

Université de Montréal

**Couplage du récepteur à sept domaines  
transmembranaires GABA-B1 aux voies intracellulaires  
de signalisation en absence de GABA-B2**

par

Maxime Richer

Département de biochimie

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de Doctorat

en biochimie

Février 2010

© Maxime Richer, 2010

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Couplage du récepteur à sept domaines transmembranaires GABA-B1 aux voies  
intracellulaires de signalisation en absence de GABA-B2

présentée par :

Maxime Richer

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Nikolaus Heveker, Président-rapporteur et représentant du doyen de la FES

Dr Terry Hébert, directeur de recherche

Dr Richard Robitaille, membre du jury

Dr Stéphane Laporte, examinateur externe

## Résumé

Le GABA est le principal neurotransmetteur inhibiteur du SNC et est impliqué dans le développement du cerveau, la plasticité synaptique et la pathogénèse de maladies telles que l'épilepsie, les troubles de l'anxiété et la douleur chronique. Le modèle actuel de fonctionnement du récepteur GABA-B implique l'hétérodimérisation GABA-B1/B2, laquelle est requise au ciblage à la surface membranaire et au couplage des effecteurs. Il y est cependant des régions du cerveau, des types cellulaires et des périodes du développement cérébral où la sous-unité GABA-B1 est exprimée en plus grande quantité que GABA-B2, ce qui suggère qu'elle puisse être fonctionnelle seule ou en association avec des partenaires inconnus, à la surface cellulaire ou sur la membrane réticulaire. Dans le cadre de cette thèse, nous montrons la capacité des récepteurs GABA-B1 endogènes à activer la voie MAPK-ERK1/2 dans la lignée dérivée de la glie DI-TNC1, qui n'exprime pas GABA-B2. Les mécanismes qui sous-tendent ce couplage demeurent mal définis mais dépendent de  $G_{i/o}$  et PKC. L'immunohistochimie de récepteurs endogènes montre par ailleurs que des anticorps GABA-B1 dirigés contre la partie N-terminale reconnaissent des protéines localisées au RE tandis des anticorps C-terminaux (CT) marquent une protéine intranucléaire. Ces données suggèrent que le domaine CT de GABA-B1 pourrait être relâché par protéolyse. L'intensité des fragments potentiels est affectée par le traitement agoniste tant en immunohistochimie qu'en immunobuvardage de type western. Nous avons ensuite examiné la régulation du clivage par le protéasome en traitant les cellules avec l'inhibiteur epoxomicine pendant 12 h. Cela a résulté en l'augmentation du marquage intranucléaire de GABA-B1-CT et d'un interacteur connu, le facteur de transcription pro-survie ATF-4. Dans des cellules surexprimant GABA-B1-CT, l'induction et la translocation nucléaire d'ATF-4, qui suit le traitement epoxomicine, a complètement été abolie. Cette observation est associée à une forte diminution du décompte cellulaire. Étant donné que les trois derniers résidus de GABA-B1-CT (LYK) codent un ligand pseudo-PDZ et que les protéines à domaines PDZ sont impliquées dans la régulation du ciblage nucléaire et de la stabilité de protéines, en complément de leur rôle d'échaffaud à la surface cellulaire, nous avons muté les trois derniers résidus de GABA-B1-CT en alanines. Cette mutation a complètement annulé les effets de GABA-B1-CT sur l'induction d'ATF-4 et le décompte cellulaire. Cette deuxième série d'expériences suggère l'existence possible de fragments GABA-B1 intranucléaires régulés par le traitement agoniste et le protéasome dans les cellules DI-TNC1. Cette régulation d'ATF-4 dépend des résidus LYK de GABA-B1-CT, qui modulent la stabilité de GABA-B1-CT et favorisent peut-être la formation d'un complexe multiprotéique incluant GABA-B1-CT, ATF-4, de même qu'une protéine d'échaffaudage inconnue. En somme, nous démontrons que les sous-unités GABA-B1 localisées au RE, lorsque non-hétérodimérisées avec GABA-B2, demeurent capables de moduler les voies de signalisation de la prolifération, la différenciation et de la survie cellulaire, via le couplage de protéines G et possiblement la protéolyse régulée. Les mécanismes de signalisation proposés pourraient servir de nouvelle plate-forme dans la compréhension des actions retardées résultant de l'activation des récepteurs 7-TMs.

**Mots-clés:** RCPGs GABA-B Signalisation MAPK-ERK1/2 ATF-4 Protéolyse PDZ

## Abstract

GABA is the principal inhibitory neurotransmitter in the CNS and is implicated in brain development, synaptic plasticity and the pathogenesis of diseases such as epilepsy, anxiety disorders and chronic pain. In the current model of GABA-B function, there is a requirement for GABA-B1/B2 dimerization for targeting to the cell surface and effector coupling. However, there are certain brain regions (putamen), cell types (glial cells) and times during brain development where GABA-B1 is expressed in higher amounts than GABA-B2, suggesting that GABA-B1 might be functional alone or in association with unidentified partners, either at the cell surface or on the ER membranes. In this thesis, we first show the capacity of endogenous GABA-B1 receptors to activate the MAPK-ERK1/2 pathway in the DI-TNC1 glial-derived cell line which does not express GABA-B2. The underlying mechanisms remain incompletely defined but depend on  $G_{i/o}$  and PKC. Immunohistochemistry of endogenous receptors shows that GABA-B1 N-terminal antibodies recognize ER-localized proteins and that C-terminal (CT) antibody shows intranuclear distribution. This data suggests that fragments of the GABA-B1 receptor are generated by proteolysis and indeed we show that agonist treatment affects the intensity of certain C-terminal GABA-B1 fragments both in immunohistochemistry and western blots suggesting that the GABA-B1 receptor is subjected to regulated proteolysis. Since a 13-residue potential PEST sequence was localized immediately distal to the ER retention motif in the GABA-B1 CT, we examined proteasome regulation of the cleavage event. Following a 12h treatment with the proteasome inhibitor, epoxomicin, we detected increases in intranuclear staining for both GABA-B1 and a known interactor, the pro-survival transcription factor ATF-4, using confocal microscopy and by western blotting of nuclear extracts. These increases are due either to proteasome inhibition or activation of the ER stress pathway. In cells overexpressing GABA-B1-CT, ATF-4 induction and nuclear translocation, which normally follows epoxomicin treatment, was completely abolished. This observation was associated to a strong decrease in cell number. Since the last three residues of GABA-B1-CT (LYK) encode a pseudo-PDZ ligand and that PDZ domain protein regulate nuclear targeting and protein stability, in complement to their role in scaffolding at the cell surface, we mutated the last three residues of GABA-B1-CT to alanines. This mutation completely reversed the effect of GABA-B1-CT on ATF-4 induction and on cell number. This second set of data suggests the existence of agonist and proteasome-regulated intranuclear GABA-B1 fragments in DI-TNC1 cells. Further, the GABA-B1-CT pseudo-PDZ ligand appears to be critically important in regulating ATF-4 induction by modulating GABA-B1-CT stability and perhaps by favoring the formation of a multiprotein complex with ATF-4, ATF-4 interactors and an unknown scaffolding protein. Overall, we show that ER-localised GABA-B1 subunits, when not dimerized with GABA-B2, can still modulate proliferation, differentiation and survival pathways, both through G-protein coupling and regulated proteolysis. The signalling mechanisms which we propose could serve as a new platform in understanding the long term effects of 7-TM receptor activation.

**Key words:** GPCRs GABA-B Signaling MAPK ATF-4 Proteolysis PDZ



## Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des figures et tableaux.....	viii

## Chapitre I - Introduction

Préambule.....	1
1.1 Récepteurs GABA.....	2
1.1.1 Canaux Cl <sup>-</sup> /HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ligand-dépendants GABA-A.....	2
1.1.2 Récepteurs à sept domaines transmembranaires GABA-B.....	3
1.1.2.1 Inhibition présynaptique de conductances Ca <sup>2+</sup> .....	6
1.1.2.2 Activation postsynaptique de conductances K <sup>+</sup> .....	7
1.1.2.3 Modulation du Ca <sup>2+</sup> .....	8
1.1.2.4 Inhibition de l'adénylate cyclase.....	9
1.1.2.5 Clonage de GABA-B1.....	11
1.1.2.6 Isoformes de GABA-B1.....	12
1.1.2.7 Hétérodimérisation GABA-B1/B2.....	15
1.1.2.7.1 Motif RSRR.....	17
1.1.2.7.2 Rôles respectifs de GABA-B1 et B2 au sein de l'hétérodimère.....	17
1.1.2.7.3 Observations non-expliquées par le modèle du récepteur hétérodimère GABA B1/B2.....	18
1.1.2.7.3.1 Localisation intracellulaire de GABA-B1.....	18
1.1.2.7.3.2 Modulation irrégulière des effecteurs par GABA-B1.....	19
1.1.2.7.3.3 Différences régionales dans l'expression de GABA-B1 et GABA-B2.....	19
1.1.2.7.3.4 Différences développementales dans l'expression de GABA-B1 et GABA-B2.....	20
1.2 Thèse défendue.....	23
1.3 Récepteurs à 7-TMs intracellulaires.....	24
1.4 Voie MAPK-ERK1/2.....	29
1.4.1 G <sub>s</sub> .....	30
1.4.2 G <sub>i</sub> .....	31
1.4.3 G <sub>q</sub> .....	36
1.5 ATF-4, collaborateur potentiel de récepteurs GABA-B1 fonctionnels en absence de GABA-B2.....	39
Résumé.....	42

## Chapitre II - Matériel et méthodes

2.1 Agents pharmacologiques.....	43
2.2 Anticorps.....	43
2.3 Constructions.....	44
2.4 Culture cellulaire et transfections.....	44
2.5 Stimulation de la phosphorylation d'ERK1/2.....	46
2.6 Immunoprécipitation.....	46
2.7 Immunobuvardage de type western.....	47
2.8 RT-PCR.....	47
2.9 Transfert d'énergie de résonance bioluminescente (BRET).....	48
2.10 Immunohistochimie confocale.....	49
2.11 Extraits nucléaires.....	50
2.12 Essai de décompte cellulaire au crystal violet.....	51

## Chapitre III - Couplage de la sous-unité GABA-B1 à la voie MAPK-ERK1/2 en absence de GABA-B2 dans la lignée cellulaire gliale DI-TNC1

### Résultats

3.1 L'activation d'ERK1/2 par les récepteurs GABA-B1A dépend de $G_{i/o}$ et de MEK1/2 dans les cellules HEK293.....	52
3.2 Modulation croisée par d'autres voies de signalisation.....	56
3.3 La lignée cellulaire gliale DI-TNC1 exprime GABA-B1 en absence de GABA B2...58	
3.4 La stimulation de la phosphorylation d'ERK1/2 par le récepteur GABA-B est démasquée par l'inhibition de PKC dans la lignée cellulaire gliale DI-TNC1.....	64
3.5 Les récepteurs GABA-B1A peuvent former des homodimères.....	66

### Discussion

3.6 Couplage des récepteurs GABA-B1 à la voie MAPK-ERK1/2.....	71
3.7 Comment les ligands GABAergiques atteignent-ils ces récepteurs?.....	74
3.8 Homodimérisation de récepteurs.....	75
3.9 Les cellules DI-TNC1 sont un modèle utile dans l'étude des récepteurs GABA-B1 endogènes.....	77

## **Chapitre IV - Le ligand pseudo-PDZ C-terminal du récepteur GABA-B1 est essentiel dans la régulation du décompte cellulaire et l'accumulation nucléaire d'ATF-4 dans la lignée cellulaire gliale DI-TNC1**

### **Résultats**

4.1 Absence de colocalisation des signaux GABA-B1 N- et C-terminaux dans la lignée gliale DI-TNC1 et dans des cultures primaires astrocytaires.....	79
4.2 Augmentation du marquage GABA-B1-CT intranucléaire endogène et réduction du marquage vésiculaire réticulaire par le traitement agoniste au baclofen .....	82
4.3 Régulation à la hausse du facteur de transcription ATF-4, protéine interagitrice de GABA-B1, par l'inhibition pharmacologique du protéasome.....	86
4.4 Le ligand pseudo-PDZ C-terminal extrême du récepteur GABA-B1 est nécessaire à l'abolition de l'induction d'ATF-4 dans les cellules DI-TNC1.....	90
4.5 La surexpression de GABA-B1-CT diminue le décompte cellulaire DI-TNC1 de manière LYK_AAA-dépendante.....	94

### **Discussion**

4.6 Discordance entre les marquages GABA-B1 N- et C-terminaux endogènes.....	96
4.7 Régulation d'ATF-4.....	100
4.8 Rôle du ligand pseudo-PDZ de GABA-B1.....	101
4.9 Effet de la surexpression sur le décompte cellulaire.....	104

## **Chapitre V – Directions futures**

5.1 Identification des isoformes PKC impliquées dans la modulation de la voie MAPK-ERK1/2 par GABA B1.....	108
5.2 Cibles cytosoliques et nucléaires de la voie MAPK-ERK1/2 en aval de GABA-B1.....	108
5.3 Régulation directe de la traduction par les récepteurs GABA-B1 localisés au réticulum endoplasmique.....	108
5.4 Confirmation de l'identité du fragment 18kDa.....	109
5.5 Détermination des endopeptidases impliquées.....	110
5.6 Clarification du rôle du ligand pseudo-PDZ et du domaine PEST de GABA-B1....	111
5.7 Clarification de l'effet de la surexpression de GABA-B1-CT sur le décompte cellulaire .....	112
5.8 Impact sur la transcription ATF-4.....	112

<b>Bibliographie.....</b>	<b>114</b>
---------------------------	------------

<b>Abréviations.....</b>	<b>130</b>
--------------------------	------------

- Annexe 1-** La protéolyse régulée comme mode de signalisation des récepteurs membranaires
- Annexe 2-** Composantes de la voie MAPK-ERK1/2, couplage des récepteurs TKs et à 7-TMs par transactivation des récepteurs tyrosine kinase
- Annexe 3-** Neurotransmission GABAergique
- Annexe 4 -** Article auquel l'auteur a participé et qui n'est pas inclu dans cette thèse
- Annexe 5-** Richer M, David M, Villeneuve LR, Trieu P, Ethier N, Pétrin D, Mamarbachi AM, Hébert TE. GABA-B(1) receptors are coupled to the ERK1/2 MAP kinase pathway in the absence of GABA-B(2) subunits. *J Mol Neurosci*, 2009. 38(1):67-79.
- Annexe 6 -** David M, Richer M, Mamarbachi AM, Villeneuve LR, Dupré DJ, Hebert TE. Interactions between GABA-B1 receptors and Kir 3 inwardly rectifying potassium channels. *Cell Signal*, 2006. 18(12):2172-81.
- Annexe 7-** Dupré DJ, Robitaille M, Richer M, Ethier N, Mamarbachi AM, Hébert TE. Dopamine receptor-interacting protein 78 acts as a molecular chaperone for Ggamma subunits before assembly with Gbeta. *J Biol Chem*, 2007. 282(18):13703-15.

## Liste des figures et tableaux

- Figure 1. Synapse GABAergique inhibitrice centrale
- Figure 2. Séquence de la queue C-terminale de GABA-B1
- Figure 3. Régulation d'ERK1/2 par  $G_s$
- Figure 4. Régulation d'ERK1/2 par  $G_i$
- Figure 5. Régulation d'ERK1/2 par  $G_q$
- Figure 6. Augmentation de la phosphorylation d'ERK1/2 par l'activation du récepteur  $GABA_{B1A}$  en cellules HEK293
- Figure 7. Modulation de l'effet GABA-B1 sur la phosphorylation d'ERK1/2 suite à l'inhibition de  $G_{i/o}$ , MEK et PKC
- Figure 8. Modulation de l'effet GABA-B1 sur la phosphorylation d'ERK1/2 suite à l'inhibition de la PLC, de la tyrosine kinase Src et de PI3K
- Figure 9. La lignée cellulaire gliale DI-TNC1 exprime GABA-B1 mais pas GABA-B2
- Figure 10. Le récepteur GABA-B1A est localisé au RE dans les cellules DI-TNC1
- Figure 11. Changements de l'état de phosphorylation d'ERK1/2 et de pEIF4E suite à l'activation du récepteur GABA-B1 dans les cellules DI-TNC1
- Figure 12. Les récepteurs  $GABA-B_{1A}$  peuvent former des homodimères
- Figure 13. Homodimérisation des récepteurs GABA-B1 en BRET
- Figure 14. Absence de colocalisation des signaux GABA-B1 N- et C-terminaux dans la lignée gliale DI-TNC1
- Figure 15. Accumulation intranucléaire d'un fragment GABA-B1 C-terminal endogène potentiel et réduction des récepteurs GABA-B1 réticulaires suite au traitement agoniste des cellules DI-TNC1
- Figure 16. Régulation à la hausse de GABA-B1 et du facteur de transcription ATF-4, protéine interactrice du récepteur GABA-B1, par l'inhibition pharmacologique du protéasome

Figure 17. Le ligand pseudo-PDZ C-terminal extrême du récepteur GABA-B1 est nécessaire à l'abolition de l'induction d'ATF-4 dans les cellules DI-TNC1

Figure 18. La diminution du décompte cellulaire causée par l'expression de GABA-B1 C-terminal est également renversée par la mutation LYK\_AAA

Figure supplémentaire 1. Absence de détection du fragment GABA-B1 de 18kDa en lysats cellulaires entiers de cerveaux de souris « knock-out » GABA-B1<sup>-/-</sup>, GABA-B1A<sup>-/-</sup>, GABA-B1B<sup>-/-</sup> et GABA-B2<sup>-/-</sup>

Figure récapitulative 1. Multiples réservoirs de récepteurs GABA-B1 intracellulaires

Tableau 1. Évidences expérimentales de localisation nucléaire des récepteurs 7-TMs

## **Dédicace**

À mon épouse Ai Thanh, mon garçon Charles-Édouard Duc, mes parents, Louis et Louise Richer, mon beau-père, M. Nguyen Huu Lạng.

## Remerciements

J'adresse mes plus sincères remerciements à toutes ces personnes sans qui cette aventure ne se serait pas concrétisée :

Au Dr Terry Hébert, superviseur de thèse, pour le support et la liberté intellectuelle fournis,

À M. Louis Villeneuve, pour son excellent travail en microscopie confocale,

Au Dr Bruce G. Allen, pour le support fourni lors de mes années à l'ICM,

À Mme Maya Mamarbachi, pour son excellent travail en biologie moléculaire,

Au Dr Dominic Devost, pour les fructueux échanges intellectuels de même que le support technique lors des moments passés à l'U. McGill,

Aux membres du laboratoire Hébert pour la période 2002-2007, je pense notamment à Mme Nathalie Éthier, Mme Thi Trieu Phan, Mme Catherine Lavoie, Mme Darlaine Pétrin, M. Martin David et M. Allara Yoadouna,

Aux collègues du Centre de recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal et du Département de pharmacologie et thérapeutique de l'Université McGill,

À mes collègues de la Faculté de médecine de l'Université Laval, je pense notamment aux Dr Roberto Lin, Dr Frédéric Arsenault, Dr Sébastien Clavel, Dr Jasmin Fauteux, Dr Sébastien Guay, Dr Guillaume Babin, Dr Stéphane Breault, Dr Jean-François Mercier, Dr Pierre-Alexandre Sylvestre, Dr Khaled Effendi,

À la Fondation Savoy,

Aux Instituts de recherche en santé du Canada.



## **Chapitre I – Introduction**

### **Préambule**

Les récepteurs à 7 domaines transmembranaires (7-TMs) sont des protéines dont le rôle consiste à relayer des signaux chimiques extracellulaires vers l'intérieur de la cellule et les traduire en réponses biologiques, via l'activation d'une variété de voies de signalisation impliquant canaux ioniques, kinases et autres effecteurs membranaires ou intracellulaires. Cela ne saurait être remis en cause. Ces récepteurs existent toutefois bien avant leur acheminement à la membrane de surface. Cela amène la possibilité qu'ils puissent intégrer des signaux depuis les endomembranes nucléaires, réticulaires ou golgiennes.

Nous nous intéressons dans le cadre de cette thèse à la fonction des récepteurs 7-TMs sensibles à l'acide  $\gamma$ -butyrique (GABA) de type GABA-B et localisés au réticulum endoplasmique (RE) de même qu'à l'appareil de Golgi. Nous introduirons le sujet en présentant les récepteurs GABA (A et B) tout en mettant l'emphase sur les mécanismes de couplage des récepteurs dimériques GABA-B1/2 à leurs effecteurs classiques que sont les canaux  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  et l'adénylate cyclase. Nous poursuivrons avec la description de certaines observations mal soutenues par le modèle du récepteur dimérique GABA-B1/2. Par la suite, nous définirons l'hypothèse centrale à l'origine de cette thèse et introduirons la voie MAPK-ERK1/2, objet du premier article publié dans le cadre de cette thèse (Richer et al. 2009) de même qu'ATF-4, collaborateur potentiel de récepteurs GABA-B1 étudié dans le cadre du deuxième projet. Les résultats de nos travaux seront ensuite présentés et discutés.

