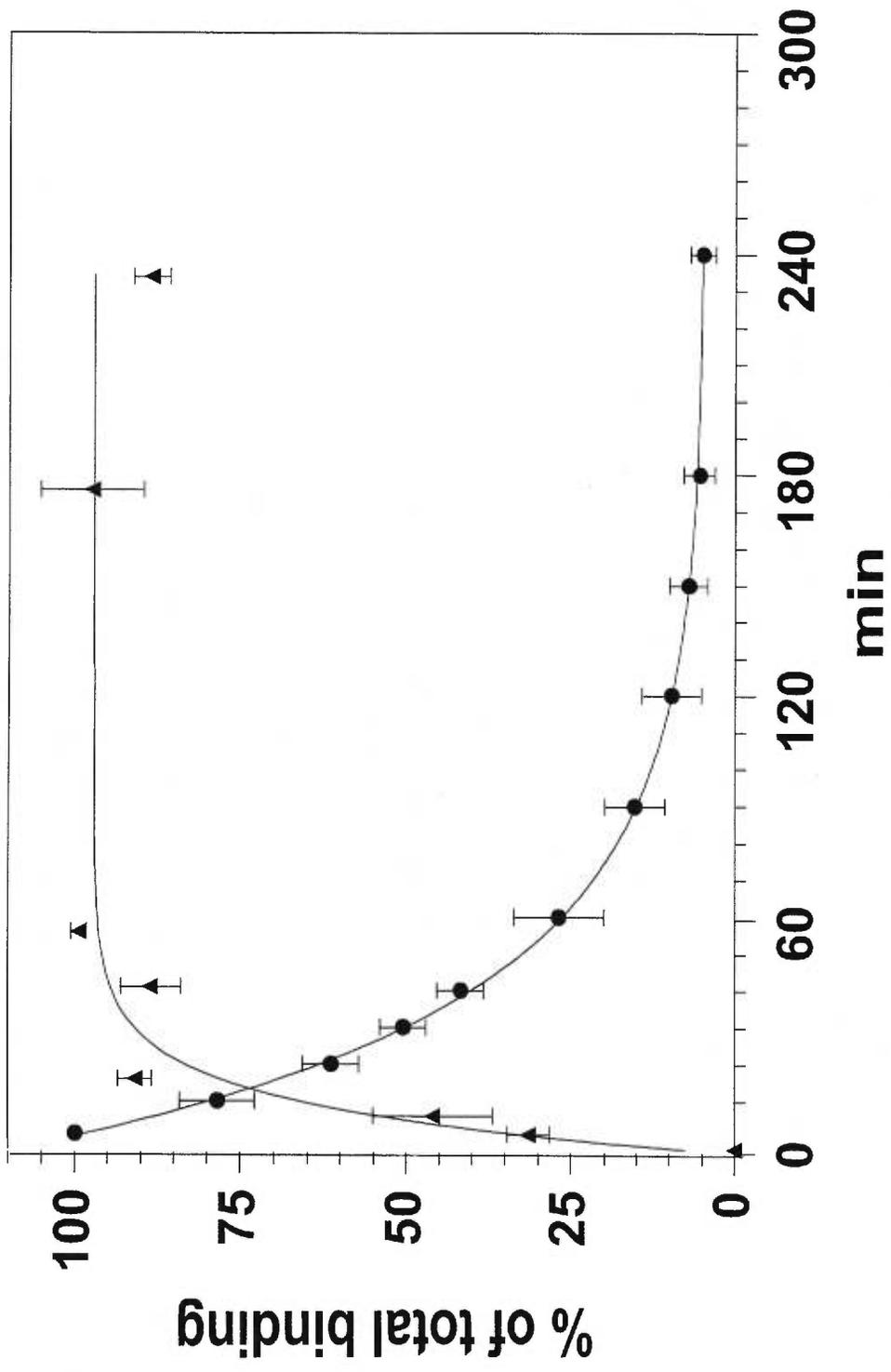


Fig.8. Time-dependence of [³H]mesulergine binding in 5HT_{2C} SF9 membranes Binding of [³H]mesulergine membranes from SF9 cells infected for 48 hr with 5HT_{2C} baculovirus (B_{max} = 27 pmol) was measured at the time indicated (♦). Dissociation of labeled mesulergine (following a 2hr incubation at 500 nM [³H]mesulergine isotopically diluted to 8 Ci/mM) was measured at different time point after a quick centrifugation and 10000 fold dilution in binding buffer as described in methods. Data from three independent experiments were averaged and expressed as % of total binding with error bars representing SEM. The averaged data were fitted adequately by assuming a one phase exponential decay (●) or association (♦). Pseudo-first-order kinetics were observed at 27°C for both [³H]mesulergine association (20 nM t_{1/2} = 10 min) and dissociation (500 nM, t_{1/2} = 40 min). Following the 2h dissociation, membranes treated with labeled 500 nM [³H]mesulergine failed to bind in a second incubation with 10 nM [³H]mesulergine (80 Ci/mM) (not shown). Control dilution of untreated membranes made in parallel did not affected their ligand binding capacity (data not shown.).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Biotechnology Research Institute of Montreal and Allelix Biopharmaceuticals for the use of the recombinant 5-HT_{2C} virus construct, Edith Hamel for providing antagonists and for helpful discussions, Roussel Uclaf for the RU24969, Anne Labonté for technical support in serum-free cell culture and André Deléan for providing helpful discussion and the program ALLFIT.

REFERENCES:

1. Lubbert, HR. , B. J. Hoffman, T. P. Snutch, T. VanDyke, A. J. Levine, P. R. Hartig, HR. A. Lester, and N. Davidson. cDNA cloning of a serotonin 5-HT_{1C} receptor by electrophysiological assays of mRNA-injected in *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**:4322-4336 (1987).
2. Humphrey, P. P. A. P. Hartig,, and D. Hoyer. A proposed new nomenclature for 5-HT receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* Receptor Supplement **14**: 233-236 (1993).
3. Julius, D. , A. B. MacDermott, R. Axel and T. M. Jessel. Molecular characterization of functional cDNA encoding the serotonin 1c receptor. *Science* **241**:558-564 (1988).
4. Meltzer, H. Y. , and J. F. Nash. Effects of Antipsychotic Drugs on Serotonin Receptors. *Pharmacol. Rev.* **43**-4, 588-600 (1991).
5. Coward, D. M. The Pharmacology of Clozapine-like Atypical Antipsychotics, Antipsychotic Drugs and their Side -effect. Academic Press inc. San Diego USA, 28-44 (1993).
6. Barker, E. L. , R. S. Westphal, D. Schmidt, and E. Sanders-Bush. Constitutively active 5-hydroxytryptamine 2C receptors reveal novel inverse agonist activity of receptor ligands. *J. Biol. Chem.* **269**:11887-11890 (1994).
7. Westphal, R. S. , and E. Sanders-Bush. Reciprocal binding properties of 5-hydroxytryptamine type 2C receptor agonist and inverse agonists. *Mol. Pharm.* **46**:937-942 (1994).
8. Chidiac, P. , T. E. Herbert, M. Valiquette, M. Dennis and M. Bouvier. Inverse agonist activity of β -adrenergic antagonists. *Mol. Pharm.* **45**:490-499 (1994).
9. Tiberi, M. , and M. C. Caron. High agonist-independent activity is a distinguishing feature of the dopamine D1B receptor subtype. *J. Biol Chem.* **269**:27925-27931 (1994).
10. Leeb-Lundberg, L. M. F, S. Mathis and M. C. S. Herzig. Antagonists of bradykinin that stabilize a G-protein-uncoupled state of the B2 receptor act as inverse agonist in rat myometrial cells. *J. Biol. Chem.* **269**:25970-25973 (1994).
11. Tian, W-N. , E. Duzic, S. M. Lanier and R. C. Deth. Determinants of α 2-adrenergic receptor activation of G proteins: evidence for a precoupled receptor/ G protein state. *Mol. Pharm.* **45**:524-531 (1993).

12. Hilf, G. , and K. H. , Jakobs. Agonist-independent inhibition of G protein activation by muscarinic acetylcholine receptor antagonists in cardiac membranes. *Eur. J. Pharmacol.* **225**:245-252 (1992).
13. Costa, T. and A. Herz. Antagonists with negative intrinsic activity at δ opioid receptors coupled to GTP-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**:7321-7325 (1989).
14. Labrecque J. M. Dennis and A. Fargin. Inverse efficacy of serotonergic antagonists at the 5-HT-2C receptor expressed in Sf9 cells. Abstract published in: *Can. J. Phys. Pharmacol.* **72**:546 (1994).
15. O'Reilly, D. R. , L. K Miller, and V. A. Luckow. Baculovirus Expression Vectors: a laboratory manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992).
16. Labrecque, J. , M. Caron, K Torossian, J Plamondon, and M Dennis. Baculovirus expression of human G proteins subunits. *FEBS letters.* **304**:157-162 (1992).
17. Schaffner, W. and C. Weissmann. A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution. *Analytic. Biochem.* **56**:502-51 (1973).
18. Fargin, A. , J. R. Raymond, J. W. Regan, S. Cotecchia, R. J. Lefkowitz and M. G. Caron. Effector coupling mechanism of the cloned 5-HT-1A receptor. *J. Biol. Chem.* **264**:14848-14852 (1989).
19. Munson, P . J. and D. Rodbard, Ligand: A versatile computerized approach for characterization of ligand binding systems. *Analytic. Biochem.* **107**: 220-239 (1980).
20. Sanders-Bush, E. 5-HT receptors coupled to phosphoinositide hydrolysis. In: The serotonin receptors, ed. E. Sanders-Bush, pp 181-198, Humana Press, Clifton, N. J. (1988).
21. Zifa, E. and G. Fillion. 5-Hydroxytryptamine receptors. *Pharmacol. Rev.* **44**:430-433 (1992).
22. Roth. , B. L. , R. D. Ciaranello and H. Meltzer. Binding of typical and atypical antipsychotic agent to transiently expressed 5-HT-1c receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **260**: 1362-1365 (1991).

23. Leonhardt, S. , E. Gorospe, B. Hoffman and M. Teitler. Molecular pharmacological differences in the interaction of serotonin with 5-Hydroxytryptamine 1C and 5-Hydroxytryptamine 2 receptors. *Mol. Pharm.* **42**:328-335 (1992).
24. Arunlakshana, O. , and H. O. Schild. Some quantitative uses of drug antagonists. *Br. J. Pharmacol.* **14**:48-58 (1959).
25. Pranzatelli, M. R. , J. N. Murthy and P. T. Tailor. Novel regulation of 5-HT_{1C} receptor: down-regulation induced both by 5HT-1C/2 receptor agonists and antagonists. *Eur. J. Pharmacol.* **244**: 1-5 (1992).
26. Kuoppamäki, M. ,T. Seppälä, E. Sylvälähti and J. Hietala. Chronic Clozapine treatment decreases 5-hydroxytryptamine 1C receptor density in the rat choroïd plexus: Comparison with haloperidol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **264**: 1262-1267 (1992).
27. Roth, B. L. , M. W. Hamblin, R. Desai, and R. D. Ciaranello. Developmental and synaptic regulation of 5HT-2 and 5-HT_{1c} serotonin receptors. In Serotonin: Molecular biology, receptors and functional effects. ed. J. R. Fozard/P. R. Saxena , Birkhauser verlag, Basel, Switzerland 33-42 (1991).
28. Sanders-Bush, E. Adaptive regulation of central serotonin receptor linked to phosphoinositide hydrolysis. *Neuropsychopharm.* **3**:411-416 (1990).
29. Smith, R. L. , R. J. Barrett, and E. Sanders-Bush. Adaptation of brain 5HT₂ receptors after mianserin treatment: receptor sensitivity, not receptor binding, more accurately correlates with behavior. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **254**:484-488 (1990).
30. Sanders-Bush and E. M Breeding. Serotonin_{1c} receptor reserve in the choroid plexus mask receptor subsensitivity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **252**:984-988 (1989).
31. Sanders-Bush, E. and M. Breeding. Putative 5HT-2 antagonists block serotonin 5-HT-1C receptors in the Choroid plexus. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **247**:169-173 (1988).
32. Raming K. , J. Krieger, J. Strotmann, J. Boekhoff, S. Kubic, C. Baumstark and H. Breer. Cloning and expression of odorant receptors. *Nature.* **361**:353-356 (1993).
33. Hu Y. , L. Rajan, and W. P. Schilling. Ca²⁺ Signaling in Sf9 insect cells and the functional expression of a rat brain M5 muscarinic receptor. *Am. J. Physiol.* **266**:1736-1743 (1994).
34. Caron M. G. and R. J. Lefkowitz. Catecholamine receptors: structure, fonction, and regulation. *Recent Prog. Horm Res.* **48**:277-290 (1993).

35. von Zastrow, M. and B. K. Kobilka. Antagonist-dependent and independent steps in the mechanism of adrenergic receptor internalization. *J. Biol. Chem.* **269**:18448-18452 (1994).
36. Lefkowitz, R. J. G-proteins-coupled receptors. Turned on to ill effect. *Nature* **365**: 603-604 (1993).

FOOTNOTES

¹ **The abbreviations cited are:** G proteins, guanine nucleotide-binding regulatory proteins; IPs, total inositol phosphates; D. O. I, 2,5-Dimetoxy-4-iodoamphetamine hydrobromide; 5-HT, 5-hydroxytryptamine; EDTA, ethylenediaminetetracetic acid; TPCK, n-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone; PBS, phosphate buffered saline; M. O. I. , multiplicity of infection; AcNPV, *Autographia californica* nuclear polyhedrosis virus; Sf9, *S. frugiperda* pupal ovarian cells; Ki, drug affinity constant; EC₅₀, drug potency (*concentration producing 50 % of the maximal response*); IC₅₀, drug competitive potency (*concentration inhibiting 50 % of agonist activity*); pA₂, apparent affinity (*deduced from Schild analysis*).

2. 0. 2. 2 Deuxième article

Activité agoniste inverse, sous-régulation atypique et sensibilisation du couplage fonctionnel par les ligands sérotoninergiques.

Les prétraitements avec des antagonistes augmentent l'activité spontanée et la réponse des agonistes du récepteur de la 5-hydroxytryptamine de type 2C chez les cellules Sf9

Préambule

Le phénomène de sous-régulation atypique du récepteur 5-HT_{2c} exprimé en cellules Sf9 rapporté dans la première étude était encore trop peu caractérisé pour pouvoir en déterminer le mécanisme sous-jacent. Afin d'élucider ce mécanisme et surtout de mieux comprendre les différents aspects des activités induites par les prétraitements aux antagonistes sérotoninergiques, j'ai examiné, de plus près, l'impact de ces prétraitements sur la fonction du récepteur 5-HT_{2c} exprimé en cellules Sf9. À ma grande surprise, au lieu d'observer une diminution de fonction avec la réduction du nombre de récepteurs, j'ai observé une augmentation spectaculaire de l'activation spontanée du récepteur (ce qui est difficile à réconcilier avec leur propriété d'agonisme inverse) et une potentiation de la réponse aux agonistes qui est normalement assez faible pour ce récepteur exprimé chez des cellules Sf9 non traitées. Cette activité inusitée causée par les traitements aux antagonistes semblait présenter certaines caractéristiques du phénomène appelé "Augmentative Antagonism" rapporté pour certains antagonistes du récepteur de l'angiotensine AI (109). Cet effet spectaculaire de sensibilisation de la réponse fonctionnelle du récepteur par les antagonistes pourrait être une nouvelle propriété des antagonistes distincte de leur propriété d'agonisme inverse. Cet article fut soumis pour publication dans le journal *Molecular pharmacology* et est présentement sous révision.

Résumé du second article

Dans cette étude, l'expression du récepteur sérotoninergique recombinant de rat 5-HT_{2C} dans le système du baculovirus/cellules d'insectes Sf9 fut utilisée pour démontrer les effets de sensibilisation de l'efficacité du couplage du récepteur par des prétraitements avec des agonistes inverses. Des prétraitements avec la métergoline, la miansérine et la clozapine ont produit un changement persistant du niveau d'activation spontanée du récepteur et de l'efficacité de la réponse aux agonistes. Contrairement à ces ligands, aucune potentiation de la réponse aux agonistes ne fut mesurée à la suite de prétraitements avec la chlorpromazine, la loxapine et la méthysergide. Cela suggère que les antagonistes diffèrent dans leur efficacité intrinsèque à induire une sensibilisation de la réponse du récepteur. En parallèle avec cette propriété, les prétraitements avec des agonistes inverses ont produit une réduction dose-dépendante (jusqu'à 90 %) du nombre de sites de liaison pour la [³H]mesulergine. Cette activité évoque le concept de sous-régulation atypique observé *in vivo* à la suite de traitements chroniques avec des neuroleptiques. Somme toute, les habiletés relatives des agonistes inverses à produire une augmentation de la réponse spontanée et de la réponse stimulée par un agoniste du récepteur, suggère que cette nouvelle propriété est une activité qui ne peut être complètement expliquée par l'activité agoniste inverse des antagonistes sérotoninergiques testés dans cette étude.

De plus, nos observations indiquent que les antagonistes sérotoninergiques sont capables d'imposer un changement persistant dans la population de récepteurs qui permet une transition d'un système possédant un mauvais couplage fonctionnel vers un système où le couplage fonctionnel avec la PLC endogène aux cellules Sf9 démontre une excellente efficacité en présence d'agonistes.

Antagonists pretreatments Increase Agonist and Inverse Agonist responsiveness of the Rat 5-HT_{2C} Receptor expressed in Sf9 Cells.

Jean Labrecque^{1,2}, Michel Bouvier³ Peter Chidiac^{1,3}, Annick Fargin² and Michael Dennis^{1,4}.

¹ BioSignal Inc. 1744 William St., Montreal (Quebec) Canada, H3J-1R4.

Departments of ²Pharmacology and ³Biochemistry, University of Montreal, B.P. 6128, Succ. Centre ville, Montreal, Quebec, Canada, H3C-3J7.

⁴ To whom correspondence should be addressed.

This investigation was supported in part by the Medical Research Council of Canada (grants MT-11215 and MT-11582).

Running title: *Increase spontaneous activity and sensitization of agonist response of the rat 5-HT_{2C} receptor.*

Key words: 5-HT_{2C} receptor, augmentative antagonism, inverse agonism, coupling efficacy, atypical downregulation, sensitization, baculovirus and receptor reserve.

SUMMARY

In the present study the expression of the recombinant rat 5-HT_{2C} serotonin receptor in the baculovirus/Sf9 insect cell system was used to demonstrate the sensitizing effects of serotonergic inverse agonists pre-treatments on the coupling efficacy of the receptor. Pre-treatment with metergoline, mianserin and clozapine produced persistent change in the level of spontaneous receptor activity and promoted a significant increase in agonist efficacy. By contrast, no potentiation of agonist efficacies was measured following pretreatment with chlorpromazine, loxapine or methysergide, suggesting that antagonist differ in their intrinsic sensitizing efficacy of the 5HT_{2C} receptor function. In parallel to this property, the inverse agonists pre-treatments, produced a dose-dependent decrease (up to 90%) in the number of [³H]mesulergine binding sites. This activity is reminiscent of the atypical downregulation observed *in-vivo* following chronic treatment with neuroleptics. Overall, the relative abilities of inverse agonists to produce an increase in ligand-independent and agonist-stimulated responsiveness suggest that this novel property of antagonists is an activity which cannot be fully explained by the inverse agonist activity of the serotonergic antagonist tested. Moreover, our observations indicate that serotonergic antagonists are able to impose a persistent changes in the receptor population that allows a transition from poorly coupled receptors population showing poor agonist responsiveness to a population of receptor displaying high agonist efficacy for the functional coupling with endogenous Sf9 cells PLC signaling pathway.

INTRODUCTION

Recent evidence suggests that G protein-coupled receptors isomerize rapidly between active and inactive forms and that such isomerization is responsible for ligand-independent spontaneous receptor activity (1-6). According to this two state model, agonists bind preferentially, and stabilize the active form whereas inverse agonists favor inactive forms, thereby inhibiting spontaneous receptor activity. Ligands with inverse agonist activities have now been reported for a number of G protein-coupled receptors in a large number of systems (6).

Recently, the rat 5-HT_{2C} receptor was also shown to exhibit spontaneous activity in transfected (1,2) as well as in baculovirus infected cells (3) several classical 5-HT_{2C} antagonists were shown to display inverse agonist activity toward this receptor. In addition to this property, antagonists of the 5-HT_{2C} receptor have been reported to promote atypical "downregulation" both *in-vivo* (7-12) and *in vitro* in choroid plexus cells (2) or transfected system (3). Atypical downregulation refers to the apparent loss in receptor binding capacity observed after chronic treatment and removal of antagonist. It is atypical in the sense that downregulation is usually observed following long term treatment with agonists and not with antagonists. Although the mechanism leading to antagonist-promoted loss of binding sites remains largely unknown, it may have important clinical implications. Indeed, atypical downregulation of the 5-HT_{2C} has been proposed to contribute to the therapeutic properties of some neuroleptics (7-13).

An abundant literature has documented the effects of agonist-promoted downregulation. In most cases, this downregulation leads to a reduction in signaling efficacy and thus contributes to the desensitization phenomenon (13 for review). In contrast, very little is known concerning the effects of atypical downregulation observed following antagonist treatment.

In the present study, the functional effects of several 5-HT antagonists which display inverse agonist properties and/or promote downregulation of the receptor were assessed. Both ligand-dependent and independent activity of the 5-HT_{2C} receptor were measured in Sf9 cells following transient treatment with antagonists. In addition to their acute inhibitory effects on spontaneous receptor activity, transient treatment with certain inverse agonists

increased **both** spontaneous activity and responsiveness to agonist stimulation. This sensitizing effect was well correlated with the ability of the compounds to promote receptor downregulation. In contrast to the inhibitory action of inverse agonist which require the continuous presence of the ligand, both the downregulation and the sensitization persist upon removal of the ligand, suggesting the existence of additional properties of some 5-HT antagonists.

MATERIALS AND METHODS

Reagents. Buffer chemicals and protease inhibitors were purchased from Sigma, and cell culture media from Gibco/BRL. Unlabeled ligands were supplied by Research Biochemicals International, with the exception of loxapine, which was a gift from Dr. B. Roth. [3H]mesulergine (78-82 Ci/mM) was purchased from Amersham and [3H]myo-inositol (10-20 Ci/mM) was purchased from NEN-Dupont. The AG 1 X-8 ion exchange resin was supplied by Bio-Rad.

The recombinant baculovirus used for expression of the rat 5-HT_{2C} receptor was provided by the Biotechnology Research Institute of Montreal. The virus was constructed using a synthetic DNA fragment encoding the rat 5-HT_{2C} receptor, based on the published sequence of the cloned cDNA from choroïd plexus (14). The synthetic cDNA was prepared and its sequence verified by Allelix Biopharmaceuticals. The cDNA was inserted into the IpDC-126 baculovirus transfer vector and a recombinant baculovirus was produced and purified as previously described (15) .

Cell culture and receptor expression. Sf9 cells were cultured in 50 ml batches in 250 ml shaker flasks at 27°C in Sf-900 II serum free medium as described in (3) . The infected cells were maintained in culture for various periods and used for analysis of ligand binding and measurement of IPs production as described below.

Radioligand binding assays. For the estimation of total receptor numbers in intact Sf9 cells, the cells were pelleted by low-speed centrifugation (3 min at 800 RPM in Sorvall H6000A rotor), followed by resuspension in PBS and re-centrifugation, and resuspended in either PBS or binding buffer (50 mM Tris/HCl, pH 7.4, 15 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 0.1% ascorbic acid, 5 mg/ml leupeptine, 10 mg/ml aprotinin, 20 mg/ml benzamidine, 50 mg/ml TPCK and 50 mg/ml trypsin inhibitor). Cell viability after washing was estimated at 60-70% by trypan blue exclusion. Aliquots of 10,000 cells were incubated for 1 hr at 27°C in a final volume of 540 µl containing 20 nM of [3H]mesulergine. Incubations were terminated by vacuum filtration over GF/C filters and washing with binding buffer at 4°C. Bound radioactivity was measured on filters impregnated with MeltiLexTM

melt-on scintillant using a Wallac MicroBeta counter. Non-specific binding was estimated in parallel incubations containing 10 mM mianserin or metergoline.

For analysis of ligand binding to membrane preparations, cultures were harvested at 48 h post-infection, lysed and a membrane pellet was prepared as previously described (16) and stored at -80°C. Protein concentrations were determined by the nitrocellulose amido black method (17). Membranes were thawed on ice and resuspended in binding buffer by homogenization in a Potter homogenizer. The membranes (5 mg) were incubated with [3H]mesulergine for 1 hr at 27°C in a final volume of 540 µl, and the assays terminated as described above for intact cells. Saturation binding assays performed with [3H]mesulergine concentration ranging from 0.2 nM to 6 nM yielded a $K_d = 2.3 \pm 1.02$ nM and a B_{max} of 22.2 ± 2.0 nM whereas competition binding assays with unlabeled drugs were carried out with 3 nM [3H]mesulergine (Table 1).

Inositol phosphate production and Effect of drug pre-treatment on [3H]mesulergine binding. Growing cell cultures (1×10^6 cells/ml) were pre-labeled for 24 hr with 2 mCi/ml [3H]myo-inositol prior to infection, and the labeled cells were then transferred to 50 ml shaker flasks for infection as described in (3). 48 h after infection, Sf9 cell cultures were treated with antagonists by adding drugs directly to the culture medium 1 h before cell harvest. Cells from treated cultures were extensively washed in culture medium (4 X 1h) to remove unbound ligands and resuspended for polyinositolphosphate production and for parallel binding with in with 20 nM [3H]mesulergine as described (3). Further details are described in Tables and figure legends.

Analysis of Data. The binding of [3H]mesulergine (saturation experiments) and the inhibition of [3H]mesulergine binding by unlabeled serotonergic ligands were analyzed either in terms of a single or two class of binding sites using the computer program Allfit (Delean). Data from three independent binding experiments were fitted individually and the affinities presented for [3H]mesulergine (K_d) and other ligands (K_i) represent the average values (\pm SEM) from 3 sets of data. Dose-response data for IPs and antagonist-induced decreases in [3H]mesulergine binding capacity were scaled taking values

measured in the absence of added ligand as 100%. The scaled data were analyzed according to a 4 parameter logistic equation analogous to the Hill equation (ALLFIT; A. DeLean, Department of Pharmacology, Université de Montréal or INPLOT; Prizm Software, SanDiego CA). For the decrease in [3H]mesulergine binding with each ligand, 3-4 sets of data were fitted simultaneously using ALLFIT with the slope factor set equal to 1. Further details are described in Tables and figure legends. Maximal inverse agonist activities measured for each drug tested were compared statistically by a two tailed t test ($\alpha = 0.05$).

RESULTS

Apparent "downregulation" of the 5-HT_{2C} receptor by antagonists.

The downregulating properties of six 5-HT inverse agonists were assessed in Sf9 cells expressing the rat 5-HT_{2C} receptor. As can be seen in figure 1, a one hour treatment with all these compounds induced a dose-dependent decrease in [³H]mesulergine binding measured in whole cells. The rank order of potency of these ligands to promote downregulation was metergoline > mianserin > loxapine = chlorpromazine = clozapine >> methysergide. As shown in table 1, this order follows the inhibition constants (pKi) determined for these agents in [³H]mesulergine binding experiments, except for methysergide that displayed high binding affinity but low potency in the downregulation paradigm. The extent of the downregulation varied depending on the drug, from over 90% for metergoline treatment to 50% for methysergide. The downregulation observed most likely did not result from contaminating residual ligands, since as previously reported (3) more than 95% of [³H]mesulergine is dissociated from the receptor while a treatment with this drug promoted a downregulation of 60 % of the binding sites.

Sensitizing effects of metergoline pretreatment on 5-HT_{2c} receptor functional coupling.

Since metergoline had the highest potency and efficacy to promote loss of receptor binding sites, the effect of a one hour treatment with increasing concentrations with this inverse agonist was assessed on receptor-stimulated IPs formation. Figure 2A illustrates the effects of the metergoline treatments on basal and 5-HT-stimulated responses. At 1 nM, metergoline was without effect on the 5-HT dose response curve. However, treatment with 10 nM lead to a dramatic increase in both basal and 5-HT-stimulated IPs production. Further increases in the concentration of metergoline promoted a progressive reduction in the basal IPs levels which reached a minimum following a 1 μM metergoline pretreatment. In contrast, the potentiation of the 5-HT maximal response observed at 10 nM metergoline was maintained for concentrations of 0.1 and 1 μM of this drug. However, at the highest concentration (10 μM) of metergoline tested, the pretreatment caused an abrupt reduction in the 5-HT-stimulated IPs production. The fact that basal

and stimulated levels were differentially affected by metergoline pretreatments resulted in variations in the net responses (maximal-basal) observed for the different pretreatment conditions. For example, the larger net responses were obtained following pretreatments with 0.1 and 1 μM metergoline whereas lower net responses were found for treatment concentrations of 10nM and 10 μM . In addition to these effects on basal activity and 5-HT efficacy, the metergoline pretreatment caused a dose dependent rightward shift of the 5-HT dose response curves indicative of a reduction in the potency of the agonist following the treatments. This decreased potency that accompanies the downregulation is suggestive of the presence of spare receptors. Table 2 summarizes the pharmacological parameters of the 5-HT dose response curves.

Figure 2B shows the effect of metergoline pre-treatment on mianserin dose dependent inhibition of basal ligand-independent IPs production. First, as was observed in panel A, metergoline treatment had a biphasic effect on basal IPs level. Indeed, a potentiation of the ligand-independent activity was observed at 10 nM while an attenuation of this response was found for the highest concentrations used (1 and 10 μM). The fact that basal activity was not reduced below control conditions despite a downregulation of more than 89% of the sites (table 2) at 100 nM metergoline is consistent with the presence of a large number of spare receptors as suggested above. These results also indicate that the downregulation observed in figure 1 did not result from contaminating residual inverse agonists since pretreatments with 10 nM metergoline (which promoted a 71% loss of binding capacity) resulted in a higher rather than a reduced basal activity.

Second, mianserin had slight effect on basal level behaved as a very weak inverse agonist in control cells with less than 10 % inhibition of the basal receptor activity. However, the capacity to detect the inverse efficacy of this ligand was greatly improved (36% inhibition) by pretreatment of the cells with 10 nM metergoline. This apparent potentiating effect of inverse efficacy was largely due to the elevation in basal activity promoted by the pretreatment. The effect could also be observed, albeit to a lesser extent, following pretreatment with 100 nM metergoline. At higher doses of pretreatment, the reduction in basal activity hindered the detection of the inverse agonist activity. Taken

together, the results presented in figure 2 demonstrate that at low concentration, pretreatments with metergoline increased the apparent efficacy of both agonist and inverse agonist whereas high concentration pretreatment reduced these efficacies. This suggested a biphasic effect of metergoline. To determine if the sensitizing effect of metergoline is a general feature of inverse agonists, the properties of five additional inverse agonists were examined.

Distinct effects of inverse agonists on 5-HT_{2C} receptor functional coupling.

The effects of pretreatment with increasing concentrations of metergoline, mianserin, clozapine, loxapine, chlorpromazine and methysergide were measured on basal, 5-HT-stimulated and mianserin-inhibited IP_s production. As can be seen in figure 3, of the six antagonists tested, only metergoline, mianserin and clozapine showed substantial effects on basal activity and drug responses. In these three cases, pretreatments generated bell shaped curves for the effect on both basal and maximal 5-HT-stimulated activities that is reminiscent of the biphasic effect observed for metergoline in figure 2. In contrast, the activity inhibited by mianserin was unaffected by the pretreatments. This indicate that the activity measured in the presence of mianserin reflects the receptor-independent activity of the phospholipase C. Thus, the increase in agonist-independent PLC activity promoted by metergoline, mianserin and clozapine pretreatments resulted in an apparent increase in the inverse efficacy of mianserin. The potentiating effect of the pretreatments on the 5-HT-stimulated activity was observed for a wider range of concentrations than that observed on the basal ligand-independent activity. These features of the dose response curves create distinctive concentration windows of pretreatment at which inverse agonism and agonism can be more easily detected.

The sensitizing effect of the inverse agonist cannot be strictly correlated to their efficacy to promote downregulation since loxapine and chlorpromazine induced a loss of binding sites equivalent to those observed following pretreatment with mianserin or clozapine. Nevertheless, the potencies of metergoline, mianserin and clozapine to sensitize the IP response is well correlated with their potencies to promote downregulation.

Effects of sensitizing treatment on agonist binding affinity.

The data described above suggest that treatment with some inverse agonists increases the functional coupling of the 5-HT_{2C} receptor to the IP signaling pathway. Such sensitizing effects could be attributed to a more efficient coupling of the receptor to its cognate G protein. This has often been associated with an increase in the proportion of high affinity agonist binding sites (18, 19). To determine if the sensitization promoted by inverse agonists follows this paradigm, the effect of metergoline pretreatment on 5-HT binding parameters was assessed. As shown in table 3, although the pretreatment led to a significant decrease in the number of mesulergine binding sites, neither the high (K_{iH} :control; 0.31 nM \pm 0.20, metergoline; 0.31 \pm 0.16) or low affinities (K_{iL} :control; 0.33 μ M \pm 0.06, metergoline; 1.77 \pm 1.00) for 5-HT nor the proportion of sites in the high affinity state were affected (R_H/R_L); control; 44% \pm 21, metergoline; 41% \pm 9).

DISCUSSION

In the present study several inverse agonists were shown to produce dose dependent downregulation of the [³H]mesulergine binding sites and to sensitize the functional coupling of the 5HT_{2C} receptor. While all ligands tested did promote downregulation only three (metergoline, mianserin and clozapine) displayed the sensitizing effects indicating that sensitization and down-regulation may represent distinct properties shared by some but not all inverse agonists.

The loss of sites induced by inverse agonist treatment could be considered as being only apparent as it could result from the presence of residual inverse agonists in the binding assay. At least four lines of evidence argue against such a possibility. 1) After treatment, cells were washed following a protocol which was previously shown to allow dissociation of more than 95% of labeled mesulergine (3). Such a low level of residual ligand cannot account for the downregulation of more than 60% of the sites. 2) Pretreatment with metergoline decreased the number of binding sites by 89% without significantly affecting the apparent 5-HT binding affinity (K_i) (table 3), an observation inconsistent with the presence of residual reversible antagonists. 3) Pretreatment with metergoline concentration greater than 1 μM, reduced 5-HT maximal efficacy (100 μM 5-HT), an observation inconsistent with the classic competitive property of putative residual antagonists. 4) As it will be discussed below, the downregulation induced by metergoline was accompanied by a sensitization of the agonist response (fig.2), a phenomenon hardly compatible with the presence of contaminating inverse agonist.

The downregulation induced by antagonists in Sf9 cells is a phenomenon that is reminiscent of the downregulation of the 5-HT_{2C} receptor observed *in vivo* following chronic antagonist treatment (5-11). This loss of binding sites observed upon chronic treatment has been termed "atypical downregulation", reflecting the general view that agonists normally downregulate whereas antagonists upregulate receptor numbers. It has been proposed that this atypical action of antagonists represents an adaptive response which could underlie the therapeutic efficacy of serotonergic antagonists as antipsychotics (20, 21). Interestingly, many of these antagonists have now been shown to

be inverse agonists and not simply competitive antagonists (3). This led Barker *et al.* to propose that atypical downregulation promoted by certain ligands may be correlated to their inverse efficacy (2). However, using a larger number of ligands, a strict correlation between inverse efficacy and atypical downregulation was not observed in Sf9 cells (3), raising questions about the mechanisms responsible for the downregulation. This lack of correlation between inverse efficacy and the atypical downregulation is further confirmed in the present study. Indeed, methysergide a potent inverse agonist ($-pEC_{50}= 7.95$) displayed very weak ($-pEC_{50}>5.0$) downregulating activity.

Classically, agonist treatment leads to a downregulation which is believed to involve both internalization and degradation of the receptor protein as well as a negative regulation of the mRNA levels (22, 23). However, in primary cultures of choroid plexus epithelial cells, the atypical downregulation observed following mianserin treatment is not accompanied by any change in the mRNA levels (2) thus suggesting that regulatory events at the level of the protein are responsible for the atypical downregulation. Consistent with such a notion is the recent observation that the CCK antagonist (D-Tyr-Gly-[(Nle^{28,31}, D-Trp³⁰)cholecystikinin-26-32]-phenethyl ester) (DTrp-OPE) promotes receptor internalization (24). However, whether or not DTrp-OPE is an inverse agonist remains to be determined.

Three of the inverse agonists tested (metergoline, mianserin and clozapine), in addition to promoting atypical downregulation, also increase the responsiveness to subsequent treatment with agonist and the spontaneous agonist-independent activity of the receptor. Such sensitizing effect is reminiscent of the augmentative antagonism described for other receptors (25-32). It was proposed that this augmentative antagonism could be due to an hemiequilibrium between inactive refractory and activatable receptors (33). In such a scheme, an augmentative antagonist would bind preferentially and stabilize the activatable state of the receptor and the isomerization between the two receptor states would have to be slow. Alternatively, the sensitizing effects of some inverse agonists could result from the reversal of a constitutive desensitization. Indeed, elevated spontaneous activity has been shown to be accompanied by constitutive desensitization (34, 35) leading to blunted agonist responses. Inverse agonists, by inhibiting the spontaneous activity, would prevent the occurrence of such desensitization (1) leading to apparent sensitization. Although attractive,

this model cannot account for the lack of sensitizing effects of efficacious inverse agonists such as methysergide. Thus, one is left with the notion that inverse agonism and sensitization are at least partly independent properties of antagonist drugs.