## 1.1 Récepteurs GABA

L'effet généralement inhibiteur de la neurotransmission GABAergique est tributaire de deux composantes, soit la neurotransmission inhibitrice rapide médiée par les canaux  $\text{Cl}^-$  ligand-dépendants de type GABA-A d'une part, et la neurotransmission inhibitrice lente médiée par les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) de type GABA-B, d'autre part. La complémentarité entre les actions électriques médiées par les récepteurs GABA-A, GABA-B présynaptiques et GABA-B postsynaptiques est sous-tendue par des différences dans la vitesse de réponse, la nature des conductances impliquées ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{K}^+$ ) et la localisation des récepteurs par rapport au site de relâchement du GABA (les récepteurs GABA-A sont plutôt synaptiques et les récepteurs GABA-B plutôt pérисynaptiques) [Nicol 2004]. Cette complémentarité, illustrée à la fig. 1, contribue à la complexité et à la flexibilité des réponses électrophysiologiques inhibitrices du GABA dans le SNC.

### 1.1.1 Canaux $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ ligand-dépendants GABA-A

Les récepteurs GABA-A sont des canaux  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  ligand-dépendants, largement exprimés, qui médient, en compagnie des canaux glycine, la plupart des courants inhibiteurs rapides dans le SNC mature, puisque le potentiel de renversement neuronal de l'ion  $\text{Cl}^-$  est généralement, dans ce contexte, de 15 à 20mV plus négatif que le potentiel de repos [Goetz et al. 2007]. En des circonstances où la concentration neuronale intracellulaire en  $\text{Cl}^-$  est plus élevée, par exemple lors du développement embryonnaire et postnatal précoce, les récepteurs GABA-A activés peuvent également produire des courants  $\text{Cl}^-$  sortants et dépolarisants [Ben-Ari 2002]. L'ouverture de canaux  $\text{Ca}^{2+}$

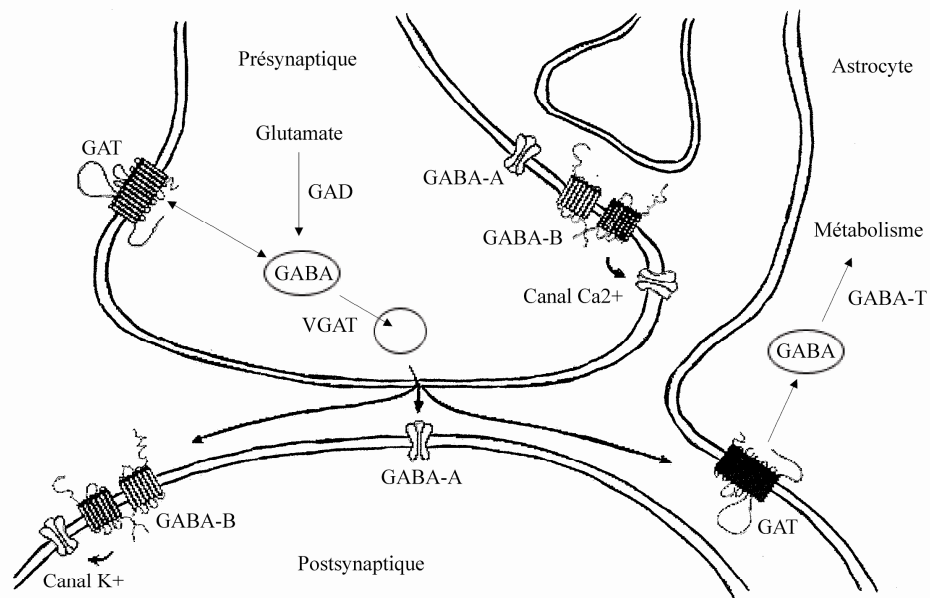
voltage-dépendants et l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  qui suivent cet effet dépolarisant sur la cellule est d'ailleurs un mécanisme fréquemment cité comme contributeur des effets du GABA sur la prolifération des cellules embryonnaires et la migration neuronale. [Ben-Ari 2002 ; Bordey 2007].

Le récepteur GABA-A est un assemblage hétéropentamérique de sous-unités possédant chacune 4 domaines transmembranaires orientés autour d'un pore central conducteur d'ions. Plus de 19 sous-unités GABA-A, codées par des gènes distincts et possédant des profils d'expression cellulaires et développementaux variés ont été clonées ( $\alpha 1$ - $\alpha 6$ ,  $\beta 1$ - $\beta 3$ ,  $\gamma 1$ - $\gamma 3$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$ ,  $\pi$  et  $\rho 1$ - $\rho 3$ ) [Goetz 2007]. La composition sous-unitaire des récepteurs GABA-A affecte leurs propriétés biophysiques, leur affinité pour le GABA et leur profil pharmacologique. La majorité des récepteurs GABA-A cérébraux sont probablement des combinaisons des sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma 2$ , qui respectent un ratio  $2\alpha/2\beta/1\gamma$  [Ernst et al. 2003]. Des études effectuées dans des homogénats de cerveaux entiers de souris ont permis d'estimer que la combinaison  $\alpha 1\alpha 1\beta\gamma 2$  représente 61% des récepteurs GABA-A cérébraux [Benke et al. 2004]. Les récepteurs GABA-A  $\alpha\beta\gamma 2$  sont la cible des benzodiazépines classiques comme le diazepam et le flunitrazepam, puisque le site de liaison de ce modulateur allostérique est situé entre les sous-unités  $\alpha$  et  $\gamma 2$  [Ernst et al. 2003].

### **1.1.2 Récepteurs à sept domaines transmembranaires GABA-B**

L'existence de sites récepteurs GABA, entièrement distincts de ceux activant une conductance  $\text{Cl}^-$ , fut initialement suggérée par l'effet inhibiteur présynaptique,

picotoxine et bicuculline-résistant, d'un variant lipophile du GABA, le baclofen, sur le relâchement de transmetteur dans le ganglion supérieur cervical de poulet [Nicol 2004 ; Bowery et al. 1980]. Cet effet propre au baclofen fut éventuellement lié à l'inhibition picotoxine-résistante de conductances  $Ca^{2+}$  dans des neurones sensoriels embryonnaires de poulet cultivés [Dunlap 1981 ; Dunlap et Fischbach 1981]. Un effet hyperpolarisant, secondaire à l'activation de conductances  $K^+$ , fut ensuite démontré dans des cellules pyramidales hippocampales [Dunlap et Fischbach 1981]. Des études de liaison du récepteur GABA-B, effectuées suivant des traitements avec le N-éthylmaléimide (NEM), l'« islet activating protein » (IAP), la toxine *pertussis* (PTX), des oligonucléotides antisens ainsi que des souris « knock-out » ont ensuite permis de montrer le couplage préférentiel à  $G_{\alpha i}$  et  $G_{\alpha o}$  [Greif 2000 ; Menon-Johansson et al. 1993 ; Morishita et al. 1990]. L'inhibition présynaptique de canaux  $Ca^{2+}$ , l'activation postsynaptique de canaux  $K^+$ , toutes deux médiées via  $G_{\beta\gamma}$ , ainsi que l'inhibition de l'adénylate cyclase, médiée par  $G_{\alpha i/o}$ , sont les conséquences les mieux établies de l'activation du récepteur GABA-B (fig. 1). Elles sont approfondies dans les sections qui suivent.



**Figure 1. Synapse GABAergique inhibitrice centrale.** Illustration des différentes composantes impliquées dans la transmission synaptique au sein d'une synapse GABAergique du SNC mature : récepteurs-canaux Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> GABA-A pré- et postsynaptiques; récepteurs GABA-B1/2 pré- et postsynaptiques couplés à des conductances Ca<sup>2+</sup> et K<sup>+</sup>, respectivement; transporteurs GAT neuronaux et astrocytaires.

### 1.1.2.1 Inhibition présynaptique de conductances $\text{Ca}^{2+}$

Le récepteur GABA-B agit en autorécepteur inhibiteur présynaptique à la fois des terminaisons neuronales GABAergiques et non-GABAergiques du SNC. Il médie généralement cet effet par l'inhibition de canaux  $\text{Ca}^{2+}$  voltage-dépendants de type N ( $\text{Ca}_v2.2$ ) et P/Q ( $\text{Ca}_v2.1$ ) [revu dans Bettler et al. 2004]. Cette inhibition,  $G_{\beta\gamma}$ -dépendante [Kajikawa et al. 2001] et voltage-dépendante, varie entre 10 et 42% selon les études considérées [Chieng et Bekkers, 1999 ; Connor et al. 1999 ; Santos et al. 1995]. L'influx  $\text{Ca}^{2+}$  est corrélé au relâchement de neurotransmetteur à la puissance 3 à 4, ce qui explique que la fermeture de moins de 50% des canaux  $\text{Ca}^{2+}$  puisse résulter en une diminution du relâchement de neurotransmetteur de l'ordre de 90%. Dans des neurones sensoriels embryonnaires de poussin, l'inhibition des canaux  $\text{Ca}^{2+}$  de type T par GABA-B nécessite l'activité de la tyrosine kinase Src [Diverse-Pierluissi et al. 1997]. Plus récemment, le développement de souris « knock-out » isoforme-spécifiques pour le récepteur GABA-B a permis de confirmer, au niveau des synapses glutamatergiques hippocampales CA1-CA3, que le GABA diminue le relâchement de glutamate via l'inhibition présynaptique de conductances  $\text{Ca}^{2+}$  médiée par l'isoforme GABA-B1A [Vigot et al. 2006]. L'isoforme GABA-B1B médierait quant à elle l'inhibition de canaux  $\text{Ca}^{2+}$  postsynaptiques dans les neurones pyramidaux somatosensoriels néocorticaux de la couche V [Pérez-Garci et al. 2006].

En plus d'un effet inhibiteur des influx  $\text{Ca}^{2+}$ , l'activation du récepteur GABA-B peut retarder le relâchement de transmetteur des terminaisons glutamatergiques du calice de Held, dans le tronc cérébral auditif, en bloquant directement le recrutement des vésicules

[Sakaba et Neher, 2003]. Cet effet passe par une diminution de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC), laquelle inhibe l'effet stimulateur de l'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  sur le recrutement vésiculaire. Cet effet inhibiteur de l'AMPC impliquerait le facteur d'échange nucléotidique cAMP-GEFII (« cAMP-guanine nucleotide exchange factor II ») et la petite protéine G Rim, deux protéines régulatrices de la fusion des vésicules à la membrane plasmique.

### **1.1.2.2 Activation postsynaptique de conductances $\text{K}^+$**

L'activation des récepteurs GABA-B somatodendriques et postsynaptiques, exprimés par les neurones principaux de l'hippocampe et du cortex, mène à l'ouverture  $\text{G}_{\beta\gamma}$ -dépendante de canaux  $\text{K}^+$  à rectification entrante Kir3 (« inwardly rectifying ») et la genèse de courants postsynaptiques inhibiteurs sortants [Newberry et Nicoll, 1984 ; Gähwiler et Brown, 1985 ; Benardo, 1984]. Elle explique la phase tardive des potentiels postsynaptiques inhibiteurs, facilement distinguable de la phase rapide GABA-A. Les courants sortants médiés par le baclofen dans les neurones hippocampaux sont d'ailleurs absents chez les souris « knock-out » Kir3.2 et GABA-B1 [Lüscher et al. 1997 ; Schuler et al. 2001]. La régulation de cette conductance a été plus récemment attribuée à l'isoforme GABA-B1B, suivant l'étude des souris « knock-out » isoforme-spécifiques GABA-B1A et 1B [Vigot et al. 2006]. Il a par ailleurs été rapporté que la phosphorylation de la queue C-terminale de la sous-unité GABA-B2 en sérine 892, par PKA, augmente le couplage des canaux Kir3 par le récepteur hétérodimérique GABA-B1/B2 [Couve et al. 2002].

### 1.1.2.3 Mobilisation du $\text{Ca}^{2+}$

L'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire par le récepteur GABA-B a été rapportée dans le contexte astrocytaire sans pour autant que les voies impliquées ne soient clairement identifiées [Kang et al. 1998 ; Serrano et al. 2006]. Cet effet de l'activation des récepteurs GABA-B gliaux est essentiel à la modulation, exercée par les astrocytes dans l'hippocampe, de l'activité des synapses inhibitrices CA1 et de l'induction de la dépression hétérosynaptique des synapses collatérales de Schaffer. La mobilisation du  $\text{Ca}^{2+}$  par GABA-B a récemment été caractérisée en lignées CHO stables et en cultures primaires de neurones corticaux de rat [New et al. 2006]. Les courants générés s'avèrent sensibles à la PTX et au U73122, ce qui suggère la dépendance à  $G_{i/o}$  ainsi qu'à la phospholipase  $C\beta$  (PLC $\beta$ ), potentiellement activée par des sous-unités  $G_{\beta\gamma}$  relâchées par  $G_{i/o}$ , cette voie ayant déjà démontrée pour d'autres RCPGs [Rebecchi et Pentylala, 2000]. Les canaux modulés par cette voie ne seraient pas les récepteurs  $\text{IP}_3$ , les récepteurs ryanodine ou encore les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  voltage-dépendants mais plutôt les « store-operated channels » (SOC). Ces canaux ioniques, localisés à la membrane de surface, s'ouvrent suivant la déplétion du réservoir interne de  $\text{Ca}^{2+}$ . Leur identité est incertaine, mais plusieurs appartiendraient à la famille de canaux ioniques TRP (« large transient receptor protein »), codée par 23 gènes différents [Nilius, 2004]. L'importance de cette voie GABA-B –  $G_{i/o}$  – PLC $\beta$  – canaux SOC reste à confirmer.

Il est également possible que la mobilisation du  $\text{Ca}^{2+}$  par le récepteur GABA-B soit exercée indirectement via la régulation croisée du récepteur mGluR1 (récepteur métabotrope glutamate 1), couplé à  $G_q$ . Il a en effet été démontré, dans le contexte de



la synapse excitatrice entre fibres parallèles et cellules de Purkinje du cervelet, que les réponses  $\text{Ca}^{2+}$  qui suivent l'activation de mGluR1 sont potentiées par l'activation de GABA-B [Hirono et al. 2001]. Cette sensibilisation de mGluR1 par GABA-B est d'ailleurs constitutive et médiée par la liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  à GABA-B, indépendamment de la présence de GABA [Tabata et al. 2004].

#### 1.1.2.4 Inhibition de l'adénylate cyclase

Les événements de signalisation influencés par l'AMPC sont multiples, ce qui justifie la fine régulation exercée sur les différentes isoformes des enzymes adénylate cyclase et phosphodiésterases AMPc-spécifiques par les sous-unités de protéines G hétérotrimériques, les protéine sérine/thréonine kinases et le  $\text{Ca}^{2+}$ , au sein de complexes macromoléculaires membranaires incluant RCPGs, protéines de signalisation effectrices des voies AMPc et autres protéines modulatrices [Willoughby et Cooper, 2007].

Il a été montré que le récepteur GABA-B inhibe la formation d'AMPC basale ainsi que celle stimulée par la forskoline [Xu et Wojcik, 1986 ; Knight et Bowery, 1996]. Les protéines  $G_{\alpha i/o}$  sont à l'origine de cet effet, par leur inhibition des isoformes adénylate cyclase 1, 3, 5, 6, 8 et 9 [Willoughby et Cooper, 2007]. Le récepteur GABA-B peut également augmenter la synthèse de l'AMPC, lorsque qu'activé concomitamment avec des récepteurs  $G_{\alpha s}$  sensibles à la noradrénaline, l'isoprénaline, l'histamine et le VIP (peptide vasoactif intestinal) [Simmons, 1999 ; Tang et Gilman, 1991]. Cet effet potentiateur, résultat d'une régulation croisée, serait expliqué par un effet activateur de  $G_{\beta\gamma}$  sur les formes d'adénylate cyclase 2, 4 et 7, qui requiert la présence de  $G_{\alpha s}$  pour se

manifester. Ces effets inhibiteurs et activateurs du récepteur GABA-B sur la synthèse d'AMPC ont été confirmés par microdialyse in vivo dans le striatum de rat [Hashimoto et Kuriyama, 1997].

À ce moment-ci toutefois, le seul rôle physiologique démontré de l'inhibition de l'AMPC par le récepteur GABA-B est celui, mentionné précédemment, du ralentissement dans le recrutement de vésicules dans les terminaisons glutamatergiques, qui impliquerait cAMP-GEFII et Rim plutôt que PKA, effecteur AMPC le mieux connu [Sakaba et Neher, 2003]. On peut envisager que la régulation de l'AMPC médiée par le récepteur GABA-B influe via la diminution de la phosphorylation PKA sur la fonction de différentes protéines signalisatrices à travers la cellule, au vu du grand nombre de cibles de cette protéine sérine/thréonine kinase. Au niveau membranaire, par exemple, la phosphorylation PKA potentialise les courants excitateurs médiés par les canaux glutamate de type AMPA (acide  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique) et NMDA (acide N-méthyl-D-aspartique), par phosphorylation de la sérine 845 de la sous-unité GluR1 [Roche et al. 1996]. Elle favorise également la désensibilisation du récepteur  $\beta$ 2-adrénérique ( $\beta$ 2-AR) par phosphorylation directe et par activation de GRK2 («G protein-coupled receptor kinase 2») [Freedman et al. 1995]. Il a même été rapporté que la phosphorylation PKA de ce récepteur le transforme de récepteur  $G_s$  en récepteur  $G_i$ , et promeut ainsi l'activation d'une voie MAPK-ERK1/2 impliquant c-Src et Ras par des sous-unités  $G\beta\gamma$ , quoique cela demeure controversé [Daaka et al. 1997]. Au niveau nucléaire, la régulation génique médiée par la voie AMPC-PKA, qui implique la translocation nucléaire de sous-unités catalytiques PKA, relâchées de l'holoenzyme suite à l'augmentation d'AMPC, et la

phosphorylation ou la régulation à la hausse de facteurs de transcription, tels que CREB (« cAMP response element binding »), est également bien caractérisée. L'influence de l'inhibition de l'adénylate cyclase par activation de récepteurs GABA-B sur ces différents effets physiologiques établis de PKA demeure malgré tout inconnue à ce moment-ci.

En somme, les canaux  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^{+}$  et l'adénylate cyclase sont les effecteurs les mieux caractérisés des récepteurs GABA-B localisés à la membrane de surface. Ils permettent l'intégration rapide de signaux GABA extracellulaires par les neurones et astrocytes qui les expriment. Les récepteurs GABA-B localisés à la surface membranaire sont en réalité des dimères des sous-unités GABA-B1 et GABA-B2. Nous présenterons la découverte de ces sous-unités de même que les mécanismes moléculaires nécessaires à leur bon fonctionnement dans la prochaine section.

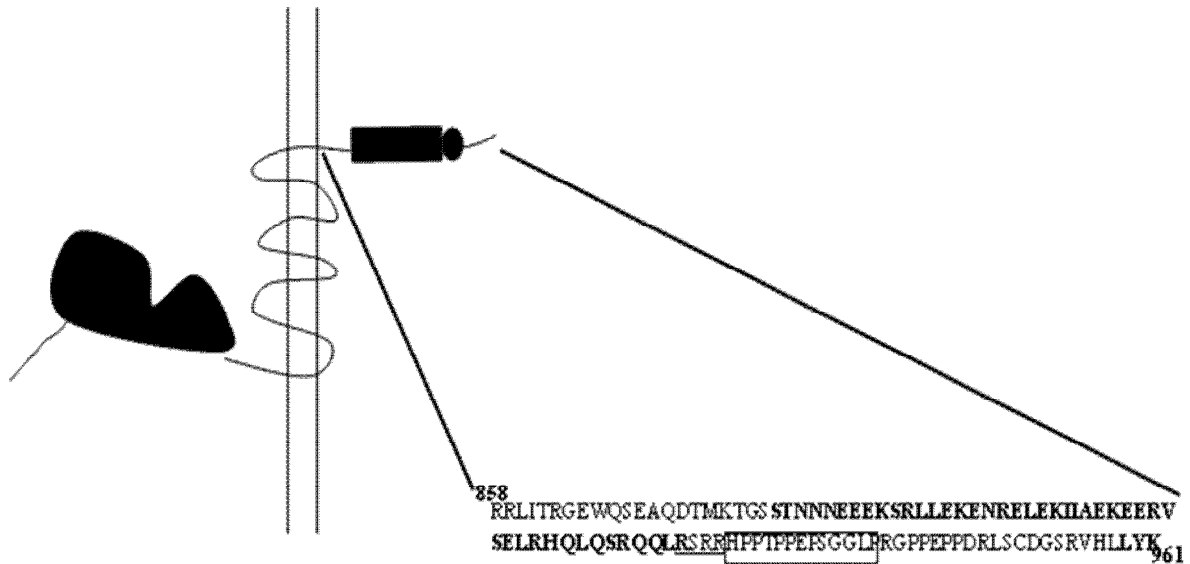
### **1.1.2.5 Clonage de GABA-B1**

Les séquences des deux principales isoformes d'un récepteur GABA-B ont été clonées par expression chez le rat, à l'aide d'un essai de liaison à des antagonistes GABA-B radiomarqués de haute affinité tels que le  $^{125}\text{I}$ -CGP64213 [Kaupman et al. 1997]. Elles codent deux protéines de 960 et 844 résidus (130kDa et 100kDa), GABA-B1A et 1B, issues du même gène, et qui ne diffèrent que par leurs domaines  $\text{NH}_2$ -terminaux, les 147 premiers résidus de GABA-B1A étant remplacés par 18 résidus différents chez GABA-B1B. Le récepteur GABA-B1 partage 18-23% d'acides aminés identiques et 43-48% d'acides aminés reliés avec les récepteurs mGluR1 et CaSR (récepteur sensible au  $\text{Ca}^{2+}$ ).

Ces trois récepteurs font partie de la famille C de récepteurs 7-TMs et se démarquent par leurs grands domaines N-terminaux extracellulaires. La cristallographie du domaine N-terminal de mGluR1 supporte la notion que ces domaines extracellulaires, constitués de deux lobes, entourent leurs ligands respectifs comme les plantes carnivores de la famille *Dioneae* gobent les mouches, d'où le concept du « Venus flytrap » [Kunishima et al. 2000]. Ces domaines partagent un certain degré d'homologie structurale et de séquence avec des protéines de liaison d'acides aminés retrouvées chez la bactérie, LIVBP et LBP [Kaupmann et al 1997]. La queue C-terminale de GABA-B1, constituée de 102 résidus, est affublée d'un domaine « coiled-coil » grâce auquel le récepteur interagit avec la plupart de ses interacteurs (fig. 2). Ce domaine est immédiatement suivi d'un motif de rétention RE RSRR et d'une séquence PEST. Ces régions destructurées, à forte prévalence de résidus proline (P), acide glutamique (E), sérine (S) et thréonine (T), sont associées à la courte demi-vie de plusieurs protéines telles que des facteurs de transcription et des régulateurs du cycle cellulaire (Myc, Fos, Jun, p53, etc.) [Rechsteiner et Rogers, 1996]. Les trois derniers résidus de GABA-B1, LYK, constituent un ligand pseudo-PDZ pour lequel aucune protéine interactrice n'a encore été identifiée.

### 1.1.2.6 Isoformes GABA-B1

Tel que mentionné précédemment, GABA-B1A et GABA-B1B ont été les deux premières isoformes identifiées. Elles sont également les isoformes les plus abondantes du SNC. Elles sont générées par initiation alternative de la transcription plutôt que par épissage, un deuxième site d'initiation étant présent dans l'intron GABA-B1A précédant l'exon 6 [Martin et al, 2001 ; Pfaff et al. 1999]. Les 147 résidus supplémentaires de



**Figure 2. Séquence de la queue C-terminale de GABA-B1.** GABA-B1 interagit avec la plupart de ses interacteurs protéiques via un domaine « coiled-coil » illustré en gras (résidus 880-923). Il est immédiatement suivi d'un motif RSRR de rétention RE (en souligné, résidus 923-926) et d'une séquence PEST (en encadré, résidus 927-939). Les trois derniers résidus de GABA-B1, LYK, constituent un ligand pseudo-PDZ pour lequel aucune protéine interactrice n'a encore été identifiée.

GABA-B1A contiennent deux domaines Sushi, modules d'interaction protéine-protéine originalement identifiés dans les protéines du complément et essentiellement retrouvés dans les molécules d'adhésion cellule-cellule. Une isoforme GABA-B1C contenant seulement un domaine Sushi a été identifiée chez l'humain. Une isoforme GABA-B1E, codant seulement le domaine extracellulaire, a également été identifiée. Elle est peu exprimée dans le SNC, davantage en périphérie [Schwarz et al. 2000]. Elle est sécrétée dans le milieu de culture lorsque surexprimée dans des cellules mammifères.

GABA-B1A et 1B ont des profils d'expression différents selon les régions du système nerveux, les neurones considérés et le stade de développement cérébral. GABA-B1A prédomine par exemple dans les ganglions de la corne dorsale. Dans le cervelet, GABA-B1A est retrouvé dans la couche granulaire, contenant les somas des cellules du même nom, tandis que GABA-B1B est exprimé dans la couche moléculaire, soit sur les dendrites des cellules de Purkinje. GABA-B1A est exprimé plus fortement que GABA-B1B dans le cerveau embryonnaire tandis que GABA-B1B reprend le dessus à l'âge adulte.

Il est suggéré depuis un bon moment que des domaines N-terminaux divergents permettent aux deux isoformes GABA-B de médier des fonctions cellulaires distinctes en les ciblant à des compartiments sous-cellulaires différents. Des localisations respectivement pré- et postsynaptiques de GABA-B1A et GABA-B1B ont d'ailleurs été suggérées par des études en électrophysiologie et en microscopie électronique chez des souris « knock-out » isoforme-spécifiques GABA-B1A et GABA-B1B [Vigot et al.

2006; Perez-Garci et al. 2006]. Alors qu'au sein de synapses hippocampales CA1-CA3 les récepteurs GABA-B1A agissent en hétérorécepteurs présynaptiques sur des terminaisons glutamatergiques, les récepteurs GABA-B1B médient essentiellement une inhibition postsynaptique. La plasticité synaptique est de plus perturbée par l'absence de GABA-B1A mais non pas celle de GABA-B1B, ce qui démontre des rôles physiologiques propres à chacune des deux isoformes GABA-B principales du SNC.

### **1.1.2.7 Hétérodimérisation GABA-B1/B2**

Même si le domaine N-terminal du récepteur GABA-B1 lie efficacement le ligand et que ses éléments structuraux semblent être ceux requis d'un RCPG, il ne couple pas ses effecteurs traditionnels (canaux Kir3, canaux  $Ca^{2+}$  et adénylate cyclase) efficacement en systèmes hétérologues d'expression [Kaupmann et al. 1997]. Lors de son clonage, la rétention du récepteur à la membrane du RE a été avancée pour expliquer cet échec [Couve et al 1998]. Plusieurs groupes sont donc partis à la recherche du facteur manquant qui permettrait au récepteur GABA-B1 de récupérer sa fonction. Cette quête a éventuellement mené à la publication de trois articles scientifiques dans la même édition de la revue Nature, suivie de la publication d'un article dans la revue Science et d'un autre dans la revue JBC, cinq articles identifiant donc une deuxième sous-unité, GABA-B2, possédant 35% d'homologie de séquence avec GABA-B1, et devant être coexprimée avec cette dernière afin de permettre le ciblage à la surface membranaire et le couplage des voies de signalisation [Jones et al. 1998 ; White et al. 1998 ; Kaupmann et al. 1998 ; Kuner et al. 1999 ; Ng et al. 1999]. Il s'agissait de la première description d'un RCPG hétérodimérique. La coexpression de GABA-B1 et GABA-B2 permet en effet un robuste

couplage  $G_{i/o}$ -dépendant aux canaux Kir3, la stimulation de la liaison du  $GTP\gamma[^{35}S]$  et l'inhibition de l'accumulation d'AMPC stimulée par la forskoline, selon un profil pharmacologique très semblable à celui précédemment rapporté pour les récepteurs GABA-B dans le cerveau de rat. L'affinité de GABA-B1 pour le GABA est augmentée par un facteur de 10 par la coexpression de GABA-B2, telle que mesurée par l'inhibition de la liaison du  $[^{125}]CGP64213$  et ce malgré le fait que GABA-B2 ne puisse lier seul les ligands GABA-B.

Ces travaux ont de plus montré, en hybridation *in situ*, une codistribution des ARNs messagers GABA-B1 et GABA-B2 au sein des mêmes cellules neuronales et une forte colocalisation dans plusieurs régions cérébrales, notamment dans le cortex cérébral, l'hippocampe, les couches de Purkinje et granulaires du cervelet, le thalamus et les ganglions de la corne dorsale.

Le criblage d'une librairie d'ADNs complémentaires de cerveau humain avec le domaine « coiled-coil » C-terminal de GABA-B1, en système de double hybride chez la levure, a également permis d'identifier la sous-unité GABA-B2 en tant qu'interacteur GABA-B1 majeur. Cette interaction de GABA-B1 et GABA-B2 a été confirmée par des expériences de coimmunoprécipitation. Les domaines « coiled-coil » sont des interfaces de dimérisation retrouvés dans un grand nombre de protéines et leur implication dans l'interaction GABA-B1-GABA-B2 apparaît logique. On note toutefois qu'une étude ultérieure a montré que l'isoforme GABA-B1E, uniquement constitué du domaine extracellulaire de GABA-B1, peut coimmunoprécipiter avec GABA-B2, ce qui suggère



que les domaines « coiled-coil » ne sont pas les seuls interfaces de dimérisation entre GABA-B1 et GABA-B2 [Schwartz et al. 2000].

#### **1.1.2.7.1 Motif RSRR**

Le récepteur GABA-B1 est retenu au RE par la présence d'un motif de rétention RSRR (arginine, sérine, arginine, arginine) dans sa queue C-terminale, immédiatement après le domaine « coiled-coil » (fig. 2) [Margeta-Mitrovic et al. 2000]. Des motifs semblables, contenant des résidus arginines, ont également été identifiés dans les sous-unités Kir 6 et SUR (« sulfonyleurea receptor ») des canaux  $K_{ATP}$ , les récepteurs NMDA, les canaux CFTR (« cystic fibrosis transmembrane conductance regulator ») et les canaux  $Ca^{2+}$  voltage-dépendants [Zerangue et al. 1999 ; Standley et al. 2000; Scott et al. 2001; Xia et al. 2001 Chang et al. 1999 ; Bichet et al. 2000]. Le motif RSRR de GABA-B1 est masqué par la dimérisation avec GABA-B2, ce qui permet le ciblage de GABA-B1 à la surface membranaire. Si sa mutation en ASAR permet à GABA-B1 d'être ciblé en surface en absence de GABA-B2, elle ne permet pas pour autant le couplage des effecteurs classiques. Cela suggère que la sous-unité GABA-B2 n'agit pas seulement en protéine chaperone, mais qu'elle assume également d'autres fonctions au sein de l'hétérodimère.

#### **1.1.2.7.2 Rôles respectifs de GABA-B1 et GABA-B2 au sein de l'hétérodimère**

Cela nous amène à discuter des rôles respectifs de GABA-B1 et GABA-B2 au sein de l'hétérodimère. On savait déjà que la liaison du ligand était assumée par le domaine N-terminal de GABA-B1 depuis son clonage [Kaupmann et al. 1997]. L'étude de récepteurs mutés et de chimères GABA-B, au sein desquelles certains domaines GABA-

B1 ont été remplacés par leur équivalent GABA-B2 et vice-versa, a permis d'approfondir sur le rôle de GABA-B2 et de montrer que sa deuxième boucle intracellulaire, mais non celle de GABA-B1, est impliquée dans le couplage de la protéine G [Galvez et al. 2001 ; Calver 2001 ; Havlickova et al. 2002]. Ce rôle s'ajoute donc à ceux de stabilisateur de la liaison entre GABA-B1 et son ligand et de chaperone, mentionnés précédemment. Un rôle des domaines C-terminaux dans l'interaction directe avec protéine G et effecteurs a par ailleurs été proposé, même si la délétion presque entière des queues C-terminales de GABA-B1 et GABA-B2 n'empêche pas l'hétérodimère d'être fonctionnel [Calver 2001 ; Margeta-Mitrovic et al. 2001].

### **1.1.2.7.3 Observations non-expliquées par le modèle du récepteur hétérodimère GABA-B1/B2**

La découverte de GABA-B2 et de la nécessité de l'hétérodimérisation GABA-B1/B2 a permis d'élucider les mécanismes de couplage  $G_{i/o}$ -dépendants du récepteur GABA-B1 à ses effecteurs traditionnels, soit les canaux Kir3, les canaux  $Ca^{2+}$  et l'adénylate cyclase. Il explique de plus le ciblage membranaire de la sous-unité GABA-B1, trappée au RE en absence de la sous-unité GABA-B2. Certaines observations demeurent toutefois mal supportées par ce modèle et sont développées dans les lignes qui suivent.

#### **1.1.2.7.3.1 Localisation intracellulaire de GABA-B1**

Plusieurs articles traitant de la localisation de GABA-B1 dans le SNC font non seulement état de marquages GABA-B1 au niveau des dendrites et terminaisons synaptiques, attendus de récepteurs agissant en surface de la cellule et relayant des signaux synaptiques et/ou pérисynaptiques, mais également d'importants marquages

intracellulaires [Sloviter 1999 ; Charles 2001 ; Gonchar 2001 Lopez-Bendito, 2004 ; Panzanelli et al. 2004 ; Lee et al. 2006]. Ces marquages sont conséquents avec ceux obtenus en immunohistochimie confocale de cellules transfectées. En comparaison, des marquages intracellulaires ne sont pas rapportés pour GABA-B2. La forte présence de la sous-unité GABA-B1 à l'intérieur de la cellule, même dans un contexte de coexpression avec GABA-B2, amène la possibilité que cette sous-unité, lorsque non-dimérisée avec GABA-B2, puisse signaler depuis les endomembranes. À ce propos, les évidences s'accroissent à l'effet que les RCPGs sont en mesure de moduler les voies de signalisation depuis des sites intracellulaires tels que le noyau, le RE et l'appareil de Golgi [Gobeil et al. 2006 ; Boivin et al. 2008]. Ces évidences seront discutées à la section 1.3.

#### **1.1.2.7.3.2 Modulation irrégulière des effecteurs par GABA-B1**

Un couplage irrégulier des canaux Kir3 en oocytes de Xénope a été rapporté lorsque GABA-B1 est surexprimé seul en cellules hétérologues [Kaupmann et al. 1997, 1998]. Cela pourrait suggérer que GABA-B1 est inhibé par un mécanisme inconnu en absence de GABA-B2 et qu'il pourrait être fonctionnel seul, dans un contexte où cette influence négative serait levée.

#### **1.1.2.7.3.3 Différences régionales dans l'expression de GABA-B1 et GABA-B2**

Plusieurs publications, dont celles rapportant le clonage de GABA-B2, montrent une forte colocalisation des transcrits GABA-B1 et GABA-B2 dans la plupart des régions du cerveau adulte du rat [Jones et al. 1998 ; White et al. 1998 ; Kaupmann et al. 1998 ;

Berthele et al. 2001 ; Clark et al. 2000 ; Durkin et al. 1999 ; Charles et al. 2001]. Il est toutefois fait mention d'une plus forte expression de GABA-B1 dans certaines régions du cerveau, notamment dans le corps strié, le noyau accumbens, l'hypothalamus et le bulbe olfactif. Les différences les plus marquées sont observées dans le corps strié. À l'extérieur du SNC, la prédominance de GABA-B1 a été également notée dans l'utérus, la rate, l'intestin grêle et les poumons [Calver et al. 2000]. Ces données suggèrent que la sous-unité GABA-B1 est en mesure de fonctionner seule ou en association avec d'autres partenaires protéiques que GABA-B2 dans certaines régions et types cellulaires du cerveau.

#### **1.1.2.7.3.4 Différences développementales dans l'expression de GABA-B1 et GABA-B2**

Le GABA est une molécule versatile qui, en plus de médier des actions fondamentales dans le SNC adulte, agit en facteur régulateur lors des étapes de prolifération, de migration et de différenciation neuronale au cours du développement cérébral, via l'activation des récepteurs GABA-A, GABA-B et de la signalisation  $Ca^{2+}$  [Owens et Kriegstein, 2002 ; Manent et Represa, 2007]. Or, une discordance dans l'expression régionale et temporelle des sous-unités GABA-B1 et GABA-B2 a été notée dans le cerveau embryonnaire de rongeur par différents groupes [Kim et al. 2003 ; Li et al. 2003 ; Martin et al. 2004 ; Lopez-Bendito et al. 2002]. Il y est en effet une période de temps (E14-E16), qui coïncide avec les étapes de prolifération et de migration des cellules neuronales précurseuses, où GABA-B1 est exprimé plus fortement que GABA-B2. Les exemples de sous-populations cellulaires exprimant fortement GABA-B1 mais faiblement GABA-B2 sont multiples et il serait exhaustif de les décrire ici. GABA-B1 est

retrouvé dès E14 dans des régions du cerveau en développement qui sont riches en cellules souches neuronales et gliales, et qui fournissent une part importante du contingent de neurones pyramidaux, d'interneurones corticaux et hippocampaux. Ces marquages, essentiellement intracellulaires, augmentent progressivement jusqu'à E18 et s'étendent à plusieurs autres régions cérébrales.

Jusqu'à présent, les réponses électrophysiologiques GABA-B les plus précoces ont été observées à E18 dans le cortex et l'hypothalamus [Obrietan et al. 1999]. Le rôle du récepteur GABA-B dans le cerveau en développement n'est toutefois pas nécessairement tributaire de la modulation de conductances ioniques de surface. La modulation de voies de signalisation non-électriques par un récepteur GABA-B1 non-dimérisé à GABA-B2 pourrait d'ailleurs soutenir la régulation transcriptionnelle par le baclofène de 20 gènes dans des cultures hippocampales primaires de rats E18 [Ghorbel et al. 2005], un contexte où la modulation de conductances électriques par le récepteur GABA-B n'a pas été montrée. Plusieurs des gènes régulés codent pour des protéines des voies « mitogen-activated protein kinase » (MAPK), la liste incluant en effet Rab18, une GTPase (guanosine triphosphatase) de la famille Ras, CNK-1 (« connector enhancer of KSR-1 »), une protéine d'échaffaudage de la voie MAPK-ERK1/2, MKK4, une MAP2K en amont de JNK et p38, ainsi que de MKK6, une MAP2K en amont de p38. Ces voies seront discutées à la section 1.4. Plus encore, il est possible que cette régulation spécifique de la transcription d'ARNs messagers soit retrouvée avant E18, à un moment où l'expression de GABA-B1 surpasse celle de GABA-B2 de manière encore plus importante.

En somme, la localisation prédominamment intracellulaire de GABA-B1, la modulation irrégulière des effecteurs par GABA-B1 de même que les différences régionales et développementales dans l'expression de GABA-B1 et GABA-B2 sont des observations mal soutenues par le modèle du récepteur hétérodimérique GABA-B1/B2 et qui suggèrent que la dimérisation GABA-B1/B2 n'est pas le seul mécanisme permettant aux récepteurs GABA-B de coupler les voies intracellulaires de signalisation. Cette éventualité, aux implications potentielles dans le contexte du cerveau en développement, n'empêche pas que le modèle de l'hétérodimère GABA-B1/B2 de bien supporter le fonctionnement des récepteurs GABA-B de surface.

## 1.2 Thèse défendue

L'existence de récepteurs hétérodimériques GABA-B1/B2 est acquise et explique de manière très satisfaisante la modulation de conductances  $\text{Ca}^{2+}$  présynaptiques, de conductances  $\text{K}^+$  postsynaptiques de même que l'inhibition de l'adénylate cyclase par le GABA et les autres agonistes GABA-B. Il est toutefois possible que des récepteurs GABA-B1 soient fonctionnels en absence de GABA-B2 et qu'ils soient en mesure de moduler certaines voies de signalisation intracellulaires depuis les endomembranes plutôt que depuis la membrane de surface, sans nécessairement impliquer de canaux ioniques. De tels récepteurs pourraient sous-tendre les actions retardées du signal GABA dans le contexte des cellules neuronales et gliales du cerveau mature et embryonnaire. La démonstration convaincante d'un couplage direct de récepteurs GABA-B1 aux voies de signalisation intracellulaire représenterait une nouvelle plate-forme pour expliquer les effets du GABA dans des contextes autres que celui de synapses inhibitrices matures.

La section qui suit débutera par un résumé de la littérature concernant les récepteurs à 7-TMs intranucléaires, thème central de nos travaux sur le récepteur GABA-B1. Il sera suivi de la description d'une voie de signalisation intracellulaire effectrice potentielle de la sous-unité GABA-B1 en absence de GABA-B2, la voie MAPK-ERK1/2, objet de la première partie des travaux de cette thèse. Nous introduirons en dernier lieu le facteur de transcription ATF-4, un interacteur GABA-B1 étudié dans la deuxième partie de nos travaux sur la signalisation GABA-B1.