Interestingly, the potency of inverse agonists to promote sensitization was well correlated with their potency to induce atypical downregulation. This could suggest that the loss of binding site is a consequence of the sensitizing effects of the compounds. Indeed, the elevation in the spontaneous activity of the receptor could trigger the mechanism classically involved in agonist-promoted downregulation. Despite the general agreement in the potency of the drugs to promote downregulation and sensitization, a direct link between the two phenomenon can not be firmly established since the efficacy of chlorpromazine and loxapine to promote downregulation are largely equivalent to that of metergoline and mianserin while only the latter ones induced sensitization.

An interesting aspect of the sensitizing effect is that it affects both the spontaneous agonist-independent and the agonist-promoted receptor activation. This suggest that sensitization most likely occurs through a change in the equilibrium between the active and inactive receptor conformations without affecting the affinity of these conformers for the agonists or the inverse agonists. This is supported by the observation that pretreatment with metergoline did not affect the K_{iH} and K_{iL} of 5-HT for the receptor (Table 3).

As shown in figure 3, the sensitizing dose response curves clearly display a bell shaped curve. The biphasic nature of the phenomenon may be due to the existence of a receptor reserve. Indeed, the potentiating effect can be observed as long as a sufficient number of receptors is present at the cell surface. In the case of metergoline pretreatment, the reduction in the number of spare receptors is reflected first by a rightward shift in the 5-HT dose response curve and at higher doses of pretreatment by a decrease in the maximally stimulated response. Interestingly, the basal agonist-independent activity also decreases as the loss of receptor becomes more prominent. In fact, the agonist-independent activity is more sensitive to the reduction in receptor number than the agonist-stimulated activity. This is expected when considering the two state model (4) since spontaneous receptor isomerization is low under normal ligand-independent conditions and thus the number of active spare receptors should be lower. This inherent feature of spontaneous receptor

isomerization often limits our capacity to observe elevated basal activity to conditions where high levels of receptor are present.

The differential sensitivity of the basal and agonist-stimulated activity to depletion of the receptor creates drug-specific concentration windows for which pretreatment favors increased agonist efficacy. Indeed, at pretreatment concentrations that lead to a significant reduction in basal activity with no effect on the agonist-stimulated activity one can observe a dramatic potentiation of the net stimulatory response mediated by the agonist. This observation strengthens the notion that the basal level of spontaneous activity present in a given system largely determines the responsiveness of this system to ligand stimulation (36).

In conclusion, we reported here that ligands classically considered as competitive antagonists can, in addition to possessing inverse agonist efficacies, also promote both sensitization and atypical downregulation of the 5-HT_{2C} receptor. Although all the compounds tested in the present study are inverse agonists, we established that sensitizing and downregulating properties of the ligands can be separated from their inverse efficacies. Whether downregulation and sensitization represent different aspects of the same process remains to be investigated further. Regardless of the fact that the precise mechanisms leading to inverse agonist-promoted sensitization (augmentative antagonism) are still poorly understood, this mechanism may provide new therapeutic strategies aimed at restoring or potentiating functional responses that have been impaired as a consequence of pathological dysfunction or prolonged agonist treatment .

Table 1

Pharmacology of 5HT_{2C} receptor expressed in Sf9 cells after different antagonists treatments.

Results are expressed as mean \pm SE for at least 3 experiments. [³H]mesulergine binding was measured in parallel on control and untreated membranes as described in materials and methods. IPs production was as described in materials and methods.

	[³H]mesulergine binding	Spontaneous activity	Downregulation
	membranes^a	wholes cells^a	wholes cells
Drug treatments	Binding	Inverse agonism	Apparent lost of [³H]mesulergine binding sites
	-pKi \pm SE	pEC₅₀ \pm SE	pEC₅₀ \pm SE
metergoline	9.22 \pm 0.10	8.81 \pm 0.20	9.02 \pm 0.22
mianserin	8.63 \pm 0.05	7.45 \pm 0.24	6.82 \pm 0.12
clozapine	7.62 \pm 0.20	6.76 \pm 0.36	5.82 \pm 0.11
loxapine	7.59 \pm 0.15	nd	5.97 \pm 0.03
chlorpromazine	7.45 \pm 0.09	nd	5.90 \pm 0.50
methysergide	9.12 \pm 0.05	7.95 \pm 0.36	< 5

a) Values were taken from Labrecque et al. (3)

Table 2

Pharmacology of 5HT_{2C} receptor expressed in Sf9 cells after metergoline treatments.

Results are expressed as mean \pm SE for at least 3 experiments. IPs responses and [³H]mesulergine binding are measured in whole cells (48 h after-infection) following various concentration of metergoline pre-treatment as described in materials and methods.

Metergoline pre-treatments	[³ H]mesulergine binding sites density		5HT Dose response		^b Net response (% Stimulation)
	% residual sites	pEC ₅₀ \pm SE	^a p values		
vehicle	100 \pm 10	7.69 \pm 0.10			12 \pm 2
-9M,	57 \pm 14	7.33 \pm 0.06	> 0.05		13 \pm 2
-8M	29 \pm 12	7.06 \pm 0.02	> 0.05		39 \pm 5
-7M	11 \pm 4	7.07 \pm 0.08	0.03		112 \pm 4
-6M	6 \pm 4	6.42 \pm 0.12	0.01		129 \pm 3
-5M	5 \pm 4	5.40 \pm 0.09	0.01		40 \pm 4

a) Student t test was performed between vehicle treated and the various metergoline treatments ($\alpha = 0.05$).

b) Values estimated from fig 2 as % over basal level.

Table 3.

Binding affinity of 5HT after apparent loss of sites for 5HT_{2C} receptors expressed in Sf9 cells.

Serotonin binding affinity (K_i) and receptor density (B_{max}) were measured in membranes (from 48 h post-infected cells) pre-incubated for 60 min with 1 μM metergoline and extensively washed prior to membranes extraction for the competition binding analysis with 2 nM [³H]mesulergine as described in materials and methods. Results from antagonist treatment of membranes were determined from 3 independent experiments with mean values and SEM calculated from separate estimates fitted with the program Allfit. The level of high affinity 5HT binding compared with the density of low affinity 5HT binding sites was expressed as a percent ratio where (B_{max} R_{high}/B_{max} R_{low}) X 100 indicate the relative proportion of affinity sites.

5HT binding parameters

Drug treatments	Ki_{low}^a μM	Ki_{high}^a nM	Bmax^b pmol/mg	% ratio of (R_{high} / R_{low})
vehicle	0.23 ± 0.06	0.31 ± 0.20	22.0 ± 2.0	44 ± 21
metergoline	1.77 ± 1.00	0.31 ± 0.16	2.5 ± 2.0	41 ± 9

a) ANOVA test was performed on Ki estimates for vehicle and drug treated membranes (α = 0.001, P > 0.05).

b) ANOVA test was performed on Bmax estimates rejected null hypothesis (α = 0.001, P = 0.001). One tail Student's test (H₀: μ_{control} > μ_{drug}; α = 0.05, P > 0.05) was used to compare Ki and Bmax from the drug treatment and the vehicle.

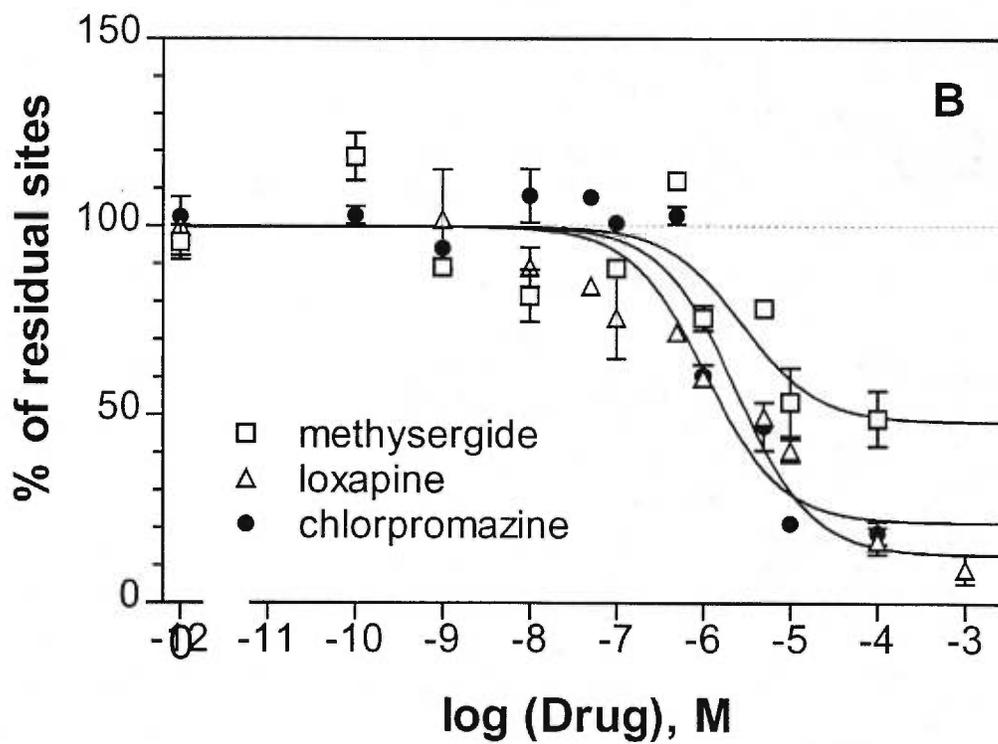
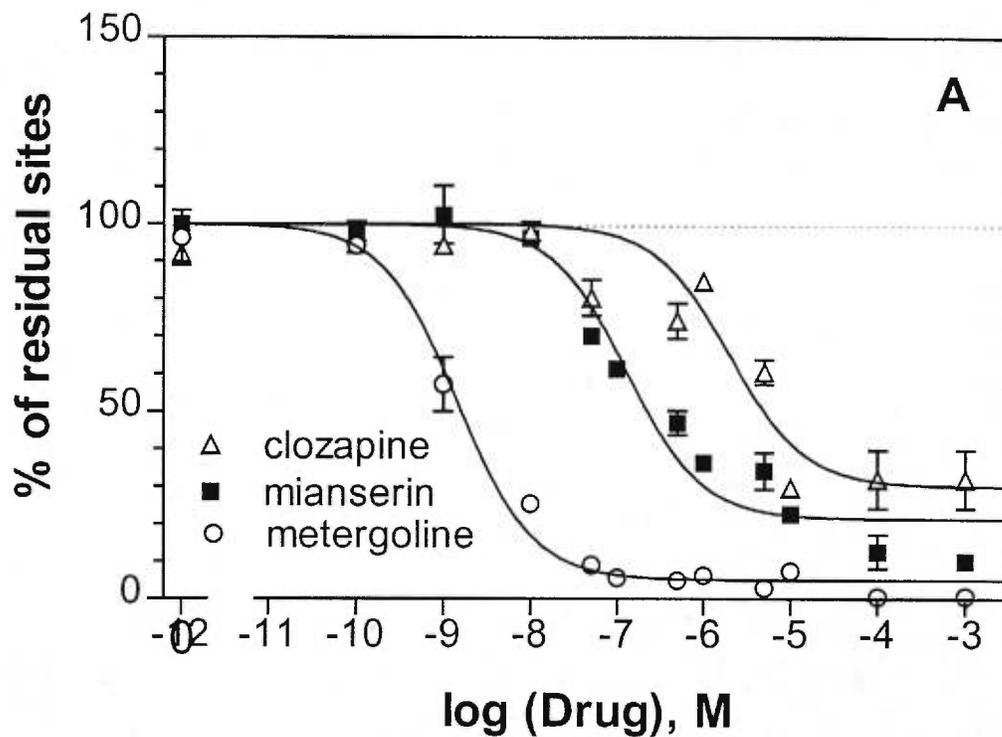


Fig.1. Effects of serotonergic antagonists on apparent loss of [³H]mesulergine binding sites in 5HT_{2C}-containing Sf9 membranes following antagonist pre-treatment. Cells were prepared at 48 hr post-infection from Sf9 cells infected with the 5HT_{2C} baculovirus were treated with the indicated 5HT_{2C} antagonists for 1 hr. Treated and control membranes were washed extensively in parallel (see material and methods) and then incubated with [³H]mesulergine (10 nM) to determine the residual binding after drug treatment. For each ligand, data from three independent experiments were analyzed simultaneously assuming a common value for EC₅₀ (see Table 1), with $Y_{(x \rightarrow 0)}$ and $Y_{(x \rightarrow \infty)}$ unconstrained. The curves and averaged points (n = 3) shown were derived from a representative experiment obtained on the same day with all drugs tested in parallel on the same membranes. Values from a representative set of data were scaled taking the fitted values of $Y_{(x \rightarrow 0)}$ as 100 %, and the points shown represent (the averages of) the scaled data (\pm SEM). Each curve was generated using the fitted values of EC₅₀, with $Y_{(x \rightarrow 0)}$ set to 100% and $Y_{(x \rightarrow \infty)}$ set to the average of $[(Y_{(x \rightarrow \infty)} / Y_{(x \rightarrow 0)}) * 100\%]$. For clarity, points corresponding to concentration $< (EC_{50}/10000)$ were omitted from the figure. Values for EC₅₀ are reported in Table 1.

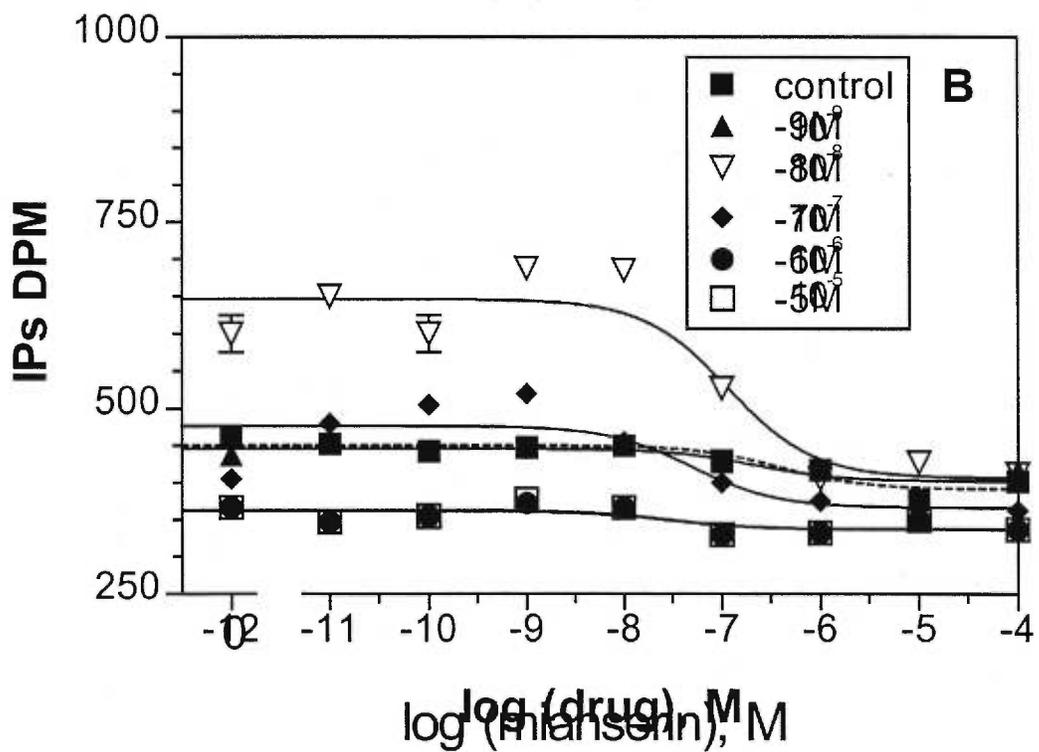
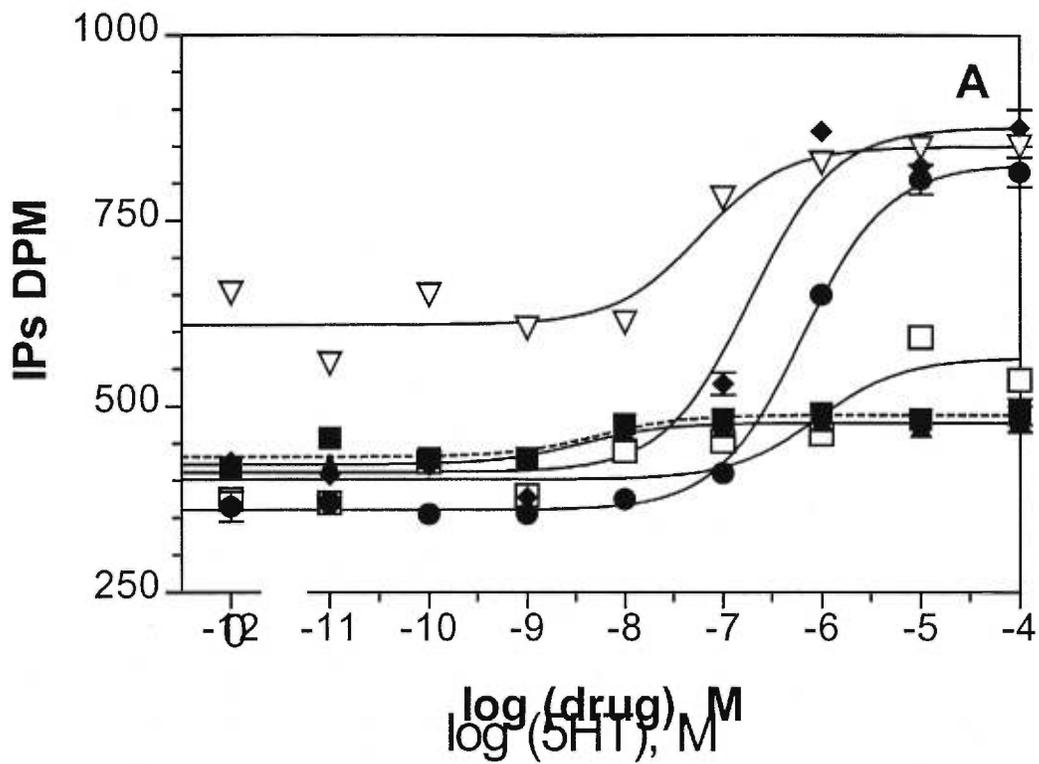


Fig2. Effects of agonist and inverse agonist on IPs release in 5HT_{2C}-expressing Sf9 cells after various pre-treatment with metergoline. Sf9 cells labeled with [³H]myo-inositol are infected with the 5HT_{2C} baculovirus, 48 h after infection cells are pre-treated for 60 min with either vehicle (control, black square) or various concentration of metergoline (10⁻⁵ M (white square) ;10⁻⁶ M (black circle) ;10⁻⁷ M (black lozenge) ;10⁻⁸ M (white triangle) ;10⁻⁹ M (black triangle) before a washout protocols is performed. IPs level are then measured in pre-treated whole cells in the presence various concentration of 5HT in panel **A** or mianserin in panel **B** as indicated on the abscissa. Data are from a representative experiment of triplicate assays and averaged results from three independent experiments (EC₅₀) are reported in Table 2.

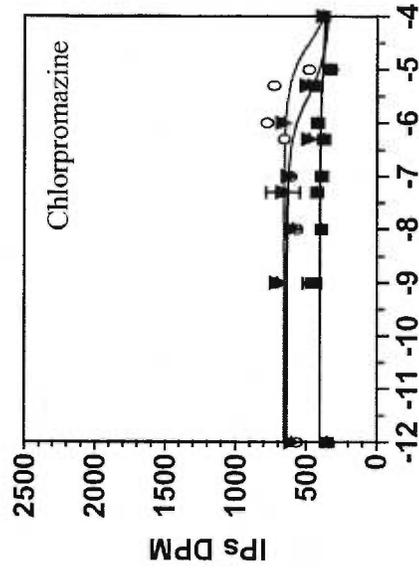
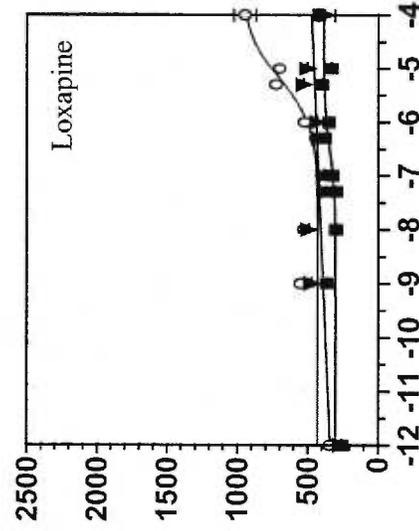
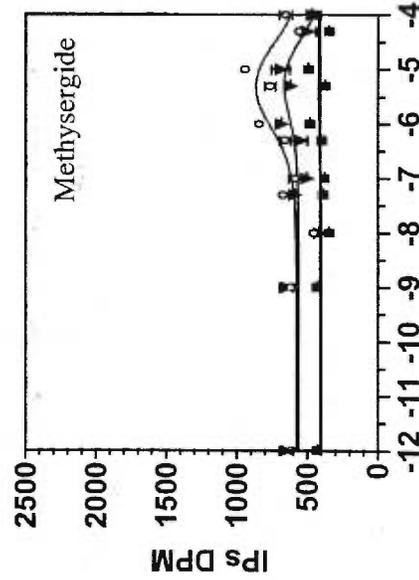
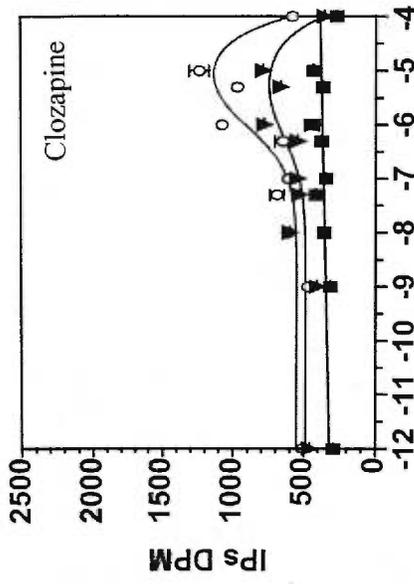
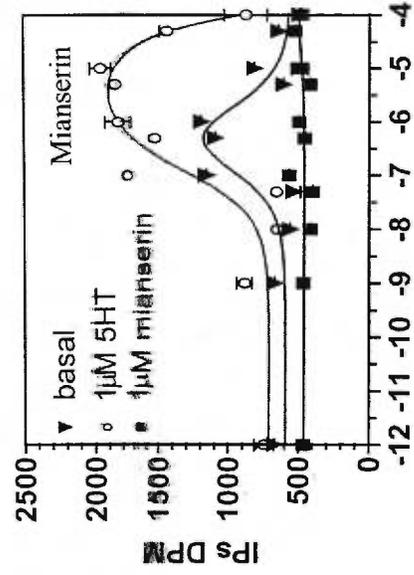
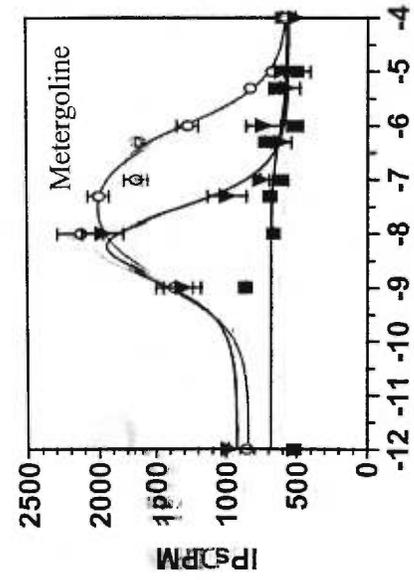


Fig. 3. Effects of various serotonergic antagonist pre-treatments on IPs release in 5HT_{2C}-expressing Sf9 cells. Sf9 cells labeled with [³H]myo-inositol (1 μCi/ml) are infected 48 h with a baculovirus encoding the 5HT_{2C} receptor and treated for 60 min as indicated on the abscissa with various concentration of metergoline (panel A), mianserin (panel B), clozapine (panel C), methysergide (panel D), loxapine (panel E) and chlorpromazine (panel F). Treated and control cells are washed extensively in parallel (see Material and methods) and then incubated in the presence of 1 μM 5HT (○), 1 μM mianserin (□) or with vehicle (▼). IPs levels are measured in whole cells in this representative experiment where the point shown represent averaged untransformed data from a triplicate assay. The half maximal effect (pEC₅₀) of antagonist treatment on basal level from 3 independent drug treatments are: metergoline; 8.48 ± 0.3, mianserin; 6.30 ± 0.3, clozapine; 5.96 ± 0.3 whereas loxapine, chlorpromazine and methysergide; < 5.0.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Biotechnology Research Institute of Montreal and Allelix Biopharmaceuticals for the use of the recombinant 5-HT_{2C} virus construct, Brian Roth for providing antagonists compounds, Patricia Laplante and Claire Normand for technical support, and André Deléan for providing helpful discussion and the program ALLFIT.

FOOTNOTES

The abbreviations cited are: G proteins, guanine nucleotide-binding regulatory proteins; IPs, total inositol phosphates; 5-HT, 5-hydroxytryptamine; EDTA, ethylenediaminetetracetic acid; TPCK, n-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone; PBS, phosphate buffered saline; M.O.I., multiplicity of infection; AcNPV, *Autographia californica* nuclear polyhedrosis virus; Sf9, *S. frugiperda* pupal ovarian cells; K_i, drug affinity constant; EC₅₀, drug potency (*concentration producing 50% of the maximal response*);

REFERENCES

- 1 Westphal, R.S., and E. Sanders-Bush. Reciprocal binding properties of 5-hydroxytryptamine type 2C receptor agonist and inverse agonists. *Mol. Pharmacol.* **46**:937-942 (1994).
- 2 Barker, E.L., R.S. Westphal, D. Schmidt, and E. Sanders-Bush. Constitutively active 5-hydroxytryptamine 2C receptors reveal novel inverse agonist activity of receptor ligands. *J. Biol. Chem.* **269**:11887-11890 (1994).
- 3 Labrecque J, A. Fargin, M. Bouvier, P. Chidiac and M. Dennis. Serotonergic antagonists differentially inhibit spontaneous activity and decrease ligand binding capacity of the rat 5-hydroxytryptamine Type 2C in Sf9 cells. *Mol. Pharmacol.*, **48**:150-159 (1995).
- 4 Chidiac, P., T.E. Hebert, M. Valiquette, M. Dennis and M. Bouvier. Inverse agonist activity of b-adrenergic antagonists. *Mol. Pharmacol.* **45**:490-499 (1994).
- 5 Hilf, G., and K.H., Jakobs. Agonist-independent inhibition of G protein activation by muscarinic acetylcholine receptor antagonists in cardiac membranes. *Eur. J. Pharmacol.* **225**:245-252 (1992).
- 6 Bond RA.. Do recent operational studies indicate that a single state model is no longer applicable to G protein-coupled receptors? *Ann N Y Acad Sci* **30**:812:92-97 (1997).
- 7 Pranzatelli, M.R., J. N. Murthy and P. T. Tailor. Novel regulation of 5HT-1C receptor: down-regulation induced both by 5HT-1C/2 receptor agonists and antagonists. *Eur. J. Pharmacol.* **244**: 1-5 (1992).
- 8 Roth, B.L., M.W. Hamblin, R. Desai, and R.D. Ciaranello. Developmental and synaptic regulation of 5HT-2 and 5-HT_{1c} serotonin receptors. In *Serotonin: Molecular biology, receptors and functional effects.* ed. J.R. Fozard/P.R.Saxena , Birkhauser verlag, Basel, Switzerland 33-42 (1991).
- 9 Sanders-Bush, E. Adaptive regulation of central serotonin receptor linked to phosphoinositide hydrolysis. *Neuropsychopharm.* **3**:411-416 (1990).

- 10 Smith, R.L., R.J. Barrett, and E. Sanders-Bush. Adaptation of brain 5HT₂ receptors after mianserin treatment: receptor sensitivity, not receptor binding, more accurately correlates with behavior. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **254**:484-488 (1990).
- 11 Kuoppamäki, M., T. Seppälä, E. Sylvälähti and J. Hietala. Chronic Clozapine treatment decreases 5-hydroxytryptamine 1C receptor density in the rat choroïd plexus: Comparison with haloperidol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **264**: 1262-1267 (1992).
- 12 Sanders-Bush and E. M Breeding. Serotonin_{1c} receptor reserve in the choroïd plexus mask receptor subsensitivity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **252**:984-988 (1989).
- 13 Böhm S. K., E. F Grady and N.W. Bunnett. Regulatory mechanism that modulate signalling by G-protein-coupled receptors. *Biochem J.* **322** :1-18 (1997).
- 14 Julius, D., A.B. MacDermott, R. Axel and T.M. Jessel. Molecular characterization of functional cDNA encoding the serotonin 1c receptor. *Science* **241**:558-564 (1988).
- 15 O'Reilly, D. R., L. K Miller, and V. A. Luckow. Baculovirus Expression Vectors: a laboratory manual, W.H. Freeman and Company, New York (1992).
- 16 Labrecque, J., M. Caron, K Torossian, J Plamondon, and M Dennis. Baculovirus expression of human G proteins subunits. *FEBS letters.* **304**:157-162 (1992).
- 17 Schaffner, W. and C. Weissmann. A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution. *Analytic. Biochem.* **56**:502-51 (1973).
- 18 Cox B. A., M.P. Rosser, M.R. Kozłowski, K.M. Duwe, R.L. Neve and K.A. Neve. Regulation and functional characterization of a rat recombinant dopamine D₃ receptor. *Synapse* **21**(1):1-9 (1995).
- 19 Strasser RH, J. Krimmer, R. Braun-Dullaeus, R. Marquetant, W. Kubler. Dual sensitization of the adrenergic system in early myocardial ischemia: independent regulation of the beta-adrenergic receptors and the adenylyl cyclase. *J Mol Cell Cardiol* **22**(12): 1405-1423 (1990).
- 20 Meltzer, H.Y., and J.F. Nash. Effects of Antipsychotic Drugs on Serotonin Receptors. *Pharmacol. Rev.* **43-4**, 588-600 (1991).

- 21 Coward, D.M. The Pharmacology of Clozapine-like Atypical Antipsychotics, Antipsychotic Drugs and their Side -effect. Academic Press inc. San Diego USA, 28-44 (1993).
- 22 Kelsen SG, O. Anakwe, M.O. Aksoy, P.J. Reddy, N. Dhanesekaran, R. Penn, J.L. Benovic and C. Owman. Chronic effects of catecholamines on the beta 2-adrenoreceptor system in cultured human airway epithelial cells. *Am J Physiol* **272**:916-924 (1997).
- 23 Burns CM, H. Chu, S.M. Rueter, L.K. Hutchinson, H. Canton, E. Sanders-Bush and R.B Emeson. Regulation of serotonin-2C receptor G-protein coupling by RNA editing. *Nature* **387**:303-308 (1997).
- 24 Roettger BF, D. Ghanekar, R. Rao, C. Toledo, J. Yingling, D. Pinon and L.J. Miller. Antagonist-stimulated internalization of the G protein-coupled cholecystokinin receptor. *Mol Pharmacol* **51**: 357-362 (1997).
- 25 Liu, Y.J., N.P Shankley, N. Welsh, and J.W. Black. Evidence that the apparent complexity of the receptor antagonism by angiotensin II analogues is due to a reversible and synaptic action. *Br. J. Pharmacol.* **106**:233-241 (1992).
- 26 De Chaffoy de Courcelles, D., J.E. Leysen, P. Roevens and H. Van Belle. The serotonin-S2 receptor: A receptor transducer coupling model to explain insurmountable antagonist effects. *Drug Dev. Research.* **8**:173-178 (1986).
- 27 Kaumann A.J. and M. Frenken. A paradox: the 5HT2-receptor antagonist ketanserin restores the 5HT-induced contraction depressed by methysergide in large coronary arteries of calf. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **328**:295-300 (1985).
- 28 Rhaleb, N-E., N. Rouissi, F. Nantel, P. D'orlean-Juste and D. Regoli. DuP 753 is a specific antagonist for the angiotensin receptor. *Hypertension* **17**,480-484 (1991).
- 29 Gallacher, D.C., LKL. Clark K.L. and M.J. Robertson M.J. title *Br. J. Pharmacol.* **107** (supp) 466p (1992).
- 30 Burns, L., K.L. Clark, J. Bradley, M.J. Robertson and A.J.L. Clark. Molecular cloning of the canine angiotensin II receptor. An AT1-like receptor with reduced affinity for DuP753. *FEBS lett.* **343**:146-150 (1994).
- 31 Robertson MJ, Barnes JC, Drew GM, Clark KL, Marshall FH, Michel A, Middlemiss D, Ross BC, Scopes D, Dowle MD. Pharmacological profile of GR117289 in vitro: a

novel, potent and specific non-peptide angiotensin AT1 receptor antagonist. *Br J Pharmacol* **107**: 1173-1180 (1992)

32 Bond, R.A., Ornstein, A.G. and Clarke, D.E. Unsurmountable antagonism to 5-hydroxytryptamine in rat kidney results from pseudoirreversible inhibition rather than multiple receptors or allosteric receptor modulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther* **249** (suppl 2):401-410 (1989).

33 Robertson M.J., I.G. Dougall, D. Harper, K.C.W. McKennie and P. Leff. Agonist-antagonist interactions at the angiotensin receptor :application of a two-state model. *Trend in Pharmacol. Sci.* **15**:364-368 (1994).

34 Pei G, Samama P, M. Lohse, M. Wang, J. Codina and R.J. Lefkowitz. A constitutively active mutant beta 2-adrenergic receptor is constitutively desensitized and phosphorylated. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **91**:2699-2702 (1994).

35 Westphal RS, J.R. Backstrom and E. Sanders-Bush. Increased basal phosphorylation of the constitutively active serotonin 2C receptor accompanies agonist-mediated desensitization. *Mol. Pharmacol.* **48**:200-205 (1995).

36 Chidiac P, S. Nouet and M. Bouvier. Agonist-induced modulation of inverse agonist efficacy at the beta 2-adrenergic receptor. *Mol. Pharmacol.* **50**: 662-669 (1996).

2. 0. 2. 3 Troisième article

Activité agoniste inverse et impact du précouplage fonctionnel sur les antagonistes du récepteur A_1 de l'adénosine.

Propriétés de liaison des agonistes inverses du récepteur A_1 de l'adénosine du rat exprimé en cellules CHO et Sf9: évidences de sensibilité des antagonistes au précouplage

Préambule

Puisque plusieurs antagonistes se révélèrent posséder des propriétés opposées à celles des agonistes (i. e. activité agoniste inverse), il semblait plausible que certains antagonistes pourraient aussi démontrer une sensibilité au découplage fonctionnel (traitement au GTP γ S) qui serait opposée à celle des agonistes. Cette observation avait été rapportée sans, toutefois, avoir été caractérisée dans plusieurs études du récepteur A_1 de l'adénosine (182, 183, 184, 185). Certaines de ces études suggéraient, sans adresser directement la question, que l'augmentation de la capacité de liaison des antagonistes A_1 , en présence de GTP γ S, était une indication de l'activité intrinsèque négative de ces ligands (¹⁷¹). Cette hypothèse suggérait que ces ligands étaient potentiellement des agonistes inverses, cependant, personne n'avait démontré directement cette activité. Par ailleurs, le raffinement du modèle mathématique ternaire de l'interaction récepteur/protéine G prédisait que la forme inactive du récepteur puisse interagir spontanément avec la protéine G sans générer une réponse. Cette prédisposition au précouplage serait importante pour les récepteurs couplés à G_i (⁹⁰⁻⁹⁵). Cette interprétation plus étendue du modèle ternaire permet de simuler certaines des propriétés inusitées (augmentation de liaison en présence de GTP γ S) des antagonistes A_1 . Les résultats de l'étude de coexpression en cellules Sf9 de protéines G exogènes et du récepteur A_1 de l'adénosine furent ainsi analysés et simulés selon une simplification mathématique du

modèle proposé par Weiss et *al* (⁹⁸) afin de démontrer l'importance du précouplage sur les propriétés des agonistes inverses. Cet article a été soumis pour publication dans *Molecular pharmacology* et est présentement sous révision complète.

Résumé du troisième article

Les analogues non hydrolysables du GTP comme le GTP γ S, sont reconnus comme affectant la propriété de liaison des agonistes des récepteurs couplés aux protéines G, alors que leurs effets sur les propriétés des antagonistes demeurent inconnus.

Dans cette étude, nous avons bénéficié du caractère modulaire du système d'expression baculovirus/cellules d'insectes Sf9 afin d'étudier les propriétés de liaison et de couplage du récepteur A₁ de l'adénosine de rat dans des expériences de coinfection. Les expériences ont été menées en parallèle chez les cellules CHO démontrant une expression stable et un niveau équivalent du récepteur A₁ (1-2 pmol/mg, liaison de [³H]DPCPX). Dans les expériences de saturation menées en cellules CHO, le B_{max} du [³H]DPCPX (antagoniste) fut augmenté d'une manière apparente par le GTP γ S alors que le récepteur A₁ exprimé seul en cellules Sf9 était insensible à ce traitement. Cependant, la sensibilité du [³H]DPCPX au GTP γ S fut rétablie chez les cellules Sf9 par l'expression combinée du récepteur A₁ et des sous-unités exogènes $\alpha_{i3}\beta_1\gamma_2$ des protéines G de mammifères.

L'influence de la présence ou de l'absence d'un couplage à la protéine G sur les propriétés de liaison des antagonistes fut examinée plus abondamment dans des expériences de compétition et de cinétique de liaison ainsi que par des tests fonctionnels (échange de [³⁵S]GTP[S] induit par l'activation du récepteur). L'analyse de la compétition entre le [³H]DPCPX et le DPCPX froid nous indique la présence d'un site de liaison de faible affinité sensible au GTP γ S (6.0 nM) et d'un site de haute affinité insensible au GTP γ S (0.5 nM). D'autre part, les analyses de cinétique de liaison démontrent que le taux de dissociation du [³H]DPCPX lié est diminué par le GTP γ S (0.1 min⁻¹ à 0.03 min⁻¹) suggérant une transition vers des sites de haute affinité en présence de GTP γ S.

Les propriétés fonctionnelles d'agoniste inverse du DPCPX ont été démontrées par l'habileté du composé à inhiber le niveau basal d'échange de [³⁵S]GTP[S] induit par le récepteur, uniquement pour les membranes des cellules CHO et des cellules Sf9 coinfectées avec des protéines G. La caractérisation pharmacologique de différents ligands démontre que XAC est aussi puissant et efficace que le DPCPX pour inhiber l'activité spontanée basale du récepteur (pEC₅₀ 7. 2-7. 6) alors que les agonistes CPA et RPIA étaient des agonistes absolus.

Nos résultats démontrent clairement que le DPCPX est un agoniste inverse du récepteur A₁ de l'adénosine. Par surcroît, de manière analogue aux agonistes, les activités des antagonistes A₁, telles que mesurées dans cette étude, suggèrent que leurs propriétés de liaison aux radioligands sont dépendantes de la présence de protéines G fonctionnelles. Cette observation suggère aussi que la forme inactive du récepteur peut vraisemblablement interagir avec la protéine G. La validité de cette hypothèse est démontrée mathématiquement à l'aide de la version complète du modèle à complexe ternaire étendu.

Inverse agonist binding properties of the rat A1 adenosine receptor in Sf9 and CHO cell membranes: Evidence of inverse agonist sensitivity to receptor pre-coupling.

Jean Labrecque^{1,2}, André DeLéan², Michael Dennis^{1,2} and Luc Ménard^{1*}

¹ BioSignal Inc. 1744 William St., Montréal, Québec, Canada, H3J 1R4.

² Department of Pharmacology, University of Montréal, B.P. 6128, Succ. Centre ville, Montréal, Quebec, Canada, H3C-3J7.

* To whom correspondence should be addressed. lménard@biosignal.com

This investigation was supported in part by the Medical Research Council of Canada (grants MT-11215 and MT-11582).

Running title: *Modulation of inverse agonist binding by G proteins on the A1 adenosine receptor.*

Key words: A1 adenosine receptor, co-expression, G protein-coupled receptor, baculovirus, inverse agonist, ternary model.

SUMMARY

Non-hydrolyzable GTP analogues, such as GTP γ S, are well known to affect agonist binding properties of G protein coupled receptors while their effect on antagonists remains largely uncharacterized. In this study, parallel experiments were conducted with CHO and Sf9 insect cells expressing equivalent levels of receptor. In saturation experiments using CHO cells, the Bmax of [3 H]DPCPX (antagonist) was increased by GTP γ S. The A1 receptor expressed alone in Sf9 cells was insensitive to this treatment; however, GTP γ S sensitivity of [3 H]DPCPX binding was restored by co-expression of G proteins subunits (G α_{i3} $\beta_1\gamma_2$). In homologous competition binding, two antagonist affinity sites were observed for DPCPX (6.0 nM and 0.5 nM, GTP γ S sensitive and insensitive, respectively). Kinetic analyses of [3 H]DPCPX also supported the existence of two affinity sites for antagonists. The functional activity of DPCPX, as well as other antagonists (XAC, CGS-15943) and agonists (CGA, CPA, R-PIA), was determined using [35 S]GTP[S] exchange in both expression systems. All the antagonists tested were found to be inverse agonists. Based on the properties of DPCPX, we propose that inactive A1 receptors exist as an uncoupled (R) and coupled forms (RG), and that inverse agonists interact preferentially with R (high affinity), as predicted by the fully extended ternary model used in this study to simulate the experimental data. Our results clearly demonstrate that G proteins can regulate the affinity of both agonists and antagonists and that the fully extended ternary complex model can be applied experimentally to understand the effects of agonists and inverse agonists on different receptor species.

INTRODUCTION

G protein-coupled receptors (GCRs) are heptahelical membrane receptors that upon agonist binding, will interact with and activate guanine nucleotide binding proteins (G proteins), which in turn will activate various effector molecules (1). In its simplest form, receptor activation is totally agonist-dependent, while antagonists possess no activity of their own and act by competing with agonists for receptor binding (2). The concept that antagonists lack activity has been recently challenged by the demonstration of spontaneous activity of GCRs, which has led to the proposal of the two state model where receptor could exist in active (R^*) and inactive conformations (R) (3). In the proposed paradigm, agonists preferentially bind and increase the proportion of the active form of the receptor (R^*). Antagonists are divided as inverse agonists and neutral antagonists (4). Inverse agonists bind and increase the level of the inactive receptor, which leads to a reduction in basal activity, while neutral antagonist, bind equally well to R and R^* without affecting basal receptor activity. Inverse agonists have been reported for adrenergic (3), serotonergic (5, 6), dopaminergic (7), muscarinic (8), histamine (9) and peptidergic receptors (10, 11).

The A1 adenosine receptor has been attracting considerable attention because of its use as a potential therapeutic target for the treatment of seizure disorder, for the development of neuroprotective agents and the treatment of asthma (12). The A1 adenosine receptor is expressed at high levels in the brain (16-17). Pharmacological studies of the A1 receptor have shown that activation of this receptor leads to inhibition of adenylate cyclase via a pertussis toxin sensitive G proteins (12). A functionally coupled A1 receptor possessing high affinity sites for agonists has been reconstituted *in vitro* using purified receptor and G proteins (G_o and G_i) (13, 14). Evidence that CPX had inverse agonist activity had been reported for that receptor using the human A1 receptor expressed in CHO cells (15). Several groups also reported an increase in antagonist binding level in the presence of non-hydrolysable GTP analogues (16, 17, 18, 19, 20) in both native and reconstituted systems.

In this study we took advantage of the modular nature of the baculovirus/Sf9 expression system to study the binding and functional properties of various A1 agonist and antagonists in relation with the presence or absence of exogenous G proteins. The A1 receptor was uncoupled when expressed alone in Sf9 cells. However, its coupling and pharmacological properties were properly restored by the co-expression of specific G proteins, showing that co-expression of receptor and G proteins in insect cells offers an easy and rapid method to restore fully functional receptors. As expected, all traditional A1 antagonists (DPCPX, XAC, CGS-15943) were found to be inverse agonists. Results from the saturation, competition and kinetic binding together with co-expression experiments demonstrate the existence of GTP γ S sensitive affinity sites for both agonist and inverse agonists, with the difference that GTP γ S promotes high affinity binding for antagonists and low affinity binding of agonists, strongly supporting the existence of inactive uncoupled (R) and inactive coupled receptors (RG). The experimental data could be simulated using a mathematical model derived from the extended ternary model proposed by Kenakin (21, 22). Results from the simulations confirmed that, in a highly pre-coupled system, inverse agonists decrease basal receptor activity by increasing the fraction of inactive uncoupled receptor (R). Conversely in this system, agonist do not affect the coupling state of the receptor (RG) but only interact with the coupled form (RG). Our results demonstrate that G proteins can regulate the affinity of both agonists and antagonists in a pre-coupled system and that the fully extended ternary complex model can be applied experimentally to understand the mechanism of action of agonists and inverse agonists.

MATERIALS AND METHODS

Materials. Buffer chemicals and protease inhibitors were purchased from Sigma (St-Louis, MO), and cell culture media was from Gibco/BRL (Bethesda, MD). Unlabeled ligands were purchased from Research Biochemicals International (Natick, MA) and [³H]DPCPX (109-120 Ci/mmol) and polyclonal antisera against G α i3, G α s and G β 1 were purchased from NEN (Wilmington, DE). Adenosine deaminase and unlabeled GTP γ S were purchased from Boehringer-Manheim Canada (Laval, PQ). Enhanced chemiluminescence detection kit (ECL) and [³⁵S]GTP γ S (1200 Ci/mmol) were from Amersham (Arlington Heights, IL). Antisera against the bovine G γ 2 subunit was from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Ca). Nitrocellulose membranes (0.45 μ m) were purchased from (Bio-Rad, Hercules CA). Kodak XAR-5 film was purchased from InterSciences (Markham, Ont).

METHODS

Generation of recombinant baculoviruses encoding for the rat A1 adenosine receptor and G protein subunits. The cDNA encoding for the rat A1 adenosine receptor was subcloned into the Stu1/Pst1 site of the pJVETLZMC plasmid from Invitrogen and recombinant baculovirus was produced and purified as previously described (23). Construction of the recombinant baculoviruses encoding for β galactosidase, rat G α i-3, rat G α s_{L-A}, human G β 1, bovine G γ 2 have been described previously (23, 24).

Cell culture and membrane preparation. Sf9 cells were grown in suspension at 27°C in Sf-900 II serum free medium as described previously (5). Co-infection with multiple viruses was achieved by simultaneous addition of different viral stock (MOI of 2/virus) to cells grown to a density 2 million cells/ml. The cells were collected by centrifugation 40-48 hours post infection (cell viability was between 60-70% as determined by Trypan blue exclusion) and membrane fractions were prepared and stored at -80°C as described

previously (5). The rat A1 adenosine receptor stably transfected into CHO-B3 cells was provided by Mahan et al. (25). The cells were grown in 850 cm² roller bottle in DMEM medium supplemented with 5% serum and gazed with 5% CO₂. CHO cells were detached using PBS- 5 mM EDTA, collected by centrifugation and used for membrane preparation. Protein concentrations were determined by the nitrocellulose amido black method and BSA as the standard (26).

Radioligand binding assays. Frozen membranes were thawed on ice and resuspended in binding buffer (50 mM Hepes, pH 7.4, 10 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 5 µg/ml leupeptine, 10 µg/ml aprotinin, 20 µg/ml benzamidine, 50 µg/ml TPCK, 50 µg/ml trypsin inhibitor). The membrane preparations were treated with 1 unit/ml of adenosine deaminase for 1 h at 30°C. The membranes (5 µg to 15µg/assay) were then incubated for 1 h at 27°C in a final volume of 540 µl for radioligand binding experiments. Saturation experiments were performed using 0.05 to 3nM [³H]DPCPX in the absence or presence of 50 µM GTPγS. Single point binding analysis were performed using 2 nM of [³H]DPCPX and competition binding experiments were performed using 0.5nM of [³H]DPCPX and varying concentrations of CPA or DPCPX. Non-specific binding was determined using 10 µM XAC. The amount of bound ligand was determined by rapid filtration over GF/B filters saturated with binding buffer containing 0.2% polyethylenimine. The filters were washed 3 times with 2 ml of binding buffer at 4°C. Bound radioactivity was measured by scintillation counting using a table top counter.

Kinetic of [³H]DPCPX binding. Membranes from Sf9 co-infected with A1 receptor and Gαi3β1γ2 subunits (5 µg to 15µg/assay) were pre-incubated for one hour at 30°C with adenosine deaminase (1 unit/ml) in the presence or absence of 1µM GTPγS. Membranes were equilibrated at 15°C for 10 min before [³H]DPCPX was added to a final concentration of 3nM. Samples were collected at different time points and the level of bound radioactivity was determined by rapid filtration as described above. In dissociation experiments, membranes were pre-treated with adenosine deaminase in the presence or

absence of $1\ \mu\text{M}$ $\text{GTP}\gamma\text{S}$ and they were incubated for an additional hour at 27°C with $10\ \text{nM}$ $[\text{}^3\text{H}]\text{DPCPX}$. Dissociation was initiated by 3000 fold dilution ($500\ \mu\text{l}$ into $1.5\ \text{liter}$) in binding buffer at 15°C and $50\ \text{ml}$ aliquots ($10\ \mu\text{g}$ of membranes) were taken at different time points. The amount of bound radioactivity was determined by rapid filtration over GF/B filter using a Millipore 90001 bucket. Samples were washed with 3 times $4\ \text{ml}$ of ice cold binding buffer (without adenosine deaminase). Bound radioactivity was measured on filters impregnated with universol Es liquid scintillant cocktail using a table top counter.

$[\text{}^{35}\text{S}]\text{GTP}[\text{S}]$ binding assays. Ligand stimulated binding of $[\text{}^{35}\text{S}]\text{GTP}[\text{S}]$ to membranes was measured by standard filtration over nitrocellulose filters as described previously (27). Membranes ($30\ \mu\text{g}/\text{assay}$) were resuspended in binding buffer and incubated for $1\ \text{h}$ at 30°C with $1\ \text{unit}/\text{ml}$ of adenosine deaminase. The reactions were started by the simultaneous addition of drugs (or vehicle) and $100\ \text{nM}$ GDP , $10\ \text{nM}$ $\text{GTP}\gamma\text{S}$, and $[\text{}^{35}\text{S}]\text{GTP}[\text{S}]$ ($1200\ \text{Ci}/\text{mmol}$) [$100000\ \text{CPM}/\text{assay}$]. Reaction were stopped after $30\ \text{minutes}$ by rapid filtration over nitrocellulose filters, the filters were washed 4 times with $2\ \text{ml}$ of ice cold binding buffer, and bound radioactivity was measured by scintillation counting as described above. Levels of stimulation or inhibition were calculated as a percent over basal after subtracting non-specific binding (determined using $10\ \mu\text{M}$ $\text{GTP}\gamma\text{S}$). The total level $\text{G}\alpha_{\text{i}3}$ protein expressed in the co-infection experiments was determined using $2\ \mu\text{M}$ $[\text{}^{35}\text{S}]\text{GTP}[\text{S}]$ (diluted isotopically to $120\ \text{Ci}/\text{mmole}$) and rapid filtration as described above for ligand stimulated $[\text{}^{35}\text{S}]\text{GTP}[\text{S}]$ exchange.

Western blot analysis. Membrane fractions from CHO-A1 and Sf9-A1 cells co-infected with different G proteins subunits ($20\ \mu\text{g}$ per sample) were resuspended in SDS sample buffer and proteins were denatured by boiling for $3\ \text{minutes}$. $\text{G}\alpha_{\text{i}3}$, $\text{G}\alpha_{\text{S}_{\text{L-A}}}$ and $\text{G}\beta_1$ were resolved on 11% or while $\text{G}\gamma_2$ was resolved on 17% polyacrylamide gels and the proteins were transferred onto nitrocellulose as described previously (23, 24). Nitrocellulose membranes were blocked with 3% non-fat dairy milk in TBS ($20\ \text{mM}$ Tris-HCl , pH 7.5 , and $150\ \text{mM}$ NaCl) for $2\ \text{hours}$ and then incubated overnight at 4°C with specific antisera

diluted at 1:2000 in TBS containing 1% milk. Nitrocellulose membranes were washed 3 times for 10 minutes with TBS-0.1%Tween-20 and incubated for 1 h at room temperature with horseradish peroxidase-conjugated anti rabbit IgG (diluted 1:2000 in TBS containing 1% milk). Membranes were washed as described above and the immunoreactive bands were detected by autoradiography using Kodak XAR-5 film.

Analysis of Data. Bmax, Kd and Ki were determined using Allfit software with single or two sites analyses. Scatchard transformation were generated using Graphpad Prizm Software. [³⁵S]GTP[S] dose-response assays were analyzed using a logistic four parameter square hyperbola equation with fix hill coefficient (AllFit and GraphPad) where $f(x) = \text{Bottom} + [(\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10 \text{LogEC50-X})]$, with $f(x)$ as 0% in the absence of added ligand and X the concentration of added drug. In Kinetic experiments, Kon were

calculated as $Kon = \frac{Kobs - Koff}{[Mol]}$ and Koff were calculated with a two phase

exponential decay were $f(x) = \text{Span1}e^{-K1X} + \text{Span2}e^{-K1X} + \text{plateau}$ or with a single phase

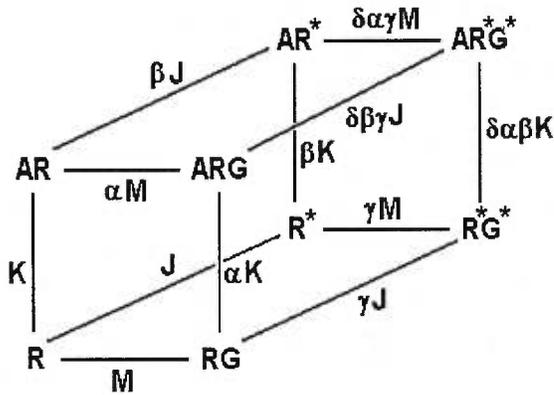
exponential decay were $f(x) = \text{Span1}e^{-K1X} + \text{plateau}$ (Graphpad), with a

$halflife = \frac{0.6932}{Koff}$ and $Kd = \frac{Koff}{Kon}$. Student's *t* test were performed using Excel

for Windows 95.

Fully Extended form of the ternary model. The extended ternary model as proposed by Kenakin (1, 21, 22) was used to simulate the spontaneous interaction between G protein and inactive forms of the receptor (R). In contrast with previous extended ternary models (28), this model accounts for the spontaneous interaction between inactive and active form of the receptor (R, R*) with G proteins. The pre-coupling constants are *M* for $R \leftrightarrow RG$ and γM for $R^* \leftrightarrow R^*G^*$. It should be noted that in this model the receptor and G protein activation are described as a concerted process R^*G^* . A constant δ was included to account for the synergistic effect of agonist binding and G protein coupling on receptor activation leading to the form AR^*G^* . The constants $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ and *J* all

contribute to determine the proportion of active receptor. The model is based on the following reactions:



$$J = \frac{R^*}{R} \quad \beta J = \frac{AR^*}{AR} \quad \gamma J = \frac{R^*G^*}{RG} \quad \delta\beta\gamma J = \frac{AR^*G^*}{ARG} \quad [1]$$

The constants M , J and γ are characteristic of the receptor while the constants α , β , δ and K depend on the agonist. The fully extended form of the ternary complex can be shown to be mathematically equivalent to the original form (2) provided the following equivalence for the free receptor R , the pre-coupling constant M , the efficiency factor α and the limiting affinity constants K_{min} and K_{max} :

$$R' = R + R^* = R \cdot (1 + J) \quad [2]$$

$$M' = M \left(\frac{1 + \gamma J}{1 + J} \right) \quad [3]$$

$$\alpha' = \alpha \left(\frac{1 + J}{1 + \beta J} \right) \left(\frac{1 + \delta\beta\gamma J}{1 + \gamma J} \right) \quad [4]$$

$$K'_{min} = K \left(\frac{1 + \beta J}{1 + J} \right) \quad [5]$$

$$K'_{\max} = \alpha K \left(\frac{1 + \delta \beta \gamma J}{1 + \gamma J} \right) = \alpha' \cdot K'_{\min} \quad [6]$$

From equation 3 it can be seen that the constants M , J and γ determine the level of receptor pre-coupling corresponding to parameter M' . Equation 5 indicates that the constants K , J and β determine the affinity of the agonist for the uncoupled form of the receptor characterized by the parameter K'_{\min} . The efficacy of the agonist in promoting receptor coupling is documented by equation 4 which is dependent on constants J , α , β , γ and δ . The amount C^* of active and coupled receptor (R^*G^* and AR^*G^*) is obtained by:

$$C^* = \left(\frac{\gamma J}{1 + \gamma J} \right) \cdot \left(\frac{M' \cdot G}{1 + M' \cdot G} \right) \cdot \left(\frac{1 + \delta \alpha \beta K F}{1 + K'_{app} \cdot F} \right) \cdot R \quad [7]$$

A dose-response curve of active and coupled receptor as a function of agonist concentration varies from C^*_{\min} in the absence of agonist:

$$C^*_{\min} = \left(\frac{\gamma J}{1 + \gamma J} \right) \cdot \left(\frac{M' \cdot G}{1 + M' \cdot G} \right) \cdot R \quad [8]$$

up to C^*_{\max} when agonist concentration reaches very high values:

$$C^*_{\max} = \left(\frac{\gamma J}{1 + \gamma J} \right) \cdot \left(\frac{M' \cdot G}{1 + M' \cdot G} \right) \cdot \left(\frac{\delta \alpha \beta K}{K'_{app}} \right) \cdot R \quad [9]$$

The potency (ED_{50}) of the agonist in promoting the coupled and active form C^* is approximated by:

$$ED_{50} = \frac{1}{K'_{app}} \quad [10]$$

Data analysis and simulations using the extended ternary complex model The total number of receptors was determined using Bmax values obtained by non-linear least

squares regression analysis on the binding isotherms using Allfit. G protein levels (G_{tot}) were determined by [35 S]GTP[S] as describe above. Estimates of agonists or inverse agonists potency were provided by the EC_{50} derived from the dose response curves. The parameters K_{min} , α , M and EC_{50} obtained by least squares curve fitting were used as estimates of the equivalent parameters K'_{min} , α' , M' and $1/K'_{app}$ for the extended form of the ternary complex model. The parameters α , β , γ , δ , J , M and K were then optimized by the solver function of Excel with the automatic scaling option. These seven parameters were adjusted in order to provide accurate estimates of the parameter values for K'_{min} , α' , M' and K'_{app} previously obtained by curve fitting using equations 3, 4, 5 and 8. The optimization function used was the sum of squared differences between the estimated and calculated values for K'_{min} , α' , M' and K'_{app} . Appropriateness of the selected values were tested by simulation of agonist binding and activation curves with the fully extended form of the ternary complex model.

RESULTS

Properties of the A1 receptor expressed in Sf9 and mammalian cells.

Several studies had suggested that non-hydrolysable analogues of GTP (e.g. GTP γ S) could increase antagonist binding on the A1 adenosine receptor (16-20). We took advantage of the limited coupling observed for several receptors and the modular nature of the Sf9-baculovirus (13) system to examine the pharmacological properties of the A1 adenosine receptor in the presence and absence of exogenous G proteins. First, saturation binding assays were performed using the antagonist [3 H]DPCPX in the presence or absence of 50 μ M GTP γ S. As shown in Figure 1A, GTP γ S did not affect antagonist binding on the receptor expressed alone in Sf9 cells; however, it increased by 2.2 fold the level of antagonist binding for the receptor co-expressed with G $\alpha_{i3}\beta_1\gamma_2$ (Table 1, Figure 1B). As shown in the inset of Figure 1B and Table 1, the effect of GTP γ S was to increase the level of DPCPX binding without apparently affecting its affinity. Partial increase of DPCPX binding by GTP γ S was also observed when the G α_i3 subunit was expressed alone; however, maximal effect required the expression of the G protein heterotrimer (data not shown). The behavior of the receptor co-expressed in Sf9 cells was very similar to the receptor expressed in mammalian cells (Figure 1C, Table 1), and GTP γ S increased antagonist binding levels by 1.5 fold from 0.78 to 1.22 pmol/mg protein without affecting the apparent affinity for ligand (0.39 vs 0.47 nM, Table 1). The results show that co-expression of the A1 receptor with the G protein subunits in Sf9 cells fully restores the GTP γ S sensitivity of antagonist binding and generates a receptor that mimics the receptor expressed in mammalian cells.

Competition binding assays. The lack of GTP γ S effect on the affinity of DPCPX in Sf9 and CHO cells was difficult to reconcile with the fully extended ternary complex model of receptor coupling (21, 22). A possible explanation was that saturation experiments did not enable the detection of low affinity sites for antagonist. To circumvent this problem, competition experiments were carefully performed using [3 H]DPCPX and CPA (agonist) or DPCPX (antagonist). Representative competition isotherms are shown in Figure 2 and

the data from three independent experiments are summarized in Table 2. The results indicate that two affinity sites can be observed for both agonist and antagonist in membranes prepared from CHO cells; 0.5 and 6 nM for DPCPX and 0.7 and 35 nM for CPA. GTP γ S had different effects on the binding of agonist and antagonist: it abolished low (6 nM) and high (0.7 nM) affinity binding for the antagonist and agonist, respectively. This is consistent with the notion that inactive receptors (R) can spontaneously interact with G proteins (RG), and that antagonists (i.e. inverse agonists) would bind preferentially to inactive uncoupled receptors (R).

Kinetic binding of [3 H]DPCPX. To further substantiate the competition data we examined the effect of GTP γ S on the kinetics of [3 H]DPCPX binding. Association and dissociation rates were measured using Sf9 membranes containing A1 receptor co-expressed with G $\alpha_{i3}\beta_1\gamma_2$ subunits. As can be seen in Figure 3A, the half life of [3 H]DPCPX association was 2.3 ± 0.2 min at 15 °C and was unaffected by 1 μ M GTP γ S. In contrast, GTP γ S affected the dissociation kinetic as shown in Figure 3B. The half life observed in the presence of 1 μ M GTP γ S (23 ± 2 min, $K_{off} = 0.03$ min $^{-1}$) was different from the two half lives measured in the absence of GTP γ S (14 ± 2 min, $K_{off} = 0.048$ min $^{-1}$ or 2 ± 1 min, $K_{off} = 0.38$ min $^{-1}$). This effect was not observed in membranes from Sf9 cells expressing only A1 adenosine receptors (K_{off} of 28 ± 3 min $^{-1}$, data not shown). Using these K_{on} and K_{off} , K_d values of 0.30 nM \pm 0.15 (GTP γ S treated), and 0.70 nM \pm 0.12 and 6.09 nM \pm 0.30 (GTP γ S untreated) were obtained. These K_d s are very similar to the K_d s obtained in competition experiments with unlabeled DPCPX (0.5 nM \pm 0.1 and 6.0 nM \pm 0.7 , Table 2). The results demonstrate that GTP γ S converts a mixed population of receptor towards a single class of receptor with high affinity for DPCPX, further supporting the existence of R and RG forms of the receptor.

Functional coupling of the A1 receptor to G proteins. The sensitivity of antagonist binding to GTP γ S suggested that DPCPX might have inverse agonist properties. This prompted us to fully characterize the effect of various agonists and antagonists at promoting nucleotide exchange on G protein. The experiments were performed with two

agonists (CPA, RPIA) and two antagonists (XAC, DPCPX). As shown in Figure. 4A, maximal effect of agonist on [³⁵S]GTP[S] binding was observed after 30 min of incubation. The A1 receptor expressed in CHO cells was compared with the receptor expressed alone in Sf9 cells or in the presence of $\alpha i3\beta 1\gamma 2$ or $\alpha s_{L-A}\beta 1\gamma 2$ (negative control). Expression levels for the A1 receptors measured with DPCPX in the presence of GTP γ S were similar in all four conditions and DPCPX binding was only affected by GTP γ S for the receptor expressed in CHO or co-expressed with $G\alpha i3\beta 1\gamma 2$ (data not shown). As shown in Figure 4B for the receptor expressed in CHO cells or co-expressed with $\alpha i3\beta 1\gamma 2$, both agonists were able to stimulate a robust [³⁵S]GTP[S] exchange on G protein, while the two antagonists were found to inhibit the exchange, showing that they have inverse agonist activity. No significant exchange was observed for the receptor expressed alone or in the presence of $G\alpha s_{L-A}\beta 1\gamma 2$. The absence of exchange observed with $G\alpha s_{L-A}\beta 1\gamma 2$ was not due to the lack of expression of the subunits since these were expressed as revealed by Western blot analysis (data not shown). Moreover, in these assays, it is very unlikely that the inverse agonist activity observed for both compounds was caused by the release on contaminating adenosine as suggested by Prater et al. (29), since high concentrations of adenosine deaminase were included throughout the assays (30).

Ability of different agonists and antagonists to modulate GTP γ S binding on the A1 receptor. The activity of various agonists and antagonists to promote [³⁵S]GTP[S] exchange was compared for the receptor expressed in CHO cells or co-expressed with G proteins subunits in Sf9 cells. Typical dose-response curves are presented in Figure 5 and the data are summarized in Table 3. The three agonists that were tested (CHA, CPA and RPIA) had similar potencies in both systems (pEC₅₀ 7.2-7.6). However, agonist efficacy was slightly better in Sf9 cells, especially for CHA which behaved as a full agonist in Sf9 cells and as a partial agonist in CHO cells.

The four antagonists that were tested showed inverse agonist activity to varying levels. The potency and efficacy of XAC and DPCPX were very similar in both systems; however, CGS-15943 was more potent and efficacious in Sf9 cells than in CHO cells

(pEC50 of 7.44 vs 6.51, respectively and Emax -23.4 vs -4.2%, respectively) while 8-(3-Chloro-caffeine had very little effect on GTP γ S exchange in Sf9 cells (pEC50 > 5.0, Emax -11.2 %). The ability of DPCPX to reduce basal level of spontaneous receptor activation strongly suggest that this compound preferentially binds to inactive uncoupled receptors (R) consistent with the properties of an inverse agonist ligand.

Discussion

The A1 adenosine receptor is naturally expressed at high levels in the brain (1-3 pmol/mg protein; 17-18). Several reports have demonstrated that the receptor possessed a high basal activity (15), could be associated with G proteins in the absence of ligand (15, 16, 31), and that incubation of membranes preparations (15) or purified receptors (16) with antagonists (XAC, CPX) led to a decrease in basal GTP γ S exchange and modulation of the number of antagonists binding sites (15, 16). These findings suggested that A1 antagonists were inverse agonists and that their binding properties could be modulated by G proteins. Based on the ternary model of GCR coupling, agonists, as well as inverse agonists, would be expected to have high and low, G protein modulated affinity sites. Although two affinity sites have been reported for several agonists which interact with the A1 receptor, two affinity sites for inverse agonists have never been reported for this receptor.

In this study, we determined the effects of G proteins on the affinities of agonists and antagonists. Instead of using an in vitro reconstitution approach using purified G proteins and receptor, we used the baculovirus/Sf9 expression system to selectively add G proteins subunits. This system has enabled us to rapidly and efficiently study the effects of G proteins on ligand-receptor interactions, without having to go through the lengthy purification and reconstitution procedures. Our results demonstrate that, as predicted from the ternary model, inverse agonists, like agonists, possess two affinity states that can be modulated by G proteins. Modelization of the pharmacological properties of agonists and antagonists has revealed that, in a highly pre-coupled system, inverse agonist will directly affect the coupling state of the receptor (converting RG to R), while agonists interact with the coupled-form without affecting the coupling state of the receptor (no conversion of R to R*G).

The A1 adenosine receptor is coupled to the inhibition of adenylyl cyclase via pertussis toxin sensitive G proteins (11). Biochemical analyses of the coupling specificity of the

receptor using purified receptor and G protein subunits using in vitro reconstitution experiments has revealed that the receptor preferentially couples to G α i3 subunit (14). As reported for the human A1 receptor expressed in CHO cells (15) or for purified bovine A1 receptor reconstituted in vitro (14), CPX and XAC behaved as inverse agonists on the rat A1 receptor expressed in CHO cells or co-expressed with G α i3 β 1 γ 2 in Sf9 cells using the baculovirus expression system (Figure 4). As expected, observation of the inverse agonist activity required the expression of the appropriate G α subunit, since no activity was measured for the receptor in the absence of co-expressed G protein or when G α s was substituted for G α i3 (Figure 4) (13, 14). This suggested that the A1 receptor does not interact efficiently with the endogenous G proteins present in insect cells, and shows that the predicted coupling specificity are efficiently recreated in the co-expression experiments.

Pharmacological characterization of different agonists (CPA, CHA, R-PIA) in both expression systems gave similar pharmacological profile, except for CHA that was less efficacious in the mammalian system. As reported for endogenous receptors, CPA was found to be the most potent and efficacious agonist in both systems, followed by CHA and R-PIA (27). The potencies and efficacies of XAC and CPX were found to be similar in both expression systems (pEC₅₀ 7.2 7.6, Table 3, Figure 5), except for CGS-15943 that was less potent and efficacious in the mammalian expression system. The difference in efficacy of observed for CHA and efficacy and potency observed for CGS-15943 in the mammalian expression system might suggest that these compounds interact preferentially with G α i3, and that G α i3 proteins are limiting in CHO cells. This possibility is in agreement with the reported 8 fold lower levels of G α i3 protein compare to G α i2 in CHO cells (32). These interesting findings raise the possibility that the pharmacology of specific compounds would be affected by the specific subset of G protein interacting with the receptor. As shown in this study, such an hypothesis can be easily and rapidly tested in Sf9 cells by selectively expressing different G protein subunits. Experiments aiming at verifying that possibility are currently underway.

The effect of inverse agonists on the basal activity of GCRs can be explained by the fully extended ternary model developed by Kenakin (21, 22). In this model, receptors exist as active (R^*) and inactive forms (R). As it is the case for the isomerization between R and R^* , the receptor may also spontaneously interact with its cognate G proteins in absence of agonist (A), which leads to the formation of eight different species (R , AR , R^* , AR^* , RG , ARG , R^*G^* , AR^*G^* , see Table 4 and Methods section). According to the model, agonists interact preferentially with the active forms of the receptor (R^* and R^*G^*), while inverse agonists interact with the inactive forms (R and RG). The fully extended ternary model was preferred to the allosteric model proposed by Samama et al. (28), because the latter model predicts that all coupled receptors were necessarily active, leaving no opportunity for agonists to further activate the receptor in the case of spontaneous pre-coupling. Since both agonists and inverse agonists interact with two forms of the receptor (coupled and non coupled), both of these classes of ligands would be expected to have two affinity sites, that should reflect the coupling state of the receptor (i.e. interaction with G proteins). Although two affinity states are commonly found for A1 agonists (33) presumably R^* (low affinity) and R^*G^* (high affinity), the presence of two affinity states for inverse agonist (i.e. R , high affinity and RG , low affinity) had never been reported for the A1 receptor (13). However, reports showing $GTP\gamma S$ sensitivity of antagonist binding had been reported for the CB1 cannabinoid (34), 5HT-2C serotonin, (35), D2 dopamine (36), muscarinic (37) and delta opioid (11) receptors.

Low and high, $GTP\gamma S$ sensitive affinity states were observed for CPA in competition experiments with [3H]DPCPX (Figure 2, Table 3). As predicted for an inverse agonist by the fully extended ternary model, we also observed two affinity states for DPCPX in competition experiments (Figure 2, Table 3). These two affinity states were only observed in the presence of G protein (CHO cells or co-expression in Sf9 cells), while single, $GTP\gamma S$ insensitive states were observed with the receptor expressed alone in Sf9 cells. In contrast to its effect on agonist binding, $GTP\gamma S$ abolished the low affinity state for the inverse agonist DPCPX (RG). This effect was only observed in the competition and kinetic binding experiments, but not in the saturation experiments as observed by

others (16-20). The failure to detect two affinity sites in saturation experiments can be attributed to the technical limitation of the assay, since concentrations of radioligand required to saturate the low affinity site (60 nM) could not be achieved experimentally. Since only high affinity sites were measured in the saturation experiments, no increase in affinity was observed in parallel with the apparent increase in B_{max} resulting from GTP γ S treatments (Figure 1, Table 1).

The second line of evidence supporting two affinity states for the inverse agonist DPCPX came from the kinetic experiments (Figure 2). GTP γ S did not effect the on rate for DPCPX. However, the off rate of DPCPX was biphasic in the absence of GTP γ S, suggesting two affinity states. In the presence of GTP γ S, the biphasic decay was converted to a slower monophasic exponential decay, supporting the conversion of low to high affinity binding states. Calculation of the relative affinity states using competition and kinetic binding experiments gave very similar high and low K_d s (0.4, 6.0 nM in competition; 0.8, 6.0 nM in kinetic studies). Taken together, our data clearly demonstrate that DPCPX is an inverse agonist. Based on the fully extended ternary complex model, we would like to propose that DPCPX (or any other inverse agonist) binds with high and low affinity to the uncoupled and coupled forms the receptor, R and RG, respectively.

In order to test mathematically the validity of this proposal and to further analyze the level of each receptor complex, we used the experimental data presented in Tables 1-3 for the receptor expressed in CHO cells to calculate the different constants (see the legend of Figure 6 and Table 4 for the values). G protein concentration was calculated based on the summation of ligand-independent (estimated from DPCPX inhibition) and agonist-stimulated GTP γ S exchange instead of the absolute amount of G α i3 present, since the former was believed to better represent the G protein population which interacts with the receptor. G protein concentration gave a ratio of receptor over G protein > 1 , which is similar to the ratio used by Costa et al (38) in their thermodynamic interpretation of inverse agonist activity.