### 1.3 Récepteurs à 7-TMs intranucléaires

Parmi les mécanismes de fonctionnement des récepteurs 7-TMs de surface, ceux couplant des stimuli extracellulaires à des réponses physiologiques rapides et non-génomiques (sécrétion hormonale, contraction musculaire, métabolisme cellulaire) sont les mieux définis. Ils impliquent l'activation des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta\gamma$  des protéines G hétérotrimériques, capables de stimuler différentes enzymes qui catalysent la production d'une variété de seconds messagers (inositol triphosphates, DAG,  $\text{Ca}^{2+}$ , AMPc, GMPc) ou encore d'activer directement des canaux ioniques. En revanche, les mécanismes par lesquels les récepteurs 7-TMs médient des réponses biologiques retardées (division cellulaire, prolifération et apoptose) demeurent mal compris, à l'exception du couplage de la voie AMPc-PKA-CREB par les récepteurs couplés à  $G_s$  et  $G_{i/o}$  et du couplage aux voies MAPK (qui sera décrit à la section suivante).

La thèse que nous défendons propose l'existence de récepteurs GABA-B1 intracellulaires fonctionnels. Mais qu'est-il connu quant aux mécanismes de fonctionnement des récepteurs 7-TMs intracellulaires? D'abord, la localisation nucléaire de récepteurs 7-TMs a été démontrée par l'utilisation d'une variété de méthodes expérimentales (immunohistochimie, microscopie électronique et confocale, autoradiographie, études de liaison, cytométrie de flux, essais fonctionnels, etc.). Ces travaux, révisés par Gobeil et al. (2006) de même que par Boivin et al. (2008), sont résumés et enrichis au tableau 1.

La présence d'une multitude de composantes des systèmes effecteurs a également été démontrée aux membranes nucléaires et dans le nucléoplasme. La liste inclut protéines G



**Tableau 1.** Évidences expérimentales de localisation nucléaire des récepteurs 7-TMs

Récepteur	Type cellulaire/tissu	Espèce	Méthode de détection	Références
<b>Famille 1</b> ACh	Cornées, cellules cornéennes, cellules CHO	Lapin	Autoradiographie	Lind et Cavanagh 1993,1995
$\alpha$ -AR	Cardiomyocytes néonataux et adultes	Rat Souris	Études de liaison, MC-GFP MC-GFP, IHC	Boivin et al. 2006 Huang et al. 2007
$\beta$ -AR	Cardiomyocytes néonataux et adultes Cardiomyocytes adultes	Rat Rat, souris	Études de liaison Études de liaison, IHC, WB	Buu et al. 1993 Boivin et al. 2006
Angiotensine II (AT <sub>1</sub> -R)	Cellules endothéliales et musculaires lisses vasculaires, cardiomyocytes Foie  Foie Foie Cortex cérébral Cardiomyocytes Cellules musculaires lisses vasculaires Cerveau, neurones Cellules musculaires lisses vasculaires Cellules endothéliales et musculaires lisses vasculaires Cellules musculaires lisses vasc.A10 et CHO-K1 Cellules musculaires lisses vasculaires A10, cellules CCF-STTG1, COS-7	Rat  Rat  Rat Rat Rat Rat Rat Humain Rat, hamster Rat	Autoradiographie  Essai de solubilité chromatine, études de liaison Études de liaison Études de liaison; essai de transcription IHC (Ang II) Essai électrophysiologique Microinjection d'Ang II et essai Ca <sup>2+</sup> ICC et WB (AT <sub>1</sub> ) IHC et WB (AT <sub>1</sub> ); essai Ca <sup>2+</sup> Études de liaison  MC-GFP, gènes rapporteurs  MC-GFP, WB	Robertson et Khairallah, 1971 Re et al. 1983, 1984  Booz et al. 1992 Eggena et al. 1993, 1996 Erdmann et al. 1996 De Mello 1998 Haller et al. 1999 Lu et al. 1998 Bkaily et al. 2003 Lee et al. 2004  Cook et al. 2006  Cook et al. 2007
Apeline (APJ)	Cervelet, cellules D283 transfectées	Humain	IHC, ICC et WB (ApelinR)	Lee et al. 2004
Chemokine CXCR4	Hépatome, cellules HT 29 NSCLC Cellules Hela	Humain Humain Humain	IHC (CXCR <sub>4</sub> ) IHC (CXCR <sub>4</sub> ) ICC (CXCR <sub>4</sub> )	Shibuta et al. 2002 Spano et al. 2004 Gobeil Jr et al. 2006
Dynorphine B	Cardiomyocytes	Hamster	Études de liaison; activité PKC et essai de transcription (RPA)	Ventura et al. 1998
Endothéline-1 (ETR)	Foie Cellules musculaires lisses vasculaires Cardiomyocytes, cerveau  Cellules endothéliales endocardiques	Rat Humain Chien, rat  Humain	Études de liaison Essai Ca <sup>2+</sup> ICC et WB (ET <sub>B</sub> ); activité PKC et essai Ca <sup>2+</sup> ICC (ET-1, ET <sub>B</sub> ); essai Ca <sup>2+</sup>	Hocher et al. 1992 Bkaily et al. 2000 Boivin et al. 2003  Jacques et al. 2005
Ghrelin (GLRN-R)	Cellules HEK293 transfectées	Humain	MC-GFP	Leung et al. 2007
Leukotriène D4 (CysLT <sub>1</sub> )	Cancer colorectal, cellules Int 407 et CaCO-2		IHC, ICC, MC-GFP, WB (CysLT <sub>1</sub> ); essai Ca <sup>2+</sup>	Nielsen et al. 2005
LPA (LPA <sub>1</sub> R)	Cellules endothéliales microvasculaires cérébrales, foie, cellules HTC4 transfectées  Cellules CHO, PC12, neurones cérébelleux granulaires	Porc, rat	Études de liaison; IHC, ICC, WB (LPA <sub>1</sub> ); essai Ca <sup>2+</sup> , activation Akt, essai transcription (RT-PCR) et activité eNOS  IHC, WB (LPA <sub>1</sub> ), cytométrie de flux	Gobeil et al. 2003, 2006  Waters et al. 2006
Mélanocortine (MC2R)	Cellules H295R (adrénocarcinome)	Humain	WB (MC2R)	Doufexis et al. 2007
Mélatonine (MT2)	Cellules choriocarcinome placentaire	Humain	ICC	Lanoix et al. 2006
Neuropeptide Y	Cellules hypophysaires Cellules endothéliales endocardiques	Rat Humain	ICC (NPY) ICC (NPY <sub>1</sub> ); radioimmunoessai pour NPY; essai Ca <sup>2+</sup>	Chabot et al. 1998 Jacques et al. 2003
Opioides (OPR1/2)	Cellules neurohybrides NG 108-15	Humain, hamster	IHC, ICC, études de liaison, essai de transcription	Belcheva et al. 1993 Ventura et al. 1998
PAF (PAFR)	Foie Cerveau, cellules endothéliales microvasculaires cérébrales, cellules CHO transfectées	Rat Porc	Essai de production de DAG Études de liaison, IHC, ICC, cytométrie de flux (PAFR); radioimmunoessai (PAF); essai Ca <sup>2+</sup> , production AMPe et IP <sub>3</sub> , liaison NFκB, essai de transcription (RT-PCR)	Miguel et al. 2001 Marrache et al. 2002 Zhu et al. 2006

Peptide vasoactif intestinal	Cellules HT29	Humain	Études de liaison	Omary et al. 1987
Prolactine	Foie	Rat	Activité PKC	Buckley et al. 1988
Prostaglandines (EP <sub>1-4</sub> )	Cerveau, myomètre, cellules HEK293 et Swiss 3T3 transfectées	Rat, porcelet	Études de liaison; ICC et IHC (EP <sub>1</sub> ); essai Ca <sup>2+</sup> et de transcription (hybridization ARN)	Bhattacharya et al. 1998
	Cerveau, foie	Rat, porcelet	Études de liaison; WB (EP <sub>3a</sub> , EP <sub>4</sub> ), ICC (EP <sub>3a</sub> , EP <sub>4</sub> ); essai Ca <sup>2+</sup> essai de transcription (hybridization ARN)	Bhattacharya et al. 1999
	Cellules endothéliales microvasculaires cérébrales	Porc	Essais fonctionnels EP <sub>3</sub> : activation MAPK et Akt, production AMPc et IP <sub>3</sub> , essai Ca <sup>2+</sup> et de transcription (RT-PCR)	Gobeil et al. 2002
Tachykinine (NK <sub>1</sub> R)	Cellules neuronales du ganglion de la corne dorsale	Rat	ICC, IHC	Boer et al. 2006
<b>Famille 2</b> Hormone parathyroïdienne (PTH <sub>1</sub> R)	Cellules ostéoblastes-like Foie, rein, intestin, utérus, ovaires MC3T3-E1, UMR106, cellules SaOS2 Cartilage, ostéoclastes Cellules ostéoblastes-like	Souris Rat Cerf Souris	ICC (PTHrP) IH (PTH <sub>1</sub> R et PTHrP); WB (PTH <sub>1</sub> R) ICC (PTH <sub>1</sub> R) IHC, ICC et WB (PTH <sub>1</sub> R) IHC, WB (PTH <sub>1</sub> R)	Henderson et al. 1995 Watson et al. 2000 Watson et al. 2000 Faucheux et al. 2002 Pickard et al. 2006
<b>Famille 3</b> Glutamate (mGluR5)	Neurones, cellules HEK293 transfectées	Rat	ICC et WB (mGlu <sub>5</sub> ); essai Ca <sup>2+</sup> , études fonctionnelles	O'Malley et al. 2003, 2005, 2007, 2008, 2009
«Gonadotropine releasing hormone» (GnRHR)		<i>C. Elegans</i>	IHC	Vadakkadath et al. 2006
<b>Autres</b> WNT (DFz2)	Jonction neuromusculaire glutamatergique (postsynaptique)	Drosophile	IHC (DFz2), WB (DFz2)	Mathew et al. 2005 Ataman et al. 2006

ICC, immunocytochimie; IHC, immunohistochimie; MC-GFP, microscopie confocale avec protéines à fusionnées à la GFP; RPA, essai de protection à la RNase; WB, immunobuvardage de type western.

(G<sub>s</sub>, G<sub>i</sub>/G<sub>o</sub>), enzymes (PLC-A2, C, D, PKC, PKA, adénylate cyclase, eNOS), canaux ioniques (K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>), pompes, échangeurs, composantes des voies MAPK-Erk1/2, PI3K/Akt et Ca<sup>2+</sup> [William et Crouch 2000; Gobeil et al. 2003, 2005, 2006; Bkaily et al. 2003; Marrache et al. 2004; Zhu et al. 2006]. La présence de ces différentes protéines à la membrane nucléaire suggère la possible existence de voies de signalisation RCPGs autonomes à cet endroit, indépendantes des voies RCPGs présentes à la membrane de surface.

La seule présence de récepteurs et d'effecteurs en un endroit donné ne suffit pas à conclure de l'existence de complexes de signalisation fonctionnels. Les ligands auxquels

ces récepteurs sont sensibles doivent également être présents à proximité. À cet égard, les ligands des récepteurs activés par les lipides PGE<sub>2</sub>, PAF et LPA<sub>1</sub> ont fait l'objet d'une caractérisation approfondie. Il a été établi que les diverses enzymes responsables de leur synthèse (PLA<sub>2</sub>, PLC, PLD, COX-2, PGE<sub>2</sub> synthase, etc.) sont détectées au noyau cellulaire, ce qui est en faveur de la synthèse de ces ligands endogènes à proximité du réservoir de récepteurs nucléaires [Zhu et al. 2006].

La fonction même des récepteurs PGE<sub>2</sub>, PAF et LPA<sub>1</sub> de noyaux isolés de cellules endothéliales microvasculaires a également été étudiée. La stimulation avec des agonistes spécifiques amène une augmentation du Ca<sup>2+</sup> intranucléaire (fig. 3A) [Zhu et al. 2006]. Cette augmentation dépend de G<sub>i/o</sub> et de canaux K<sub>Ca</sub>. Elle est suivie de l'induction de gènes pro-inflammatoires tels que c-fos, eNOS, COX-2 et iNOS via des mécanismes partiellement compris impliquant MAPK-ERK1/2 et NF-κB. Il est fort probable que cette induction dépende également des différentes composantes de la machinerie Ca<sup>2+</sup> retrouvées au noyau (récepteurs EP<sub>3</sub> et EP<sub>4</sub>, pompe Ca<sup>2+</sup>-ATPase, échangeur Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>, canaux TRPC, calmodulin, calreticulin, calpain, « calmodulin-dependent protein kinase », facteurs de transcription etc...). Le lien direct avec l'activation de la machinerie Ca<sup>2+</sup> reste toutefois à être démontré.

En somme, les évidences s'accroissent à l'effet que certains récepteurs 7-TMs peuvent opérer des voies de signalisation depuis la membrane nucléaire, des voies qui diffèrent de celles initiées depuis la surface membranaire. Ces évidences élargissent le cadre d'action des récepteurs 7-TMs et les réconcilient d'une certaine façon avec la nature même d'agonistes issus du métabolisme des lipides membranaires ou d'acides aminés présents en grande concentration à l'intérieur de la cellule.

Dans la section suivante, nous approfondirons sur une voie de signalisation candidate en aval de récepteurs GABA-B1 intracellulaires, la voie MAPK-ERK1/2. Elle fait l'objet de la première partie de nos travaux.

## 1.4 Voie MAPK-ERK1/2

La régulation spécifique de la transcription de multiples composantes des voies MAPK par le baclofen, observée en cultures hippocampales primaires de rats E18 et mentionnée précédemment, nous a amené à considérer cette voie en tant qu'effectrice potentielle en aval de récepteurs GABA-B1 fonctionnels en absence de GABA-B2 [Ghorbel et al. 2005]. Les voies MAPK sont des triades de kinases hautement conservées, classiquement composées d'une MAP kinase (MAPK), régulée par sa phosphorylation par une MAPK kinase (MAP2K), elle-même régulée par sa phosphorylation par une MAPKK kinase (MAP3K) [Dhanasekaran et Johnson, 2007]. On recense au moins 11 MAPKs, 7 MAP2Ks et 20 MAP3Ks. L'activation par une variété de signaux extracellulaires (facteurs de croissance, hormones, neurotransmetteurs, stress osmotique, etc.) des différentes voies MAPKs caractérisées chez les mammifères (ERK1/2, ERK3/4, ERK5, ERK7/8, JNK1/2/3 et p38  $\alpha/\beta/\gamma$  (ERK6)/ $\delta$ ) contribue à une régulation spécifique des processus cellulaires fondamentaux que sont l'embryogenèse, la prolifération, la différenciation et l'apoptose. La spécificité des MAP3Ks pour certaines MAP2Ks, celle des MAP2Ks pour certaines MAPKs, de même que le regroupement physique des triades kinases en modules fonctionnels via des interactions protéine-protéine impliquant des modules d'amarrage et stabilisées par des protéines d'échaffaudage, assure la spécificité des signaux transmis [Raman et al. 2007]. La dérégulation des voies MAPKs est impliquée de manière importante dans le développement et la progression du cancer [Dhillon et al. 2007]. La plus étudiée de ces voies, la voie Raf-MEK1/2-ERK1/2, est dérégulée dans approximativement le tiers des néoplasies. L'action positive des ligands RTKs et RCPGs sur la voie MAPK-ERK1/2 dépend de plusieurs voies parallèles liant ces

récepteurs aux petites protéines G (protéines G hétérotrimériques, transactivation de RTKs, recrutement de  $\beta$ -arrestine, etc...) dont l'importance varie selon les types cellulaires considérés. Nous introduirons plus particulièrement l'activation par l'entremise des différentes protéines G hétérotrimériques et des kinases dépendantes de seconds messagers tels que l'AMPc, le DAG, l'IP<sub>3</sub> et le Ca<sup>2+</sup> [Luttrel, 2002]. Les autres mécanismes sont présentés en annexe.

### 1.4.1 G<sub>s</sub>

Les récepteurs couplés à la protéine G<sub>s</sub> sont en mesure d'activer la voie MAPK-ERK1/2 par l'activation AMPc et/ou PKA-dépendante de différentes protéines GEF (« guanine nucleotide exchange factor ») (fig. 3) [Goldsmith et Dhanasekaran, 2007]. L'importance des différentes voies varie selon les types cellulaires considérés. Les voies convergeant sur la petite protéine G Rap-1 et B-Raf ont été relativement bien caractérisées. La Rap-1-GEF EPAC (« exchange protein directly activated by cAMP »), par exemple, est régulée de manière positive par l'AMPc et permet l'activation de la voie MAPK-ERK1/2 en cellules rénales de rat. Une autre Rap-1-GEF, C3G (« Crk SH3 domain-binding guanine nucleotide-releasing factor »), activée indirectement par la tyrosine kinase Src, elle-même activée par PKA, permet également l'activation de MAPK-ERK1/2 par G<sub>s</sub> dans plusieurs autres types cellulaires. Une voie G<sub>as</sub> – AMPc – PKA – Ras menant à MAPK-ERK1/2 a également été rapportée et impliquerait les activations PKA-dépendante de la Ras-GEF GRF1 et PKA-indépendante de la Ras-GEF CNrasGEF (« CN-Ras- guanine nucleotide exchange factor »).

Un effet inhibiteur de  $G_{as}$  sur la voie MAPK-ERK1/2 est également recensé et implique la phosphorylation PKA de l'isoforme Raf-1 ou C-Raf en sérine 259 ou la séquestration de C-Raf par Rap-1 activé, possible de par les similitudes structurales entre les domaines effecteurs de Rap-1 et de Ras.

En résumé,  $G_{as}$  tend à stimuler des modules B-Raf-MEK1/2-ERK1/2 via Rap-1 dans les cellules exprimant B-Raf. Elle inhibe ou active toutefois les modules C-Raf-MEK1/2-ERK1/2 des types cellulaires exprimant C-Raf sans qu'une tendance générale ne se dégage.

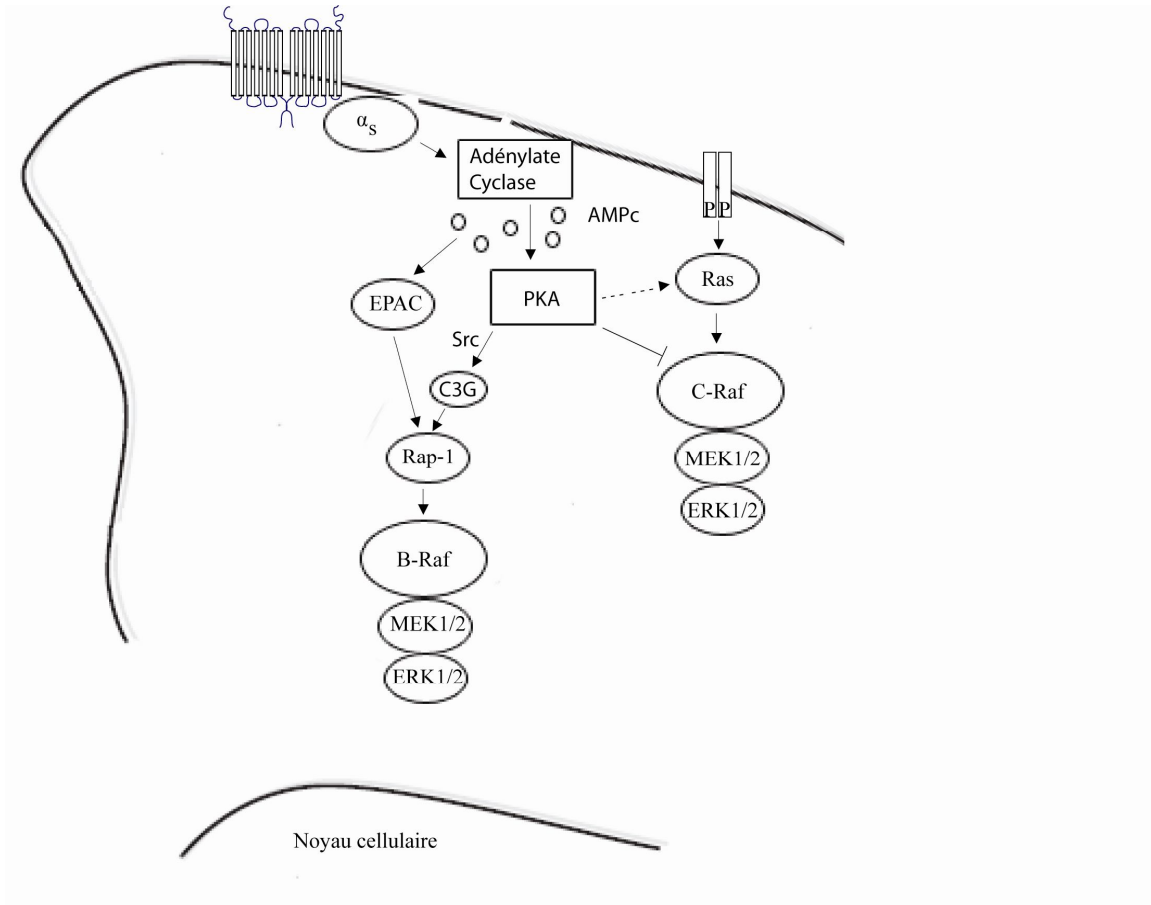
#### 1.4.2 $G_i$

La protéine  $G_i$ , inhibitrice de l'adénylate cyclase, exerce des effets essentiellement stimulateurs de la voie MAPK-ERK1/2 et ce par une activation directe ou indirecte de Ras, médiée par des mécanismes  $G_\alpha$  et  $G_{\beta\gamma}$ -dépendants (fig. 4). L'activation de MAPK-ERK1/2 par  $G_{\alpha i2}$  implique la suppression de voies inhibitrices. Son effet inhibiteur sur l'adénylate cyclase conduit par exemple à une diminution de l'activité PKA et de l'effet inhibiteur de la phosphorylation PKA sur C-Raf. Cela résulte en un effet potentiateur de l'activation de la protéine  $G_\alpha$  sur la signalisation Ras-C-Raf.