The values were used to simulate the saturation, competition and functional coupling for both an agonist (CPA) and an inverse agonist (DPCPX). The results of the simulations are presented in Figure 6: saturation with DPCPX (Fig. 6A); homologous or heterologous competition between [³H]DPCPX and DPCPX or CPA (Figure 6B and 6C), and stimulation of GTP γ S exchange by both ligands (Figure 6D). Comparison of the modeled results with the experimental results show a perfect correlation between both sets of curves, suggesting the appropriateness of the model to explain the results (simulation for the receptor co-expressed in Sf9 cells were also performed and correlated perfectly with the experimental results, data not shown). Analysis of the proportion of each of the eight individual species calculated from the different simulations is presented in Table 4 in the absence of ligand, with saturating concentrations (1 μ M) of agonist and inverse agonist, and with 2 nM DPCPX in the presence and absence of GTP γ S (to demonstrate the effect of coupling on DPCPX binding in saturation assays). Three important features of the system are revealed by those analyses: 1- the basal level of coupling is high, since almost equal levels of coupled and uncoupled inactive receptors are present (RG = 41%; R = 44 %), and 15% of the total receptor population is spontaneously active (R*G*, basal activity); 2- the binding of saturating concentrations of agonist (1 μ M) does not greatly increase the proportion of coupled receptor (56 to 60 %, ARG + AR*G*), but increases the level of active coupled forms (15% R*G* to 48% AR*G*); 3- the binding of saturating concentrations of DPCPX (1 μ M, an inverse agonist) decreased the proportion of coupled forms (from 56% RG + R*G* to 14% ARG) and concomitantly increased (doubled) the proportion of uncoupled forms (from 44% R to 86% AR). Under non saturating concentrations of DPCPX (2 nM), the ligand interacts preferentially with the uncoupled form of the receptor (AR) and very little with the coupled form (RG, 1.5%), addition of GTP γ S increased the population of uncoupled receptor (from 38 to 74%), which would translate in an apparent increase in Bmax in saturation experiments as described in Figure 1. The results presented in Table 4 clearly illustrate the properties of different ligands in a highly pre-coupled receptor system: the agonist will predominantly promote the isomerization-activation of the receptor by interacting with the coupled forms (RG, R*G*), while the inverse agonist will promote

both inactivation and receptor uncoupling, decreasing the level of coupled receptor (RG, R*G*).

In summary, the A1 adenosine receptor is strongly pre-coupled to G proteins. Results from saturation, competition and kinetic studies of ligand binding in mammalian and insect cells in the presence and absence of GTP γ S support the existence of an inactive RG forms of the receptor. All of the antagonists tested in this study (DPCPX, XAC, CGS-15943) were found to be inverse agonists and therefore decrease the basal activity of the receptor. In agreement with the theoretical model developed by Kenakin (21, 22), the experimental and simulated data strongly supports the existence of two affinity states for both agonists and antagonists, states that can be modulated by GTP γ S in a pre-coupled receptor system. Our results demonstrate the usefulness of the mathematical model to enable the rapid estimation of the different receptor population under any ligand conditions, therefore providing quantitative information about the effects of agonists and antagonists of specific receptor populations. Our results also demonstrate that co-expression of receptors and G proteins using the baculovirus/Sf9 expression system easily mimics the mammalian expression system, with the added advantages of offering a system that possess low basal activity and offers the possibility of expressing specific G proteins over a very low level of endogenous expression. Such a system might prove to be very useful to rapidly study the effect of numerous combinations $\alpha\beta\gamma$ subunits on the pharmacological properties of different receptors.

TABLE 1

Binding of [³H]DPCPX to membranes from CHO and Sf9 cells expressing the rat A1 adenosine receptor.

	KD ± SEM (nM) ^a	Bmax ± SEM (pmol/mg)
CHO-A1	0.39 ± 0.10	0.78 ± 0.06
CHO-A1 + 50 μM GTPγS	0.47 ± 0.21	1.22 ± 0.05
Sf9-A1 βgal	0.51 ± 0.13	0.85 ± 0.05 ^b
Sf9-A1 βgal + 50 μM GTPγS	0.60 ± 0.26	0.84 ± 0.07 ^b
Sf9-A1 α ₁₃ β ₁ γ ₂	0.49 ± 0.27	1.03 ± 0.30
Sf9-A1 α ₁₃ β ₁ γ ₂ + 50 μM GTPγS	0.50 ± 0.10	2.27 ± 0.24

^a Student *t* test performed ($\alpha=0.05$) failed to demonstrate difference in mean values between control and GTPγS membranes.^b Student *t* test performed ($\alpha=0.05$) failed to demonstrate difference in mean values between control and GTPγS membranes from Sf9-βgalactosidase

TABLE 2

Competition binding for DPCPX and CPA with [³H]DPCPX to CHO membranes expressing the rat A1 adenosine receptor.

	$K_H \pm \text{SEM}$ (nM)	$K_L \pm \text{SEM}$ (nM)	$B_{\text{max}L}/B_{\text{max}H}$	Hill
^a DPCPX	0.50 ± 0.10	6.00 ± 0.70	0.55	0.80 ± 0.05
^a DPCPX + 50 μM GTPγS	0.50 ± 0.10	-	-	0.97 ± 0.03
^b CPA	0.70 ± 0.10	35.00 ± 5.00	0.75	0.41 ± 0.05
^b CPA + 50 μM GTPγS	-	30.00 ± 3.00	-	0.98 ± 0.04

^a Student's *t* test performed ($\alpha=0.05$) failed to demonstrate difference in mean values between control K_H (high) and GTPγS treated membranes.

^b Student's *t* test performed ($\alpha=0.05$) failed to demonstrate difference in mean values between control K_L (low) and GTPγS membranes from SF9-βgal.

TABLE 3

GTPγS binding results from membranes of CHO-A1 and Sf9-A1 receptor co-expressed with rat $\alpha_{13}\beta_1\gamma_2$ G proteins subunits.

Drugs	CHO-A1 membranes		Sf9-A1 $\alpha_{13}\beta_1\gamma_2$ membranes	
	pEC ₅₀	E _{max} ^a (% of basal)	pEC ₅₀	E _{max} ^a (% of basal)
CHA	7.40 ± 0.17	9.8 ± 4.2	7.36 ± 0.12	83.2 ± 10.0
CPA	7.34 ± 0.14	47.7 ± 6.8	7.60 ± 0.09	95.6 ± 8.1
RPIA	7.31 ± 0.16	38.0 ± 9.1	7.17 ± 0.24	63.4 ± 12.5
DPCPX	7.71 ± 0.23	-22.0 ± 3.1	7.62 ± 0.08	-29.8 ± 4.2
XAC	7.65 ± 0.13	-15.8 ± 9.0	7.23 ± 0.19	-39.0 ± 3.0
CGS-15943	6.51 ± 0.11	-4.2 ± 3.1	7.44 ± 0.20	-23.4 ± 7.1
8-(3-Chlorostyryl) caffeine ^b	nd	nd	>5.00	-11.2 ± 6.1

^a Values are calculated as % stimulation over basal treated conditions and inhibition are reported as negative values. ^b Values estimated with single concentration of 8-(3-Chlorostyryl) caffeine.

TABLE 4

Ratio of the different A1 Receptor isoforms in CHO cells according to simulations performed with the fully extended ternary model.

^a Simulations (ligands)	A1 receptor isoforms (% of the total receptor binding states)											
	Uncoupled					Coupled						
	R	AR	inactive	active	R*	AR*	RG	inactive	active	ARG	^b R*G*	^b AR*G*
Vehicle	44.0	-	-	-	-	-	41.0	-	-	-	14.7	-
1 μ M CPA	-	39.5	-	0.13	-	-	-	11.8	-	-	-	48.0
1 μ M DPCPX	0.5	86.1	-	-	-	-	-	13.8	-	-	-	-
^c 2nM DPCPX	13.3	38.1	-	-	-	-	34.6	1.5	12.4	-	-	-
^c 2nM DPCPX+GTP γ S	25.9	74.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

a) Simulations are also reported in Figure 6 based on the following parameters of the fully extended Ternary Complex Model : R_{tot} = 2×10^{11} mol/liter, G_{tot} = 1.2×10^{11} mol/liter, J* = 5.74×10^{-4} , M = 1×10^{12} liter/mole, α = 0.015 (DPCPX); 9.21 (CPA), β = 0,01 (DPCPX); 6.0 (CPA), δ = 1.87, γ = 639, k_{ar} = $k_{dar}^{-1} \times 1.5 \times 10^9$ liter/mole (DPCPX); 8×10^6 liter/mole (CPA).. b) R*G* and AR*G* forms correspond to the basal and the ligand-dependent activation of [³⁵S]GTP[S] exchange, respectively. c) DPCPX bound A1 receptor isoforms after simulations under maximal concentration of antagonist reported for saturation experiments in figure 1, where GTP γ S treatment is simulated by M < 1 liter/mole). - : residual states (less than 0.5% of total states).

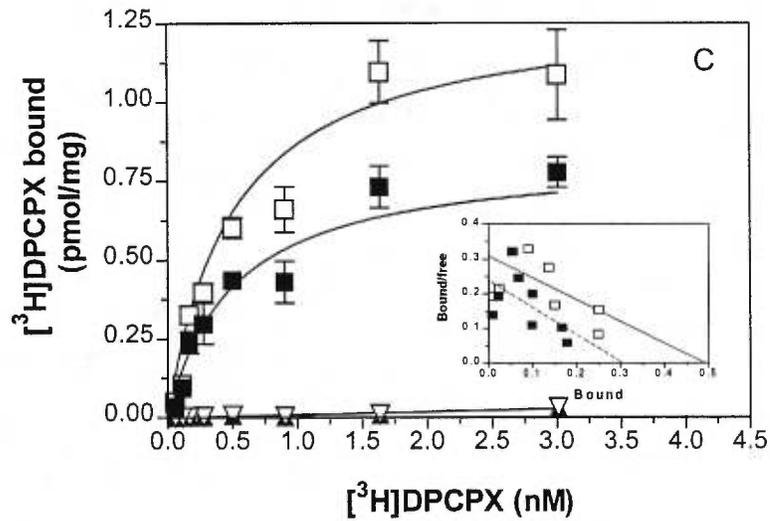
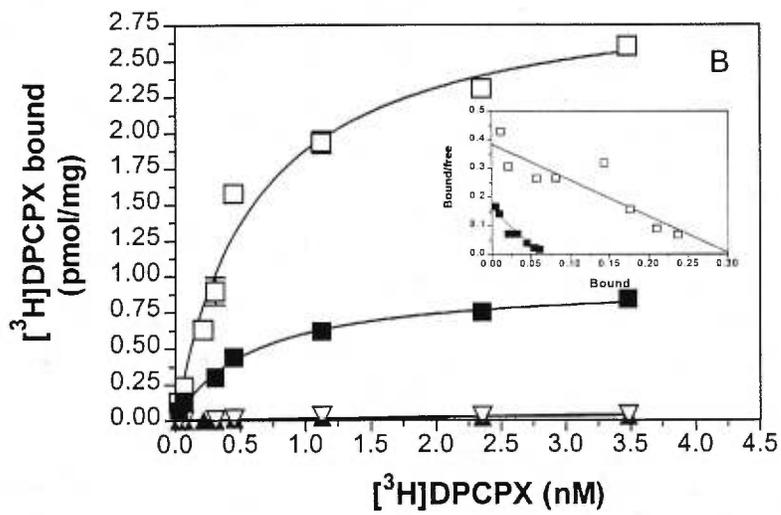
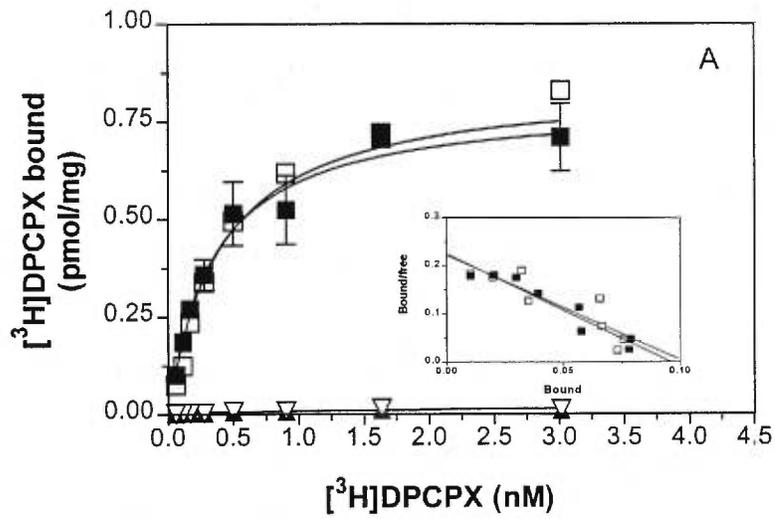


Figure.1 Effect of GTP γ S on [3 H]DPCPX binding on membranes from CHO-A1 cells and Sf9 cells. Membranes fractions were prepared from CHO cells stably expressing the A1 receptor or from Sf9 cells infected with A1 AR baculovirus together with viruses encoding ($\alpha_{i3} + \beta_1 + \gamma_2$) G protein subunits or β galactosidase virus (control). All membranes were pretreated for 1 h with 1 unit/ml of adenosine deaminase before incubation with 50 μ M GTP γ S (white squares and triangle) or vehicle (black squares and triangle) followed by binding using increasing concentrations of [3 H]DPCPX (see Methods Section). Total binding were represented as squares and non-specific (1 μ M XAC \pm GTP γ S) as triangles. Panel A: Sf9 cells infected with A1 receptors and β gal virus; Panel B: Sf9 cells infected with the A1 receptors and $\alpha_{i3}\beta_1\gamma_2$; Panel C: membranes from CHO cells. Saturation binding data and scatchard transformed binding isotherm (*inset*) from representative experiments are shown. The values represent mean \pm standard error from triplicates.

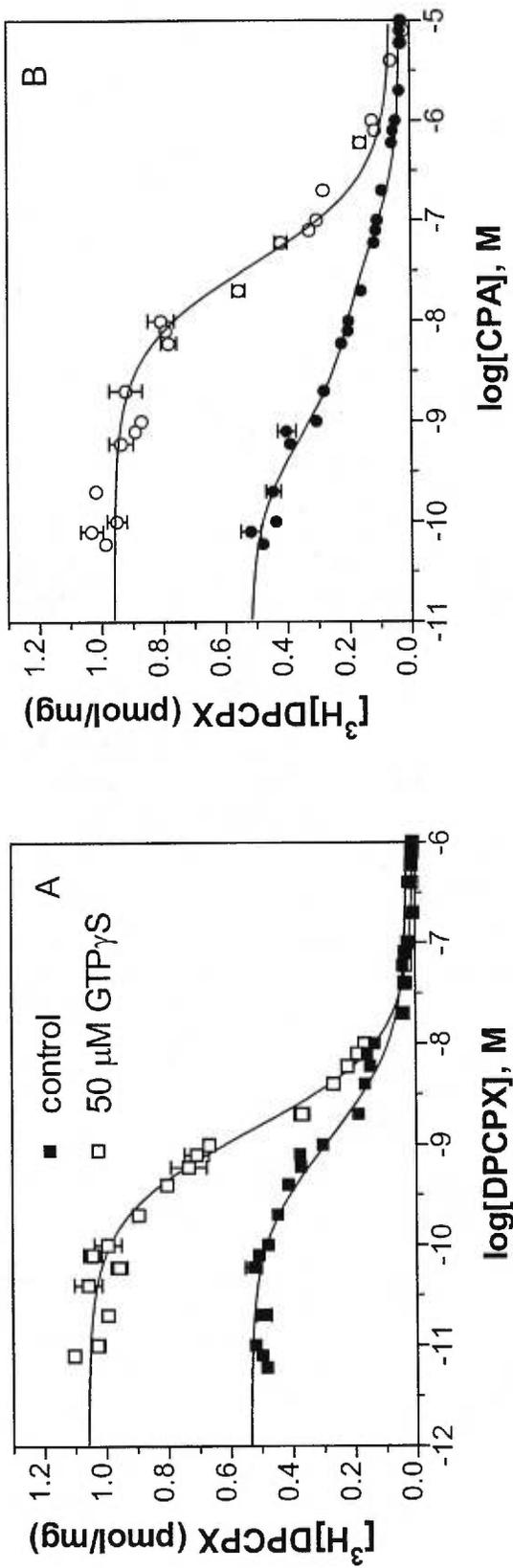


Figure 2. Competition binding experiments between $[^3\text{H}]\text{DPCPX}$ and DPCPX or CPA . Membranes from CHO-A1 cells were incubated with 0.5 nM $[^3\text{H}]\text{DPCPX}$ in the absence (black square) or in the presence of 50 μM $\text{GTP}\gamma\text{S}$ (white square). Data represent specific levels of $[^3\text{H}]\text{DPCPX}$ bound in the presence of varying concentration of unlabeled DPCPX (panel A) and CPA (panel B). Non specific binding was determined using 1 μM XAC. Curve fitting was performed using AllFit for windows software (Deléan).

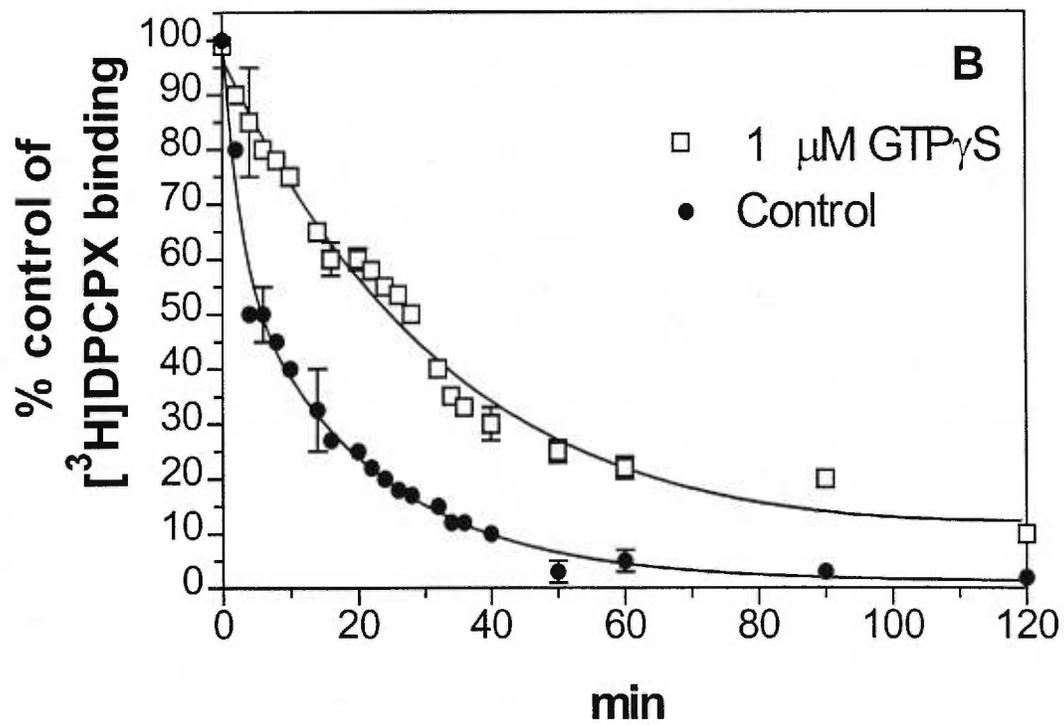
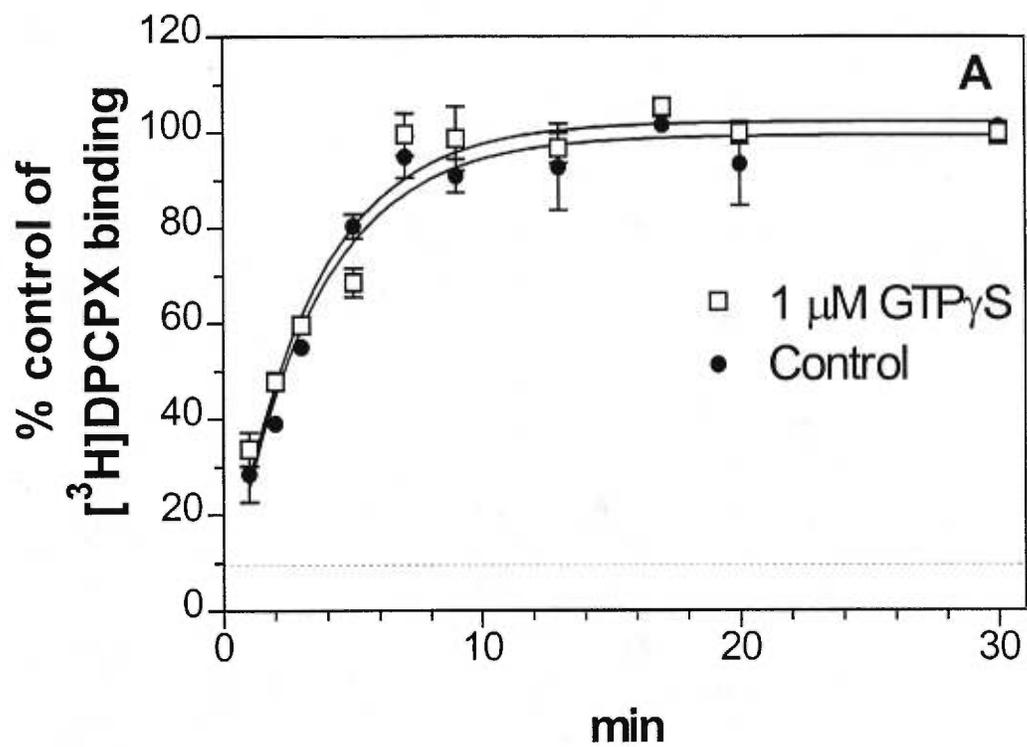


Figure 3. Association and dissociation kinetic for the binding of [³H]DPCPX on membranes from Sf9 cells infected with A1 receptors and $\alpha_{i3}\beta_1\gamma_2$ subunits. All assays reported are performed on membranes pre-treated with 1 units/ml of adenosine deaminase in absence (black circle) or presence of 1 μ M GTP γ S (white square) as described in methods. Data represent level [³H]DPCPX binding normalized as % of maximal binding. Panel A: Total [³H]DPCPX binding (3 nM) from association isotherm and non specific (1 μ M XAC, dotted line) for a representative experiment performed at 15 °C. Curves are plotted using a one phase exponential association equation (Prism, software) and display a half life of 2.3 ± 0.2 min. Panel B: [³H]DPCPX dissociation isotherm from a representative experiment performed at 15 °C. Curves are plotted using a two phase exponential decay equations with half life estimate and K_{off} for Sf9-A1 $\alpha_{i3}\beta_1\gamma_2$ were 23 ± 2 min ($K_{off} = 0.03 \text{ min}^{-1}$) in presence of 1 μ M GTP γ S and 14 ± 2 min ($K_{off} = 0.048 \text{ min}^{-1}$) or 2 ± 1 min ($K_{off} = 0.38 \text{ min}^{-1}$) in control. Results from the calculation of Kd estimate was $0.30 \text{ nM} \pm 0.10$ for GTP γ S treated membranes and $0.76 \text{ nM} \pm 0.12$ or $6.09 \text{ nM} \pm 0.30$ for control (two component).

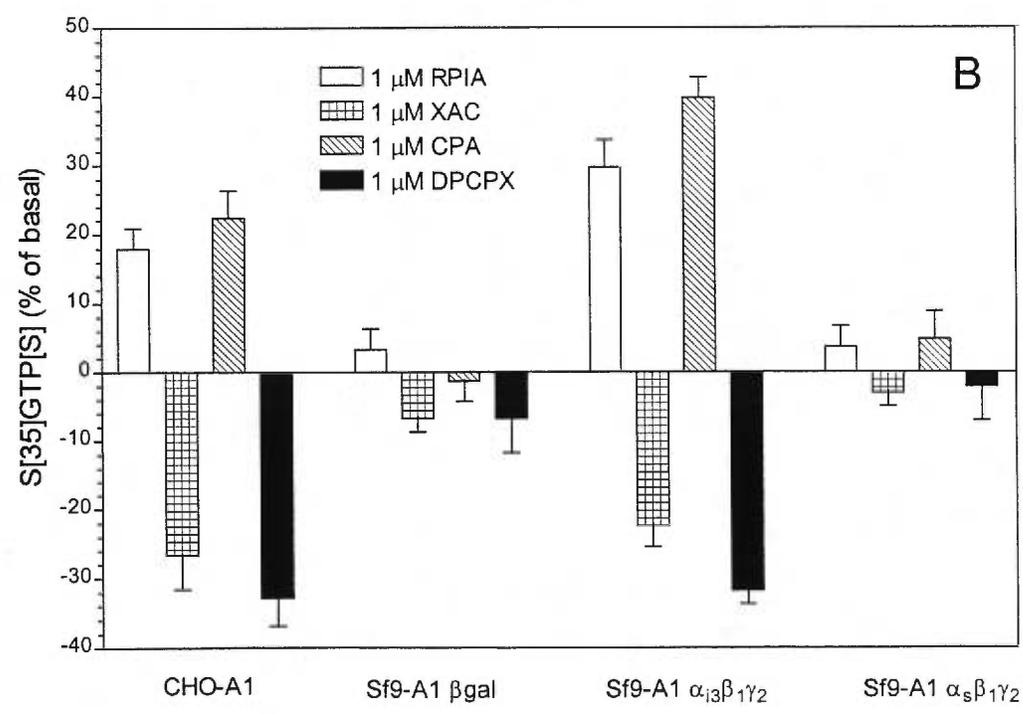
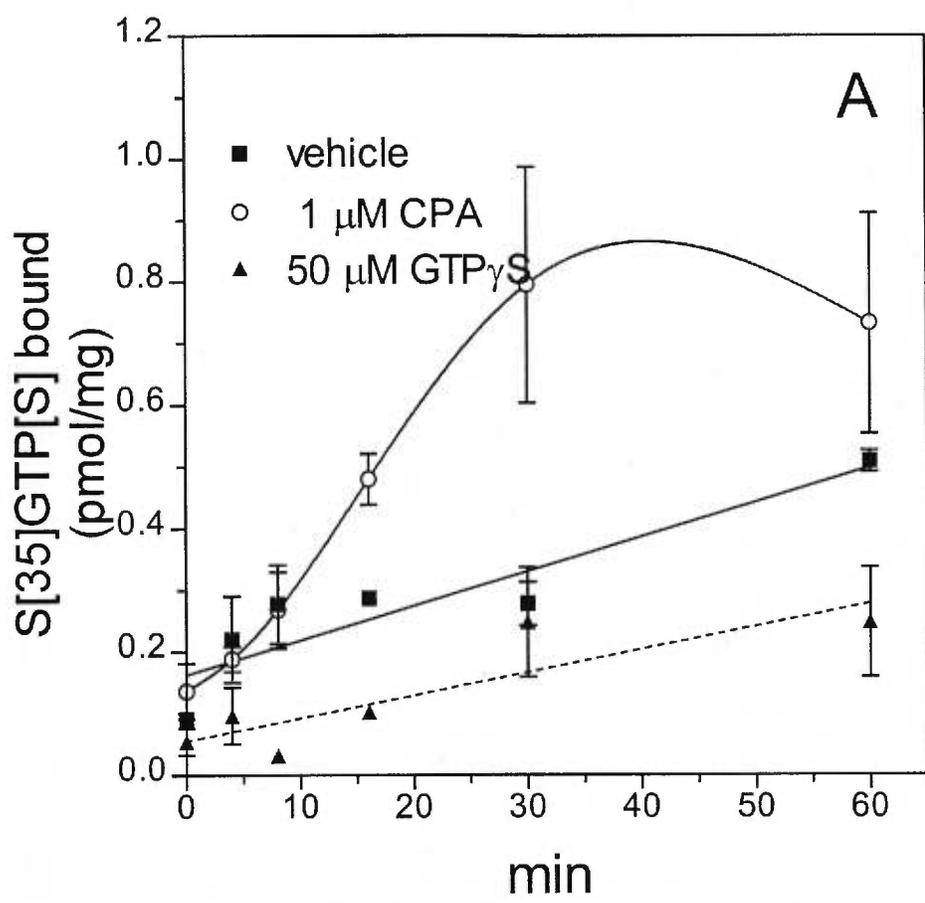


Figure 4. Functional coupling of the A1 adenosine receptor co-expressed in Sf9 cells with various G proteins or in CHO cells. Membranes were prepared from receptor expressed in CHO cells or co-expressed in Sf9 cells with β galactosidase, $\alpha_{i3}\beta_1\gamma_2$ or $\alpha_s\beta_1\gamma_2$. Panel A: Time course of agonist stimulated [35 S]GTP[S] binding to Sf9-A1 co-expressed with $\alpha_{i3}\beta_1\gamma_2$ membranes stimulated with 1 μ M CPA. Basal activity was measured in the absence of agonist and non-specific binding was determined as described in methods. Panel B, Effect of different agonists and antagonists on [35 S]GTP[S] binding. Membranes preparations were incubated with 1 μ M concentration of drug and the specific increase in GTP γ S binding was determined. Results were scaled taking the level of IPs measured in the absence of added ligand as 0%. Basal levels of [35 S]GTP[S] binding were (DPMs): CHO-A1 (2500 ± 122), Sf9-A1 β gal (1500 ± 55), Sf9-A1 $\alpha_{i3}\beta_1\gamma_2$ (3000 ± 78) and Sf9-A1 $\alpha_s\beta_1\gamma_2$ (2100 ± 111).

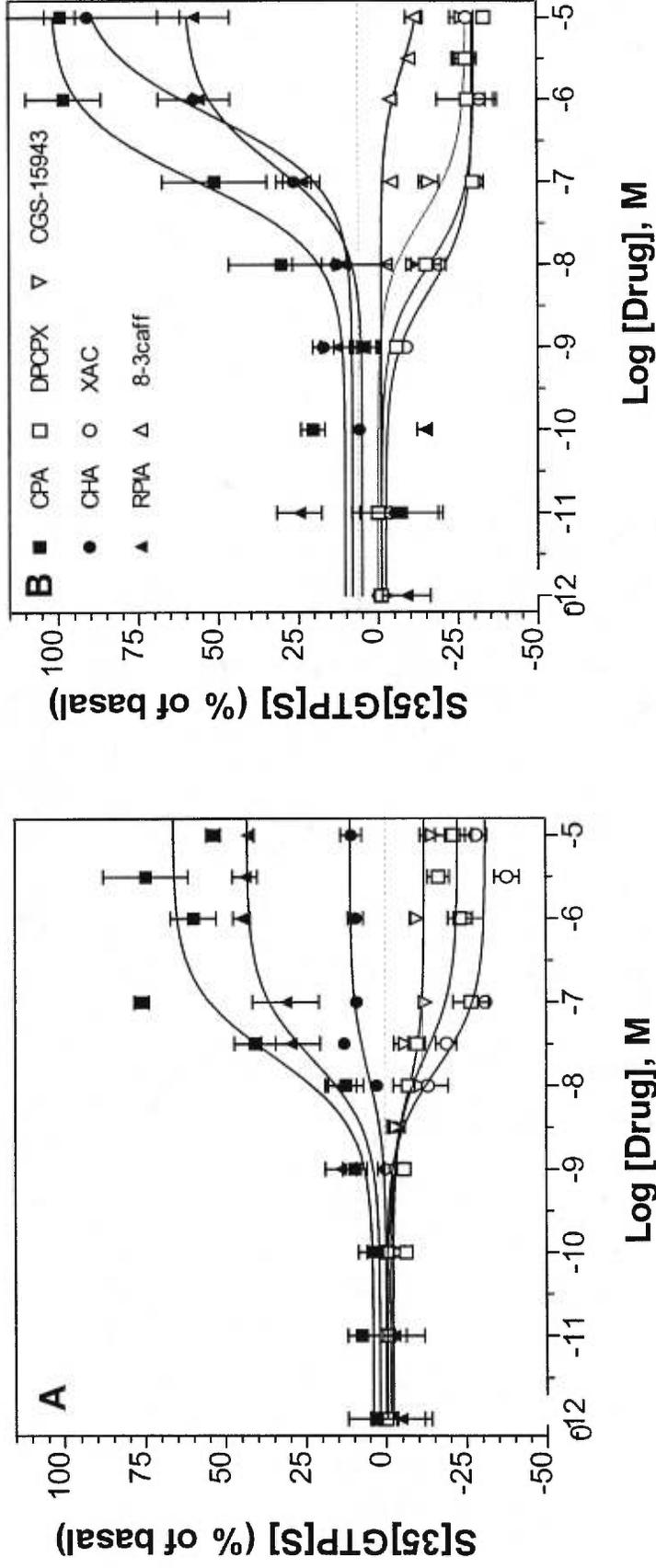


Figure 5. Dose response curves of [³⁵S]GTP[S] binding for the A1 receptor expressed in CHO cells or in Sf9 cells co-expressed with G α i3 β 1 γ 2. [³⁵S]GTP[S] binding was determined after 30 min as described in legend of figure 4. Data represent level of stimulation in % above basal from values with non-specific subtracted (10 μ M GDP). The basal levels were respectively 4500 \pm 239 and 6000 \pm 511 DPM for CHO-A1 (panel A) and Sf9-A1 α ₃ β ₁ γ ₂ (panel B). All assays reported are performed on membranes pre-treated with 1 units/ml of adenosine deaminase.

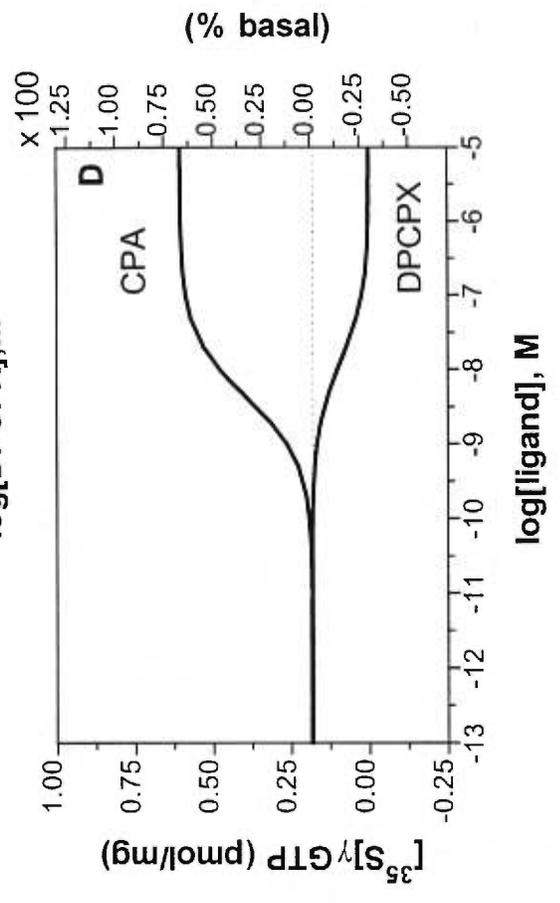
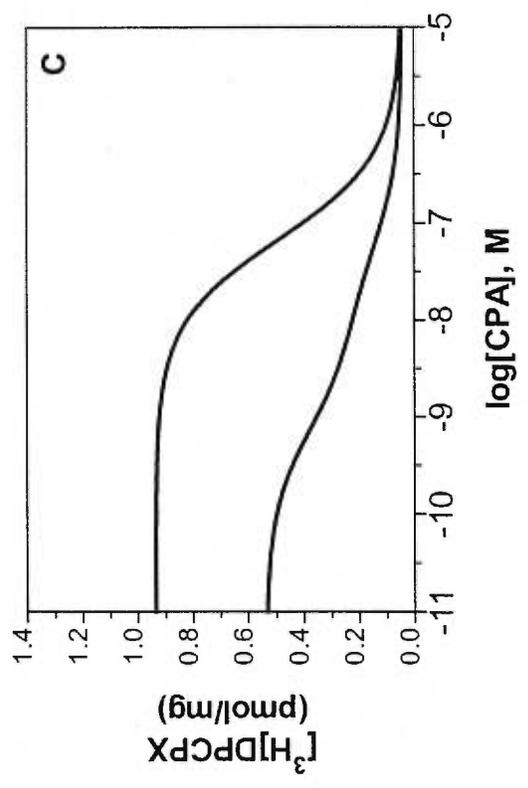
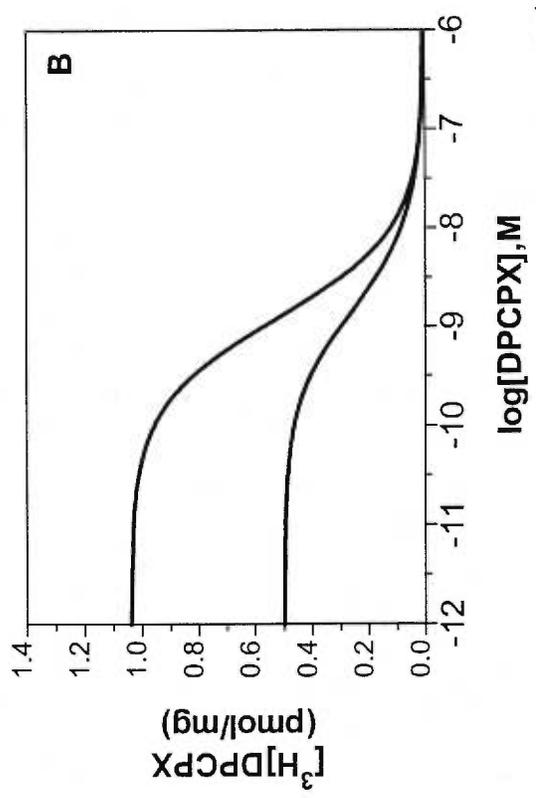
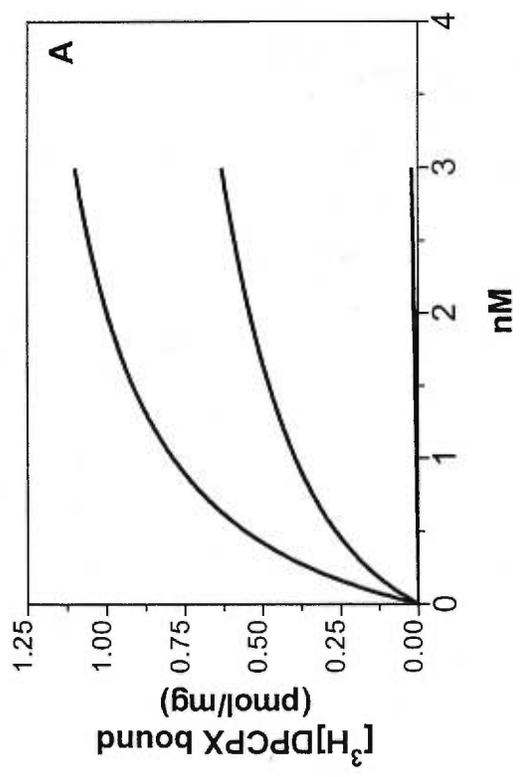


Figure 6. Computer simulation according to the “fully” extended Ternary Complex Model. Theoretical curves were generated based on the extended form of the ternary model presented in material and methods. Data analysis of fig.1, fig.2 and fig.5 performed with Allfitt for windows (Deléan) was used to estimate initial parameters. For simplification of the simulation, α and β were restricted to vary in the same direction where as receptor (R_{tot}), functional G proteins density (G_{tot}) and isomerization constant (J^*) were fixed to pre-determined parameters. All other constant (M , δ , γ , kar , $karg$) were allowed to vary. The simulations performed in this figure were based on the following parameters of the fully extended Ternary Complex Model: $R_{tot} = 2 \times 10^{-11}$ mol/liter, $G_{tot} = 1.2 \times 10^{-11}$ mol/liter, $J^* = 5.74 \times 10^{-4}$, $M = 1 \times 10^{12}$ liter/mole, $\alpha = 0.015$ (DPCPX); 9.21 (CPA), $\beta = 0,01$ (DPCPX); 6.0 (CPA), $\delta = 1.87$, $\gamma = 639$, $kar = kdar^{-1} 1.5 \times 10^9$ liter/mole (DPCPX); 8×10^6 liter/mole (CPA). In panel A, the binding isotherms for a saturation of an inverse agonist ($\alpha = 0.015$, $\beta = 0.01$) in the presence of receptor pre-coupling ($M = 1 \times 10^{12}$ liter/mole) (lower curve) and receptor uncoupling ($M = 1$ liter/mole) (upper curve) for the range of concentration reported in fig.1. In panel B, simulations of [^{35}S] γ GTP dose response binding as the sum of active species $[R^*G^*] + [AR^*G^*]$ for an agonist ($\alpha = 9.21$, $\beta = 6.0$, CPA) and an inverse agonist ($\alpha = 0.015$, $\beta = 0.01$, DPCPX). Optimized simulations performed with the apparent K_d reported in Table 2 ($K_{app} = EC_{50}^{-1}$) are representative of the results reported in fig 5. In panel C, simulations of homologous competition between unlabeled and labeled inverse agonist ($\alpha = 0.015$, $\beta = 0.01$, DPCPX) for a pre-coupled receptor system with ($M = 1 \times 10^{12}$ liter/mole) (lower curve) and for an uncoupled system ($M = 1$ liter/mole or $G_{tot} = 0$ mol/liter) (upper curve). Simulations with optimized ternary model constant (M , α , β , δ , γ and kar , $karg$) are representative of the results presented in fig.2A. In panel D, simulation of competition between labeled inverse agonist ($\alpha = 0.015$, $\beta = 0.01$, DPCPX) and agonist ($\alpha = 9.21$, $\beta = 6.0$, CPA) in the presence of receptor pre-coupling ($M = 1 \times 10^{12}$ liter/mole) (lower curve) and receptor uncoupling ($M = 1$ liter/mole or $G_{tot} = 0$ mol/liter) (upper curves). The simulations presented in panel D are representative of the experimental data presented in Fig.2B.

Acknowledgments

We thank Louise Blythe and Dr. David Hampson of the University of Toronto for their early contribution to this work.

Footnotes

Abbreviations: G proteins, guanine nucleotide-binding regulatory proteins; GTP γ S, guanosine 5'-(3-O-thio)triphosphate; CGS-15943, 9-chloro-2(2-furyl)[1,2,4]triazolo-[1,5]quinazolin-5 amine; GDP, guanosine diphosphate; CPX, 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine; [3 H]DPCPX, 8-[dipropyl-2,3- 3 H(N)] cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine; XAC, xanthine amine congener; CPA, N 6 -cyclopentyladenosine; CHA, N 6 -cyclohexyladenosine; RPIA, (r)N 6 -phenylisopropyladenosine; EDTA, ethylenediaminetetracetic acid; TPCK, n-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone; BSA, bovine serum albumine; HEPES, 4-(2-hydroxyethyl)1-piperazineethanesulfonic acid; M.O.I., multiplicity of infection; Sf9, *Spodoptera. frugiperda* pupal ovarian cells; CHO, Chinese hamster ovarian cells.

References

- 1 Kenakin T. The classification of seven transmembrane receptors in recombinant expression systems. *Pharmacol. Rev.* **48**:413-463 (1996).
- 2 De Léan A., J.M. Stadel and R.J. Lefkowitz. A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of adenylate cyclase coupled β adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **255**: 7108-17 (1980).
- 3 Chidiac P, T.E. Hebert , M. Valiquette, M. Dennis and M. Bouvier. Inverse agonist activity of beta-adrenergic antagonists. *Mol. Pharmacol.* **45**:3, 490-9 (1994).
- 4 Costa T. and A. Herz. Antagonists with negative intrinsic activity at delta opioid receptors coupled to GTP-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86** 19: 7321-7325 (1989).
- 5 Labrecque J., A. Fargin, M. Bouvier, P. Chidiac and M. Dennis. Serotonergic antagonists differentially inhibit spontaneous activity and decrease ligand binding capacity of the rat 5-hydroxytryptamine Type 2C in Sf9 cells. *Mol. Pharmacol.* **48**:150-159 (1995).
- 6 Stanton J.A. and M.S. Beer. Characterization of a cloned human 5-HT_{1A} receptor cell line using [³⁵S]GTP gamma S binding. *Eur. J. Pharmacol.* **320** (2-3): 267-275 (1997).
- 7 Nilsson CL, A. Ekman, M Hellstrand and E Eriksson. Inverse agonism at dopamine D₂ receptors: Haloperidol-induced prolactin release from GH4C1 cells transfected with the human D₂ receptor is antagonized by R(-)-n-propylnorapomorphine, raclopride, and phenoxybenzamine. *Neuropsychopharmacol.* **15** (1): 53-61 (1996).
- 8 Spalding T.A, E.S. Burstein, H Brauner-Osborne, D Hill-Eubanks, and M.R Brann. Pharmacology of a constitutively active muscarinic receptor generated by random mutagenesis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **275** (3): 1274-1279 (1995).
- 9 Smith M.J., R. Leurs, A.E. Alewijnse, J Blauw, G.P. Van Nieuw Amerongen, Y. Van De Verde , E Roovers, H Timmerman. Inverse agonism of histamine H₂ antagonist accounts for upregulation of spontaneously active histamine H₂ receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **93** (13): 6802-6807 (1996).

- 10 Groblewski T, B. Maigret, R. Larguier, C. Lombard, J.C. Bonnafous and J. Marie. Mutation of Asn111 in the third transmembrane domain of the AT_{1A} angiotensin II receptor induces its constitutive activation. *J. Biol. Chem.* **272** (3): 1822-1826 (1997).
- 11 Chiu T.T, L.Y. Yung, Y.H. Wong. Inverse agonist effect of ICI-174,864 on the cloned delta-opioid receptor: role of G protein and adenylyl cyclase activation. *Mol. Pharmacol.* **50** (6): 1651-1657 (1996).
- 12 Olah M.E and G.L. Stiles. Adenosine receptor subtypes: characterization and therapeutic regulation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **35**: 581-606 (1995).
- 13 Figler RA, S.G. Graber, M.A. Lindorfer, H. Yasuda, L. Linden and J.C. Garrison. Reconstitution of recombinant bovine A1 adenosine receptors in Sf9 cell membranes with recombinant G proteins of defined composition. *Mol. Pharmacol.* **50** (6): 1587-1595 (1996).
- 14 Freissmuth M, W. Schutz and M.E. Linder. Interactions of the bovine brain A1-adenosine receptor with recombinant G protein alpha-subunits. Selectivity for Gi alpha-3. *J. Biol. Chem.* **266** (27): 17778-17783 (1991).
- 15 Kollias-Baker, C.A., J.R.M. Jacobson, J.K. Harrison, M. Ozeck, J. C. Shryock. and L. Belardineli. Agonist-independent effect of an allosteric enhancer of the A1 adenosine receptor in CHO cells stably expressing the recombinant human A1 receptor. *J. Pharm. Exp. Ther.* **281**:716-768. (1997).
- 16 Freissmuth M., E. Selzer and W. Schutz. Interaction of purified bovine A1-adenosine receptors with G proteins. *Biochem. J.* **275**:651-656. (1991)
- 17 Stiles G.L. A1 adenosine receptor-G proteins coupling in bovine brain membranes: effect of guanine nucleotides, salt and solubilization., *J. Neurochem.* **51**: 1592-98 (1988).
- 18 Koltz. K.N., R. Keil, F.J. Zimmer and U Schwabe. Guanine nucleotide effects on 8 cyclopentyl-1,3- [3H] dipropylxanthine binding to membrane bound and solubilized A1 receptor of rat brain. *J. Neurochem.* **54**:1988-94 (1990).
- 19 Green R.D. Reciprocal modulation of agonist and antagonist binding to inhibitory adenosine receptors by 5'-guanylylimidodiphosphate and monovalent cations. *J. Neurosci.* **4**:10, 2472-6 (1984).

- 20 Schutz W. and M. Freissmuth. Reverse intrinsic activity of antagonist on G proteins-coupled receptor. *Trend in pharmacol. Sci.* **13**, 376-80 (1992).
- 21 Kenakin TP. Pharmacological Proteus? *Trend in pharmacol. Sci.* **16**:256-59 (1995).
- 22 Weiss JM, P.H. Morgan, M.W. Lutz and T.P. Kenakin. The cubic ternary complex receptor-occupancy model I. Model description. *J. theor. Biol.* **178**:151-167 (1996).
- 23 Labrecque J, M. Caron, K. Torossian, J. Plamondon and M. Dennis. Baculovirus expression of mammalian G protein alpha subunits. *FEBS Lett.* **304** (2-3): 157-162 (1992).
- 24 Wildman D.E., H. Tamir, E. Leberer, J.K. Northup, M. Dennis. Prenyl modification of guanine nucleotide regulatory protein gamma 2 subunits is not required for interaction with the transducin alpha subunit or rhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **90** (3): 794-798 (1993).
- 25 Mahan L.C., L.D. McVittie, E.M. Smyk-Randall, H Nakata, F.J. Monsma Jr, C.R. Gerfen, D.R. Sibley. Cloning and expression of an A1 adenosine receptor from rat brain. *Mol. Pharmacol.* **40** (1): 1-7 (1991).
- 26 Nakamura K, T. Tanaka, A. Kuwahara, K. Takeo. Microassay for proteins on nitrocellulose filter using protein dye-staining procedure. *Anal. Biochem.* **148** (2): 311-319 (1985).
- 27 Lorenzen A, M. Fuss, H. Vogt and U. Schwabe U. Measurement of guanine nucleotide-binding protein activation by A1 adenosine receptor agonists in bovine brain membranes: stimulation of guanosine-5'-O-(3-[35S]thio)triphosphate binding. *Mol. Pharmacol.* **44** (1): 115-123 (1993).
- 28 Samama P., S. Cotecchia, T. Costa and R.J. Lefkowitz. A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. *J. Biol. Chem.* **268**: 4625-4636 (1993).
- 29 Prater MR, H. Taylor, R. Munshi, J. Linden. Indirect effect of guanine nucleotides on antagonist binding to A1 adenosine receptors: occupation of cryptic binding sites by endogenous vesicular adenosine. *Mol. Pharmacol.* **42** (5): 765-772 (1992).

- 30 Ciruela F., C. Saura, E.I. Canela, J. Mallol, C. Luis and R. Franco. Adenosine deaminase affects ligand-induced signalling by interacting with cell surface adenosine receptors. *FEBS Lett* **380** (3): 219-223 (1996).
- 31 Wax MB. and RV. Patil. Immunoprecipitation of A1 adenosine receptor-GTP-binding protein complexes in ciliary epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **35**:3057-3063 (1994).
- 32 Palmer, T.M., T.W. Gettys, and G.L. Stiles. Differential interaction with and regulation of multiple G-proteins by the rat A3 adenosine receptor. *J. Biol. Chem.* **270** (28):16895-16902, 1995.
- 33 Lorenzen A., L. Guerra, H. Vogt, U. Schwabe. Interaction of full and partial A1 adenosine receptor with receptor/G protein complexes in Rat brain membranes. *Mol. Pharmacol.* **49**: 915-926 (1996).
- 34 Bouaboula M, S. Perrachon, L. Milligan, X. Canat, M. Rinaldi-Carmona, M. Portier, F. Barth, B. Calandra, F. Pecceu, J. Lupker, J.P. Maffrand, G. Le Fur, P. Casellas. A selective inverse agonist for central cannabinoid receptor inhibits mitogen-activated protein kinase activation stimulated by insulin or insulin-like growth factor 1. Evidence for a new model of receptor/ligand interactions. *J. Biol. Chem.* **272**:22330-22339 (1997).
- 35 Westphal, R.S. and E. Sanders-Bush. Reciprocal binding properties of 5-hydroxytryptamine type 2C receptor agonist and inverse agonists. *Mol. Pharm.* **46**:937-942 (1994).
- 36 DeLéan, A., B. F. Kilpatrick, and M.G. Caron. Dopamine receptor of the porcine anterior pituitary gland: Evidence for two affinity sites discriminated by both agonists and antagonists. *Endocrinology* **110**: 1064-1066 (1982).
- 37 Burgisser, E., A DeLéan. And R.J. Lefkowitz. Reciprocal modulation of agonist and antagonist binding to muscarinic cholinergic receptor by guanine nucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **79**:1732-1736 (1982).
- 38 Costa T, Y. Ogino, P.J. Munson, H. O. Onaran, D. Rodbard. Drug efficacy at guanine nucleotide-binding regulatory protein-linked receptors: thermodynamic interpretation of negative antagonism and of receptor activity in the absence of ligand. *Mol. Pharmacol.* **41** (3): 549-560 (1992).

3.0 DISCUSSION

Dans cette discussion sur les nouveaux phénomènes associés aux activités des antagonistes des récepteurs couplés aux protéines G, je vous présenterai un résumé de mes réflexions et conclusions sur le phénomène d'agonisme inverse, de sous-régulation atypique et de sensibilisation fonctionnelle induite par certains antagonistes sérotoninergiques. Les applications pharmacologiques fondamentales du modèle cubique à complexe ternaire seront également abordées.

3.1 Résumé des discussions expérimentales

Aux fins de la présente étude, je reprendrai dans cette section, certains points et concepts traités dans les articles présentés à la section 2.0. Par souci de simplification, je porterai mon attention sur les résultats qui me semblent les plus pertinents afin de bien expliquer chacun des phénomènes associés aux propriétés des antagonistes et de pouvoir traiter plus abondamment de leurs nouvelles activités.

3.1.1 Premier article

Les antagonistes sérotoninergiques inhibent de façon différentielle l'activité spontanée et la perte de capacité de liaison du récepteur de la 5-hydroxytryptamine de type 2C chez les cellules Sf9.

Les résultats de cette étude démontrent que l'expression à niveau élevé (27 pmol/mg de protéine), chez les cellules d'insectes Sf9 du récepteur 5-HT_{2C} de rat génère des conditions d'activation de la signalisation de la PLC endogène en l'absence d'agonistes, ce qui suggère une activation spontanée du récepteur. Cette élévation spontanée du niveau basal de production d'inositols phosphates augmente

progressivement avec l'augmentation du nombre de récepteurs et elle est inhibée par des antagonistes sérotoninergiques de façon similaire à ce que l'on rapporte pour l'expression du récepteur chez les cellules NIH-3T3 (¹⁸⁶). Cette inhibition de l'activation spontanée du récepteur est représentative des propriétés agoniste inverses des antagonistes telle que présenté à la section 1. 4. 1. 3. L'absence de contamination par des agonistes fut maximisée par l'utilisation d'un milieu de culture sans sérum et est confirmée par la présence d'un antagoniste compétitif neutre (spiroxatine). Cet antagoniste neutre compétitionne la liaison de la sérotonine (5-HT, agoniste) et de la miansérine (agoniste inverse) sans modifier le niveau d'activation du récepteur. Cette propriété du ligand vient ainsi confirmer l'activité agoniste inverse des antagonistes sérotoninergiques.

Une observation importante de cette étude est que le prétraitement des cellules Sf9 et de leurs membranes avec certains agonistes inverses produit une diminution importante du nombre de sites de liaison. Cette diminution est représentative de la sous-régulation atypique rapportée *in vivo* chez le rat lors de traitement chronique avec des neuroleptiques (^{63-65, 148, 149}). La sous-régulation observée dans le système Sf9/baculovirus est considérée comme atypique par rapport à la sous-régulation "classique" qui est généralement un processus associé à l'action des agonistes (section 1. 3. 5. 4). Cette diminution apparente du nombre de sites de liaison du [³H]mésulergine n'est pas due à la présence d'une liaison réversible d'antagonistes résiduels, puisque l'affinité de la [³H]mésulergine (Kd:2.1nM) n'est pas affectée par le prétraitement des membranes avec 10 nM métergoline (Kd:2.0 nM), une concentration menant à la perte de 90 % des sites de liaison. La réversibilité de la liaison de la mésulergine (500nM), une condition qui induit une perte de plus de 50 % des sites de liaison, suggère que la perte apparente des sites de liaison ne provient pas d'un artefact causé par un processus irréversible de liaison au récepteur 5-HT_{2C}. Cette observation établie également que les conditions de lavage des membranes après traitement sont adéquates pour minimiser la contamination par des ligands résiduels aux prétraitements.

Par ailleurs, l'activité agoniste inverse de la miansérine observée chez les cellules NIH-3T3 (Barker et al ⁸³) avait été proposée pour expliquer la perte de sites induite par ce ligand lors du traitement de cellules en culture provenant du choroïde plexus, une région

riche en récepteurs 5-HT_{2C} (voir section 1. 7. 1. 2). Cependant, comme cette étude ne permettait pas une comparaison précise de ces deux activités dans un même système, les conclusions que l'on pouvait en tirer restent matière à controverse. Afin d'établir clairement si les deux activités étaient des propriétés distinctes des antagonistes sérotoninergiques, seule une comparaison pharmacologique de ces deux phénomènes pouvait répondre à cette question.

Les résultats de l'étude de ces phénomènes démontrent clairement qu'il existe une corrélation entre la puissance (EC₅₀) des agonistes inverses et leur affinité de liaison. Cependant, le même genre de corrélation ne peut être établie entre la puissance de l'activité agoniste inverse d'un ligand et sa puissance à induire une perte de sites de liaison. Les résultats suggèrent que les deux effets observés en cellules Sf9 (agonisme inverse et la sous-régulation atypique) sont vraisemblablement le reflet de deux propriétés distinctes des antagonistes sérotoninergiques. Même si certains des antagonistes étudiés sont capables de produire les deux effets, certains démontrent une préférence ou une sélectivité favorisant l'une ou l'autre des activités. Les résultats présentés démontrent qu'en plus de leurs propriétés compétitives classiques, les antagonistes sérotoninergiques possèdent au moins deux autres propriétés fonctionnelles : l'inhibition de l'activation spontanée d'un récepteur (agonisme inverse) et la réduction du nombre de sites de liaison (sous-régulation atypique).

Afin de bien comprendre les propriétés thérapeutiques des ligands, il est essentiel de considérer toutes les propriétés pharmacologiques d'un composé. Dans cette optique, l'étude propose une nouvelle approche qui pourrait fournir un nouvel index de classification permettant d'établir le potentiel thérapeutique du nouveau composé. L'activité agoniste inverse et de sous-régulation atypique des antagonistes du récepteur 5-HT_{2C} ouvre la voie à de nouvelles avenues de régulation des systèmes biologiques par les antagonistes.

Futurs défis scientifiques

Le principal défi scientifique soulevé par cette étude est d'examiner les conséquences fonctionnelles sur le couplage d'un prétraitement induisant la perte de sites de liaison. Cette question fut partiellement abordée dans la seconde étude présentée dans ce manuscrit.

3. 1. 2 Deuxième article

Les prétraitements avec des antagonistes augmentent l'activité spontanée et la réponse des agonistes du récepteur de la 5-hydroxytryptamine de type 2C chez les cellules Sf9.

Les résultats de la première étude nous indiquaient que certains antagonistes du récepteur 5-HT_{2c} favorisaient une sous-régulation atypique au détriment de l'activité agoniste inverse chez les cellules d'insectes Sf9. Cependant, les répercussions de cette perte de sites sur le couplage fonctionnel du récepteur demeuraient inconnues. Il semblait donc plausible que la réponse fonctionnelle du système 5-HT_{2c} soit diminuée par rapport au système non traité, en raison de la perte d'une grande partie de la capacité de liaison de la population de récepteurs ayant subi un traitement avec un antagoniste capable d'induire une sous-régulation atypique. Cette hypothèse serait admissible si l'on considère que la sous-régulation atypique puisse être similaire aux mécanismes impliqués dans la sous-régulation induite par les agonistes. Toutefois, contrairement à nos attentes, cette seconde étude démontre que certains des antagonistes qui induisent une sous-régulation atypique induisent également une sensibilisation importante de la réponse aux agonistes et une augmentation dose-dépendante du niveau basal d'activation spontanée du récepteur 5-HT_{2c} exprimé en cellule Sf9.

Les traitements des cellules Sf9 exprimant le récepteur 5-HT_{2c} par les antagonistes sérotoninergiques : métergoline, miansérine et clozapine potentialisent la réponse

fonctionnelle des agonistes (5-HT) et des agonistes inverses (miansérine), alors que les traitements avec la méthysergide, la loxapine et la chlorpromazine sont inefficaces à modifier la réponse fonctionnelle du récepteur 5-HT_{2c} exprimé dans les cellules Sf9. L'absence d'effets de sensibilisation par le ligand méthysergide (agoniste inverse étudié dans la première étude) suggère fortement que l'activité agoniste inverse ne peut être la seule responsable du phénomène de sensibilisation de la réponse fonctionnelle induite par les prétraitements aux antagonistes.

L'effet des prétraitements sur l'efficacité des agonistes inverses est curieusement observé à plus faible concentration que l'effet sur les agonistes. De plus, cet effet est entièrement dépendant de l'élévation du niveau d'activité spontanée du récepteur lors de faibles concentrations de prétraitements avec la métergoline ou la miansérine. Cette activité d'augmentation du niveau basal de production d'IP₃ diminue avec les traitements de plus grandes concentrations d'antagonistes et est observé en parallèle avec la diminution de la densité des sites de liaison. Ce mode d'action biphasique du prétraitement sur la réponse fonctionnelle du récepteur observé lors de l'augmentation de la concentration de métergoline nous suggère que de façon préférentielle, il y a un enrichissement apparent des formes actives ou activables du récepteur (élévation de l'activité spontanée). Cependant, l'absence de changement dans la liaison de haute et basse affinité pour l'agoniste 5-HT (compétition avec [³H]mésulergine) semble partiellement en désaccord avec cette conclusion puisqu'il n'y a pas d'augmentation de la proportion de sites de haute affinité pour l'agoniste. Il est donc possible que le traitement affecte uniquement l'équilibre apparent entre les formes actives et inactives sans affecter l'affinité apparente des isoformes pour l'agoniste inverse et l'agoniste. Ceci est supporté par le fait que le traitement avec la métergoline n'affecte pas significativement le K_{iH} et K_{iL} du 5-HT.

L'étude permet, néanmoins, d'établir que le processus de sensibilisation est manifestement différent des mécanismes de sensibilisation de réponse observés lors de la sur-régulation produite par des agonistes inverses. Cette hypothèse est examinée plus loin dans la discussion. Toutefois, l'étude ne permet pas d'établir clairement que la sous-régulation atypique et la sensibilisation sont des propriétés indépendantes des

antagonistes sérotoninergiques. Cette incertitude soulève plusieurs questions quant aux mécanismes impliqués. Il est également difficile d'interpréter le phénomène en se basant sur le modèle cubique à complexe ternaire (section 1. 4. 2. 4) sans faire intervenir un hémiequilibre (tel que proposé par Roberston et al ¹¹⁰) pour expliquer le phénomène "d'Augmentative Antagonism" qui s'apparente étrangement au phénomène rapporté pour le récepteur 5-HT_{2c}. Malgré le fait que le mécanisme impliqué dans la sensibilisation induite par les antagonistes sérotoninergiques soit encore méconnu, ce dernier pourrait éventuellement fournir une approche thérapeutique pour restaurer et augmenter les réponses fonctionnelles déficientes provenant de systèmes désensibilisés par des pathologies ou des traitements thérapeutiques prolongés.

Futurs défis scientifiques

Cette étude doit être considérée comme un préambule à l'étude globale du phénomène de la sensibilisation fonctionnelle des récepteurs couplés aux protéines G induite par les antagonistes puisqu'elle est la première à rapporter de telles observations. Les futures études de cette activité inusitée devrait d'abord adresser la question du mécanisme impliqué dans ce phénomène. Il serait alors avantageux de recourir à des récepteurs 5-HT_{2c} dotés d'un épitope qui pourrait être reconnu par un anticorps monoclonal. Cette approche permettrait d'examiner si des formes multimériques du récepteur (dimère) accompagnent l'activité de sensibilisation fonctionnelle des antagonistes sérotoninergiques ou bien de déterminer s'il y a agrégation des récepteurs sous-régulés. Il serait également utile de développer un test de stimulation de l'échange du GTPγS³⁵ afin d'examiner si la sensibilisation de la réponse se situe en aval ou en amont de la protéine G endogène présente dans cellules Sf9. Cependant, en raison de la faible capacité d'échange GDP-GTP de la sous-unité Gαq impliquée dans le couplage avec le récepteur 5-HT_{2c} cette entreprise pourrait être vouée à l'échec. Par ailleurs, il me semble important de démontrer que ce phénomène de sensibilisation n'est pas uniquement exclusif aux antagonistes du récepteur 5-HT_{2c}. Des résultats préliminaires (communications personnelles de Michel Bouvier) nous indiquent qu'un phénomène

similaire est présent pour les récepteurs δ opiacés exprimés en cellules HEK-293 ayant subi des prétraitements avec des agonistes inverses. Ces résultats pourraient démontrer que le phénomène n'est pas exclusif au récepteur 5-HT_{2C} ou au système pharmacologique étudié. De plus, des résultats préliminaires (non rapportés) de coexpression chez les cellules Sf9 du récepteur 5-HT_{2c} avec des récepteurs dopaminergiques (D1-4), suggèrent qu'il est possible d' sur-réguler ou de sous-réguler les sites de liaison dopaminergiques par la sous-régulation conjointe des sites de liaison des récepteurs 5-HT_{2c} coexprimés. Cette observation reproductible soulève la possibilité de d'interactions croisées dans le processus de sous-régulation ou, alternativement, la possibilité de formation de dimères ou de regroupements hétérologues (cluster), impliquant la possibilité que la liaison sur un type de récepteurs aurait un effet allostérique sur un autre type. Selon ces observations, il serait intéressant de regarder s'il est possible de sensibiliser le couplage fonctionnel d'autres récepteurs par un traitement du récepteur 5-HT_{2C}. Ces observations amèneront peut-être une explication sur l'efficacité thérapeutique de certains neuroleptiques qui possèdent une bonne affinité pour le récepteur 5-HT_{2C} (voir tableau IV).

3. 1. 3 Troisième article

Propriété de liaison des agonistes inverses du récepteur A₁ de l'adénosine du rat exprimé en cellules CHO et Sf9: évidences de sensibilité des antagonistes au précouplage.

Les récepteurs A₁ de l'adénosine (rat) exprimés chez les cellules CHO démontrent une augmentation apparente de la liaison de l'antagoniste DPCPX en présence de GTP γ S. Cette sensibilité inusitée aux analogues non hydrolysables du GTP suggère que les propriétés de liaison des antagonistes A₁ sont possiblement dépendantes du couplage physique entre le récepteur et la protéine G d'une manière opposée aux agonistes. Cette hypothèse est supportée par trois évidences pharmacologiques présentées dans la troisième étude (section 2. 0. 2. 3). La première évidence est, qu'en l'absence de protéine

G exogène, la liaison du DPCPX sur le récepteur A₁ exprimé en cellules Sf9 n'est pas affectée par le GTPγS. De plus, la coexpression de protéines Gαi2β1γ2 avec le récepteur A₁ restaure cet effet du GTPγS chez les cellules Sf9 suggérant que l'antagoniste DPCPX favorise la liaison aux formes découplées et couplées du récepteur mais avec une plus faible affinité pour les formes découplées. La seconde évidence vient de la présence de deux sites de liaison observés lors de la compétition homologue [³H]DPCPX contre le DPCPX froid. Le site de haute affinité (0.5 nM) observé avec le DPCPX est insensible au GTPγS alors que le site de basse affinité (6 nM) est sensible au GTPγS. Cette observation indique clairement que l'antagoniste DPCPX se lie avec une faible affinité aux formes couplées du récepteur, ce qui est l'opposé de ce que l'on observe pour l'agoniste CPA. La troisième évidence provient des paramètres de cinétique de dissociation du [³H]DPCPX qui démontrent, également, que la présence de protéines Gi exogènes diminue l'affinité apparente (Kd) du [³H]DPCPX de 0.3 nM en présence de GTPγS ou en l'absence de Gi exogène à 1.59 nM en présence de Gi coexprimés. Ces observations confirment, qu'en l'absence d'agoniste, le récepteur interagit spontanément avec la protéine G pour former une population de récepteurs couplés (faible affinité pour le [³H]DPCPX) et une population de récepteurs noncouplés (haute affinité pour le [³H]DPCPX).

La sensibilité du [³H]DPCPX au GTPγS, un activateur des protéines G, suggère, également que cet antagoniste pouvait posséder des propriétés agonistes inverses dans les cellules CHO et dans les cellules Sf9 coexprimant des protéines Gi exogènes. Cette propriété des antagonistes fut démontrée par leur capacité à inhiber le niveau basal d'activation spontanée de l'échange de GTPγS³⁵ sur les sous-unités α des protéines G couplées aux récepteurs A₁, exprimées dans les cellules CHO et Sf9 coexprimant des protéines Gi. Cette activité fonctionnelle fut mesurée dans des conditions limitant la possibilité de contamination par des agonistes endogènes. Bien que nous n'ayons pas pu vérifier, par la présence d'un antagoniste neutre, l'origine du niveau basal élevé des systèmes pharmacologiques étudiés, nous sommes confiants que l'inhibition observée n'était pas due à la présence de contamination par des agonistes. Les résultats obtenus avec les tests fonctionnels suggèrent qu'en tant qu'agoniste inverse, le DPCPX stabilise

la conformation inactive du récepteur. Par conséquent, l'ensemble des résultats suggèrent que le DPCPX enrichit principalement la forme *R* inactive du récepteur et se lie également, avec une faible affinité, à la forme *RG* couplée inactive du récepteur présente en raison de la grande affinité d'interaction entre le récepteur inactif et la protéine G trimérique. Cette hypothèse de précouplage fonctionnel est supportée par des simulations mathématiques avec la forme étendue du modèle thermodynamique à complexe ternaire (section 1. 4. 2. 4). Les simulations des études de liaison de ligands et de liaison de $GTP\gamma S^{35}$ furent rendues possibles grâce à l'application du modèle cubique utilisant les paramètres expérimentaux et en supposant que le récepteur et la protéine G démontrent une grande affinité réciproque (précouplage fonctionnel).

Les limitations expérimentales mesurées lors de l'échange de $GTP\gamma S^{35}$ en présence de CPA, soit le meilleur agoniste, suggèrent que le nombre maximal de protéines G couplées mesurables dans cet essai est légèrement inférieur au nombre total de récepteurs. Ceci implique que, même en présence d'un excès de protéines G exogènes, un mode d'interaction bimoléculaire existe, c'est-à-dire que le récepteur interagit avec un nombre limité de protéines G. On trouve, ainsi, par les mesures d'activités maximales provenant des tests fonctionnels et des analyses de liaison que les récepteurs A_1 sont légèrement en excès ou égaux au nombre de protéines G couplées. Cette contrainte est également utilisée par Costa et al pour simuler les activités agonistes inverses d'un système selon la forme simple du modèle à complexe ternaire (¹⁸⁷). Ce concept appliqué au modèle de couplage des récepteurs couplés au protéines G peut être limité et ne pas correspondre à la réalité qui pourrait impliquer que les récepteurs A_1 et les protéines G interagissent à l'intérieur d'amas fonctionnels comprenant des récepteurs et des protéines G (^{188, 189}).

Cependant, il est clair que la modélisation des résultats expérimentaux à l'aide du modèle cubique nous indique qu'en l'absence de ligand, le récepteur est majoritairement couplé à G_i (56 % du total de récepteurs), laquelle est presque complètement associée au récepteur (93 % du total des protéines G_i couplées). La majeure partie des récepteurs couplés sont inactifs (41 % du total) alors que les récepteurs couplés actifs responsables de l'élévation du niveau basal sont minoritaires (14 % du total). Lors de la liaison de

ligand, il y a une ré-équilibre des différentes conformations de telle sorte que l'agoniste n'augmente pas le couplage entre la protéine G et le récepteur, qui lui, est déjà au maximum (précouplage fonctionnel), mais augmente plutôt la proportion de récepteurs couplés actifs (de 14 % à 47 % du total), ce qui a pour effet d'augmenter le signal de sortie. À l'opposé, l'agoniste inverse diminue la proportion de récepteurs couplés (de 56% à 14 % de R_{total}) en plus de supprimer la forme active, ce qui laisse les récepteurs couplés résiduel inactifs. Le modèle nous permet d'extrapoler les conséquences d'un système fortement couplé sur les propriétés d'un ligand: l'agoniste ne favorise pas le couplage récepteur/protéine G mais plutôt l'activation de R vers R^* alors que l'agoniste inverse favorise, à la fois, le découplage et la désactivation du système. Cette hypothèse est incompatible avec le modèle proposé par Samama et al (section 1. 4. 2. 3) selon lequel l'agoniste doit nécessairement favoriser le couplage et l'activation du récepteur puisque le récepteur ne peut être précouplé au récepteur inactif (couplage inerte).

Les résultats de cette étude sur la dépendance au couplage fonctionnel des propriétés de liaison des antagonistes nous permet de mieux comprendre comment les propriétés des agonistes inverses et également celles des agonistes sont incontestablement dépendantes des caractéristiques de couplage d'un système pharmacologique. Cette dépendance des agonistes inverses aux conditions de couplage implique que les phénomènes affectant le couplage fonctionnel du récepteur (désensibilisation, balance stœchiométrique, etc.) auront également des effets sur les propriétés thérapeutiques des agonistes inverses.

Futurs défis scientifiques

La suite logique de cette étude pourrait être de démontrer clairement que le couplage physique entre le récepteur et la protéine G est diminué par la présence d'agonistes inverses. Cette démonstration peut se faire à l'aide d'une immunoprécipitation du complexe agoniste inverse/récepteur, avec ou sans protéine G, à l'aide d'anticorps reconnaissant le récepteur et la protéine G. La démonstration d'une

telle observation confirmerait nos évidences selon lesquelles il existe une interaction spontanée entre le récepteur inactif et la protéine G (RG).

Il serait également intéressant d'utiliser la propriété modulaire du système de coexpression en cellule Sf9 pour comparer les effets des différents sous-types de G_i sur la liaison des agonistes et des antagonistes du récepteur A_1 de l'adénosine. On pourrait, alors identifier la présence d'une sélectivité de pré-couplage pour l'un ou l'autre des sous-types de protéines G. De plus, le perfectionnement du modèle cubique pourrait également permettre de simuler des conditions dans lesquelles un récepteur interagit avec différentes protéines G. Ce raffinement du modèle pourrait alors être utilisé pour reproduire le comportement d'un système biologique dans lequel deux types de protéines G compétitionnent pour l'interaction avec le récepteur.