Tel que mentionné précédemment, Rap-1 peut inhiber la voie C-Raf-MEK1/2-ERK1/2 par séquestration de C-Raf.  $G_{\alpha i2}$  peut en revanche limiter cet effet inhibiteur de Rap-1 sur Raf par sa capacité à recruter la protéine Rap1GAPII à la membrane, ce qui diminue

l'activité Rap-1. L'effet net de l'activation de  $G_{\alpha i}$  sur la voie C-Raf-MEK1/2-ERK1/2 est ainsi positif.

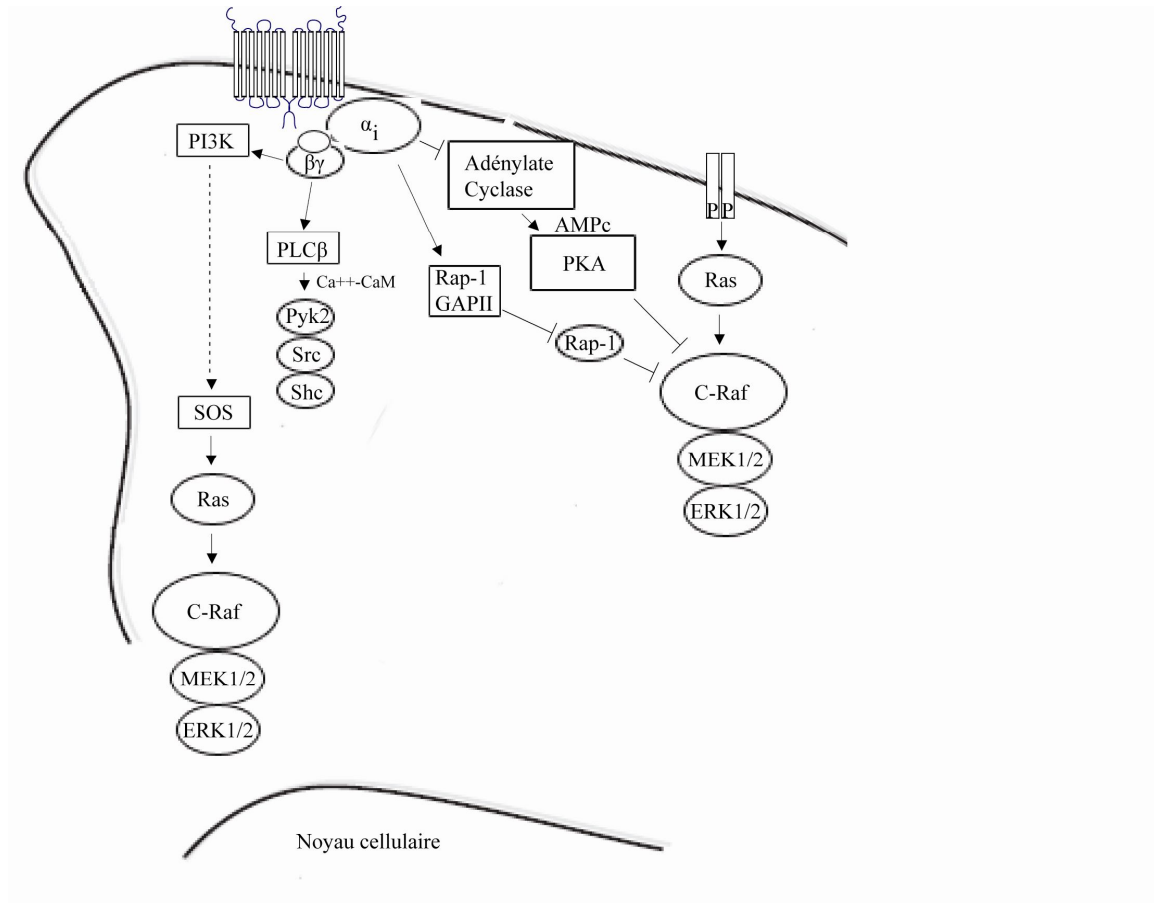




**Figure 3. Régulation d'ERK1/2 par  $G_s$ .** Figure montrant les différentes voies  $G_s$  en mesure d'activer MAPK-ERK1/2. Leur importance varie selon les types cellulaires considérés. La Rap-1-GEF EPAC active Rap-1 suivant sa propre activation par l'AMP<sub>c</sub>. La Rap-1-GEF C3G active quant à elle Rap-1 suivant son activation PKA et Src-dépendante. On note également une régulation négative de PKA sur C-Raf. Lignes se terminant par des flèches, régulation positive, lignes se terminant par un trait, régulation négative.

La médiation des effets positifs d'une variété de RCPGs sur la voie MAPK-ERK1/2 implique  $G_{\beta\gamma}$ . Elle influe notamment sur des modules MAPK-ERK1/2 en aval de Ras. Elle est dépendante d'une activité tyrosine kinase qui varie selon le contexte cellulaire. La cascade débute par l'activation initiale de PLC- $\beta$  et/ou PI3K. La stimulation de PLC $\beta$  mène à une augmentation de la production d'IP<sub>3</sub>, de Ca<sup>2+</sup>, puis à l'activation de la tyrosine kinase Pyk2 kinase par Ca<sup>2+</sup>-calmoduline. Pyk2 active ensuite une deuxième tyrosine kinase, Src, qui stimule à son tour la protéine adaptatrice Shc, ce qui mène à l'activation de Ras par la Ras-GEF mSOS.

Un autre mécanisme de couplage  $G_{\beta\gamma}$  des récepteurs  $G_i$  à la voie MAPK-ERK1/2, indépendant de Src et de Shc, implique la phosphorylation de la dynamine II et son association avec Grb2 [Kranenburg et al. 1997]. Ce mécanisme est dépendant de PI3K de même que d'une tyrosine kinase favorisant la formation des complexes dynamine II-Grb2. La capacité de la dynamine à lier la Ras-GEF SOS et Ras pourrait sous-tendre l'effet activateur de  $G_{\beta\gamma}$  sur Ras. La dynamine est une protéine par ailleurs associée à l'endocytose vésiculaire, elle-même nécessaire à l'activation de MAPK-ERK1/2 par H-Ras [Hinshaw et Schmid, 1995; Praefcke et McMahon, 2004; Roy et al. 2002]. L'endocytose dépendante de la dynamine II pourrait ainsi être déterminante dans l'activation de MAPK-ERK1/2 par  $G_{\beta\gamma}$ .



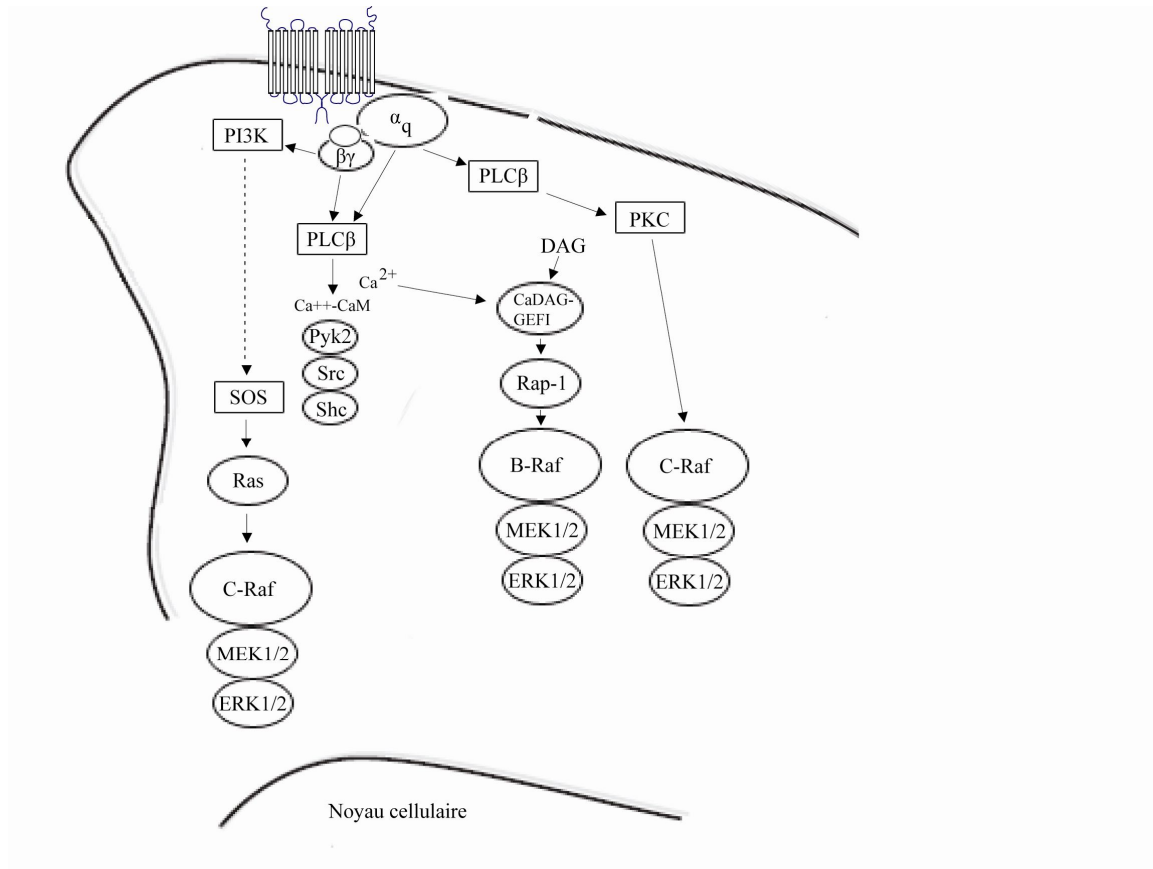
**Figure 4. Régulation d'ERK1/2 par G<sub>i</sub>.** Figure montrant les différentes voies G<sub>i</sub> en mesure d'activer MAPK-ERK1/2. Leur importance varie selon les types cellulaires considérés. L'effet inhibiteur de G<sub>i</sub> sur la synthèse d'AMP<sub>c</sub> amène une diminution de l'activité PKA et ainsi de son effet inhibiteur sur C-Raf. L'activation de G<sub>αi2</sub> amène le recrutement de Rap-1GAP11 à la membrane, ce qui limite la séquestration de C-Raf par Rap-1. G<sub>βγ</sub> active quant à elle la voie MAPK-ERK1/2 via PLCβ, la genèse d'IP<sub>3</sub> et la mobilisation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire, puis l'activation de Pyk2 kinase par Ca<sup>2+</sup>-calmoduline. Lignes se terminant par des flèches, régulation positive, lignes se terminant par un trait, régulation négative.

### 1.4.3 G<sub>q</sub>

La voie G<sub>q</sub>, PTX-résistante, conduit aussi à l'activation de MAPK-ERK1/2 (fig. 5). Les voies PLC-DAG-PKC et PLC-IP<sub>3</sub>-Ca<sup>2+</sup> sont notamment bien décrites. Dans le cas de la voie PLC-DAG-PKC, les isoformes PKC activées par G<sub>αq</sub> peuvent stimuler directement C-Raf par phosphorylation. La voie PLC-IP<sub>3</sub>-Ca<sup>2+</sup> mène quant à elle à Ras par la cascade Calmoduline-Pyk2-Src-Shc-SOS. La contribution de ces deux voies, typiques, varie selon les RCPGs et types cellulaires considérés. On note que les sous-unités G<sub>βγ</sub> dissociées de protéines G<sub>q</sub> activées peuvent également activer la voie MAPK-ERK1/2 suivant la stimulation de PLCβ.

Un autre mécanisme impliquant une Rap-1-GEF dépendante de DAG et du Ca<sup>2+</sup>, CaDAG-GEFI (« calcium and diacylglycerol-regulated guanine nucleotide exchange factor ») favorise l'activation par Rap-1 de modules MAPK-ERK1/2 incluant B-Raf. Les différentes voies liant la protéine G<sub>q</sub> à la voie MAPK-ERK1/2 ne sont pas mutuellement exclusives puisque l'activation de G<sub>q</sub> amène une accumulation tant de DAG que d'IP<sub>3</sub>.

L'existence de plusieurs voies reliant coopérativement un RCPG donné à MAPK-ERK1/2 (G<sub>s</sub>, G<sub>i</sub>, G<sub>q</sub>, transactivation, β-arrestine, etc.) semble être la norme plutôt que l'exception. La multiplicité des voies en amont de MAPK-ERK1/2 permet une flexibilité dans l'intégration des différents signaux mitogènes en une réponse cohérente, de par ses paramètres d'intensité et de durée, lesquels déterminent la nature prolifératrice ou différenciatrice de la réponse cellulaire [Vaudry et al. 2002; Pouysségur et al. 2002].



**Figure 5. Régulation d'ERK1/2 par G<sub>q</sub>.** Figure montrant les différentes voies G<sub>q</sub> en mesure d'activer MAPK-ERK1/2. Leur importance varie selon les types cellulaires considérés. La voie PLC-DAG-PKC mène à l'activation directe de C-Raf. La voie PLC-IP<sub>3</sub>-Ca<sup>2+</sup> mène quant à elle à Ras par la cascade Calmoduline-Pyk2-Src-Shc-SOS, qui peut être également activée par G<sub>βγ</sub>. La genèse de DAG et la mobilisation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire qui suivent l'activation de PLC $\beta$  par G<sub>q</sub> amènent l'activation de Rap-1 par CaDAG-GEFI puis celle de B-Raf. Lignes se terminant par des flèches, régulation positive, lignes se terminant par un trait, régulation négative.

Dans le cadre de l'introduction de cette thèse sur la signalisation des récepteurs GABA-B1 intracellulaires, nous présenterons en dernier lieu le facteur de transcription ATF-4, un interacteur GABA-B1 étudié dans le cadre de la deuxième partie de nos travaux.

## **1.5 ATF-4, collaborateur potentiel de récepteurs GABA-B1 fonctionnels en absence de GABA-B2**

Trois groupes ont identifié ATF-4 (« activating transcription factor 4») comme interacteur GABA-B [Nehring et al. 2000 ; Vernon et al. 2001 ; White et al. 2000]. ATF-4 est un facteur de transcription de type glissière à leucine, constitué de 351 résidus chez le rat, possédant un domaine de liaison de l'ADN (glissière à leucine) C-terminal et un domaine transcriptionnel N-terminal. Il porte de plus un site de phosphorylation MAPK N-terminal mais aucun site PKA ou PKC. ATF-4 peut former des hétérodimères avec des facteurs de transcription de sa propre famille ou de la famille C/EBP (« CCAAT enhancer binding protein »), via des interactions entre domaines « coiled-coil », augmentant ainsi la sélectivité et la diversité des interactions protéines-ADN l'impliquant. Il peut activer ou réprimer la transcription selon le contexte [Newman et Keating, 2003]. ATF-4 est faiblement exprimé de manière ubiquitaire en conditions physiologiques normales, mais est fortement régulé à la hausse par différents stress cellulaires tels que l'accumulation de protéines mal-repliées dans le RE, la déprivation d'acides aminés comme la leucine ainsi que par les ARNs à double brin viraux [Rutkowski et Kaufman, 2003]. La cellule répond à ces stress en inhibant la traduction de la plupart des ARNs messagers, via la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF2 $\alpha$  (« eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$  »). La traduction de quelques rares ARNs messagers est toutefois paradoxalement régulée à la hausse par un mécanisme de type « leaky-scanning » de multiples cadres de lecture ouverts [Hinnebusch et al. 2002]. Le transcript ATF-4 est l'un de ces rares transcripts, et sa régulation positive à l'étape de la traduction permet l'activation transcriptionnelle de gènes impliqués dans le métabolisme des acides aminés et dans la protection contre le stress oxydatif. Dans le cerveau, un rôle d'inhibiteur de la

potentiation à long terme et de la consolidation de la mémoire a par ailleurs été trouvé pour ce facteur de transcription [Chen et al. 2003].

L'interaction GABA-B1/ATF-4 a été trouvée à l'aide du système de double hybride chez la levure puis reproduite en coimmunoprécipitation de cellules transfectées et d'homogénats de cerveaux [White et al. 2000]. Elle se produit entre le domaine glissière à leucine C-terminal d'ATF-4 (résidus 301-337) et le domaine « coiled-coil » C-terminal de GABA-B1. La co-distribution d'ATF-4 et GABA-B1 a été observée en immunohistochimie confocale de cultures neuronales primaires corticales et cérébelleuses [White et al. 2000], de cultures neuronales primaires hippocampales transfectées et de cellules amacrines de la rétine [Nehring et al. 2000 ; Vernon et al. 2001]. GFP-ATF-4 est relocalisé dans la région périnucléaire lorsque coexprimé avec GABA-B1 mais non pas lorsque coexprimé avec GABA-B2 en cellules HEK293 [Vernon et al. 2001].

Des résultats conflictuels concernant l'effet de l'activation de GABA-B1 sur le ciblage sous-cellulaire d'ATF-4 ont été obtenus [Vernon et al. 2001 ; White et al. 2000]. Suivant la stimulation des récepteurs GABA-B, la translocation d'ATF-4 tant vers le noyau que vers le cytosol a en effet été observée. L'activation de la transcription d'un gène rapporteur sensible à ATF-4 suivant la stimulation des récepteurs GABA-B est observée et le profil pharmacologique de cette réponse est compatible avec celui du récepteur GABA-B [White et al. 2000].



L'interaction entre le récepteur GABA-B1 et le facteur de transcription ATF-4 est donc démontrée en système de double hybride et en études de coimmunoprécipitation. Son rôle physiologique mérite d'être étudié davantage puisqu'il amène la possibilité d'un mode de signalisation nucléaire inédit pour le récepteur GABA-B1.

## Résumé

Dans le cadre de l'introduction de cette thèse traitant de la signalisation des récepteurs GABA-B, nous avons revisité les mécanismes admis de couplage aux canaux  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  et à l'adénylate cyclase, tributaires de la dimérisation GABA-B1/B2. Nous avons par la suite émis l'hypothèse, sur la base d'observations mal soutenues par le modèle du récepteur dimérique GABA1/B2 que la sous-unité GABA-B1 puisse intégrer des signaux depuis les endomembranes en absence de GABA-B2. Nous avons pour cette raison résumé la littérature des récepteurs 7-TMs intracellulaires. Nous testons l'hypothèse à l'effet que les récepteurs endomembranaires GABA-B1 régulent la voie MAPK-ERK1/2 (dont l'activation par les protéines G hétérotrimériques a également été présentée) au chapitre III. À la fin de cette introduction, nous avons présenté le facteur de transcription ATF-4, interacteur GABA-B1. Nous testons l'hypothèse à l'effet que les récepteurs GABA-B1 intracellulaires signalent en régulant les voies de signalisation intranucléaires ATF-4 au chapitre IV.

## Chapitre II - Matériel et méthodes

### 2.1 Agents pharmacologiques

Le R-(+)-Baclofen, le GABA ainsi que la toxine *pertussis* proviennent de Sigma, le CGP 46381, le CGP 52432, le SCH 50911 et le CGP 55845 de Tocris. La Bisindolylmaleimide 1, la chelerythrine chloride, l'U73122, le PP2, le SB203580, le PD98059 et l'époxomicine viennent de Calbiochem et la Wortmannine de Kamiya Biomedical.