3. 2 Implications pharmacologiques des activités des antagonistes des récepteurs couplés aux protéines G

Le but premier de mon projet de doctorat étant de fournir des preuves de l'activité intrinsèque des antagonistes, il me semble donc approprié de discuter de chacune des activités des antagonistes rapportées dans ce manuscrit dans un contexte plus large qui me permet de conclure sur les phénomènes. Dans la prochaine section, je vous ferai part du résultat de mes recherches sur ces nouveaux concepts d'action des ligands des récepteurs couplés aux protéines G. Le lecteur doit être avisé que les notions et conclusions émises dans cette section peuvent déborder du cadre des concepts et modèles établis. Elles sont donc matière à discussion.

3. 2. 1 Les modèles allostériques de l'interaction récepteur/protéine G

Mes limitations conceptuelles personnelles m'ayant souvent contraint à des approches pharmacologiques descriptives plutôt qu'intégratives, je pouvais difficilement passer sous silence l'exhaustivité de certains modèles thermodynamiques qui expliquent l'action des ligands sur les récepteurs couplés aux protéines G. Il existe des dizaines de modèles pour expliquer le comportement des systèmes pharmacologiques. Que le mode d'action du ligand induise des processus coopératifs indépendants de la protéine G (section 1. 4. 3. 1) ou bimoléculaires d'interaction (i. e. une protéine G/un récepteur) (section 1. 4. 2), la modélisation de ce processus implique que le modèle puisse simuler et prédire l'action d'un ligand. Dans cette optique, mon projet de doctorat m'a amené à me familiariser, principalement, avec les modèles à complexe ternaire qui impliquent des protéines G dans l'émission de signaux. Cette section rend compte de mes réflexions personnelles sur l'importance de tels modèles pour l'interprétation des phénomènes pharmacologiques observés dans mes travaux de recherches.

La citation suivante de Heinz R. Pagels nous rappelle que les simulations obtenues avec des modèles mathématiques ne sont que des reflets virtuels de la réalité qui sont parfois esthétiquement et mathématiquement plaisant, mais sans plus. Cette idée nous rappelle que le modèle n'est que le produit de l'esprit de l'expérimentateur et qu'il doit être rejeté aussitôt qu'il ne correspond plus à la réalité expérimentale. Chaque fois que l'esprit simplifie un phénomène pour mieux le comprendre, il risque de perdre l'essence même de ce phénomène.



“A good simulation, be it a religious myth or scientific theory, gives us a sense of mastery over experience. To represent something symbolically, as we do when we speak or write, is somehow to capture it, thus making it one's own. But with this appropriation comes the realization that we have denied the immediacy of reality and that in creating a substitute we have but spun another thread in the web of our grand illusion.”



Heinz R. Pagels

Les modèles mathématiques décrivant les phénomènes biologiques sont aussi diversifiés que les processus biologiques qu'ils décrivent. La façon dont ses modèles sont utilisés est déterminée par leur complexité et notre capacité à évaluer ses paramètres. Dans le cas où un petit nombre de paramètres sont connus, le modèle n'est alors, qu'une esquisse de la réalité. Par contre, si le modèle est assez complexe, la majorité des paramètres nécessaires à la caractérisation du modèle pourront être déterminés et c'est alors que nous simulerons, dans son essence même, la réalité biologique du phénomène.

Les protéines G jouent un rôle crucial dans la fonction de multiples récepteurs. En conséquence, il est primordial que l'on considère le fait que ces protéines ont un impact important sur les propriétés pharmacologiques des ligands. Parmi les premiers modèles théoriques de la fonction des récepteurs qui tenaient compte des protéines auxiliaires (protéine G), le modèle à complexe ternaire de De Léan et al⁽⁸⁷⁾ offre la première interprétation heuristique de l'action des ligands (section 1. 4. 2. 1). La qualité principale d'un modèle heuristique par rapport à un modèle simplifié est qu'il est suffisamment complexe pour intégrer les déterminants essentiels du système tout en possédant une certaine élégance mathématique (clarté, symétrie, polyvalence et intégralité). Le modèle allostérique cubique à complexe ternaire (Weiss⁹⁹) est le prolongement du modèle heuristique de De Léan et al⁽⁸⁷⁾ qui, selon moi, représente le plus fidèlement la complexité du modèle à complexe ternaire en découplant l'activation du récepteur de la liaison du ligand, ce qui permet une activation du récepteur indépendamment de l'interaction avec la protéine G ($R \star R^*$).

Tel que décrit à la section 1. 4. 2. 4, ce modèle inclut des formes actives et inactives du récepteur qui peuvent interagir avec la protéine G. L'implication de ce concept est, qu'en l'absence de ligand, l'effet dominant de l'activation du récepteur est de changer son affinité pour la protéine G. Ce fait contraste avec la version simplifiée du modèle étendu du complexe ternaire, proposée par Samama et al⁽⁹⁰⁾ (section 1. 4. 2. 3), selon laquelle l'affinité de la protéine G pour le récepteur inactif est zéro et que cette protéine G ne peut interagir uniquement qu'avec le récepteur actif. Ce modèle est donc limité aux systèmes dans lesquels le niveau basal d'interaction spontanée (précouplage

entre le récepteur et la protéine G) est faible puisque dans le cas contraire, on peut difficilement concevoir la façon dont un agoniste pourrait augmenter un couplage qui serait déjà maximal.

Le modèle cubique (section 1. 4. 2. 4) utilisé pour simuler les résultats expérimentaux présentés dans la troisième étude permet, non seulement de prédire les propriétés d'un ligand A agissant sur un récepteur couplé à une protéine G, mais également, de simuler l'effet de la présence d'un ligand compétitif (B), ce qui génère quatre nouvelles espèces de récepteurs soit BR, BR*, BRG et BRG*. Dans ces conditions, le ligand B construit alors son propre cube en utilisant une partie des récepteurs et des protéines G disponibles. Le cube du ligand A et celui du ligand B partagent alors la même face, celle du récepteur libre du ligand. Le même genre de simplification est applicable à un récepteur interagissant avec deux protéines G différentes. La nouvelle protéine G (identifié H dans la figure 5) contribue à une face additionnelle, c'est-à-dire que chaque protéine G contribue à son propre cube et que lorsque ces protéines partagent le même ligand et le même récepteur, chaque cube issu d'une protéine G (celui de G et celui de H), est alors interrelié par la face libre de protéines G. Cependant, dans un système ayant plus de deux protéines G ou plus de deux ligands, la représentation géométrique de plusieurs cubes partageant des surfaces communes devient alors difficile. C'est à cette étape qu'échoue la représentation tridimensionnelle cubique. L'ajout de nouveaux ligands ou de protéines G produit un cube qui n'existe pas dans le contexte de la géométrie tridimensionnelle euclidienne, mais plutôt dans un espace hyperdimensionnelle nécessitant alors un hypercube (une entité existant uniquement dans l'esprit). Bien que cette hypothèse soit plausible, mais difficile à imaginer, elle nécessite un certain effort qui entraînera un manque de clareté du concept de ce modèle à complexe ternaire. De façon conceptuelle, afin de simplifier l'interprétation, on peut dire que pour le modèle cubique simple, différents récepteurs compétitionnent pour la même réserve de ligands et de protéines G. Alors, les différents récepteurs génèrent leur propre cube qui ne partage aucune face. Malgré cela, le modèle reste applicable puisque différents récepteurs s'influencent mutuellement en compétitionnant pour un pool commun de protéines G et/ou de ligands. En fin de compte,

c'est la valeur de la constante d'équilibre pour chacune des espèces comparables (isoformes d'un récepteur), qui dictera l'importance relative de chaque isoforme d'un récepteur particulier. C'est ainsi que les propriétés de plusieurs récepteurs et plusieurs protéines G peuvent être interprétées selon une nouvelle extension du modèle cubique.

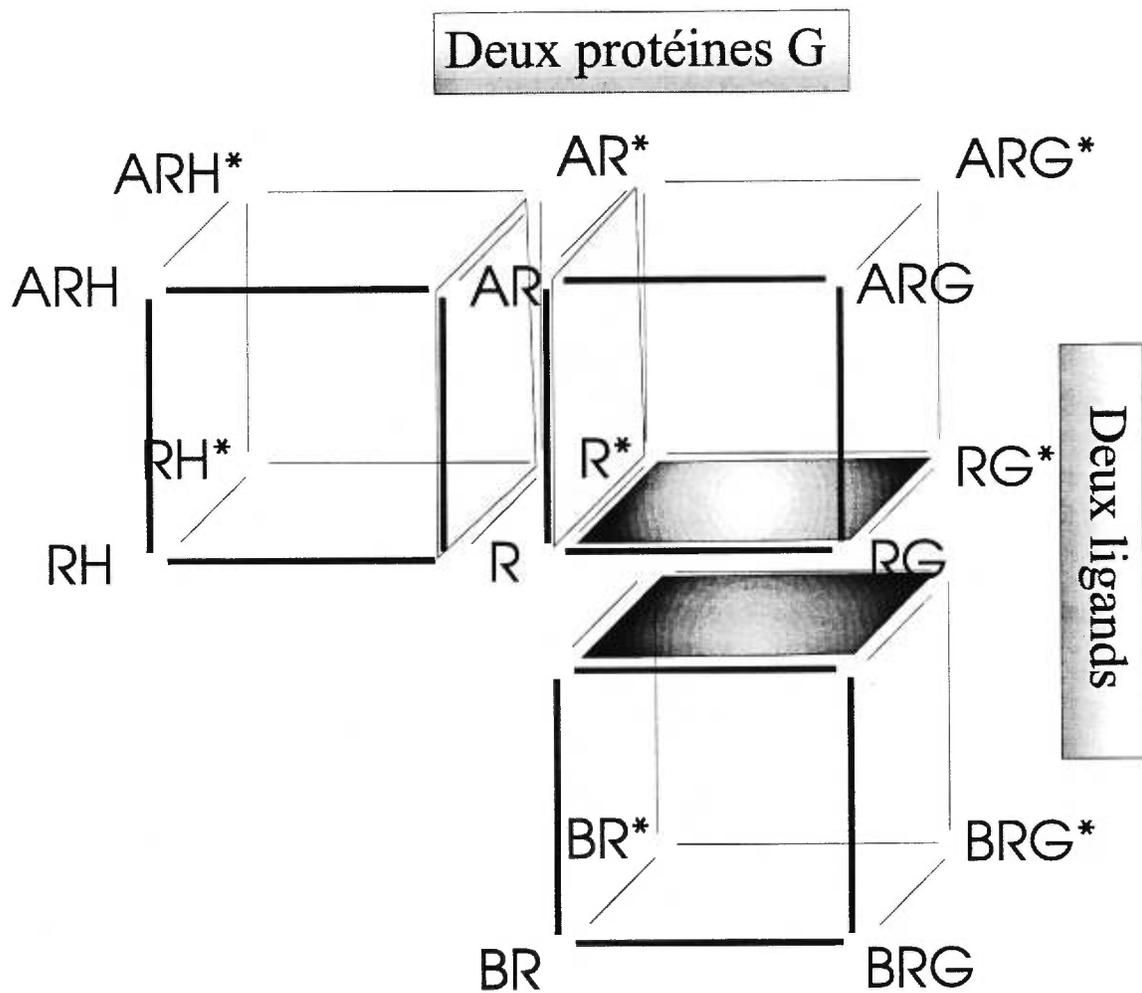


figure 5. Extension du modèle cubique

Efficacité et affinité apparente : application du modèle cubique

Le concept d'efficacité d'un ligand est malheureusement assez flou bien que dans l'esprit des gens il désigne qualifie l'habileté de transmission d'un signal par le ligand. Cette définition un peu réductionniste apporte peu d'informations quant à la nature de cette efficacité. Terry Kenakin décrit l'efficacité comme étant une propriété à la fois reliée au récepteur et au ligand. Il en résulte que l'efficacité provient alors de deux mécanismes putatifs: l'induction conformationnelle et la sélection conformationnelle (¹⁹⁰).

Lors de l'induction conformationnelle, on spécule que la liaison du ligand abaisse une barrière énergétique permettant au récepteur d'adopter plus aisément une conformation favorable à la signalisation. Le phénomène est alors ultérieur à la liaison du ligand. Par contre, lors de la sélection conformationnelle, le ligand se lie préférentiellement à une ou plusieurs conformations du récepteur dont certaines produisent une signalisation; ce qui induit un déplacement de l'équilibre favorisant ainsi l'apparition d'une conformation particulière. Le phénomène est alors simultané à la liaison du ligand. Cette dichotomie (des deux concepts) présente une certaine analogie avec le concept relativiste de la physique élémentaire qui stipule que la lumière se comporte à la fois comme une particule et une onde. Il serait donc plus approprié de considérer que la réponse d'un système à l'action d'un ligand (efficacité) peut être reliée à une dispersion vectorielle de l'affinité individuelle des espèces conformationnelles présentes. L'affinité apparente en serait la première phase de cette distribution vectorielle alors que l'efficacité en serait la péroration. L'efficacité provient alors principalement d'une variabilité des affinités locales de chaque isoforme, mais elle requiert que cette variabilité démontre une direction privilégiée, soit l'activation pour les agonistes ou la désactivation pour les agonistes inverses. Comme l'efficacité est dépendante des différentes affinités apparentes, il en découle que les contraintes "environnementales" (stoechiométrie, nature de la protéine G, etc.) d'un système d'expression auront un impact important sur l'efficacité d'un ligand.

Effet de la stoechiométrie récepteurs/protéines G sur les propriétés des ligands et l'aiguillage de la réponse

Dans les systèmes d'expression cellulaire où la stoechiométrie du récepteur et de la protéine G est variable, par exemple chez les cellules Sf9, la surexpression du récepteur peut engendrer des conditions où le ratio de formes découplées par rapport aux formes couplées est important, donnant ainsi l'impression que la protéine G n'est que faiblement couplée au récepteur étudié. Ces conditions auront alors des conséquences néfastes principalement sur les propriétés de liaison des agonistes.

Il est ainsi fréquent que la densité de sites (B_{max}) mesurée avec des agonistes soit inférieure au B_{max} provenant de la saturation avec des antagonistes pour des récepteurs exprimés à haut niveau. Pour remédier à ce problème, l'ajout de protéines G exogènes permet, parfois, de minimiser l'effet de la surexpression des récepteurs. Cette stratégie fut utilisée, dans la troisième étude, pour démontrer l'importance pour les agonistes inverses du couplage physique entre la protéine G et le récepteur. On doit, cependant, s'assurer de l'identité de la protéine G. Autrement, il est possible que l'on génère des conditions favorisant un couplage aberrant (artefact de promiscuité) qui n'a rien à voir avec la sélectivité normale d'un récepteur. Cette contrainte est aussi applicable aux systèmes dans lesquels aucune protéine G exogène n'est ajoutée. On rapporte ainsi que les récepteurs muscariniques M_1 et M_4 exprimés en cellules JEG-3 peuvent alternativement inhiber ou stimuler l'adénylate cyclase selon le niveau d'expression des récepteurs (¹⁹¹). Il y a donc de bonnes raisons d'être soucieux des conditions de densité des récepteurs en fonction de la disponibilité et du type de protéines G disponibles pour un couplage fonctionnel dans la membrane. Il serait très facile de produire des conditions d'expression élevée de récepteurs et de protéines G qui permettent la mesure d'une réponse fonctionnelle, alors que dans des conditions physiologiques "normales" cette combinaison ne formerait pas un complexe fonctionnel en raison de la faible affinité entre le récepteur et la protéine G. Dans cette situation, il ne serait pas étonnant qu'un agoniste démontre une activité de "agoniste complet" dans le

système d'expression hétérologue alors que dans le tissu, ce ligand ne possède aucune activité agoniste.

Il y a donc deux implications importantes dans l'aiguillage du stimulus de la réponse du récepteur à la liaison de ligands, plus particulièrement, des ligands agonistes. La première est liée au criblage de nouveaux composés pour leur potentiel thérapeutique. Ainsi, si certains agonistes induisent le couplage préférentiel du récepteur avec certaines protéines G, un ligand qui interfère avec le couplage récepteur/protéine G (agoniste inverse) pourrait lui aussi être sélectif sur la base du système choisi pour mesurer l'activité de la molécule étudiée. La deuxième implication d'un aiguillage préférentiel de la réponse d'un récepteur (i.e. différentes protéines G activées par différents agonistes) est la possibilité de produire des agonistes sélectifs ciblant une réponse thérapeutique en particulier. Il me semble donc plausible que certains agonistes induisent à la fois des effets thérapeutiques via un sous-type de protéine G et des effets délétères en raison de l'activation d'un autre type de protéine G. Il serait alors avantageux de pouvoir sélectionner des agonistes qui n'activent pas les voies métaboliques menant aux effets toxiques. Cette hypothèse ouvre la porte à l'étude des mécanismes de la sélectivité de couplage en fonction du ligand. Si l'on considère cette hypothèse, il devient alors important que le pharmacologue respecte les limites du système étudié et qu'il considère le fait que les propriétés pharmacologiques des ligands sont largement dépendantes des conditions de couplage d'un système.

L'approche moléculaire de l'étude des récepteurs couplés aux protéines G provoque encore un certain scepticisme. Certains emploieront alors le terme "artefact d'expression" pour minimiser et critiquer l'importance des systèmes d'expression hétérologues sur la recherche pharmacologique. Cette mentalité est malheureusement restrictive parce qu'elle rejette un outil précieux qui nous permet de mieux comprendre les mécanismes fondamentaux reliés à l'action des ligands, même s'il est très difficile de reproduire, ou même de connaître, les conditions expérimentales (stoechiométrie récepteur/protéine G) qui correspondent à la réalité d'un système pharmacologique. Cette limitation impose alors que l'on essaie de reproduire, au meilleur de nos connaissances et dans la mesure de nos capacités, les conditions physiologiques. Lorsque celles-ci sont

inconnues, il faut alors considérer que l'activité observée est le reflet des propriétés de la substance et du système biologique étudiés, ce qui doit être validé à l'aide de modèle animal. Dans ces conditions, le profil pharmacologique d'un médicament devrait être validé avec différents systèmes afin d'établir une vue d'ensemble des propriétés du ligand.

L'approche expérimentale moléculaire qui semble la plus populaire, en ce moment, dans le domaine des récepteurs couplés aux protéines G, est la manipulation des niveaux d'expression des composantes de couplage afin d'affecter directement la réponse d'un système. En théorie, cette approche reste valide. Cependant, il n'est pas toujours certain qu'augmenter l'expression d'une ou de plusieurs des composantes impliquées dans la signalisation favorisera notre capacité de mesurer une activité biologique. Par exemple, même si on multiplie par 100 le nombre de protéines G par rapport au récepteur, le nombre total de protéines G exprimées n'aura probablement aucune signification par rapport à la population réelle de protéines G accessibles pour l'interaction avec le récepteur. Une telle limitation du nombre maximal de protéines G couplées à un récepteur se retrouve pour le récepteur A₁ de l'adénosine en cellules CHO et Sf9 (section 2.). Ainsi, on retrouve un ratio d'environ 60 % de protéines G activables par rapport au nombre total de récepteurs (R:G; 1:0.6) alors qu'en réalité, qu'il existe un ratio de plus de 600 % de protéines G totales (R:G; 1:6). Cette contrainte, quant au nombre maximal de protéines G couplées, est peut-être le reflet d'une limitation imposée par des éléments du cytosquelette qui limiteraient l'accès des récepteurs et des protéines G⁽¹⁹²⁾.

On a même spéculé quant à l'existence de micro-domaines propres à la localisation des récepteurs et des protéines G. Ces régions spécifiques formeraient des zones de dispersion asymétriques (non homogènes) à la surface cellulaire^(193, 194). Ce patron de localisation sélective réfute le concept quelque peu minimaliste du récepteur flottant librement (free floating model) dans une membrane plasmique dans le but de se lier, par le fruit du hasard, à la bonne protéine G pour finalement activer le bon effecteur. Je pense qu'il existe une organisation fonctionnelle des composantes de couplage qui facilite leur interaction. Il me semble plus logique que l'efficacité d'interaction ne soit

pas limitée par la probabilité que deux composantes interagissent en fonction d'un modèle basé uniquement sur la collision entre les éléments de ce système. Par ailleurs, il est presque certain que plusieurs protéines accessoires interagissent avec les différentes composantes du système de signalisation. Ces nouvelles protéines régulatrices auront, elles aussi, une influence importante sur l'efficacité d'un ligand. Il est donc prévisible que l'évolution logique des modèles à complexe ternaire tend à inclure les régulateurs des protéines G. A court terme, je pense que l'on pourra inclure au modèle courant, l'effet des RGS (section 1. 3. 2), des GRK (section 1. 3. 5. 2) ou de l'interaction récepteurs-récepteurs (section 1. 4. 3. 2). Le piège principal du développement des modèles multidimensionnels est leur embarrassante complexité qui, en fait, limite leur utilisation. Ainsi, plus le nombre de paramètres nécessaires à la description augmente, plus il devient difficile de les déterminer de façon expérimentale et plus faible est notre capacité à simuler la réalité expérimentale. Selon ces notions élémentaires, on doit admettre que l'objectif principal d'un modèle est de prédire les propriétés des ligands, qu'il s'agisse de l'agonisme, de l'antagonisme compétitif ou de l'agonisme inverse.

3. 2. 2 Les propriétés agonistes inverses des antagonistes des récepteurs couplés aux protéines G: implications thérapeutiques et rôle du système d'expression

Lorsqu'un ligand est mis en contact avec un système de couplage aux protéines G, ce système est perturbé et la façon dont celui-ci s'ajuste à cette perturbation produit l'effet pharmacologique de l'interaction récepteur-ligand que les pharmacologues utilisent pour caractériser et pour développer des agents thérapeutiques. Il est donc important que la mesure de l'activité d'un composé soit, le plus possible, indépendante du système dont elle provient. La manière habituelle d'obtenir une constance est de mesurer l'affinité des ligands et leur efficacité. Il faut, cependant, considérer que l'absence de réponse à un ligand ne démontre pas nécessairement un manque d'efficacité de ce dernier, mais peut-être seulement l'inaptitude du système à la mesurer. C'est pourquoi plusieurs chercheurs croyaient que l'agonisme inverse était un artefact dû à la présence d'agonistes dans le

système. Cependant, plusieurs études ont démontré l'absence de contamination par des agonistes endogènes.

Généralement, la caractéristique commune aux différentes approches utilisées pour démontrer une activité agoniste inverse provient des conditions établies pour augmenter la prépondérance des états spontanément actifs du récepteur, et/ou amplifier les effets des récepteurs spontanément actifs. Une méthode prometteuse qui permet la mesure d'activité agoniste inverse est d'augmenter le niveau basal d'activation du récepteur. La première détection d'agonisme inverse reconnue pour un récepteur couplé aux protéines G fut rapportée grâce à cette approche par Costa et al (¹⁹⁵). Le couplage spontané du récepteur δ opioïde et de la protéine G est déstabilisé par le Na^+ . En remplaçant le NaCl par le KCl, le niveau basal d'activation membranaire augmente, ce qui permet de mesurer l'inhibition de cette activation par les agonistes inverses. Des indices de l'activité agoniste inverse putative avaient également été rapportés lors d'études de liaison d'antagonistes qui démontrent une sensibilité aux analogues du GTP. Contrairement à la réduction de la liaison des agonistes, les analogues du GTP augmentent la liaison de certains antagonistes qui se sont révélés être des agonistes inverses (voir section 2.). Cet effet du $\text{GTP}\gamma\text{S}$ sur les antagonistes n'est pas récent, puisque déjà en 1982, on démontrait que le $\text{GTP}\gamma\text{S}$ avait un effet sur le spiropéridol, ce qui suggérerait l'efficacité négative du composé (¹⁹⁶).

Une autre approche très populaire de l'étude des récepteurs couplés aux protéines G est l'étude de l'effet des ligands sur des récepteurs mutants constitutivement actifs (voir section 1. 4. 1. 3). L'apanage de ces mutants est qu'ils démontrent un niveau d'activation spontanée indépendant de l'agoniste et généralement supérieur aux récepteurs natifs (type sauvage) lorsqu'ils sont exprimés dans les mêmes conditions. Cependant, la capacité de ces mutants à adopter une forme R^* active, en l'absence ou en présence d'agoniste est probablement intrinsèque à ces protéines mutantes et ne reflète pas nécessairement les propriétés du récepteur natif. Cette faiblesse artéfactuelle des CAM (Constitutively Activated Mutant) est démontrée expérimentalement par la présence d'une instabilité structurale du mutant affectant la liaison d'un mutant constitutivement actif du récepteur β_2 adrénergique marqué par un agent fluorescent via

une cystéine (¹⁹⁷). Les contraintes mutationnelles observées pour les CAM nous suggèrent des différences significatives entre l'activité des ligands mesurée chez ceux-ci versus les récepteurs natifs. Cette supposition me laisse perplexe, puisque rien ne nous permet de dire que ces mutations ne confèrent pas aux récepteurs mutants des conformations actives différentes de celles adoptées par le récepteur natif.

Jusqu'à présent, je pense que l'approche la mieux adaptée aux contraintes pharmacologiques est le développement de systèmes de surexpression tel que décrits dans ce manuscrit. Des évidences probantes suggèrent que la stoechiométrie relative des récepteurs et des protéines G peut être importante dans la production d'activité constitutive (voir section résultats). Ce concept découle du principe que l'augmentation des concentrations des agents impliqués dans le couplage spontané entre le récepteur et la protéine G enrichira la quantité de récepteurs actifs et de protéines G actives, ce qui résulte en une augmentation du niveau basal. Le niveau basal d'activité du récepteur n'augmente pas en raison de l'augmentation de la durée des formes actives sur les formes inactives, ou bien à cause d'un changement dans la composition d'isomérisation du récepteur, mais plutôt parce que le nombre total de récepteurs actifs augmente suffisamment pour entraîner une élévation du signal indépendamment de l'agoniste. Dans le cas où les protéines G ne sont pas limitantes, l'augmentation du niveau de récepteurs permet une élévation du niveau basal, alors que dans le cas contraire, l'augmentation du niveau de protéines G pourra affecter la stoechiométrie de couplage et ainsi affecter positivement un niveau basal d'activation spontanée du récepteur. Ainsi, la surexpression de protéines G peut aussi résulter en une activation constitutive du récepteur (¹⁹⁸), possiblement parce que l'abondance de protéines G favorise l'interaction avec le récepteur et stabilise le récepteur en une forme active cependant, Il ne faut pas croire que les récepteurs possèdent des niveaux d'activation spontanée équivalents puisque même des récepteurs provenant de variantes d'épissage du même gène démontrent des différences d'activation spontanée (¹⁹⁹).

Une autre approche découlant des principes élaborés est l'utilisation d'animaux transgéniques surexprimant un récepteur pour produire, par exemple, une augmentation spontanée de la signalisation du récepteur β_2 adrénergique (²⁰⁰). Dans ce modèle animal,

cette surexpression du récepteur triple le niveau basal de la tension artérielle mesurée, alors que celle-ci est réduite sélectivement par l'agoniste inverse ICI-118,551. Il y a, cependant, des critères pharmacologiques qui doivent être remplis avant de déterminer l'activité intrinsèque d'un ligand possédant une activité agoniste inverse putative. Ces critères sont les suivants: 1) la contamination par les agonistes endogènes est négligeable dans le système étudié, 2) le niveau basal peut être inhibé par un antagoniste sélectif du récepteur, 3) les effets des analogues du GTP sur la liaison de l'antagoniste sont opposés à ceux des agonistes, 4) la réponse des agonistes inverses peut-être bloquée sélectivement par des antagonistes neutres. Idéalement, tous ses critères devraient être satisfaits pour identifier un agoniste inverse, cependant, il n'est pas toujours possible de tous les démontrer.

La compétitivité de la réponse de l'agoniste inverse par l'agoniste neutre est probablement le critère le plus déterminant qui permet de conclure à la présence d'activation spontanée d'un système. Elle indique que le phénomène est relié uniquement au récepteur de façon indépendante à l'agoniste complet. Il est, cependant facile de concevoir que les véritables antagonistes neutres seront assez rares si on admet que l'efficacité d'un composé est, en partie, basée sur son affinité différentielle pour les diverses conformations du récepteur. Le désir de vouloir trouver un ligand ayant une efficacité nulle devient alors un peu irréaliste puisque cela implique qu'il ne doit pas modifier la proportion des différentes formes actives et inactives du récepteur. Cette condition suppose que le ligand ne présente aucune différence d'affinité pour ces deux formes et que sa présence ne doit modifier, d'aucune façon, l'interaction entre le récepteur et la protéine G. Le ligand doit bloquer, à la fois, les effets des agonistes et des agonistes inverses. Sous ces conditions, un ligand peut être qualifié d'antagoniste neutre, ce qui signifie que son affinité sera insensible aux caractéristiques du système d'expression, c'est-à-dire que le type cellulaire, la stoechiométrie des protéines G et le niveau relatif d'activation spontanée du récepteur n'affecteront pas l'affinité de ce composé. Les antagonistes neutres auront, ainsi, une valeur inestimable dans la classification pharmacologique des récepteurs couplés aux protéines G parce que peu importe le système cellulaire utilisé leurs propriétés demeurent constantes et

indépendantes des contraintes de couplage,. Il est donc à prévoir que les antagonistes classiques, que l'on croit neutres, à priori, sont possiblement des agonistes inverses putatifs et que seul un nombre limité de composés seraient de véritables antagonistes neutres.

Sous l'angle de la thermodynamique, les contraintes et prérequis nécessaires pour définir un antagoniste neutre et définir l'efficacité positive des agonistes et l'efficacité négative des agonistes inverses peuvent être considérés comme le double tranchant de la lame d'une épée, avec d'un côté des ligands stabilisant le complexe récepteur/protéine G et de l'autre, les ligands déstabilisant ce complexe. Ce concept n'exclut, cependant pas, la possibilité de retrouver des efficacités partielles à l'intérieur d'une même classe de ligands. Cela implique un continuum de réponses possibles allant de l'agoniste inverse à l'agoniste complet. Malheureusement, seuls des systèmes pharmacologiques appropriés peuvent nous permettre d'observer la gamme complète des réponses pharmacologiques des ligand des récepteurs couplés aux protéines G.

Un aspect pharmacologique important de l'agonisme inverse est de reconnaître que cette propriété des antagonistes puisse être associée à son activité. J'ai déjà discuté de la difficulté liée au développement des systèmes permettant de mesurer cette activité. Néanmoins, cela ne signifie pas que l'activité agoniste inverse n'a pas d'application potentielle comme activité thérapeutique. Par ailleurs, puisque les ligands endogènes sont des agonistes, la règle probable du système sera que la position d'équilibre de la majorité des récepteurs couplés aux protéines G favorisera l'état inactif du récepteur de sorte que la cellule puisse répondre à la présence d'agonistes en augmentant la proportion des formes actives et ainsi transmettre un signal amplifié. Cependant, le récepteur endogène, que l'on retrouve encodé dans le virus 8 de l'herpès humain, fait exception à cette règle. Ce récepteur semble démontrer une activité constitutive maximale qui pourrait être inhérente au besoin de la fonction virale qui doit être indépendante des agonistes provenant de l'hôte ⁽²⁰¹⁾. Dans le même ordre d'idée, plusieurs évidences démontrent que des mutations naturelles des récepteurs couplés aux protéines G engendrent des dysfonctions pathologiques possiblement reliées à l'activation constitutive de ses récepteurs (pour revue, ²⁰²). Parmi ces pathologies, on retrouve la dégénérescence

rétinienne (rodhopsine ²⁰³), le syndrome familiale de puberté précoce masculine (récepteur de l'hormone leutéinisante ²⁰⁴), l'adénome thyroïdien (récepteur de la thyrotropine ²⁰⁵) et l'hypercalcémie chondrodysplasique métaphyséale de type Jansen (récepteur de la PTH ²⁰⁶). Par ailleurs, une mutation (GLY16) du récepteur β_2 adrénergique induirait une surexpression et une accélération de la sous-régulation du récepteur mutant chez des patients souffrant d'asthme nocturne (²⁰⁷), ce qui confirme également la possibilité que les mutations des récepteurs pourraient jouer un rôle important dans plusieurs maladies. Les techniques utilisées en biologie moléculaire comme, par exemple, les analyses mutationnelles, sont présentement utilisées pour associer des états pathologiques avec des variations de séquence dans les gènes (²⁰⁸). Cette approche est largement utilisée en neuropsychiatrie où des évidences de polymorphisme pour les récepteurs dopaminergiques (D_4) ont été associées à des variations de réponses aux traitements avec les neuroleptiques (²⁰⁹). L'implication de ces résultats dans le traitement de la schizophrénie demeure cependant encore controversée.

Puisque les agonistes inverses sont perçus comme étant un nouveau type de composés, il serait extrêmement intéressant de voir quelle sera la place de ces composés dans les thérapies expérimentales. Il pourrait même être désavantageux pour un composé de posséder des propriétés agonistes inverses. Ainsi, si le niveau membranaire normal de certains récepteurs est contrôlé par la phosphorylation spontanée des récepteurs activés, l'agoniste inverse pourrait prévenir ce processus normal et produire un déséquilibre du cycle de synthèse/destruction du récepteur et engendrer des effets indésirables (sur-régulation et tachyphylaxie).

3. 2. 3 Les propriétés de sur-régulation et de sous-régulation atypiques induites par les antagonistes

Je vous présente maintenant un aspect important de la régulation des récepteurs qui fut abordé à la section 1. 3. 5. Il s'agit de la capacité des ligands agonistes à induire la désensibilisation (phosphorylation), l'internalisation ou la séquestration des récepteurs membranaires lors de l'exposition aux agonistes. Cette propriété des systèmes biologiques mène à une réduction de la réponse, ce qui permet un contrôle sur l'intensité de la réponse aux multiples signaux extracellulaires. En tenant compte de la vision réductionniste selon laquelle les agonistes inverses stabilisent sélectivement les conformations inactives alors que les agonistes favorisent les conformations actives et, puisque l'exposition prolongée aux agonistes résulte fréquemment en une sous-régulation du récepteur (diminution du nombre de récepteurs), il est prévisible que des traitements avec des agonistes inverses régulent les récepteurs d'une manière opposée aux agonistes. Il est donc facilement envisageable que les agonistes inverses puissent induire une sur-régulation des récepteurs (augmentation du nombre de récepteurs). Par ailleurs, on retrouve une vaste littérature portant sur les effets *in vivo* de sur-régulation par les "antagonistes" classiques. Cependant, il est difficile de discerner si ces effets sont causés par l'action antagoniste "compétitif simple" des composés qui préviendrait un certain degré de sous-régulation induite par les agonistes endogènes circulant, ou si ces effets sont le reflet de l'activité agoniste inverse de ces ligands. Néanmoins, des évidences suggèrent que l'activité agoniste inverse est responsable de la sur-régulation de certains récepteurs spontanément actifs. Ainsi, des agonistes inverses du récepteur H₂ (cimétidine et ranitidine) de l'histamine produisent une sur-régulation de ce récepteur exprimé en cellules CHO, alors que les traitements avec un antagoniste neutre (burimamide) étaient sans effet sur le niveau de récepteurs exprimés (²¹⁰). On a également observé que les traitements avec le bétaxolol (agonistes inverses d'un CAM du récepteur β_2 adrénergique exprimé pour les cellules NG108-15) produisent une sur-régulation indépendante de la redistribution cellulaire et de la régulation des niveaux d'ARNm codant pour le récepteur

(²¹¹). Cette sur-régulation n'a cependant aucun effet sur la réponse maximale, ce qui reflète possiblement une limitation du niveau d'activité de l'adénylate cyclase du système. Par contre, en l'absence de cette limitation, ce même mutant exprimé chez les cellules CHO présente une sur-régulation et une augmentation d'activité maximale suite aux traitements avec le bétaxolol (²¹²). Cette étude démontre également que l'activation constitutive du récepteur peut mener à une désensibilisation et à une phosphorylation soutenue du récepteur β_2 adrénergique; ce qui suggère que la forme active de ces mutants est ciblée par des protéines kinases tel que décrit à la section 1. 3. 5. 2.

Cependant, il existe des cas d'exception qui ne correspondent pas au concept de la sur-régulation induit par les agonistes inverses. Cette exception est la sous-régulation atypique du récepteur 5-HT_{2C} de rat telle que décrite et discutée préalablement à la section 2. 0. 2. 1 et 3. 1. 1 de cette discussion. Il me semble important ici d'élaborer le concept selon lequel les propriétés agonistes inverses des ligands sérotoninergiques étudiés n'ont aucun lien tangible avec leur propriété à induire une perte de sites de liaison lors de prétraitements avec certains antagonistes. Les études *in vivo* rapportant le phénomène de sous-régulation atypique présentent des résultats similaires à ce que j'ai observé *in vitro* en cellules Sf9 mais ces études ne fournissent malheureusement aucune indication sur le mécanisme impliqué. Mes propres études du phénomène ont, toutefois, révélé que le processus est non réversible (même 24 h après le traitement, données non rapportées). Ainsi, on suppose que la liaison de certains antagonistes sérotoninergiques entraîne un changement conformationnel du récepteur menant à un état possédant une très faible affinité pour les ligands. Le mécanisme impliquerait ainsi une induction conformationnelle. Cette hypothèse est toutefois contradictoire avec le concept de sélection conformationnelle par le ligand puisqu'elle ne permet pas de supporter un processus qui enrichirait une conformation pour laquelle celui-ci ne possède aucune affinité (très faible affinité). C'est malheureusement à cette étape que les modèles thermodynamiques échouent dans l'explication du phénomène. Par ailleurs, si on fait intervenir des processus irréversibles concomitants, on peut imaginer que la conformation induite par l'antagoniste down-régulateur pourrait subir une modification persistante (phosphorylation ou déphosphorylation) qui pourrait contraindre le récepteur à adopter un

état conformationnel irréversible. On peut alors spéculer que ce manque de plasticité au niveau de la transition conformationnelle entraîne la perte de capacité d'interaction avec les ligands. Bien que j'ai étudié ce phénomène en caractérisant en détail la pharmacologie de ce récepteur, aucune évidence biochimique ne me permet d'affirmer que les antagonistes favorisent une agrégation ou une dégradation putative des récepteurs 5-HT_{2c}. Les seuls indices qui peuvent nous aider à ébaucher un mécanisme expliquant la sous-régulation atypique nous proviennent de l'effet des prétraitements avec des agonistes inverses sur le couplage fonctionnel du récepteur 5-HT_{2c} exprimé chez les cellules Sf9 (section 2. 0. 2. 2). Par ailleurs, il est possible que le mécanisme impliqué dans la sous-régulation atypique découle de processus similaires à ceux impliqués dans l'internalisation du récepteur CCK-A induite par des antagonistes (²¹³). Par contre, il est difficile de démontrer ce concept car nous ignorons si cet antagoniste possède des propriétés agonistes inverses ou même s'il induit une sous-régulation atypique du récepteur dans la préparation membranaire. Ces hypothèses peuvent sembler extravagantes et très spéculatives mais, à ma connaissance, peu d'études ont adressé la question du mécanisme de sous-régulation atypique.

Une autre approche pour tenter d'expliquer le manque apparent de corrélation entre l'activité agoniste inverse des antagonistes sérotoninergiques et leur capacité à réduire la densité des sites de liaison sans impliquer la possibilité d'une liaison irréversible des ligands, serait d'envisager le problème de l'activité réelle d'un composé avec un certain scepticisme. Vu sous cet angle, les données pharmacologiques nous indiquent que certains agonistes inverses (méthysergide) et tous les agonistes étudiés (5-HT, DOI) sont incapables de produire une perte de sites de liaison lors de prétraitements. Il serait intéressant de considérer qu'au lieu de chercher une propriété commune aux antagonistes down-régulateurs, l'on examine la possibilité que ce sont les composés inactifs qui possèdent des propriétés communes. L'impact de ces agonistes inverses à faible efficacité de sous-régulation atypique constitue un des fondements explicatifs de mon hypothèse voulant que ces deux phénomènes pharmacologiques ne soient pas interdépendants. Il est donc important d'examiner toutes les interprétations possibles du phénomène, même si cela semble, à première vue, quelque peu inusité.

Parmi les hypothèses qui pourraient expliquer les propriétés communes entre les agonistes et la méthysergide, il serait intéressant de considérer que certains agonistes peuvent avoir des effets différents sur l'activation du récepteur et sur l'effet de couplage entre le récepteur et la protéine G. Selon ce concept, il devient alors possible qu'un nouveau type de ligand ait des activités différentes selon l'état basal d'un système. Ce ligand posséderait une efficacité dite "protean" ou changeante selon le système (²¹⁴). Cette nouvelle propriété pourrait être concevable si le ligand contraint le récepteur à adopter une conformation ARG*, moins efficace, qui possède des caractéristiques d'activation (efficacité) différentes de la conformation naturelle spontanément active (RG*, plus efficace). On présume alors que plusieurs conformations actives existent et qu'elles ne possèdent pas toutes la même efficacité de couplage. Si cela est possible, le récepteur pourrait acquérir ainsi, en fonction du ligand, de nouvelles caractéristiques de couplage avec la protéine G. Puisque la réponse fonctionnelle finale dépend de la sommation des formes spontanément actives et des formes actives liant un ligand, dans le cas où ces dernières sont moins efficaces, il y aura alors inhibition ou diminution apparente du niveau basal. Expérimentalement, cet effet pourrait être observé lorsque les conditions favorisent un niveau basal élevé (riche en R*G*). Dans ces circonstances, la présence du ligand enrichirait la forme AR*'G*' moins efficace que la forme R*G*, résultant ainsi en une activité agoniste inverse virtuelle. Lorsque le niveau basal spontané est faible ou négligeable, le ligand fonctionnerait comme un agoniste partiel. Certaines évidences repérées dans la littérature nous indiquent que de tels composés peuvent exister, l'effecteur allostérique PD 81,723 augmente la liaison des agonistes du récepteur A1 de l'adénosine en stabilisant l'interaction récepteur/protéine G, ce qui suggère que des ligands peuvent posséder des propriétés "protean" (²¹⁵).

Il est par contre difficile de démontrer que ces ligands "protean" existent. Si la méthysergide est un ligand "protean", les changements du niveau d'activation spontanée mesurable du récepteur 5-HT_{2C} changent selon le niveau de récepteurs exprimés devrait alors affecter les caractéristiques pharmacologiques apparentes de ce composé. Dans l'hypothèse du ligand "protean", il faut ainsi considérer que le manque de corrélation établie entre la propriété agoniste inverse et celle de la sensibilisation de la réponse par

les antagonistes n'est pas démontrable au sens strict du terme selon les résultats obtenus dans la deuxième étude. Cependant, un raisonnement analogue peut difficilement être soutenu pour rejeter les conclusions de la première étude puisque ce sont les activités de plusieurs composés qui nous permettent de conclure en un manque de corrélation entre l'agonisme inverse et la sous-régulation atypique. Il serait peu probable que plusieurs ligands soient "protean" dans la même étude. Par ailleurs, aucune donnée dans la littérature ne suggère pas que la méthysergide pourrait être un agoniste partiel du récepteur 5-HT_{2C} ou qu'elle posséderait des propriétés de type agoniste qui sont dépendantes du système pharmacologique utilisé. Sans les mécanismes impliqués dans la sous-régulation atypique et la sensibilisation induite par les antagonistes, je dois continuer à supporter mon hypothèse préliminaire suivant laquelle l'agonisme inverse ne peut expliquer la propriété de sous-régulation et de sensibilisation des antagonistes du récepteur 5-HT_{2C}. Il est donc admissible que ces trois phénomènes soient distincts et qu'ils dépendent de propriétés spécifiques, propres à certains ligands du récepteur 5-HT_{2C}.

3. 2. 4 La désensibilisation spontanée des récepteurs couplés aux protéines G et la propriété de sensibilisation de la réponse fonctionnelle du récepteur par les antagonistes

L'élévation de l'activation spontanée des récepteurs couplés aux protéines G est parfois accompagnée d'une désensibilisation constitutive qui produit une réponse maximale diminuée par rapport aux systèmes équivalents sans activation spontanée (²¹²). Dans cette optique, il est facile de concevoir qu'un agoniste inverse stabilise la forme inactive et inhibe de cette manière la désensibilisation spontanée du récepteur, soit en diminuant les concentrations cellulaires de messagers secondaires, soit en diminuant les formes actives ciblées par les GRK. Pour les récepteurs 5-HT_{2c} exprimés chez les cellules Sf9 (section 2. 0. 2. 2), les traitements chroniques avec des agonistes inverses qui induisent une perte de sites de liaison sont, dans certains cas (la miansérine, la métergoline et la clozapine), accompagnés d'une sensibilisation de la réponse aux

agonistes. L'absence de sensibilisation de la réponse des agonistes en présence de l'agoniste inverse methysergide, nous indique que cette sensibilisation ne peut pas être expliquée par l'inhibition de la désensibilisation constitutive résultant des propriétés agonistes inverses des antagonistes. La sensibilisation peut donc difficilement résulter de l'inhibition par les antagonistes métergoline, miansérine et clozapine de la désensibilisation constitutive du récepteur. La sensibilisation de la réponse fonctionnelle du récepteur 5-HT_{2c} induite par des traitements avec certains antagonistes sérotoninergiques ne peut donc provenir uniquement de l'activité agoniste inverse de ces composés. Par contre, les résultats expérimentaux de la deuxième étude ne nous permettent pas d'établir avec certitude que la sous-régulation et la sensibilisation fonctionnelle sont des propriétés distinctes et indépendantes. Si l'on considère uniquement que les ligands les plus efficaces à produire une perte de sites de liaison sont également les composés les plus efficaces à augmenter la réponse fonctionnelle du récepteur, il serait très facile de penser que la sous-régulation induit un réarrangement de l'équilibre conformationnel du récepteur qui permet une potentiation de la réponse aux agonistes. Il faut, toutefois, considérer que les traitements avec la métergoline, la miansérine et la clozapine induisent d'abord, à plus faible concentration, une augmentation de l'activation constitutive du récepteur. Cette augmentation de l'activité spontanée du récepteur (induite par le prétraitement) pourrait ainsi produire une activation, en l'absence d'agoniste, de la cascade métabolique menant à une sous-régulation classique des sites de liaison. Selon cette hypothèse, la downregulation atypique serait dépendante de l'augmentation de l'activation spontanée observée après les traitements.

Je suis conscient du fait que le mécanisme impliqué dans la sensibilisation du récepteur 5-HT_{2c} exprimé en cellules Sf9 n'a pu être élucidé lors de mes études, toutefois, les résultats observés sont tout de même évocateurs du phénomène nommé "Augmentative Antagonism" (section 1. 4. 3. 3¹⁰⁹). Plusieurs hypothèses mécanistiques pour expliquer ce phénomène de sensibilisation par les antagonistes ont été proposées (¹⁰⁰⁻¹¹²). L'explication la plus probante tient compte d'un modèle allostérique à deux états: un état réfractaire et un état activable. Ce modèle fut proposé par Robertson et al

pour expliquer les propriétés des antagonistes du récepteur A₁ de l'angiotensine (¹⁰⁹). Dans ce modèle, un "hémiequilibre" (isomérisation lente) permet aux antagonistes augmentatifs de se lier préférentiellement et de stabiliser une conformation activable du récepteur. Cet état persiste et permet à un agoniste de moduler une plus grande réponse fonctionnelle. Le concept d'hémiequilibre apporte une nouvelle dimension aux modèles thermodynamiques dont nous avons préalablement discutés. Cette propriété d'un système ne peut être complètement expliquée par la règle de réversibilité microscopique appliquée dans les modèles thermodynamiques. Celle-ci prévoit qu'après une perturbation d'un système, l'équilibre entre chaque espèce (conformation) redevient complet lorsque le système retourne à un état dynamique stable (²¹⁶). Lors de l'hémiequilibre, le récepteur maintient une conformation transitoire qui possède des propriétés différentes de l'état final stabilisé par le ligand. Cette transgression des modèles en équilibre dynamique peut expliquer des phénomènes pseudo-réversibles impliquant des modifications covalentes d'un système, comme par exemple, la désensibilisation du récepteur par l'action des kinases. Le modèle de Robertson et al ne peut malheureusement expliquer le niveau élevé d'activation spontanée du récepteur 5-HT_{2c}, ni la perte de sites de liaison induite par les antagonistes sérotoninergiques. Un autre modèle devra être proposé pour intégrer tous les phénomènes observés chez les cellules Sf9 exprimant le récepteur 5-HT_{2c}. Sans connaître le ou les mécanismes impliqués, on peut tout de même proposer un scénario pour expliquer la façon dont la perte de sites pourrait mener à la sensibilisation de la réponse des agonistes même si cette hypothèse reste spéculative. Si l'on considère la possibilité qu'une population importante de récepteurs 5-HT_{2c} soient désensibilisés, certains antagonistes pourraient se lier de façon préférentielle aux récepteurs désensibilisés favorisant ainsi leur agrégation irréversible, c'est-à-dire une élimination de leur capacité de liaison et de couplage avec la protéine G. Cette transition vers un état inerte enrichirait la proportion de formes non désensibilisées du récepteur et permettrait au pool des composantes de signalisation séquestrées par les formes désensibilisées d'interagir avec un plus grand nombre de récepteurs non désensibilisés. Dans l'état actuel de nos connaissances, le phénomène de sensibilisation reste encore ambigu et il

nous manque encore beaucoup d'observations pour pouvoir démontrer qu'il s'agit d'une propriété distincte des antagonistes.

Il est, cependant, très plausible que la sensibilisation de la réponse fonctionnelle induite par les antagonistes sérotoninergiques puisse avoir un certain rôle au niveau thérapeutique. Contrairement aux traitements avec les agonistes inverses qui produisent une sur-régulation, la sensibilisation fonctionnelle induite par les antagonistes sérotoninergiques est accompagnée d'une perte de sites (sous-régulation). Cette caractéristique pourrait ainsi minimiser les problèmes potentiels de tachyphylaxie ou de tolérance puisque même avec une diminution du nombre de récepteurs, on observe une sensibilisation de la réponse. On pourrait argumenter que le système pharmacologique du 5-HT_{2c} exprimé en cellules Sf9 est un système intrinsèquement désensibilisé par l'activation constitutive du récepteur, comme semble indiquer le niveau basal élevé de phosphorylation de ce récepteur exprimé chez les cellules NIH/3T3 (¹⁷¹). Dans ce contexte de population de récepteurs désensibilisés, la sensibilisation fonctionnelle pourrait servir à restaurer les propriétés fonctionnelles d'un système désensibilisé, soit par la présence chronique d'agonistes endogènes ou par un traitement prolongé avec des agonistes thérapeutiques. Ainsi, les antagonistes 5-HT_{2c} démontrent des activités agonistes inverses, des activités de sous-régulation atypiques et de sensibilisation fonctionnelle qui peuvent être sélectionnées pour obtenir un effet spécifique comme par exemple l'inhibition de l'activation spontanée, la diminution du nombre de sites de liaison ou la restauration d'une efficacité de couplage déficiente. Les trois nouvelles propriétés des antagonistes décrites dans ce manuscrit auront peut-être des implications importantes dans l'activité thérapeutique des ligands.

3. 3 Rôle des antagonistes en tant qu'agents thérapeutiques et leur impact sur le développement de nouveaux médicaments

Bien que depuis plusieurs années on associe le mécanisme thérapeutique des antagonistes des récepteurs couplés aux protéines G au blocage compétitif de l'action des agonistes au niveau du site de liaison d'un récepteur, il est de plus en plus évident que ce rôle classique ne correspond plus à la réalité pharmacologique des récepteurs couplés aux protéines G. Nous savons maintenant, grâce à plusieurs études parmi lesquelles figurent mes recherches, que les antagonistes ont des activités indépendantes des agonistes. Devant ce fait indéniable, il faut cependant apporter certaines nuances lorsqu'on parle de nouvelles propriétés des ligands, qu'il s'agisse d'agonistes ou d'antagonistes, car l'action proprement dite d'un ligand n'est pas de causer une nouvelle activité biologique, mais plutôt de perturber le système de façon à ce que l'activité de celui-ci soit modifiée par rapport à son état initial. Dans cette perspective, le médicament (à l'exception des antibiotiques) corrigera rarement la source ou la cause de la dysfonction, mais soulagera plutôt ses effets pernicieux. Nous traitons malheureusement les symptômes et rarement la cause de la maladie. Néanmoins, à mon avis, le médicament peut faciliter le processus normal de guérison, soit en prévenant une détérioration due aux effets néfastes de la maladie, soit en permettant une adaptation du système biologique affecté.

Ce mécanisme d'adaptation des systèmes biologiques est détrimentaire à l'utilisation de certains médicaments puisqu'il est fréquent que l'organisme humain développe une tolérance et même une dépendance aux traitements. Les antagonistes aussi bien que les agonistes induisent des adaptations des systèmes biologiques lors de traitements chroniques. Ces effets à long terme limitent le potentiel thérapeutique des médicaments. Les médicaments entraînent également des effets secondaires nuisibles, principalement parce que l'on soupçonne une sélectivité et une affinité insuffisantes envers leurs cibles pharmacologiques. À mon avis, cette façon de penser a une influence prépondérante sur le développement de nouveaux médicaments. Ainsi, la nouvelle tendance en chimie-pharmacologique est de produire, de façon aléatoire, des bibliothèques

“combinatoires” de composés chimiques. Cette approche génère des milliers de composés qui seront criblés selon leurs critères de sélectivité et d’affinité pour le récepteur. Le criblage de cette importante quantité de composés, fait appel à de multiples stratégies de biologie moléculaire pour reconstituer des systèmes pharmacologiques qui permettent une mesure rapide du potentiel de liaison du composé et ainsi que son efficacité sur une réponse biologique. Cette réponse est normalement sélectionnée pour représenter le potentiel thérapeutique d’un ligand. Dans cette approche, les ligands seront comparés avec un standard thérapeutique. On mise ainsi énormément sur cette capacité de criblage “high through put” pour découvrir de nouveaux médicaments ayant une plus grande sélectivité et efficacité. Le principal inconvénient de cette approche est le risque de retrouver systématiquement des composés ayant les mêmes propriétés et les mêmes effets secondaires puisqu’ils sont identifiés selon un nombre limité de critères pharmacologiques. Le risque inhérent à cette nouvelle technologie est qu’ elle mise plus sur la quantité et la chance rationalisée pour identifier une multitude de composés que sur la compréhension des mécanismes en cause dans la maladie. Cette approche favorise généralement la découverte de médicaments qui contrôlent les symptômes sans remédier la cause de la maladie. Ainsi, on parle plus de guérison mais de soins, puisque les médicaments soignent mais ne guérissent que rarement!

Selon mon opinion, l’avancement technologique ne peut remplacer l’approche rationnelle et systématique que constitue la connaissance fondamentale des propriétés thérapeutiques. La pharmacologie moderne devra mettre à profit ces nouvelles technologies de criblage ainsi que la découverte des nouvelles propriétés des ligands si elle désire maximiser ses efforts de développement de nouveaux médicaments.

3. 4 Tendances du domaine de recherche

Le domaine d'étude des récepteurs couplés aux protéines G évolue rapidement! On ne clone plus autant de nouveaux récepteurs et l'on découvre maintenant que les récepteurs, les protéines G et les effecteurs sont régulés par une multitude de protéines (GRK, RGS, etc.), elles-mêmes régulées par d'autres (kinase-kinase, phosphatase). Le modèle simplifié du récepteur liant le ligand et activant la protéine G et l'effecteur sera bientôt remplacé par une multitude de mécanismes de régulation. Nous ne sommes qu'à l'aube de la compréhension de ces mécanismes complexes de régulation des signaux cellulaires. Les étapes à franchir sont inconnues et le travail ardu. Même s'il est difficile de prédire exactement la direction que le domaine des récepteurs couplés aux protéines G prendra, il est fort probable, qu'à court terme, certaines questions fondamentales traitées dans ce manuscrit trouveront leur réponse.

4.0 Conclusion

En plus de rapporter une caractérisation exhaustive des propriétés des antagonistes des récepteurs 5-HT_{2C} et A1, mes études démontrent l'efficacité du système d'expression baculovirus/Sf9 pour l'expression et pour l'étude des récepteurs couplés aux protéines G. Les qualités importantes du système Sf9 sont mises en évidence par le fait que les propriétés de liaison des récepteurs exprimés sont identiques à celles observés dans les tissus ou lignés cellulaires. De plus, la réponse fonctionnelle des récepteurs étudiés nous indiquent que les cellules Sf9 permettent un couplage fonctionnel entre le récepteur 5-HT_{2C} et la protéine G endogène (IP₃) ou entre le récepteur A1 et la protéine Gi coexprimés (GTPγS³⁵). Cette capacité modulaire de coexpression du récepteur et de la protéine G est un avantage qui nous permet d'étudier pour la première fois l'effet de la protéine G sur la liaison des agonistes inverses. Il n'y a aucun doute que sans les propriétés du système Sf9, la plupart de mes études auraient été impossibles. Il serait donc difficile d'ignorer cet outil précieux dans l'étude des récepteurs couplés aux protéines G.

En résumé, mes travaux de recherche ont démontré et caractérisé trois nouvelles activités des antagonistes des récepteurs couplés aux protéines G, soit: (1) l'activité agoniste inverse, (2) la sous-régulation atypique et (3) la sensibilisation de la réponse fonctionnelle du récepteur 5-HT_{2C} par les prétraitements avec certains antagonistes sérotoninergiques. Ces nouvelles activités des antagonistes se sont révélées indépendantes de la présence d'agonistes, ce qui démontre clairement que les antagonistes des récepteurs couplés aux protéines G sont bien plus que des agents inactifs qui sont en compétition pour l'occupation du site de liaison. Avec la démonstration de ces nouvelles propriétés des antagonistes, un changement important de la perception du rôle fonctionnel des antagonistes s'impose. Désormais, on ne peut plus considérer et/ou classifier les antagonistes seulement selon leur affinité pour le récepteur, mais également selon leur efficacité intrinsèque qui est parfois opposée à celle des agonistes.

Dans ce nouveau concept pharmacologique, la caractérisation de phénomènes associés aux activités fonctionnelles des antagonistes suggère qu'il s'agit vraisemblablement de propriétés distinctes, ou le ou les mécanismes d'action impliqués restent mal étudiés, spécialement pour le phénomène de la sous-régulation atypique et de la sensibilisation fonctionnelle des RCG. Malgré que ces mécanismes demeurent inconnus, nous devons reconnaître l'importance de la caractérisation pharmacologique exhaustive des phénomènes tel que présenté dans mes études, afin de reconnaître la crédibilité de ces nouvelles propriétés des antagonistes.

Au delà de ces limitations mécanistiques, la modélisation et la simulation de l'impact du couplage fonctionnel entre le récepteur A₁ de l'adénosine et sa protéine G sur les propriétés de liaison des agonistes inverses propose un mécanisme dynamique d'interaction entre le récepteur et la protéine G. La convergence de mes observations et de leurs applications au modèle étendue à complexe ternaire démontre, pour la première fois, que les propriétés des agonistes inverses sont directement affectées d'une manière opposés à celles des agonistes, c'est-à-dire que la présence de la protéine G diminue la proportion de sites de haute affinité pour les antagonistes d'un récepteur qui démontre un pré-couplage fonctionnel. Le modèle étendu à complexe ternaire tel que décrit ici, est sans aucun doute un apport majeur à la compréhension des propriétés des antagonistes et des agonistes.

En conclusion, en contribuant à l'étude des propriétés des antagonistes des récepteurs couplés aux protéines G, mes études doctorales soulèvent plusieurs questions sur le mécanisme d'action des ligands sur l'activité des récepteurs. Ce mécanisme d'action demeure encore mal connu, ce qui devrait également susciter l'intérêt d'autres chercheurs. La compréhension des mécanismes fondamentaux de l'action des ligands sur la signalisation des RCG demeure selon moi une voie de la recherche déterminante de la pharmacologie moderne qui permettra peut être de découvrir les composés thérapeutiques selon le fondement rationnel de leur activité thérapeutique. Cette nouvelle approche devrait produire des médicaments plus efficaces et plus sélectifs, ce qui devrait diminuer les effets nuisibles des ces nouveaux agents thérapeutiques.

5. 0 REFERENCES

- ¹ Changeux J-P., Galzi J-L., Devillier T-A. et Bertrand D. The functional architecture of the acetylcholine nicotinic receptor explored by affinity labeling and site directed mutagenesis. *Quart Rev Biophys* **25**:395-432 (1992).
- ² Summers RJ. et Mc Martin LR.. Adrenoreceptor and their second messenger systems. *J. Neurochem.* **60**:10-23 (1993).
- ³ Simon MI. , Stathmann MP., Gautam N. Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* **252**:802-808 (1994).
- ⁴ Mayer BJ. et Baltimore D. Signaling through SH2 domain and SH3 domain. *Trend Cell Biol.* **3**:8-13 (1993).
- ⁵ Laduron PM. Towards a genomic pharmacology from membranal to nuclear receptor. *Adv Drug Res* **22**:108-148 (1992).
- ⁶ Hoyer D. et Humphrey P. Nomenclature and classification of transmitter receptor: Integrated approach. *J. Receptor & Signal Trans. Reas.* **17**:551-568 (1997).
- ⁷ Bray P., Carter A., Simons, C., Guo V., Puckett C. Human cDNA clones for four species of Gs signal transduction protein. *Proc Natl Acad. Sci. USA.* **83**:8893-897 (1986).
- ⁸ Ithot, H., Katada T.U.M., Kawasaki H. et Susuki, K. Identification of three pertussis toxin substrates (40,41 and 39kDa proteins) in mammalian brain. *Febs Lett.* **230**:85-89 (1988).
- ⁹ Hsu, W.H., Rudolph, U., Sanford J., Bertrand P. et Olate J. . Molecular cloning of a novel splice variant of the α subunit of the mammalian Go protein. *J. Biol.Chem.* **265**:11220-226 (1989).
- ¹⁰ Goldsmith, P., Backlund P.S., Rossiter K., Carter A. et Milligan, G. Purification of heterotrimeric GTP-binding proteins from brain . Identification of a novel form of Go. *Biochemistry* **27**:7085-90 (1988).
- ¹¹ Taylor, S.J., Chae H.Z., Rhee S.G. et Exton, J.H. Activation of β 1 isozyme of phospholipase C by α subunits of the Gp class of G protein. *Nature* **350**:516-518 (1991).
- ¹² Jones, D. T. et Reed, R. R. Golf an olfactory neuron specific-G protein involved in odorant signal transduction. *Science* **244**:790-795 (1989).

-
- ¹³Matsuoka, M. , Itoh, et Kaziro, Y. Characterization of the human gene for Gx α , a pertussis toxin-insensitive regulatory GTP-binding protein. *J. Biol. Chem.* **265**:13215-220 (1990).
- ¹⁴Casey, P. J. Fong, H. K. W. , Simon, M. I. , et Gilman, A. G. 1990. Gz, a guanine nucleotide-binding protein with unique biochemical properties. *J. Biol. Chem.* **265**:2383-2390.
- ¹⁵Amatruda, T.T., Gautam, N.H, Fong, H.K.W., Northup J.K. et Simon, M. I.. the 35 and 36kDa β subunit of GTP-binding regulatory protein are products of separate genes. *J. Biol. Chem.* **263**:5008-5011(1988)
- ¹⁶Hurley, J.B. , Fong H.K.W., Tslow, D.B., Dreyer W.J. et Simon M.I. Isolation and characterization of a cDNA clone for the γ subunit of bovine retinal transducine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**:6948-6952 (1984).
- ¹⁷Holbrook, S. et Kim S.H. 1989. Molecular model of the G protein α subunit based on the cristal structure of the HRAS protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**:568-572 (1989).
- ¹⁸Johnson,R. A. et Corbin, J. D.. Methods in enzymology, volume 195, page 171-342 (1991).
- ¹⁹Kahn, R.A. et Gilman, A.G. ADP-ribosylation of Gs promotes the dissociation of its α and $\beta\gamma$ subunits. *J. Biol. Chem.* **259**:6235-6240 (1984).
- ²⁰Kahn, R. A. , Kein, F. G. , Clark, J. , Gelmam, E. P. , et Rulka, C. Human ADP-ribosylation factors, a functionally conserved family of GTP-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **266**:2606-2614 (1991).
- ²¹Freissmuth, M. , Casey, P. J. et Gilman, A.G.. G proteins control diverse pathways of transmembrane signaling. *FASEB. J.* **14** :2125-2128. (1989)
- ²² Clapman DE et Neer E J. G proteins $\beta\gamma$ subunits. *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.* **37**:167-203 (1997).
- ²³ Berman, D. M., T. M. Wilkie and A.G. Gilman. *Cell.* **86**:445-52 (1996).
- ²⁴ Piacentini L., et Niromand F. Phosphotransfer reaction as mean of G protien activation. *Mol. Cell Biochem.* **157**:59-63 (1996).
- ²⁵ Wieland T., Nurmberg B., Ulibarri I., Kaldenberg-Stassch S., Achulz G. et Jacobs KH. Guanine nucleotide specific phosphate transfer by guanine nucleotide regulatory protein β subunits. *J. Biol. Chem.* **268**: 18111-18118 (1993).

-
- ²⁶ Strader CD, Fong TM, Tota MR, Underwood D et Dixon RAF. Structure and function of G proteins coupled receptor. *Annu. Rev. Biochem.* **63**:833-841 (1994).
- ²⁷ Guan X-M, Amend A et Strader CD. Determination of structural domain for G proteins coupling ligand binding in β_3 adrenergic receptor. *Mol Pharmacol.* **48**:492-498 (1995).
- ²⁸ Wess J, Bonner TI, Derje F, et Brann MR. Delineation of muscarinic receptor domains conferring selectivity of coupling to guanine nucleotide-binding proteins and second messengers. *Mol Pharmacol* **38**:517-523 (1990).
- ²⁹ Nishimoto I, Murayama Y et Katada T. Possible direct linkage of insulin like growth factor-II with guanine nucleotide-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **264**:14029-14038 (1989).
- ³⁰ Nishimoto I, Murayama Y , Matsuura Y et Ogata E. Alzheimer amyloid protein precursor complex with brain GTP-binding protein Go. *Nature* **362**: 75-79 (1993).
- ³¹ Ross EM, Wong SKF, Rubenstein RC et Higashijima T. Functional domains in the β -adrenergic receptor. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **53**:499-506 (1988).
- ³² Balwin JM. Structure and function of receptor coupled to G proteins. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **6**:180-90 (1994).
- ³³ Schönenberg T. , Yun J. , Wenkert D. et Wess J. Functional rescue of mutant V2 vasopressin receptors causing nephrogenic diabetes insipidus by coexpressed receptor polypeptide. *EMBO J.* **15**:1283-91 (1996).
- ³⁴ Wall MA. , Coleman DE. , Lee E. , Iniguez-Lluhi JA. , Posner BA. , Gilman AG. Et Spang SR.. The structure of the G protein hetetotrimer $G\alpha_i1\beta_1\gamma_2$. *Cell.* **83**:1047-1058 (1995).
- ³⁵ Birnbaumer L et Birnbaumer M. Signal transduction by G proteins:1994 edition. *J. Recep. & Signal Trans. Resear.* **15**:213-252 (1995).
- ³⁶ Mixon MB, Lee E, Coleman DE, Berghuis AM, Gilman AG et Sprang SR. Ternary and quaternary structural changes in Gai1 induced by GTP hydrolysis. *Science* **270**:954-960 (1995).

-
- ³⁷ Harhammer R, Nurmberg B, Harteneck C, Leopoldt D, Exner T et Schultz G. Distinct biochemical properties of the native members of the G12 G-proteins subfamily. *Biochem J.* **319**: 165-171 (1996).
- ³⁸ Offermans S. et Schultz G. Complex information processing by the transmembrane signaling system involving G proteins. *Naunym Schemiedeberg's Arch. Pharmacol.* **350**:329-338 (1994).
- ³⁹ Gudermann T. , Kalkbrenner F. et Schultz G. Diversity and selectivity of receptor-G proteins interaction. *Annu. Rev. Toxicol.* **36**:429-459 (1996).
- ⁴⁰ Offermanns S. et Simon MI. G α 15 and G α 16 couple a wide variety of receptors to phospholipase C. *J. Biol. Chem* **270**:15175-80 (1995).
- ⁴¹ Sunahara R. K., Dessauer C. W. et Gilman A.G. Complexity and diversity of mammalian adenylate cyclases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **36**:461-480 (1996).
- ⁴² Exton J. H. Regulation of phosphoinositide phospholipase by hormones, neurotransmitters and other agonist linked to G proteins. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **36**:481-509 (1996).
- ⁴³ Exton J. H. Cell signaling through guanine nucleotide binding regulatory proteins (G proteins) and phospholipase. *Eur. J. Biochem.* **243**: 10-20 (1997).
- ⁴⁴ Clapham DE. Direct G proteins gating of ion channels? *Annu. Rev. Neurosci.* **17**:441-64 (1994).
- ⁴⁵ Navarro B, Kennedy ME, Velimirovic B, Bhat D et Peterson A. Clapham DE. Nonselectivity and G $\beta\gamma$ -insensitivity of the weaver K channel. *Science* **272**:1950-53 (1996).
- ⁴⁶ Clapham DE More jobs for the G proteins G $\beta\gamma$ subunit: inhibition of Ca²⁺ currents. *Curr. Biol.* **6**:814-16 (1996).
- ⁴⁷ Wickman KD, Iniguez-Lluhl JA, Davenport PA, Taussig R, Krapivinsky GB, Linder ME, Gilman AG et Clapham DE. Recombinant G proteins $\beta\gamma$ -subunit activate muscarinic-gated atrial potassium channel. *Nature* **368**:255057 (1994).
- ⁴⁸ Hill B. Modulation of ion-channel function by G-protein-coupled receptor. *Trends Neurosci.* **17**:531-36 (1994).

-
- ⁴⁹ Pragnell M. , de Waard M, Moryi Y, Tanabe T, Snutch TP et Campbell KP. Calcium channel β subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the $\alpha 1$ -subunit *Nature* **368**:67-70 (1994).
- ⁵⁰ Clark KI, Dignard D, Thomas Dy et Whiteway M. Interaction among the subunits of the G protein involved in *Saccharomyces cerevisiae* mating. *Mol Cell. Biol.* **13**:1-8. (1993).
- ⁵¹ Leberer E, Dignard D, Harcus D, Hougan L, Whiteway M, et Thomas DY. Cloning of *Saccharomyces cerevisiae* STE5 as a suppressor of a Ste20 protein kinase mutant: structural and functional similarity of Ste5 to Far1. *Mol. Gen. Genet.* **241**:241-54 (1993).
- ⁵² Inglese J, Koch WJ, Touhara K et Lefkowitz RJ. G $\beta\gamma$ interaction with ph domains and Ras-Mapk signaling pathways. *Trend Biochem. Sci.* **20**:151-55 (1995).
- ⁵³ Pace AM, Faur M et Bourne HR. Gi2-mediated cascade of the MAP kinase cascade. *Mol. Biol. Cell* **6**:1685-95 (1995).
- ⁵⁴ Hawes BE, van Biesen T, Koch WJ, Luttrell LM et Lefkowitz RJ. Distinct pathways of Gi and Gq-mediated mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **270**:17148-53 (1995).
- ⁵⁵ Böhm S. K. , Graby E. F. et Bunnett NW. Regulatory mechanism that modulate signalling by G-proteins-coupled receptors. *Biochem. J.* **322**: 1-18 (1997).
- ⁵⁶ Stadel, J. M. , Nambi P. , Shorr R. G. L. , Sawyer, D. F. Caron M. G. et Lefkowitz R. J. Catecholamine-induced desensitization of turkey erythrocyte adenylate cyclase is associated with phosphorylation of the beta-adrenergic receptor. *Proc Natl. Acad. Sci USA* **80**:3173-3177 (1983).
- ⁵⁷ Mochly-Rosen D. Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction. *Science* **268**:247-251 (1995).
- ⁵⁸ DeBlasie A. , Parruti, G et Sallese M. Regulation of G protein-coupled receptor kinase subtypes in activated T lymphocytes. Selective increase of beta-adrenergic receptor kinase 1 and 2. *J Clin. Invest.* **95**:203-210 (1995).

-
- ⁵⁹ Roettger, B. F. Rentsch R. U. Pinon D. , Holicky E. , Hadac E. M. Larkin J. M. et Miller L. J. Dual pathways of internalization of the cholecystokinin receptor. *J. Cell. Biol.* **128**:1029-1041 (1995).
- ⁶⁰ Zhang J. Ferguson, S. G. , Barak L. S. , Menard L. et. Caron M. G. Dynamin and beta-arrestin reveal distinct mechanisms for G protein-coupled receptor internalization. *J. Biol. Chem.* **271**:18302-18305 (1996).
- ⁶¹ Roettger BF, Ghanekar D, Rao R, Toledo C, Yingling J, Pinon D et Miller LJ. Antagonist-stimulated internalization of the G protein-coupled cholecystokinin receptor. *Mol Pharmacol* **51**: 357-362 (1997).
- ⁶² - Tholanikunnel BG, Granneman JG et Malbon CC. The M(r) 35,000 beta-adrenergic receptor mRNA-binding protein binds transcripts of G-protein-linked receptors which undergo agonist-induced destabilization. *J. Biol. Chem.* **270**: 12787-12783 (1995).
- ⁶³ Pranzatelli, M. R., J. N. Murthy et P. T. Tailor. Novel regulation of 5HT-1C receptor: down-regulation induced both by 5HT-1C/2 receptor agonists and antagonists. *Eur. J. Pharmacol.* **244**: 1-5 (1992).
- ⁶⁴ Roth, B. L., M. W. Hamblin R. Desai, et R. D. Ciaranello. Developmental and synaptic regulation of 5HT-2 and 5-HT_{1C} serotonin receptors. In *Serotonin: Molecular biology, receptors and functional effects.* ed. J. R. Fozard/P. R. Saxena , Birkhauser verlag, Basel, Switzerland 33-42 (1991).
- ⁶⁵ Kuoppamäki, M. ,T. Seppälä, E. Sylvälähti et J. Hietala. Chronic Clozapine treatment decreases 5-hydroxytryptamine 1C receptor density in the rat choroïd plexus: Comparison with haloperidol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **264**: 1262-1267 (1992).
- ⁶⁶ Bouvier M. Récepteur constitutivement actifs et agonisme inverse. *M / S* **10**:1011-12 (1994).
- ⁶⁷ Milligan G., Bond RA. et Lee M. Inverse agonism: pharmacological curiosity or potential therapeutic strategy. *Trends Pharmacol. Sci.* **16**:10-13 (1995).
- ⁶⁸ Lefkowitz RG, Turned on to ill effect. *Nature.* **365**:603-604 (1993).