### 2.2 Anticorps

Anti-GABA-B1 C-terminal de lapin (SC-14006), anti-GABA-B1A N-terminal de chèvre (SC-7340), anti-ATF-4 de lapin (SC-200) et anti-CHOP/Gadd153 de souris proviennent de Santa Cruz; anti-GABA-B1B de lapin d'Alpha Diagnostic International; anti-hGABA-B2 (C-terminal) de souris, anti-GFP de lapin et anti-GFP de souris d'Invitrogen; anti-phospho ERK1/2 (Thr202/Tyr204) de lapin, anti-phospho-MEK1/2 (Ser217/221) de lapin, anti-phospho-eIF4E (Ser209) de lapin et anti-phospho GSK3 $\alpha/\beta$  (Ser21/Ser9) de lapin de Cell Signalling; anti-calnexin de lapin de StressGen; anti-Bip/GRP78 de souris, anti-GM130 de souris, anti-nucléopore p62 de souris, anti-SC35 de souris de BD Biosciences; anti-GAPDH de souris d'Ambion; anti-V5 de souris d'Invitrogen. Les anticorps secondaires Alexa 488 de lapin, Alexa 555 de souris, et Alexa 647 de chèvre, utilisés en immunohistochimie confocale, ont été obtenus de Molecular Probes.

### 2.3 Constructions

hGABA-B1A et hGABA-B2 dans pcDNA3.1 proviennent de Perkin Elmer Biosignal (Montréal, Québec, Canada) tandis que les plasmides pFR-Luc, pFA-CMV et pFA2-Elk-1 ont été généreusement fournis par le Dr Sylvain Meloche (IRIC, Université de Montréal). Des plasmides codant pour hGABA-B<sub>1A</sub> suivi de GFP10 ou RLuc fusionné à sa partie C-terminale ont également été générés [David et al. 2006]. V5-hGABA-B<sub>1A</sub> a été généré par l'insertion d'une étiquette V5 entre les résidus Glycine 185 et Glutamine 186. Toutes ces constructions ont été vérifiées par séquençage bidirectionnel et validées fonctionnellement en électrophysiologie « patch clamp » configuration « cellules entières».

Des produits PCR, codant pour le domaine C-terminal de hGABA-B1A (résidus 861-961), précédé ou non d'une cassette V5, ont été générés et clonés dans pcDNA3.1+ en utilisant les sites de restriction KpnI et XbaI. Les plasmides résultants ont été nommés pcDNA3.1-GABA-B1-CT et pcDNA3.1-V5-GABA-B1-CT. Des versions de ces 2 plasmides, avec les trois derniers résidus codants (LYK) mutés en alanine ont également été générés et nommés pcDNA3.1-GABA-B1-CT LYK\_AAA et pcDNA3.1-V5-GABA-B1-CT LYK\_AAA. Toutes ces constructions débutent par une séquence Kozak et ont été séquencées bidirectionnellement.

### 2.4 Culture cellulaire et transfections

Les cellules HEK293 proviennent d'Invitrogen et les cellules DI-TNC1 ont été généreusement fournies par le Dr Christian F. Deschepper (Institut de recherches

cliniques de Montréal, Québec). Les astrocytes ont été achetés de QBM Cell Science (Ottawa, Ontario) ou fournis gracieusement par M. Jeffery Haines du laboratoire du Dr G. Almazan (Université McGill, Montréal, Québec). Ils ont été isolés de cultures gliales mixtes de rats Sprague-Dawley nouveaux-nés et placés en culture pendant 12h avec changement de média tous les 3 jours. Les flasques de cellules ont ensuite été brassés pendant une nuit à 280 RPM afin d'enlever les cellules microgliales et les oligodendrocytes. Les astrocytes adhérents ont ensuite été enlevés par trypsinisation et placés en culture sur des lamelles recouvertes d'ornithine. Les différents types cellulaires ont été cultivés dans du média «Dulbecco's modified Eagle's» supplémenté avec du FBS 10% (Wisent or BioMedia). Les transfections transitoires de cellules HEK293 ont été effectuées sur des cellules ayant atteint une confluence de 75-90% dans des flasques T75 avec de la Lipofectamine (Invitrogen) ou encore du Fugene 6 (Roche) selon les recommandations du manufacturier et les cellules ont ensuite été cultivées pendant 48h avant l'utilisation dans le cadre des expériences décrites plus loin. Les transfections des cellules DI-TNC1 ont quant à elle été effectuées avec l'agent transfectant Fugene HD (Roche) et ont été optimisées selon les recommandations du fabricant, à un ratio de 3.25µl Fugene HD:1µg ADN, ce qui a permis d'obtenir un haut pourcentage de cellules transfectées (>75%) et ce de manière constante dans les différentes études de surexpression de la lignée DI-TNC1.

Les cellules ont ensuite été cultivées pendant 24 ou 48h avant l'utilisation dans le cadre des expériences décrites plus loin.

## **2.5 Stimulation de la phosphorylation d'ERK1/2**

Les cellules ont été déprivées de FBS pendant 8h (cellules HEK293) ou 16h (cellules DI-TNC1) et traitées pour les temps indiqués avec des agonistes ou antagonistes GABA-B ou encore avec FBS (10% v/v) à 37°C. Elles ont ensuite été lysées dans un tampon constitué de 25 mM HEPES (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.025% sodium deoxycholate, 10% glycerol (v/v), 25 mM NaF, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 µg/ml leupeptin, 10 mM benzamidine, 0.5 µM microcystin, 1% Triton X-100 (v/v), 0.1 mM PMSF et 5 mM dithiothreitol (DTT). Des échantillons ont subséquemment été préparés pour le SDS-PAGE et l'état de phosphorylation d'ERK1/2 (p42/p44) a été déterminé par immunobuvardage avec anti-phospho-ERK (dilution 1 :1000). Les membranes ont ensuite été décapées et sondées avec anti-GABA-B1 (1 :1000) ou anti-GAPDH (1 :4000) afin de contrôler l'expression de GABA-B1 et la quantité totale de protéines.

## **2.6 Immunoprécipitation**

Les cellules HEK293 transfectées avec divers plasmides ADNs ont été solubilisées dans le tampon RIPA (1% NP-40, 50mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 0.1 % SDS, 5µg/ml aprotinin, 2µg/ml leupeptin et 1mM PMSF). 500µg de protéines solubilisées, dans un volume final d'1 ml, ont été pré-nettoyées avec 100µl de billes agarose anti IgG de lapin (1h, 4°C) et subséquemment incubées en présence de 2µg/ml d'anti-GFP de lapin (1h, 4°C). Les billes ont ensuite été centrifugées et lavées 6

fois avec du tampon RIPA et éluées dans du tampon de chargement SDS 1X. Les éluats ont ensuite été assujettis à une électrophorèse SDS-PAGE suivie d'un immunobuvardage de type western.

## **2.7 Immunobuvardage de type western**

Tous les lysats cellulaires entiers ont été préparés avec le tampon de lyse décrit dans la section précédente. Les échantillons, préparés dans le tampon SDS de charge, ont été résolus, sur des gels à gradient linéaire 10-20% SDS-polyacrylamide. À la fin de la migration, ils ont été équilibrés dans un tampon de transfert constitué de 25mM Tris, 192mM Glycine, 0.075% (p/v) SDS pendant 10min et les protéines transférées sur des membranes PVDF (100V, 30 min) dans un système de transfert mouillé. Les membranes ont ensuite été bloquées dans TBST 5% (p/v) lait écrémé (1h, RT) et sondées pendant une nuit avec les anticorps pertinents. Après des étapes de lavage, les membranes ont été sondées avec des anticorps secondaires conjugués à la HRP (1:20 000) et les bandes visualisées avec l'agent chemiluminescent Western Lightning (PerkinElmer Life Sciences).

## **2.8 RT-PCR**

L'ARN total a été isolé des cellules DI-TNC1 avec le kit RNeasy (Qiagen). Une réaction de synthèse d'ADNs complémentaires (ADNc) a ensuite été effectuée avec 1µg d'ARN total, des amorces aléatoires hexanucléotidiques et de la transcriptase inverse M-MLV (Invitrogen), dans un volume final de 20µl. 35 cycles de PCR ont été effectués avec l'enzyme ADN polymérase Taq (Invitrogen) et 5µl de la réaction de synthèse d'ADNc ou 1µg d'ADNc plasmidique purifié (dans le cas du contrôle positif GABA-B2). Les

séquences d'ADNs des différentes amorces utilisées ont été les suivantes 5' to 3'):  
GABA-B1 sens GCCATGTGGTCTTTGATGCCA; GABA-B1 antisens  
TGCCAGTGAGCAGCCCACA GCAG; GABA-B2 sens ATCGCGGAGTCCCTCCA  
AGGC; GABA-B2 antisens CGTG AGGAATTGGCCTCCACA; GABA-B<sub>L</sub> sens  
GAACCAGTCTTTGACCATCAT; GABA-B<sub>L</sub> antisens  
GGCATTGCTCACTTGCTCTTG. Les températures de liaison pour GABA-B1, GABA-  
B2 et GABA-B<sub>L</sub> ont été 55°C, 57°C ou 55°C et 55°C, respectivement. Les mêmes  
amorces ont été utilisées pour les expériences de PCR quantitative. Ces expériences,  
effectuées avec un instrument Corbett Rotor-Gene (Corbett Research, distribué par  
Montréal Biotech, Montréal, Québec, Canada), ont consisté en la création de courbes  
standard par dilution en série de l'ADNc servant de patron dans une solution (volume  
final 25 l) contenant également les amorces et le mélange « qPCR SYBR Green master  
mix » de Cedarlane.

## **2.9 Transfert d'énergie de résonance bioluminescente (BRET)**

Le BRET a été effectué tel que décrit précédemment [Hébert et al. 2006 ; Rebois et al. 2006; David et al. 2006]. Des suspensions de cellules transfectées avec des constructions étiquetées avec GFP10 ou luciférase (contenant 50-100µg de protéines), ont été pipettées dans une plaque blanche à 96 puits OptiPlate (Perkin Elmer, Meriden CT). L'essai fut initié par l'addition du substrat RLuc perméable à la membrane, Coelenterazine 400a (Biotium). Le volume final dans chaque puit était de 100µl et la concentration finale de RLuc 1µM. Le ratio BRET, qui est défini comme le ratio entre les quantités de lumière émises à la plus longue et à la plus courte longueur d'onde, a été mesuré immédiatement



après l'addition du substrat à l'aide d'un lecteur de plaques Fusion universal (Perkin Elmer) et de filtres 410/80 et 515/30 nm.

## **2.10 Immunohistochimie confocale**

Les cellules ont été cultivées sur des lamelles pendant 2 jours dans le DMEM-FBS10% et déprivées de FBS pendant 12h lorsqu'assujetties à des traitements pharmacologiques. Elles ont ensuite été fixées au paraformaldéhyde 3% (w/v) pendant 10 minutes. Après 3 lavages au PBS, les cellules ont été bloquées et perméabilisées pendant 1h dans une solution PBS contenant 5% (p/v) de sérum normal pré-immune d'âne. (Jackson Laboratories) et 0.2% (v/v) Triton X-100. Les cellules fixées et perméabilisées ont été incubées pendant une nuit à 4°C dans une solution PBS contenant 1% (p/v) de sérum normal pré-immune d'âne, 0.2% (v/v) Triton X-100 et les anticorps primaires. Le jour suivant, après 3 lavages au PBS, les cellules ont été incubées avec les anticorps secondaires Alexa Fluor 488, 555 et 647 (dilution 1 :400) pendant 60 min à la noirceur et encore une fois lavées 3 fois avec du PBS. Les lamelles ont ensuite été montées à l'aide d'une solution contenant 66% (v/v) glycérol, 33% d'H<sub>2</sub>O et 0.66% (w/v) 1,4-Diazabicyclo{2.2.2}octane (DABCO). Les images en microscopie confocale ont été prises sur un système Zeiss LSM-510 avec un objectif corrigé (Zeiss Plan-Apochromat X63, ouverture numérique 1.4 à l'huile). Les séries d'image ont été prises avec une résolution spatiale de 0.06 x 0.06 x 0.16 afin de respecter l'échantillonnage Nyquist. La molécule GFP (vert) a été excitée à 488 nm avec un laser Ar, émettant de la fluorescence à 525nm. En certaines circonstances, les images ont été déconvoluées avec le logiciel Huygens Pro 2.4.1 (Scientific Volume Imaging) par estimation du maximum de

vraisemblance jusqu'à ce que ce qu'un seuil de changement de qualité de 0.01 fut atteint. Le « point spread function » (PSF) a été obtenu avec des billes 170nm conjuguées aux fluorophores appropriés (Molecular Probes). Chaque valeur PSF utilisée a été la moyenne de 15 billes différentes. Des expériences contrôles effectuées en absence d'anticorps primaires ont révélé un faible bruit de fond indiquant la spécificité des anticorps utilisés.

## **2.11 Extraits nucléaires**

Les extractions nucléaires ont été effectuées selon la méthode de Dignam et al. 1993. Les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS (1X), culottées (500g, 5min, 4°C) et resuspendues dans 5 volumes de culot d'une solution tampon hypotonique froide, constituée de 10mM HEPES-NaOH pH 7.9, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 10M KCl et 0.5mM DTT. Suite à une seconde centrifugation (1800g, 5min, 4°C), les culots ont de nouveau été resuspendus, cette fois-ci dans 3 volumes de culot de la solution tampon hypotonique, incubés sur glace pendant 10min, et homogénéisés avec 25 coups d'un homogénéisateur Dounce de type B. Environ 90% des cellules ont été brisées, tel qu'estimé par la coloration au bleu de Trypan, avant le culottage des noyaux (3300g, 15min, 4°C). Les surnageants récupérés à cette étape ont été utilisés en tant que fractions post-nucléaires. Les noyaux ont doucement été resuspendus dans un demi-volume nucléaire d'une solution tamponnée, faible en sel, constituée de 20mM HEPES (pH 7.9), 25% Glycérol, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM KCl, 0.2mM EDTA et 0.5mM DTT. Immédiatement après, un demi-volume nucléaire d'une solution tamponnée, haute en sel (même composition que la solution faible en sel mais contenant 1,2M KCl au lieu de 20mM) a été ajouté, goutte à goutte, à chaque échantillon, alors qu'il était vortexé. Les échantillons ont été placés sur

une plaque tournante (30min, 4°C), centrifugés (13200 rpm, 4°C), et les surnageants dialysés contre 20mM HEPES (pH 7.9), 20% Glycérol, 100mM KCl, 0.2mM EDTA et 0.5mM DTT, congelés dans l'azote liquide et entreposés à -80°C jusqu'à leur utilisation. Tous les tampons ont été supplémentés avec des tablettes d'inhibiteurs de protéases Complete sans-EDTA (Roche).

## **2.12 Essai de décompte cellulaire au crystal violet**

Les cellules ont été transfectées, avec les plasmides pertinents, dans des plateaux à 24 puits tel que décrit précédemment. 24h après la transfection, les cellules ont été trypsinisées et seul 1/6 a été remis en culture dans du média sans FBS pendant 24h additionnelles avant que l'on effectue l'essai de décompte cellulaire au crystal violet (Gillies et al. 1986). Les cellules ont été fixées avec 1ml de PBS-glutaraldéhyde 1% (15min, RT). Les cellules fixées ont ensuite été rincées au PBS et colorées avec 0,5ml d'une solution aqueuse contenant 0.1% crystal violet (30 min, RT). Les cellules ont subséquemment été lavées à 4 reprises avec 1ml d'eau déionisée avec l'extraction du colorant dans 0,25ml d'une solution aqueuse contenant 0.2% Triton X-100 (toute la nuit, 4°C). La densitométrie optique de la solution Triton colorée a été mesurée sur un lecteur de microplaques Fluostal Optima (BMG Labtechnologies).

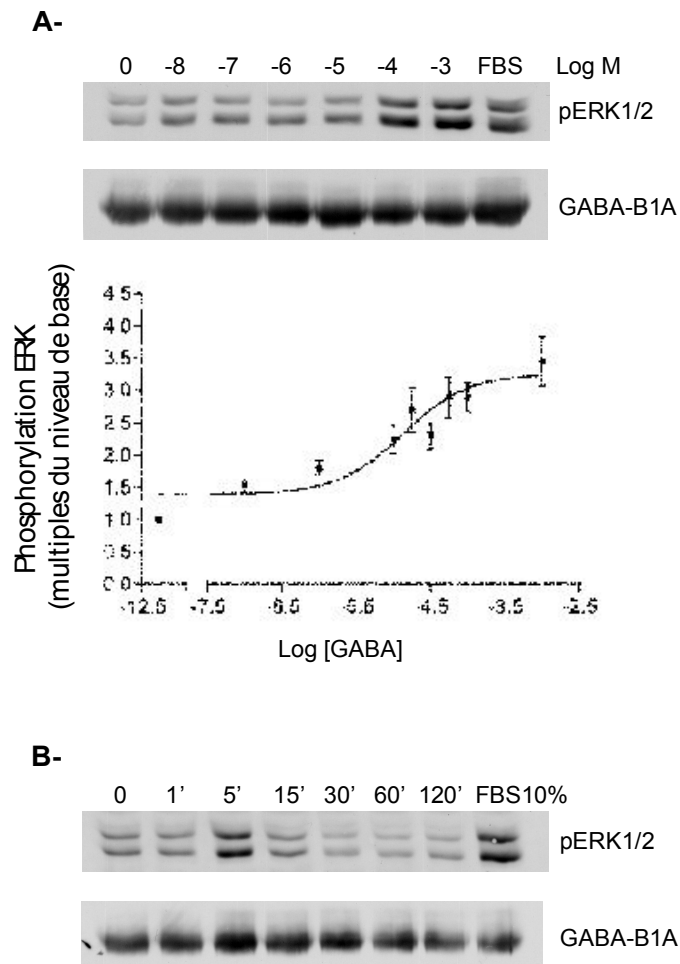
## Chapitre III

### Couplage de la sous-unité GABA-B1 à la voie MAPK-ERK1/2 en absence de GABA-B2 dans la lignée cellulaire gliale DI-TNC1

#### Résultats

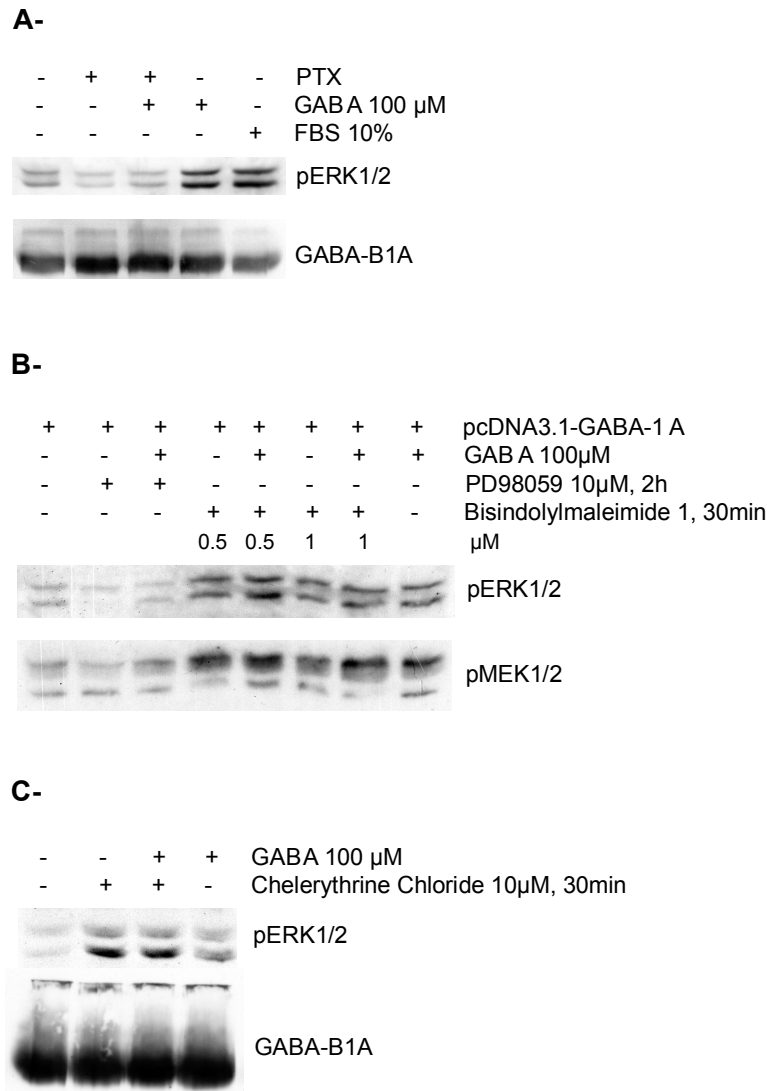
#### 3.1 L'activation d'ERK1/2 par les récepteurs GABA-B1A dépend de $G_{i/o}$ et de MEK1/2 dans les cellules HEK293.