-
- ⁶⁹ Shenker A, Laue L., Kosug S. Merendino JJ, Minegishi T. et Cutler JB. A constitutively activating mutation of the luteinizing hormone receptor in familial male precocious puberty. *Nature* **365**:652-4 (1993).
- ⁷⁰ Robinson PR, Cohen GB Zhukovsky E et Oprian DD. Constitutively active mutants of rhodopsin. *Neuron* **9**:719-25 (1992).
- ⁷¹ Robbins LS. , Nadeau JH. , Johnson KR. , Kelly MA. , Roselli-Rehms L , Back E. , Mountjoy KG. et Cone RD. Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles results from point mutation that alter MSH receptor function. *Cell*. **72**:827-34 (1993).
- ⁷² Allen LF, Lefkowitz RJ. Caron MG. et Cotecchia S. G-protein-coupled receptor genes as protooncogenes: constitutively activating mutation of the α_{1B} -adrenergic receptor enhances mitogenesis and tumorigenicity. *Proc Natl. Acad. Sci USA* **88**:11354-58 (1991).
- ⁷³ Samama P, Cotecchia S. , Costa T. et Lefkowitz RJ. A mutation-induced activated state of the β adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **268**:4625-36 (1993).
- ⁷⁴ Ren Q. Kurose H, Lefkowitz RJ et Cotecchia S. Constitutively active mutants of the α_2 adrenergic receptor. *J. Biol Chem.* **268** 16483-7 (1993).
- ⁷⁵ Herrick-Davis K, Egan C et Teitler M. Activating mutations of the serotonin 5-HT_{2C} receptor. *J. Neurochem* **69**:1138-1144 (1997).
- ⁷⁶ Kjelsberg MA, Cotecchia S, Ostrowski J. , Caron M. , Lefkowitz RJ. Constitutive activation of the α_{1B} adrenergic receptor by all amino acid substitution at a single site. *J. Biol. Chem.* **267**:1430-3 (1992).
- ⁷⁷ Lefkowitz RJ. , Cotecchia S. , Samama P. et Costa T. Constitutive activity of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Trends Pharmacol. Sci.* **14**:303-7 (1993).
- ⁷⁸ Pei G. , Samama P. Lohse M. , Wang M. , Codina J. et Lefkowitz RJ. A constitutively active mutant beta 2-adrenergic receptor is constitutively desensitized and phosphorylated. *Proc. Natl Acad. Sci* **91**:2699-702 (1994).

-
- ⁷⁹ Leeb-Lundberg LM. , Mathis SA. et Herzig MCS. Antagonist of bradykinin that stabilize a G protein uncoupled state of the B² receptor act as inverse agonists in rat myometrial cells. *J. Biol. Chem.***269**:25970-73 (1994).
- ⁸⁰ Tiberi M. et Caron M. G. High agonist-independent activity is a distinguishing feature of the dopamine D_{1b} receptor subtype. *J. Biol. Chem.* **269**:27925-31 (1994).
- ⁸¹ Thian, W-W. , Duzic E. , Lanier SM. et Deth RC. Determinants of the α_2 adrenergic receptor activation of G proteins: evidence for a precoupled receptor/G protein state. *Mol. Pharmacol.* **45**:524-31 (1994).
- ⁸² Costa, T. et Hertz, A. Antagonists with negative intrinsic activity at de δ opioid receptor coupled to GTP binding proteins *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**:7321-25 (1989).
- ⁸³ Labrecque J. Fargin A. , Bouvier M. , Chidiac P. et Dennis M. Serotonergic antagonists differentially inhibit spontaneous activity and decrease ligand binding capacity of the rat 5-hydroxytryptamine Type 2C in Sf9 cells. *Mol. Pharmacol.* **48**:150-159 (1995).
- ⁸⁴ Barker EL. , Westphal RS. , Schmidt D. et Sanders-Bush E. Constitutively active 5 Hydroxytryptamine 2C receptor reveal novel inverse agonist activity of receptor ligands *J. Biol. Chem.* **269**:11687-90 (1994).
- ⁸⁵ Chidiac P, Hebert T, Valiquette M, Dennis M et Bouvier M. Inverse agonist activity of β adrenergic receptor. *Mol. Pharmacol.***45**:490-9 (1994).
- ⁸⁶ Ariëns A. Affinity and intrinsic activity in the theory of competitive inhibition. Part I. Problems and theory. *Arch. Int. pharmacodyn. Ther.* **99**:32-49 (1954).
- ⁸⁷ De Léan A. , Stadel JM. , et Lefkowitz RJ. A ternary complexe model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled β adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **255**:7108-17 (1980).
- ⁸⁸ Costa T. Ogino Y, Munson PJ, Onarah HO et Rodbard D. Drug efficacy at guanine nucleotide-binding regulatory proteins link receptors: thermodynamic interpretation of negative antagonism and of receptor activity in the absence of ligand. *Mol. Pharmacol.* **41**:549-60 (1992).

-
- ⁸⁹ Birnbaumer LG, Swartz TL, Abramowitz J, Mintz PW et Iyengar R. Transient and steady state kinetics of the interaction of guanyl nucleotide with the adenylyl cyclase system from rat liver plasma membranes. Interpretation in terms of a two state model. *J. Biol. Chem.* **255**:3542-51 (1980).
- ⁹⁰ Samama P, Cotecchia S, Costa T, Lefkowitz R. J. A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. *J. Biol. Chem.* **268**: 4625-36 (1993).
- ⁹¹ Tian WN, Duzic E, Lanier S. M. et Deth R. C. Determinants of alpha 2-adrenergic receptor activation of G proteins: evidence for a precoupled receptor/G protein state. *Mol. Pharmacol.* **45**: 524-31 (1994).
- ⁹² Olah M et Stiles GL. Agonists and antagonists recognize different but overlapping populations of A1 adenosine receptors: modulation of receptor number by MgCl₂, solubilization, and guanine nucleotides. *J Neurochem*, **55**:1432-8 (1990).
- ⁹³ Varrault A, Journot L, Audigier Y et Bockaert J. Transfection of human 5-hydroxytryptamine_{1A} receptors in NIH-3T3 fibroblasts: effects of increasing receptor density on the coupling of 5-hydroxytryptamine_{1A} receptors to adenylate cyclase. *Mol Pharmacol* **41**:6, 999-1007 (1992).
- ⁹⁴ Wreggett KA et Delean A. The ternary complex model. Its properties and application to ligand interactions with the D2-dopamine receptor of the anterior pituitary gland. *Mol. Pharmacol.*, **26**: 214-27 (1984).
- ⁹⁵ Neubig R. R. , Gantz R. D. et Thomsen WJ. Mechanism of agonist and antagonist binding to alpha 2 adrenergic receptors: evidence for a precoupled receptor-guanine nucleotide protein complex. *Biochemistry*, **27**: 2374-84 (1988).
- ⁹⁶ Polastron J, Jauzac P, Meunier J. C. The delta-opioid receptor in neuroblastoma x glioma NG 108-15 hybrid cells is strongly precoupled to a G-protein. *Eur. J. Pharmacol.* **226**:133-9 (1992).
- ⁹⁷ Chatterjee TP, Moy JA, Lee J. J. H-C. et Fisher R: Solubilisation and characterisation of a guanine nucleotide-sensitive form of calcitonin gene-related-peptide receptor. *Mol. Pharmacol.* **43**:167075 (1993).

-
- ⁹⁸ Chiu T. T, Yung L. Y et Wong Y. H. Inverse agonistic effect of ICI-174,864 on the cloned delta-opioid receptor: role of G protein and adenylate cyclase activation. *Mol. Pharmacol.* **50**: 1651-1657 (1996).
- ⁹⁹ Weiss JM, Morgan PH, Lutz MW et Kenakin T. The cubic ternary complex receptor-occupancy Model I. Model description. *J. Theor. Biol.* **178**:151-67 (1996).
- ¹⁰⁰ Arnis SE et Hoffmann KP. Two different forms of metarhodopsin II Schiff base deprotonation precedes proton uptake and signaling state. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:7849-81 (1993).
- ¹⁰¹ Spengler D, Waeber C, Pantaloni C, Holsboer F et Bockaert J. Differential signal transduction by five splice variant of the pacap receptor. *Nature* **365**: 170-75 (1993).
- ¹⁰² Wregget, KA et Wells J. A. Cooperativity manifest in the binding properties of purified cardiac muscarinic receptors. *J. Biol. Chem.* **270**:1-12 (1995).
- ¹⁰³ Maggio R, Vogel Z et Weiss J. Coexpression studies with muscarinic receptor/adrenergic receptor provide evidence for intermolecular 'cross-talk' between G proteins receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 3113-7 (1993).
- ¹⁰⁴ Hebert TE, Moffet S, Morello J-P, Loisel TP, Bichet DG et Bouvier M. A peptide derived from a β 2-adrenergic receptor transmembrane domain inhibit both receptor dimerization and receptor activation. *J. Biol. Chem.* **271**:16384-92 (1996).
- ¹⁰⁵ Ng G. Y. , O'Dowd B. F. , Lee S. P. , Chung H. T. , Brann M. R. , Seeman P. et George S. R. Dopamine D2 receptor dimers and receptor-blocking peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **227**:200-204 (1996).
- ¹⁰⁶ Ng G. Y. , O'Dowd B. F., Caron M., Dennis M. , Brann M. R. et George S. R. Phosphorylation and palmitoylation of the human D2L dopamine receptor in Sf9 cells. *J. Neurochem.* **63**:1589-1595 (1994).
- ¹⁰⁷ Janovich J. A. et Conn P. M. Gonadotropin releasing hormone agonist provokes homologous receptor microaggregation: an early event in seven-transmembrane receptor mediated signaling. *Endocrinology* **137**:3602-05 (1996).

-
- ¹⁰⁸ Maggio R. , Barbier P. , Fornai F. et Corsini G. U. Functional role of the third cytoplasmic loop in muscarinic receptor dimerization. *J. Biol. Chem.* **271**:31055-31060 (1996).
- ¹⁰⁹ Cvejic S et Lakshmi A. D. Dimerization of the δ opioid receptor. *J. Biol. Chem.* **272**:26959-64 (1997.)
- ¹¹⁰ Robertson M. J., I. G. Dougall, D. Harper, K. C. W. McKennie et P. Leff. Agonist-antagonist interactions at the angiotensin receptor :application of a two-state model. *Trend in Pharmacol. Sci.* **15**:364-368 (1994).
- ¹¹¹ Liu, Y. J., Shankley, N. P. , Welsh, N. et Black, J. W. Evidence that the apparent complexity of the receptor antagonism by angiotensin II analogues is due to a reversible and syntopic action. *Br. J. Pharmacol.* **106**:233-241 (1992).
- ¹¹² De Chaffoy de Courcelles, D. , Leysen J. E. , Roevens P. et Van Belle H. The serotonin-S2 receptor: A receptor transducer coupling model to explain insurmountable antagonist effects. *Drug Dev. Research.* **8**:173-178 (1986).
- ¹¹³ Law, SF., Manning D. et Resine T. Identification of the subunits of the GTP binding proteins coupled to somatostatin receptors. *J. Biol Chem.* **266**:17885-97 (1991).
- ¹¹⁴ Kleuss, C. , Scherubl H. , Hescheler J. , Schultz G. et Wittig B. Different β subunits determine G-protein interaction with transmembrane receptors. *Nature* **358**:424-26 (1992).
- ¹¹⁵ McClue S. J., Selzer E., Freissmuth M et Milligan G. Gi3 does not contribute to the inhibition of adenylyate cyclase when stimulation of an $\alpha 2$ adrenergic receptor cause inhibition of both Gi2 and Gi1. *Biochem. J.* **284**:565-68 (1992).
- ¹¹⁶ Hayashi MK et Haga T. Purification and functional reconstitution with GTP-binding regulatory proteins of hexahistidine-tagged muscarinic acetylcholine receptors (m2 subtype). *J Biochem* **120**:1232-38 (1996).
- ¹¹⁷ Figler RA, Graber SG, Lindorfer MA, Yasuda H, Linden J et Garrison JC. Reconstitution of recombinant bovine A1 adenosine receptors in Sf9 cell membranes with recombinant G proteins of defined composition. *Mol. Pharmacol.* **50**:1587-95 (1996).

-
- ¹¹⁸ Labrecque J, Caron M, Torossian K, Plamondon J et Dennis M. Baculovirus expression of mammalian G protein alpha subunits. *FEBS Lett* **304**: 157-162 (1992).
- ¹¹⁹ Wildman DE, Tamir H, Leberer E, Northup JK et Dennis M. Prenyl modification of guanine nucleotide regulatory protein gamma 2 subunits is not required for interaction with the transducin alpha subunit or rhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **90**:794-798 (1993).
- ¹²⁰ Barr AJ, Brass LF et Manning DR. Reconstitution of receptors and GTP-binding regulatory proteins (G proteins) in Sf9 cells. A direct evaluation of selectivity in receptor. G protein coupling. *J Biol Chem.* **272**:2223-29 (1997).
- ¹²¹ Grunewald S, Reilander H et Michel H. In vivo reconstitution of dopamine D2S receptor-mediated G protein activation in baculovirus-infected insect cells: preferred coupling to Gi1 versus Gi2. *Biochemistry* **48**:15162-73 (1996).
- ¹²² Gupta, S. K. , Diez,E. , Heasley, L. E. , Osawa,S. et Johnson, G. L. A G protein mutant that inhibits thrombin and purinergic receptor activation of phospholipase A₂. *Science.* **249**:662-666 (1990).
- ¹²³ Woon, C. W. , Soparkar, S. , Heasley, L. et Johnson,G. L.. Expression of a G α s/G α i chimera that constitutively activates cyclic AMP synthesis. *J. Biol. Chem.* **264**:5687-5693 (1989).
- ¹²⁴ Master, S. B. , Miller,R. T. , Chi, M-H. , Chang, F-H. , Beiderman, Lopez, N. G. et Bourne, H. R. Mutation in the GTP-binding site of Gs α alter stimulation of adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* **264**:15467-15474 (1989).
- ¹²⁵ Master, S. B., Sullivan K.A., Miller R.T., Beiderman B., Lopez N.G., Ramachandran J. et Bourne, H. R. Carboxyl terminal domain of Gs α specifies coupling of receptor to stimulation of adenylyl cyclase. *Science* **241**:448-450 (1988).
- ¹²⁶ Summers, M. D. et Anderson, D. Granulosis virus deoxyribonucleic acid: a closed double-stranded molecule. *J. Gen. Virol* **9**:710-713 (1972).
- ¹²⁷ Stolks,D., Pavan C. et Da Cunha A. Nuclear polyhedrosis virus: a possible example of de novo intranuclear membrane morphogenesis. *J. Gen. Virol.* **19**:145-150 (1979).

-
- ¹²⁸ Satoh M, Miyamoto C, Terashima H, Tachibana Y, Wada K, Watanabe T, Hayes AE, Gentz R, et Furuichi Y. Human endothelin receptors ET(A) and ET(B) expressed in baculovirus-infected insect cells--direct application for signal transduction analysis. *Eur. J. Biochem.* **333**:803-81 (1997).
- ¹²⁹ Weill C, Autelitano F, Guenet C, Heitz F, Goeldner M et Ilien M. Pharmacological and structural integrity of muscarinic M2 acetylcholine receptors produced in Sf9 insect cells. *Eur. J. Pharmacol.* **333**:269-278 (1997).
- ¹³⁰ Doi T, Hiroaki Y, Arimoto I, Fujiyoshi Y, Okamoto T, Satoh M, Furuichi Y. Characterization of human endothelin B receptor and mutant receptors expressed in insect cells. *Eur. J. Biochem.* **248**:139-148 (1997).
- ¹³¹ Massotte D, Baroche L, Simonin F, Yu L, Kieffer B et Pattus F. Characterization of delta, kappa, and mu human opioid receptors overexpressed in baculovirus-infected insect cells. *J. Biol. Chem.* **272**:19987-92 (1997).
- ¹³² Henrikson KP, Quirk SM et Restivo V. Expression of rat thrombin receptor and mutants in the baculovirus-infected insect cell system. *Thromb Res.* **87**:205-214 (1997).
- ¹³³ Heitz F, Nay C et Guenet C. Expression of functional human muscarinic M2 receptors in different insect cell lines. *J. Recept. Signal Transduct Res.* **17**:305-317 (1997).
- ¹³⁴ Obermeier H, Wehmeyer A, Schulz R. Expression of mu-, delta- and kappa-opioid receptors in baculovirus-infected insect cells. *Eur. J. Pharmacol.* **318**:161-166 (1996).
- ¹³⁵ Grunewald S, Reilander H et Michel H. In vivo reconstitution of dopamine D2S receptor-mediated G protein activation in baculovirus-infected insect cells: preferred coupling to Gi1 versus Gi2. *Biochemistry* **35**:15162-15173 (1996).
- ¹³⁶ Kukkonen JP, Nasman J, Ojala P, Oker-Blom C et Akerman K.E. Functional properties of muscarinic receptor subtypes Hm1, Hm3 and Hm5 expressed in Sf9 cells using the baculovirus expression system. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **279**:593-601 (1996).
- ¹³⁷ Chen X, Earley K, Luo W, Lin SH et Schilling WP. Functional expression of a human thrombin receptor in Sf9 insect cells: evidence for an active tethered ligand. *Biochem J.* **314**:603-611 (1996).

-
- ¹³⁸ Boundy VA, Lu L et Molinoff PB. Differential coupling of rat D2 dopamine receptor isoforms expressed in *Spodoptera frugiperda* insect cells. *J. Pharmacol Exp. Ther.* **276**:784-794 (1996).
- ¹³⁹ Gimpl G, Klein U, Reilander H et Fahrenholz F. Expression of the human oxytocin receptor in baculovirus-infected insect cells: high-affinity binding is induced by a cholesterol-cyclodextrin complex. *Biochemistry* **34**:13794-13801 (1996).
- ¹⁴⁰ Jansson CC, Karp M, Oker-Blom C, Nasman J, Savola JM et Akerman KE. Two human alpha 2-adrenoceptor subtypes alpha 2A-C10 and alpha 2B-C2 expressed in Sf9 cells couple to transduction pathway resulting in opposite effects on cAMP production. *Eur. J. Pharmacol.* **290**:75-83 (1995).
- ¹⁴¹ Parker EM, Grisel DA, Iben LG, Nowak HP, Mahle CD, Yocca FD, Gaughan GT. Characterization of human 5-HT1 receptors expressed in Sf9 insect cells. *Eur J Pharmacol.* **268**:43-53 (1994).
- ¹⁴² Javitch JA, Kaback J, Li X et Karlin A. Expression and characterization of human dopamine D2 receptor in baculovirus-infected insect cells. *J. Recept Res.* **14**:99-117 (1994).
- ¹⁴³ Saxena P. R. Serotonin receptors: Subtypes, Functional Responses and Therapeutic Relevance. *Pharmacol. Ther.* **66**:339-368 (1995).
- ¹⁴⁴ Pazos A. , Hoyer D. et Palacios J. M. The binding of serotonergic ligands to the porcine choroid plexus: characterization of a new type of serotonin recognition site. *Eur. J. Pharmac.* **106**:539-546(1984).
- ¹⁴⁵ Linwall-Axelsson M. , Mathew C. , Nilson C et Owan C. Effect of 5-hydroxytryptamine on the rate of cerebrospinal fluid production in rabbit. *Exp. Neurol.* **99**: 362-368 (1988).
- ¹⁴⁶ Palacio J. M Waeber C., Hoyer D. et Mengod G. Distribution of serotonin receptors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **600**:36-51 (1991).
- ¹⁴⁷ Kennett G. A. Whitton P. , Shah k. et Curzon G. Anxiogenic-like effects of mCPP and TFMPP in animals models are opposed by 5HT-1c receptors antagonists. *Eur. J. Pharmacol.* **164**:445-454 (1989).

-
- ¹⁴⁸ Wozniak K. M. , Aulackh C. S. , Hill J. L. et Murphy D. L. Hyperthermia induced by mCPP in the rat and its modification by antidepressant treatments, *Psychopharmacology* **97**:269-274 (1989).
- ¹⁴⁹ Lübbert H. , Hoffman B. J. Snutch T. P. , van Dyke T. , Levine A. J. , Hartig P. R. , Lester H. A. et Davidson N. cDNA cloning of a serotonin 5-HT_{1C} receptor by electrophysiological assays of mRNA-injected *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**:4332-4336 (1987).
- ¹⁵⁰ Yu L., Nguyen H. , Le H. , Bloem L. J. , Kozak C. A. , Hoffman B. J. Snutch T. P. , Lester H. A. , Davidson N. et Lübbert H. The mouse 5-HT_{1C} receptor contains eight hydrophobic domains and is X-linked. *Molec. Brain Res.* **11**:143-149 (1991).
- ¹⁵¹ Julius D., Macdermott, A. B. Axel R, et Jessel TM. Molecular characterization of a functional cDNA encoding the serotonin 1c receptor. *Science* **241**:558064 (1988).
- ¹⁵² Lappalainen J, Zhang L, Dean M, Oz M, Ozaki N, Yu D-H, Virkkunen M, Weight F, Linnoila M, et Goldman D. Identification, expression, and pharmacology of a Cys23-Ser23 substitution in the human 5-HT_{2C} gene (HTR2C). *Genomics* **27**:274-79 (1995).
- ¹⁵³ Boddeke H.W.G.M, Hoffman BJ, Palacios JM et Hoyer D. Calcineurine inhibits desensitization of the cloned 5-HT_{1c} receptors. *Nuanyn-schmiedeberg's Archs Pharmac.* **348**:221-224 (1993).
- ¹⁵⁴ Panicker, M. M. Parker I et Miledi R. Receptor of the 5HT_{1c} subtype expressed from the cloned DNA mediate de closing of K⁺ membranes channel encoded by brain mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:2560-62 (1991).
- ¹⁵⁵ Kaufman MJ, Hartig PR et Hoffman BJ. Serotonin 5-HT_{2c} receptor stimulates cyclic GPM formation in choroid plexus. *J. Neurohem.* **64**:199-205 (1995).
- ¹⁵⁶ Lutz EM, Mitchell R, Johnson MS et MacEwan D. Functional expression of the 5HT_{1c} receptor cDNA in cos & cells and its influence on protein kinase C. *FEBS letters* **316**:228-32 (1993).
- ¹⁵⁷ Roth BL, Decker L et Herkenham M. An autoradiographic study of mianserin-induced down regulation of serotonin (5HT_{2a} and 5HT_{1c}) receptors. *Biol. Psychiatry* **25**:42A (1989).

-
- ¹⁵⁸ Julius D, Livelli T, J Jessel TM et Axel R. Ectopic expression of the serotonin 1c receptor and the triggering of malignant transformation. *Science* **241**:1057-1062 (1989).
- ¹⁵⁹ Leonhardt, S., Herrick-Davis K, Wilcox BD et Hoffman BJ. Site-specific mutagenesis demonstrated that arginine 195 in TMD4 is a critical determinant for agonist affinities at the 5-HT1c and 5-HT2 receptor. *Soc. Neurosci. Abstract* 19,1165 (1993).
- ¹⁶⁰ Choudhary, M. S. Craig S et Roth BL. Identification of receptor domains that modify ligand binding to 5-hydroxytryptamine 2 and 5-hydroxytryptamine 1c serotonin receptor. *Mol. Pharmacol.* **42**:627-29 (1993).
- ¹⁶¹ Kristiansen K. et Dahl SG. Molecular modeling of serotonin, ketanserin, ritanserin and their 5-HT2c receptor interactions. *Eur. J. Pharmacol.* **306**:195-210 (1996).
- ¹⁶² Murphy DL, Broocks A, Aulakh C. et Pigott TA. Anxiolytic effects of drugs acting on 5-HT receptor subtypes. Dans *Serotonin, Cell Biology to pharmacology and therapeutics*, pp223-30, Vanhoutte PM, Saxena PR, Paoletti R, Brunello N et Jackson AS eds Kluwer, Dordrecht (1993).
- ¹⁶³ Brunello H, Masoto C, Steardo L, Markstein R, et Racagni G. New insights into the biology of schizophrenia through the mechanism of action of clozapine. *Neuropsychopharmacol.* **13**:177-213 (1995).
- ¹⁶⁴ Hietala J. , Koulu M, Kuoppamäki M, Lappalainen J, Syvälahti E. Chronic clozapine treatment downregulates serotonin 5-HT1c receptors in the rat brain. *Prog. Neuropsychopharmacol & Biol psychiatry* **16**:727-32 (1992).
- ¹⁶⁵ Olah ME et Styles GL. Adenosine receptor subtypes; Characterization and therapeutic regulation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* **335**:581-606 (1995).
- ¹⁶⁶ Libert F, Parmentier M, Lefort A, Dinsart C et Van Sande J. Selective amplification and cloning of four new members of the G proteins-coupled receptor family. *Science* **244**:569-72 (1989).
- ¹⁶⁷ Libert F, Schiffman SN, Lefort A, Parmentier M et Gerard C. The orphan receptor cDNARDC7 encodes an A1 adenosine receptor. *EMBO J.* **10**:1677-82 (1991).

-
- ¹⁶⁸ Maenhaut C. , Van Sande J, Libert F, Abramowicz M et Parmentier M. RDC* codes for an adenosine A2 receptor with physiological constitutive activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **173**:1169-78 (1990).
- ¹⁶⁹ Berlardinelli L, Shyrock JC et Pelleg A. Cardiac electrophysiologic properties of adenosine. *Coron. Artery. Dis.* **12**:1122-26 (1992).
- ¹⁷⁰ Gerwins P et Fredholm BB. ATP and its metabolite adenosine act synergistically to mobilise intracellular calcium via the formation of inositol 1,4,5,-triphosphate in smooth muscle cell line. *J. Biol. Chem.* **267**:16081-87 (1992).
- ¹⁷¹ Delahunty TM, Cronin MJ et Linden J. Regulation of Gh3-cell function via adenosine A1 receptor: inhibition of prolactin release, cyclic AMP production and inositol phosphate generation. *Biochem J.* **255**:69-77 (1988).
- ¹⁷² Olah ME, Ren H, Ostrowski J, Kacobson KA et Stiles GL. Cloning, expression, and characterization of the unique A1 adenosine receptors: studies on the ligand binding site by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **267**:10763-70 (1992).
- ¹⁷³ Olah ME, Jakobson KA et Stiles GL. Role of the second extracellular loop of adenosine receptors in agonist and antagonist binding: analysis of chimeric A1/A3 adenosine receptors. *J. Biol. Chem.* **269**:24692-98 (1994).
- ¹⁷⁴ Ren H et Stiles GL. Characterization of the human A1 adenosine receptor gene: evidence of alternative splicing. *J. Biol. Chem.* **269**:3104-10 (1994).
- ¹⁷⁵ Tucker AM et Linden J. Cloned receptors and cardiovascular response to adenosine. *Cardiovasc. Res.* **27**:62-67 (1993).
- ¹⁷⁶ Schütz W et Freissmuth. Reverse intrinsic activity of antagonists on the G proteins-coupled receptors. *Trends in Pharmacol. Scien.* **13**:376-80 (1992).
- ¹⁷⁷ Leung E et Green RD, Density gradient profiles of A1 adenosine receptor labeled by agonist and antagonist radioligands before and after detergent solubilization. *Mol. Pharmacol.* **36**:412-19 (1989).
- ¹⁷⁸ Longabaugh JP, Didsbury J, Spiegel A et Stiles GL. Modification of the rat adipocytes A1 adenosine receptor-adenylate cyclase system during chronic exposure to

A1 adenosine agonist: alteration in the quantity of G_s and G_i are not associated with changes in their mRNAs. *Mol. Pharmacol.* **36**:681-88 (1989) .

¹⁷⁹ Nie Z, Mei Y et Ramkumar V. Short term desensitization of the A1 adenosine receptors in DDT1 MF-2 cells. *Mol. Pharmacol.* **52**:456-64 (1997).

¹⁸⁰ Downey JM, Liu GS et Thornton JD. Adenosine and anti-infract effect of preconditioning. *Cardvasc Res.* **27**:3-8 (1993).

¹⁸¹ Jacobson KA, von Lubitz D-KJE, Daly JW et Fredholm BB. Adenosine receptor ligands: differences with acute versus chronic treatment. *Trends. Pharmacol. Sci.* **17**:108-113 (1996)

¹⁸² Stiles G. L. A1 adenosine receptor-G proteins coupling in bovine brain membranes:effect of guanine nucleotides, salt and solubilization. *J. Neurochem.***51**: 1592-98 (1988).

¹⁸³ Koltz. K. N. , Keil R. , Zimmer F. J. et Schwabe U. Guanine nucleotide effects on 8 cyclopentyl-1,3- [3H] dipropylxantine binding to membrane bound and solubilized A1 receptor of rat brain. *J. Neurochem.* **54**:1988-94 (1990).

¹⁸⁴ Green R. D. Reciprocal modulation of agonist and antagonist binding to inhibitory adenosine receptors by 5'-guanylylimidodiphosphate and monovalent cations. *J Neurosci,* **4**:2472-6 (1984).

¹⁸⁵ Schutz W. et Freissmuth M. Reverse intrinsic activity of antagonist on G proteins-coupled receptor. *Trends inPharmacol. Scien.* **13**: 376-80 (1992).

¹⁸⁶ Westphal RS, Backstrom JR et Sanders-Bush E. Increased basal phosphorylation of the constitutively active serotonin 2C receptor accompanies agonist-mediated desensitization. *Mol Pharmacol.* **48**:200-205 (1995).

¹⁸⁷ Costa T, Ogino Y, Munson P. J, Onaran H. O et Rodbard D. Drug efficacy at guanine nucleotide-binding regulatory protein-linked receptors: thermodynamic interpretation of negative antagonism and of receptor activity in the absence of ligand. *Mol Pharmacol.* **41**: 549-560 (1992).

-
- ¹⁸⁸ Kwon G, Axelrod D et Neubig R. R. Lateral mobility of tetramethylrhodamine (TMR) labelled G protein alpha and beta gamma subunits in NG 108-15 cells. *Cell Signal*. **6**: 663-679 (1994).
- ¹⁸⁹ Franco R, Casado V, Ciruela F, Mallol J, Luis C et Canela E. I. The cluster-arranged cooperative model: a model that accounts for the kinetics of binding to A1 adenosine receptors. *Biochemistry* **35** : 3007-3015 (1996).
- ¹⁹⁰ Kenakin T. The classification of seven transmembrane receptors in recombinant expression systems. *Pharmacological reviews* **48**:413-63 (1996).
- ¹⁹¹ Migeon J.C et Nathanson NM. Differential regulation of cAMP mediated gene transcription by m1 and m4 muscarinic acetylcholine receptor. *J. Biol. Chem.* **269**:9767-73 (1994).
- ¹⁹² Neubig RR, Membrane organisation in G proteins mechanisms. *FASEB J.* **8**:939-46 (1994).
- ¹⁹³ Von Zastrow M, Link R, Daunt D, Barsh G et Kobilka B. Subtype specific difference in the intracellular sorting of G proteins-coupled receptor. *J. Biol. Chem.* **268**:763-766 (1993).
- ¹⁹⁴ Neer E. G proteins:critical control points of transmembrane signals. *Protein Sci* **3**:3-14 (1994).
- ¹⁹⁵ Costa T. et Hertz A. Antagonists with negative intrinsic activity at the δ opioid receptor coupled to GTP-binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:7321-25 (1989).
- ¹⁹⁶ De Léan A, Kilpatrick BF, et Caron MG. Dopamine receptors of the porcine anterior pituitary gland;Evidence for two affinity sites discriminated by both agonist and antagonist. *Mol. Pharmacol.* **22**:290-97 (1982).
- ¹⁹⁷ Gether U, Ballesteros JA, Seifert R, Sanders-Bush E, Weinstein H et Kobilka BK Structural instability of constitutively active G proteins-coupled receptor. *J. Biol. Chem.* **272**:2587-90 (1997).
- ¹⁹⁸ Burstein, E. S, Spalding TA, Brauner-Osborne H et Brann MR. Constitutive activation of muscarinic receptors by the G-proteins Gq. *FEBS lett* **363**:261-63 (1995).

-
- ¹⁹⁹ Hasegawa H, Negishi M et Ichikawa A. Two isoforms of the prostaglandin E receptor EP3 subtype different in agonist-independent constitutive activity. *J. Biol. Chem.* **271**: 1857-60 (1996).
- ²⁰⁰ Milano CA, Allen LF, Rockman HA, Dolber PC, Mc Minn TR, Chien KR, Johnson TD, Bond RA et Lefkowitz RJ. Enhanced myocardial function in transgenic mice overexpression of a β 2 adrenergic receptor. *Science* **264**:582-86 (1994).
- ²⁰¹ Arvanitakis, L, Geras-Raaka, E, Varma A, Gerhengorn MC et Cesarman E. Human herpesvirus KSHV encodes a constitutively active G-protein coupled receptor linked to cell proliferation. *Nature* **23**:347-50 (1997).
- ²⁰² M Birnbaumer. Mutations and diseases of G proteins coupled receptors. *J. of Receptor and Sign. Trans. Reas.* **15**:131-60 (1995).
- ²⁰³ Robinson PR, Cohen GB, Zhukovsky EA et Oprian DD. Constitutive active mutant of rhodopsin. *Neuron* **9**:719-25 (1992).
- ²⁰⁴ Shenker A, Laue L, Kosugi S, Merendino JJ. Minegishi T. et Cutler GB. A constitutively activating mutation of the luteinizing hormone receptor in familial male precocious puberty. *Nature* **365**:652-54 (1993).
- ²⁰⁵ Parma j, Duprez L, Van Sande J, Cochaux P, Gervy C, Mockel J, Dumont J et Vassart G. Somatic mutations in the thyrotropin receptor gene cause hyperfunctioning thyroid adenomas, *Nature* **365**: 649-51 (1993).
- ²⁰⁶ Schipani E, Langman CB, Parfitt AM, Jensen GS, Kikuchi S, Kooh SW, Cole WG, Juppner H. Constitutively activated receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide in Jansen's metaphyseal chondrodysplasia. *N Engl J Med* **5**:708-14 (1996).
- ²⁰⁷ Turki, J. Pak J, Green SA, Martin RJ et Liggett SB. Genetic polymorphism of the beta(2)-adrenergic receptor in nocturnal and non-nocturnal asthma:evidence that GLY16 correlates with nocturnal phenotype. *J. Clin. Invest.* **95**:1635-41 (1995).
- ²⁰⁸ Gejman PV, et Gelernter J. Mutational analysis of candidate genes in psychiatric disorders. *Am. J. Med. Genet.* **48**:184091 (1993).

-
- ²⁰⁹ Van Tol HHM, Wu CM, Guan H-C, Ohara K, Bunzow JR, Civelli O, Kenedy J, Seeman P, Niznik HB, et Jovanovic V. Multiple dopamine D4 receptor variants in the human population. *Nature* **358**:149-52 (1992).
- ²¹⁰ Smith MJ. Inverse agonism of histamine H2 antagoniste accounts for upregulation of spontaneously active histamine H2 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:6802-07 (1996).
- ²¹¹ MacEwan DJ et Milligan G. Inverse agonist-induced up-regulation of the human β_2 -adrenoceptor in transfected neuroblastoma x glioma hybrid cells. *Mol. Pharmacol* **50**:1479-86 (1996).
- ²¹² Pei G et al A constitutively active mutant β_2 -adrenergic receptor is constitutively desensitized and phosphorylated. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:2699-702 (1994).
- ²¹³ Roettger BF, Ghanekar D, Rao R, Toledo C, Yingling J, Pinon D and Miller LJ. Antagonist-stimulated internalization of the G protein-coupled cholecystokinin receptor. *Mol Pharmacol* **51**: 357-362 (1997).
- ²¹⁴ Kenakin TP, The nature of agonist-receptor efficacy. II. Agonist trafficking of receptor signal *Trends Pharmacol Sci.* **16**:232038 (1995).
- ²¹⁵ Bhattacharya, S et Linden J. The allosteric enhancer, PD 81,723 stabilizes human A1 adenosine receptor coupling to G-proteins. *Biophys. Acta.* **1265**:15-21 (1995).
- ²¹⁶ Lauffenburger DA et Linderman JJ. Receptors: Models for binding, trafficking, and signalling. New-York, Oxford University Press. (1993).