Afin de vérifier la fonction des récepteurs GABA-B1A intracellulaires, nous avons évalué le couplage de la voie MAPK-ERK1/2 en cellules HEK293 transfectées. La phosphorylation ERK1/2 en réponse à GABA, à 5 min post-stimulation, a été dépendante de la concentration d'agoniste utilisée et saturable ( $10^{-8}$ - $10^{-3}$  M; fig. 6A,  $EC_{50}$  estimé de 13  $\mu$ M). La stimulation avec 100 $\mu$ M GABA a résulté en une augmentation rapide et temporaire de la phosphorylation d'ERK1/2, avec un pic d'activation observé à 5 min post-stimulation (fig. 6B). Ces résultats diffèrent de ceux obtenus dans le cadre d'une autre étude de la stimulation de la voie MAPK-ERK1/2 par GABA-B1A, qui montrent une modeste augmentation de pERK, fortement potentiée par GABA-B2 [Balasubramanian et al. 2004]. Nous n'avons pas observé de potentiation de la phosphorylation d'ERK1/2 en présence de GABA-B2 (données non-présentées).



**Figure 6. Augmentation de la phosphorylation d'ERK1/2 par l'activation du récepteur GABA<sub>B1A</sub> en cellules HEK293.** A) Courbe dose-réponse pour la phosphorylation d'ERK1/2 par le GABA. L'état de phosphorylation d'ERK1/2 est montré au panneau supérieur de la figure (tel que mesuré avec un anticorps anti-phospho ERK1/2) en réponse à la stimulation de cellules HEK293 transfectées transitoirement avec GABA-B1A. Les stimulations ont duré 5min. Partie inférieure, courbe dose-réponse représentative de l'effet de GABA-B sur l'accumulation de pERK1/2. B) L'état de phosphorylation d'ERK1/2 est montré dans la partie supérieure en réponse à la stimulation avec 100µM GABA pendant 0, 1, 5, 15, 30, 60 et 120 min. Afin de contrôler l'expression des récepteurs transfectés (panneaux inférieurs des parties A et B), les membranes ont été décapées avec 0,2M NaOH pendant 15 min et resondées avec anti-GABA-B1. Les données sont représentatives d'au moins 3 expériences indépendantes.

Nous avons ensuite examiné la voie liant GABA-B1A à l'activation d'ERK1/2. La dépendance du couplage sur  $G_{i/o}$  a été vérifiée en traitant les cellules avec 1.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  PTX pendant 3h. L'augmentation de la phosphorylation ERK1/2 observée suite à une stimulation de 5 min avec 100 $\mu\text{M}$  GABA a été abolie (fig. 7A) suite au traitement PTX. La phosphorylation de base d'ERK1/2 étant également diminuée par le PTX, on ne peut conclure que l'effet PTX soit entièrement dépendant du couplage de GABA-B1A à  $G_{i/o}$ . La dépendance de l'effet GABA-B1A sur ERK1/2 aux protéines kinases MEK 1 et 2, situées immédiatement en amont d'ERK1/2 dans la cascade kinase Ras-Raf-MEK1/2-ERK1/2 canonique, a également été évaluée. La préincubation avec l'inhibiteur MEK1/2 PD98059 (20 $\mu\text{M}$ , 2h) a éliminé l'effet de GABA-B1A tant sur la phosphorylation d'ERK1/2 que sur celle de MEK1 et 2 aux résidus Ser217/221 (fig. 7B), confirmant ainsi le rôle de MEK1/2 dans le couplage du récepteur GABA-B1A à la voie MAPK-ERK1/2.

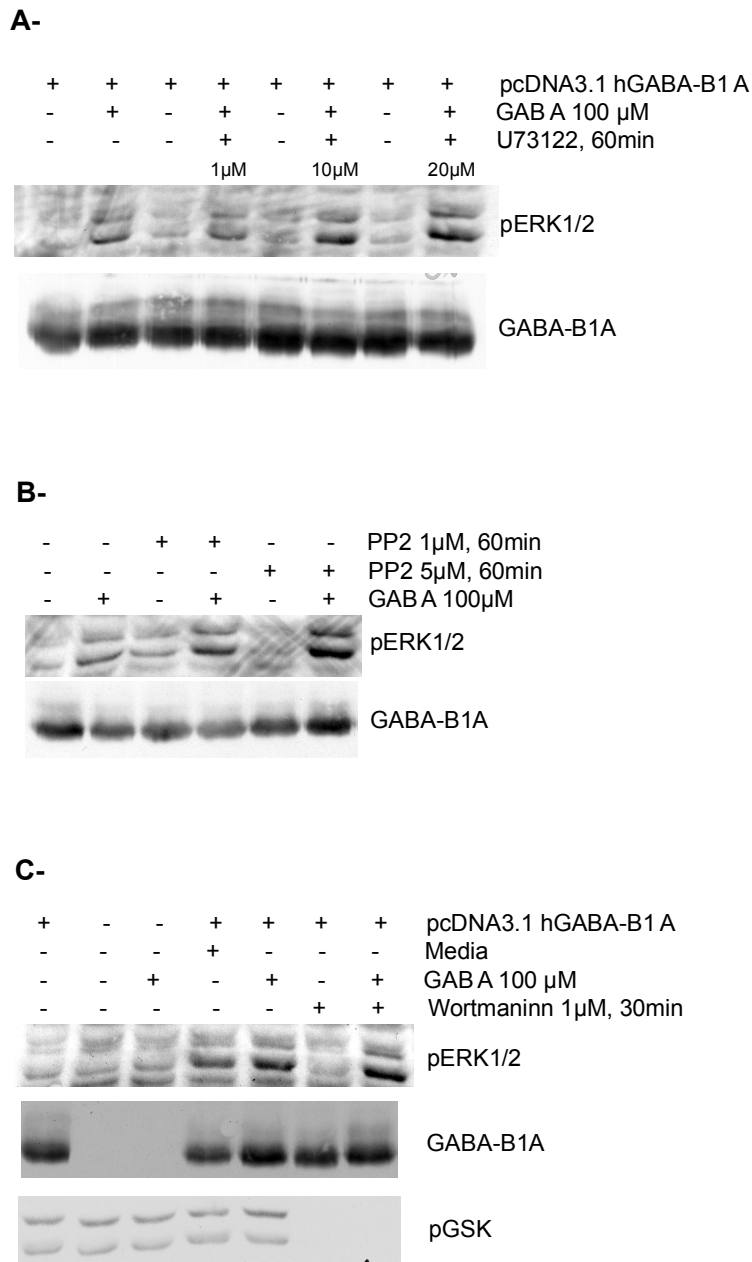


**Figure 7. Modulation de l'effet GABA-B1 sur la phosphorylation d'ERK1/2 suite à l'inhibition de  $G_{i/o}$ , MEK et PKC.** A) Panneau supérieur, l'état de la phosphorylation d'ERK1/2 par des cellules HEK293 transfectées transitoirement avec GABA-B1A, préincubées ou non avec la toxine PTX (1.5 $\mu$ g/ml, 3h), est montré suite à une stimulation de 5min avec 100 $\mu$ M GABA. Panneau inférieur, les membranes ont été décapées dans 0,2M NaOH pendant 15min et sondées avec anti-GABA-B1. B) Expériences similaires avec des cellules HEK293 transfectées transitoirement avec GABA-B1A, préincubées ou non avec PD98059 (10 $\mu$ M, 2h) et bisindolylmaleimide (0.5-1 $\mu$ M, 30min), et stimulées pendant 5min avec 100 $\mu$ M GABA. Panneau inférieur, la membrane a ensuite été décapée et sondée avec anti-phospho Ser217/221 MEK1/2. C) Expériences similaires avec des cellules HEK293 transfectées transitoirement avec GABA-B1A, préincubées ou non avec chelerythrine chlorure (10 $\mu$ M, 30min), et stimulées pendant 5min avec 100 $\mu$ M GABA. Panneau inférieur, la membrane a été décapée et sondée avec anti-GABA-B1. Les données sont représentatives d'au moins 3 expériences indépendantes.

### 3.2 Modulation croisée par d'autres voies de signalisation

Tandis que nous caractérisions la voie de signalisation liant GABA-B1A à l'activation d'ERK1/2, nous avons noté que l'inhibition de certaines voies résultait en une potentiation de l'effet du GABA. Le pré-traitement avec deux inhibiteurs PKC différents, bisindolylmaleimide 1 (0.5 $\mu$ M et 1 $\mu$ M pendant 30min) et chelerythrine chloride (10 $\mu$ M for 30min), a mené à la fois à une augmentation du niveau de base et à une potentiation de la réponse GABA sur la phosphorylation d'ERK1/2 (fig. 7B et C). L'augmentation du niveau de phosphorylation de base produite par la chelerythrine chloride peut en partie être expliquée par sa capacité à activer la voie MAPK-ERK1/2 indépendamment de l'inhibition de PKC, tel que rapporté précédemment [Yang et al. 2008]. Le pré-traitement des cellules avec des doses croissantes de l'inhibiteur PLC U73122 (1-10-20 $\mu$ M, 60min; fig. 8A) ou de l'inhibiteur Src PP2 (1-5- $\mu$ M, 60min; fig. 8B) a mené à une potentiation dose-dépendante de l'effet GABA sur la phosphorylation d'ERK1/2. L'inhibition de PI3K, un autre régulateur de la phosphorylation d'ERK1/2, avec la wortmannine (1 $\mu$ M, 30min) n'a pas changé la réponse au GABA (fig. 8C).





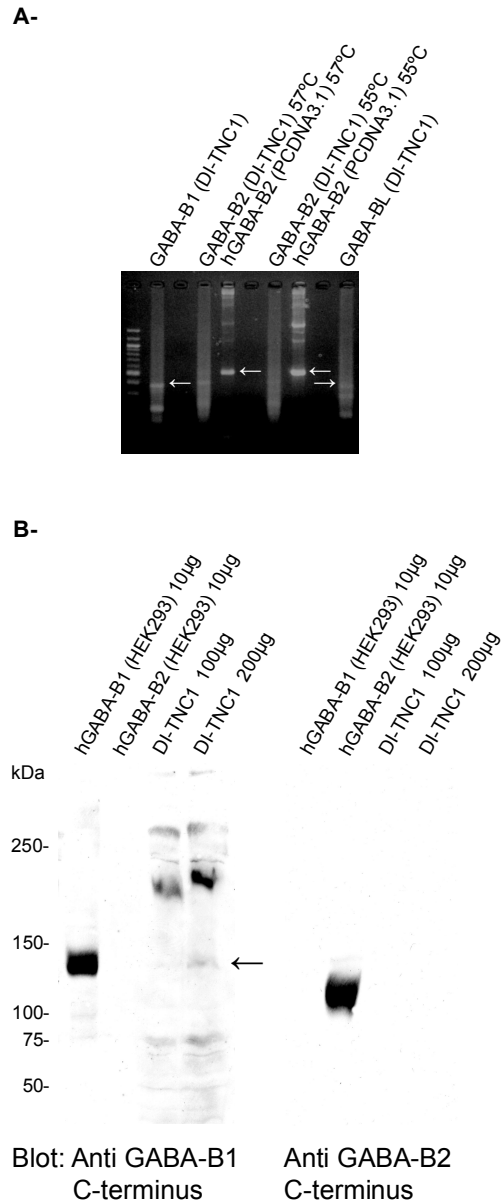
**Figure 8. Modulation de l'effet GABA-B1 sur la phosphorylation d'ERK1/2 suite à l'inhibition de la PLC, de la tyrosine kinase Src et de PI3K.** A) Panneau supérieur, l'état de la phosphorylation d'ERK1/2 par des cellules HEK293 transfectées transitoirement avec GABA-B1A, préincubées ou non avec U73122 (60min), est montré suite à une stimulation de 5min avec 100 $\mu$ M GABA. B) Expériences similaires avec des cellules HEK293 transfectées transitoirement avec GABA-B1A, préincubées ou non avec PP2 (1 et 5 $\mu$ M, 60min). C) Expériences similaires avec des cellules HEK293 transfectées transitoirement avec GABA-B1A, préincubées ou non avec la wortmaninn (1 $\mu$ M, 30min), et stimulées pendant 5min avec 100 $\mu$ M GABA. Les membranes ont ensuite été décapées dans 0,2M NaOH pendant 15min et resondées avec anti-GABA-B1. Les données sont représentatives d'au moins 3 expériences indépendantes.

### 3.3 La lignée cellulaire gliale DI-TNC1 exprime GABA-B1 en absence de GABA-B2

Afin de confirmer l'information obtenue en cellules HEK293 transfectées, nous avons cherché une lignée cellulaire exprimant des récepteurs GABA-B1 endogènes en absence de GABA-B2. La lignée cellulaire DI-TNC1, qui résulte de la transfection d'astrocytes diencephaliques de type I de rat avec une construction d'ADN contenant la région oncogénique précoce de SV40 sous contrôle transcriptionnel du promoteur GFAP humain (Radany et al. 1992), a été choisie suite à la démonstration de l'absence d'expression de GABA-B2 dans les cellules gliales natives [Clark et al. 2000]. Des réactions RT-PCR ont été effectuées avec des amorces spécifiques pour les séquences des récepteurs GABA-B1, GABA-B2 et GABA-B<sub>L</sub> (Calver et al. 2003, fig. 9A). Les amorces GABA-B1 ont été conçues pour reconnaître toutes les isoformes GABA-B1, sans distinction possible. Des fragments correspondant aux poids moléculaires prédits ont été observés pour GABA-B1 (353pb; voie 1) et GABA-B<sub>L</sub> (376bp; voie 9) mais pas GABA-B2 (479bp; voie 3). La réaction GABA-B2 a de plus été réalisée à une température 2°C plus basse que la T<sub>m</sub> prédite pour les amorces GABA-B2, sans pour autant révéler le fragment prédit (fig 9A, voie 6). L'utilisation de pcDNA3.1-hGABA-B2 comme base d'amplification a permis de confirmer l'efficacité des amorces GABA-B2 (fig. 9A, voies 4 et 7). Les expériences de PCR quantitative ont donné des résultats en tous points semblables (données non-présentées). Nous avons ainsi conclu à l'absence de transcrits GABA-B2 dans la lignée DI-TNC1.

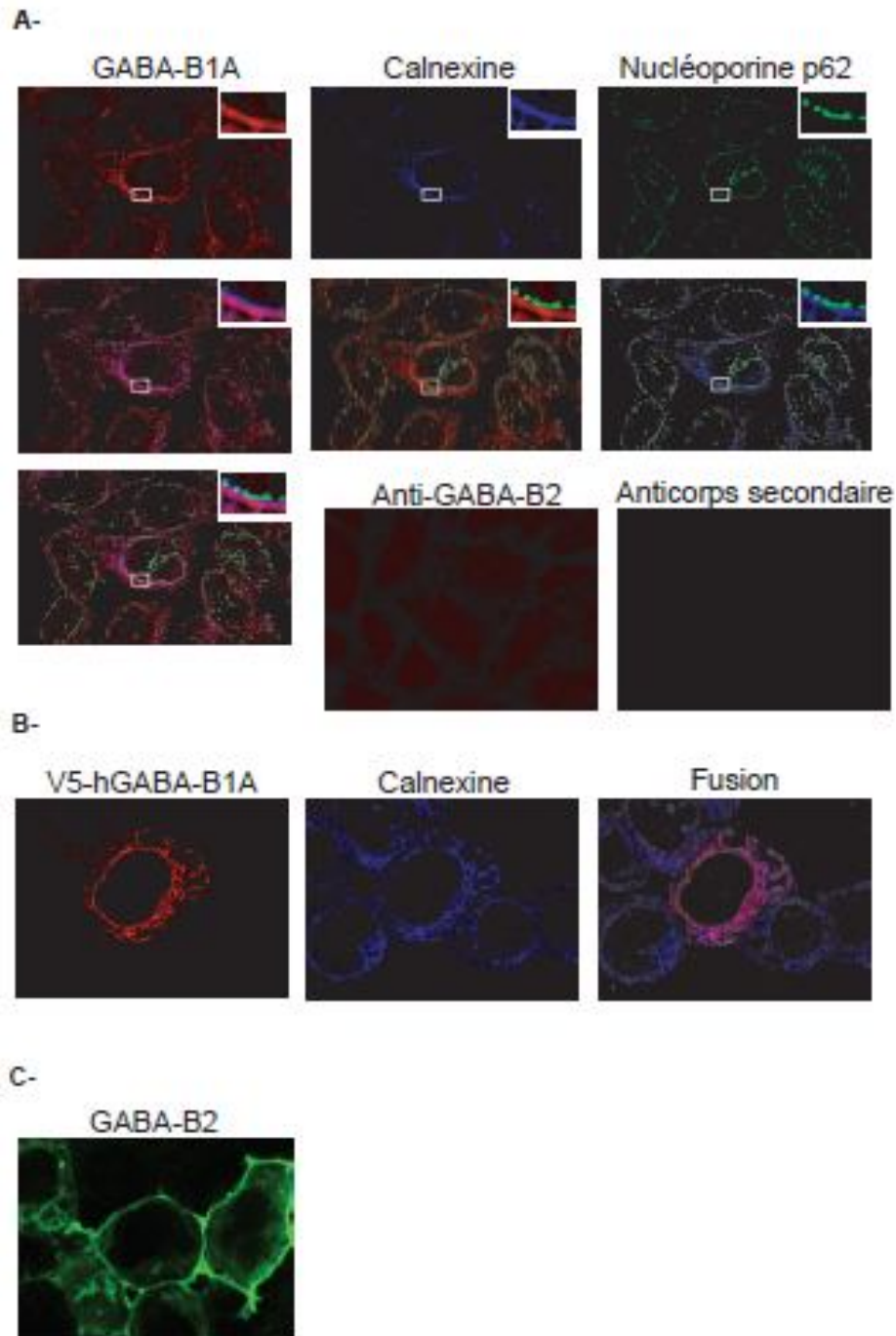
Afin de confirmer cette absence de GABA-B2 au niveau protéique, nous avons effectué une procédure d'immunobuvardage de type western sur des lysats cellulaires HEK293

transfectés et DI-TNC1 avec des anticorps dirigés contre les domaines C-terminaux des récepteurs GABA-B1 et GABA-B2 (fig. 9B). Une bande de faible intensité a été reconnue par l'anticorps GABA-B1 mais non par l'anticorps GABA-B2, malgré l'utilisation d'une grande quantité de lysat lors de la procédure (200 µg). Les lysats des cellules HEK293 transfectées avec pcDNA3.1-hGABA-B1A ou pcDNA3.1-hGABA-B2 ont confirmé la spécificité des anticorps.



**Figure 9. La lignée cellulaire gliale DI-TNC1 exprime GABA-B1 mais pas GABA-B2.** A) Des expériences en RT-PCR ont été effectuées avec des amorces spécifiques pour GABA-B1 (voie 1), GABA-B2 (voies 3, 4, 6 et 7) et GABA-B<sub>L</sub> (voie 9). pcDNA3.1 GABA-B2 a été utilisé comme contrôle positif des amorces GABA-B2 utilisées (voies 4 et 7). L'expérience a été effectuée à deux températures de liaison différentes (55°C et 57°C) dans le cas de GABA-B2. B) Immunobuvardage de type western de lysats DI-TNC1 avec des anticorps anti-GABA-B1 et GABA-B2. Les flèches indiquent le récepteur GABA-B1 endogène.

En immunohistochimie confocale, de forts marquages des membranes intracellulaires ont été observés en utilisant un anticorps dirigé contre la partie N-terminale de GABA-B1A (fig. 10A, panneau supérieur, image gauche). Ce marquage a été attribué au RE sur la base d'une forte colocalisation avec la calnexine mais pas la nucléoporeine p62. Cette observation est conséquente avec les nombreux rapports concernant la rétention réticulaire de GABA-B1 en cellules transfectées [Calver et al. 2001 ; Couve et al. 1998 ; Margeta-Mitrovic et al. 2000] ainsi qu'avec nos propres résultats avec GABA-B1A-GFP et GABA-B1A (fig. 13B). Par opposition, le sondage avec l'anticorps GABA-B2 n'a produit que de faibles marquages non-spécifiques (fig. 10A, panneau inférieur, image du milieu). En somme, nos données montrent l'utilité de la lignée cellulaire DI-TNC1 dans l'étude des voies de signalisation modulées par GABA-B1 en absence de GABA-B2.



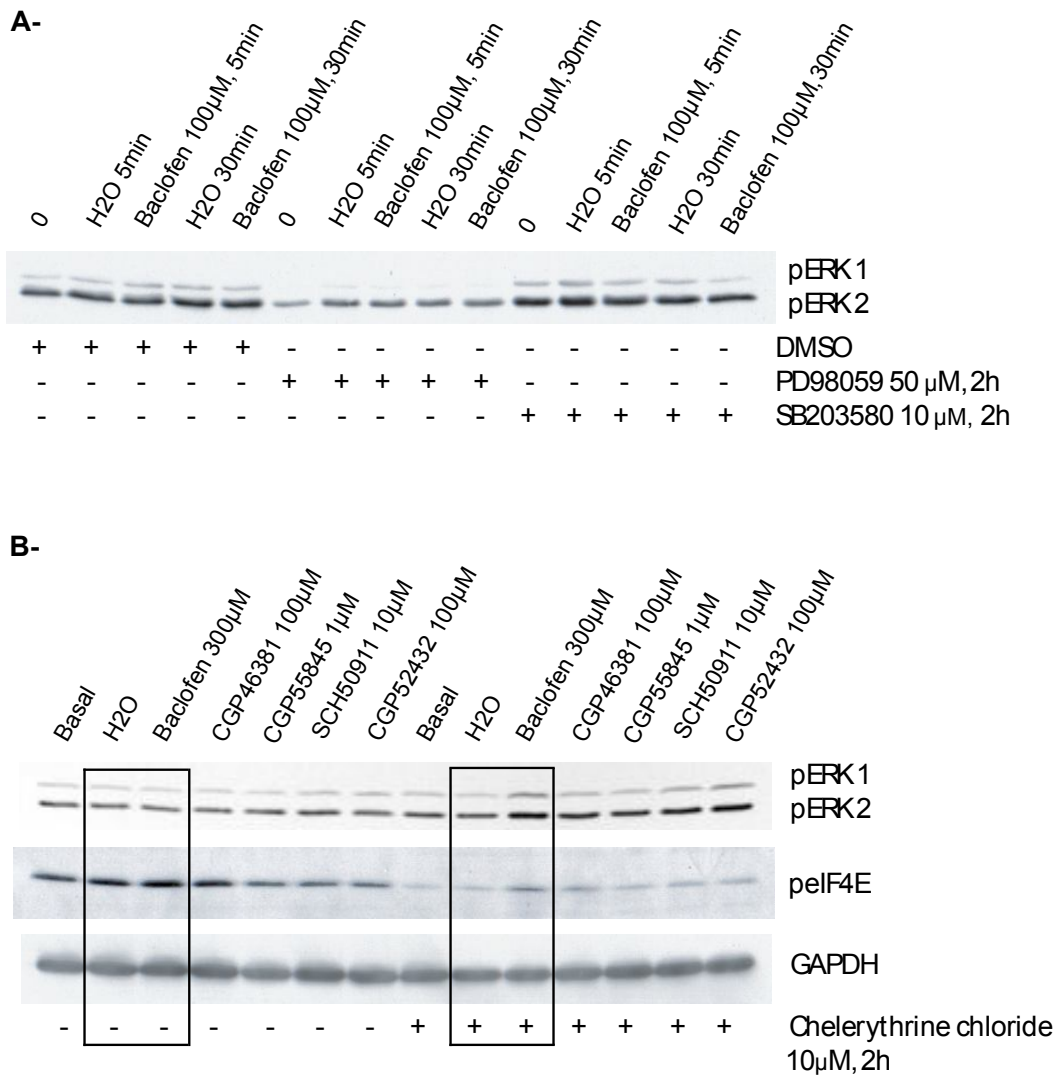
**Figure 10. Le récepteur GABA-B1A est localisé au RE dans les cellules DI-TNC1.** A) Images confocales déconvoluées montrant la colocalisation du signal anti-GABA-B1A avec anti-calnexine (RE) mais non anti-nucléoporine p62 (membranes nucléaires) dans les cellules DI-TNC1. Les boîtes représentent des vues élargies des régions indiquées sur les images entières. L'image gauche du panneau moyen montre la colocalisation entre GABA-B1 et la calnexine, l'image centrale la colocalisation entre la calnexine et la nucléoporine p62 et l'image droite celle entre GABA-B1 et la nucléoporine p62. L'image gauche du panneau inférieur montre la superposition des 3 marquages. Il n'y a pas eu de marquage spécifique observé

avec anti-GABA-B2 dans les cellules DI-TNC1 (rangée inférieure, image du milieu) et pas de marquage lorsque l'anticorps primaire est exclu (rangée inférieure, panneau droit). Des expériences semblables effectuées dans des cellules HEK293 transfectées montrent une co-localisation entre des récepteurs GABA-B1 étiquetés avec V5 et la calnexine (B) de même qu'un ciblage membranaire de GABA-B2 sondé avec anti-GABA-B2 (C). Les données sont représentatives de 3 expériences indépendantes.

### **3.4 La stimulation de la phosphorylation d'ERK1/2 par le récepteur GABA-B est démasquée par l'inhibition de PKC dans la lignée cellulaire gliale DI-TNC1**

Par opposition à ce qui a été observé en cellules HEK293 transfectées avec pcDNA3.1-GABA-B1A (fig. 6A), la stimulation de cellules DI-TNC1 déprivées de FBS avec l'agoniste GABA-B baclofen (100 $\mu$ M, 5 et 30 min, fig. 11A ; 15 min, fig. 11B) et les antagonistes GABA-B CGP46381 (100 $\mu$ M), CGP55845 (1 $\mu$ M), SCH50911 (10 $\mu$ M) and CGP52432 (100 $\mu$ M) (15 min, fig. 11B) n'a pas résulté en une augmentation de la phosphorylation d'ERK1/2 (fig. 11A et 11B, partie gauche). Le baclofen a été utilisé dans ces cellules puisqu'elles expriment peut-être des récepteurs GABA-A en plus du récepteur GABA-B1 [Radany et al. 1992]. Nous avons tenté d'utiliser un système de gène rapporteur Elk-1 pour vérifier si des changements subtils des signaux MAPK auraient pu être amplifiés à l'étape de l'expression génique. Nous n'avons toutefois pas été en mesure de détecter de changements significatifs en réponse au baclofen (données non présentées). Nous avons envisagé que le couplage du récepteur GABA-B1 endogène à la voie MAPK puisse être diminué par une régulation croisée de la voie p38 ou de PKC, tel que rapporté pour d'autres récepteurs 7-TMs [Kogkopoulou et al. 2006 ; Lewthwaite et al. 2006 ; Li et al. 1998 ; Ossum et al. 2006]. Le pré-traitement des cellules DI-TNC1 avec l'inhibiteur PKC chelerythrine chloride (10 $\mu$ M, 2h ; fig. 11B, côté droit) mais non pas avec l'inhibiteur p38 SB203580 (10 $\mu$ M, 2h ; fig. 11A, côté droit), a démasqué la stimulation de la voie MAPK-ERK1/2 par le récepteur GABA-B1, ce qui est en accord avec les résultats obtenus en cellules HEK293 transfectées. Les antagonistes classiques GABA-B CGP46381, CGP55845, SCH50911 et CGP52432 ont également pu activer la phosphorylation d'ERK1/2.





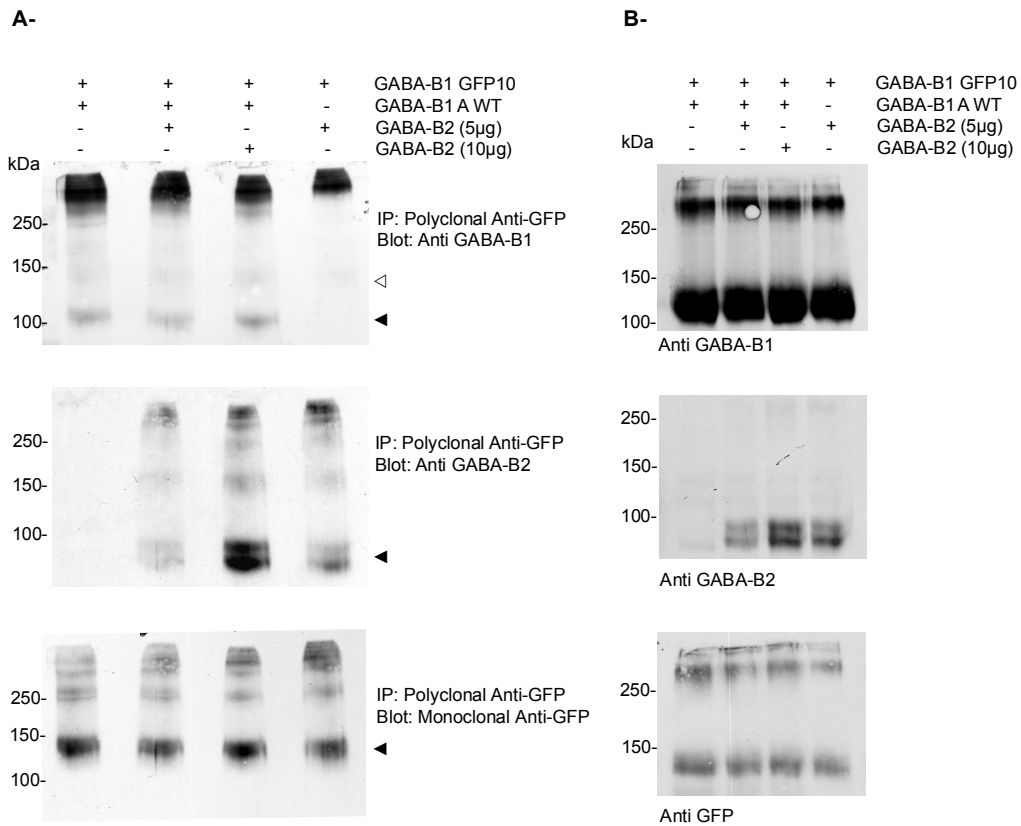
**Figure 11. Changements de l'état de phosphorylation d'ERK1/2 et de pEIF4E suite à l'activation du récepteur GABA-B1 dans les cellules DI-TNC1.** A) La phosphorylation d'ERK1/2 est montrée en réponse à la stimulation avec 100µM baclofen pendant 5 et 30 min de cellules DI-TNC1 déprivées de FBS et pré-traitées ou non avec l'inhibiteur MEK1 PD98059 (50µM, 2h) ou l'inhibiteur p38 SB203580 (10µM, 2h). B) Phosphorylation d'ERK1/2 et de la cible cytosolique eIF4E en réponse à la stimulation avec 300µM baclofen, 100µM CGP46381, 1µM CGP55845, 10µM SCH50911 et 100µM CGP52432 pendant 15 min de cellules DI-TNC1 déprivées de FBS et pré-traitées ou non avec l'inhibiteur PKC chelerythrine chlorure (10µM, 2h). Afin de contrôler la quantité de protéines chargées, les membranes ont été décapées et sondées avec anti-GAPDH. Les données sont représentatives d'au moins 3 expériences indépendantes.

À l'image de ce qui est déjà montré pour plusieurs autres récepteurs 7-TMs, cela suggère que les signaux dirigés par les ligands GABA-B varient selon le système effecteur étudié [Kenakin, 2003 ; Violin et Lefkowitz 2007]. Dans le cas de la stimulation baclofen, son amplitude a été suffisante pour augmenter la phosphorylation du résidu sérine 209 du facteur d'initiation eukaryotique 4E (eIF4E) (fig. 11B), un facteur d'initiation liant le chapeau des transcripts ARNm et activé par les voies MAPK p38 et ERK1/2 [Ueda et al. 2004 ; Wang et al. 1998]. Dans ce contexte d'inhibition de PKC, le baclofen semble plus efficace que les antagonistes GABA-B dans la stimulation de la phosphorylation d'eIF4E. Cette activation temporaire et localisée de la voie MAPK-ERK1/2 mène donc à la modulation subséquente de cibles cytosoliques impliquées dans la régulation de la synthèse protéique. En somme, nos résultats indiquent que la stimulation des récepteurs GABA-B1 exprimés de manière hétérologue ou des récepteurs endogènes des cellules DI-TNC1 mène à l'activation de la voie MAPK-ERK1/2 et suggère un nouveau rôle des récepteurs GABA-B1 homodimériques en absence de GABA-B2.

### **3.5 Les récepteurs GABA-B1A peuvent former des homodimères.**

GABA-B1 doit hétérodimériser avec GABA-B2 afin d'être ciblé à la surface membranaire et de coupler les effecteurs classiques tels les canaux  $K^+$  à rectification entrante Kir3 (« inwardly rectifying »). Il demeure toutefois possible que des homodimères GABA-B1 soient formés et qu'ils demeurent retenus à l'intérieur de la cellule à cause de leurs séquences de rétention RE [Margeta-Mitrovic et al. 2000]. Une étude récente en fait d'ailleurs état [Villemure et al. 2005]. Afin de confirmer l'existence de ces homodimères GABA-B1, nous avons utilisé les approches de

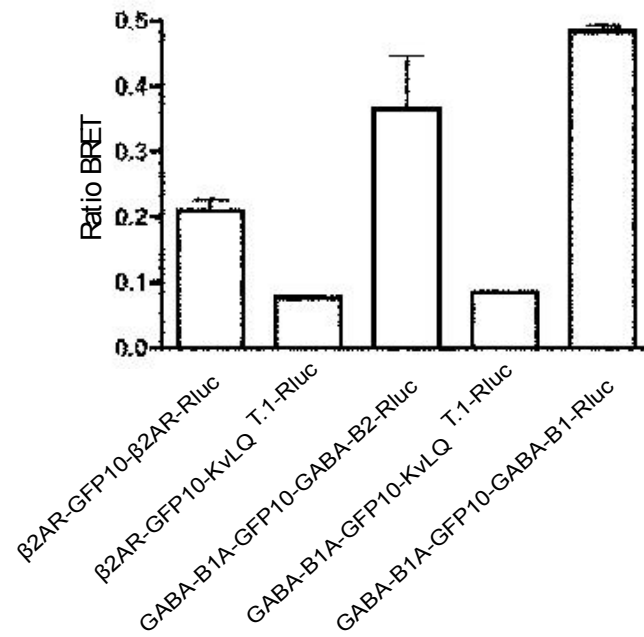
coimmunoprécipitation et de BRET. Des cellules HEK293 ont été transfectées avec hGABA-B1A-GFP, hGABA-B1A sauvage et des quantités variables de GABA-B2. Suite à l'immunoprécipitation de GABA-B1A-GFP avec anti-GFP polyclonal, nous avons détecté la coimmunoprécipitation du récepteur GABA-B1A non-étiqueté, migrant à 110kDa, dans toutes les conditions de coexpression (fig. 12A; panneau supérieur). La bande de faible intensité, également détectée dans le panneau supérieur de la fig. 12A, correspond à GABA-B1A-GFP. La coexpression de GABA-B2 n'a pas diminué l'interaction entre GABA-B1A-GFP et GABA-B1A sauvage, même si des hétérodimères GABA-B1A-GFP/GABA-B2 ont également été observés (fig. 12A; panneau moyen). Leur présence a été proportionnelle à la quantité d'ADNc GABA-B2 transfecté. L'immunobuvardage de type western de lysats de cellules entières a montré des niveaux d'expression cohérents à travers les différentes conditions expérimentales (fig. 12B). L'efficacité du protocole d'immunoprécipitation (c'est-à-dire la capacité à précipiter les récepteurs étiquetés à la GFP) est illustrée à la fig. 12A (panneau inférieur).



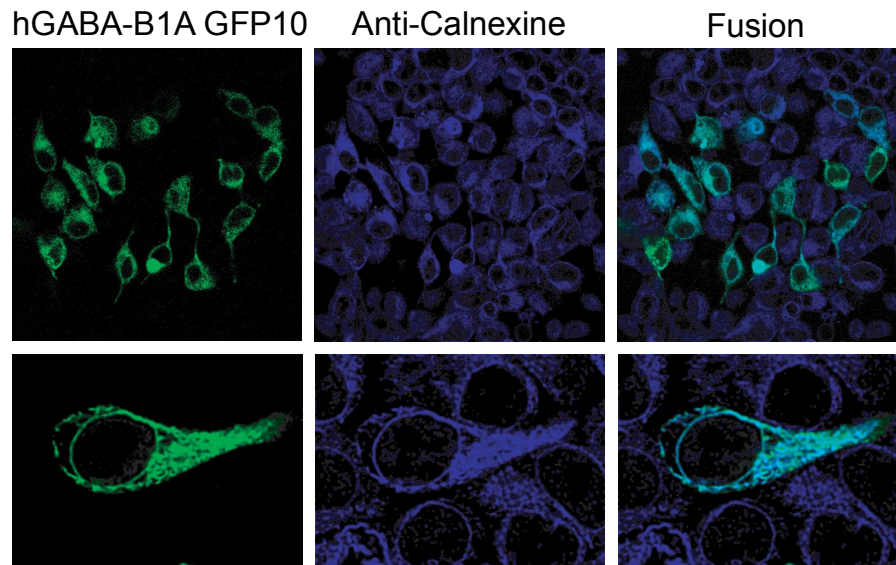
**Figure 12. Les récepteurs GABA-B<sub>1A</sub> peuvent former des homodimères.** A) Coimmunoprécipitation de cellules HEK293 transfectées avec hGABA-B1A-GFP, hGABA-B1A sauvage et hGABA-B2 sauvage. Suivant l'immunoprécipitation avec anti-GFP polyclonal, les éluats ont été assujettis à un immunobuvardage de type western et sondés avec anti-GABA-B1 (panneau supérieur) ou anti-GABA-B2 (panneau moyen). La membrane sondée avec anti-GABA-B2 a ensuite été décapée avec une solution NaOH pendant 15min puis resondée avec anti-GFP monoclonal (panneau inférieur) afin de confirmer l'efficacité de l'immunoprécipitation. Les têtes de flèches foncées indiquent GABA-B1 sauvage (panneau supérieur), GABA-B2 (panneau moyen) et GABA-B1-GFP (panneau inférieur). Un faible signal a également été détecté pour GABA-B1A-GFP lorsque sondé avec anti-GABA-B1 (tête de flèche claire au panneau supérieur). B) Immunobuvardage de type western de lysats cellulaires entiers montrant les niveaux d'expression protéiques similaires des différentes constructions (panneau supérieur, GABA-B1 sauvage; panneau moyen GABA-B2; panneau inférieur, GABA-B1-GFP).

Le BRET a ensuite été utilisé afin de confirmer l'homodimérisation GABA-B1. Des constructions étiquetées GFP10 et luciférase en C-terminal ont été transfectées dans des cellules HEK293 et le BRET a été évalué (fig. 13A). Afin de conclure que des mesures de BRET reflètent des interactions protéine-protéine authentiques, les signaux BRET doivent être saturables, c'est-à-dire que l'augmentation en quantité de l'accepteur (protéine étiquetée avec GFP) résultera éventuellement en un transfert de toute l'énergie disponible du donneur (protéine étiquetée avec luciférase). La saturation des signaux BRET GABA-B1-GFP/GABA-B1-Luc est établie et suggère la spécificité de formation des homodimères [Villemure et al. 2005]. Les signaux BRET des paires GABA-B1-GFP10/GABA-B1-Luc, GABA-B2-GFP10/GABA-B1-Luc et  $\beta_2$ AR-GFP/ $\beta_2$ AR-Luc (contrôle positif) ont dépassé significativement ceux des paires KvLQT1-Luc/ $\beta_2$ AR-GFP et KvLQT1/GABA-B1-GFP10, interprétés comme des interactions non-spécifiques. Les contrôles positifs et négatifs ont été exprimés à des niveaux similaires à ceux des autres partenaires expérimentaux (données non-présentées, voir Rebois et al. 2006). L'étiquette luciférase de KvLQT1-Luc est située du côté cytosolique de la surface membranaire, à l'image des autres constructions luciférase utilisées. Par ailleurs, la colocalisation de GABA-B1-GFP avec la calnexine endogène a été démontrée en microscopie confocale et la distribution réticulaire est similaire à celle de GABA-B1A endogène (fig. 13B).

A-



B-



**Figure 13. Homodimérisation des récepteurs GABA-B1 en BRET.** A) Ratios BRET<sup>2</sup> pour les paires GABA-B1A-GFP10/GABA-B1A-Rluc et GABA-B1A-GFP10/GABA-B2-Rluc. Les données sont exprimées en ratios BRET moyens  $\pm$  erreur standard de la moyenne pour au moins 3 expériences indépendantes. La paire  $\beta_2$ AR-GFP10/ $\beta_2$ AR-Rluc a été utilisée comme contrôle positif et les paires GABA-B1A-GFP10/KvLQT1-Rluc et  $\beta_2$ AR-GFP10/KvLQT1-Rluc comme contrôles négatifs. B) La colocalisation de GABA-B1A-GFP10 avec la calnexine endogène montre la localisation au RE. Un large champ (images supérieures) ainsi qu'une cellule représentative sont montrés (images inférieures).

## **Couplage de la sous-unité GABA-B1 à la voie MAPK-ERK1/2 en absence de GABA-B2 dans la lignée cellulaire gliale DI-TNC1**

### **Discussion**

Dans le cadre du premier projet de cette thèse, nous démontrons que les récepteurs GABA-B1 peuvent stimuler la phosphorylation de la voie MAPK-ERK1/2 lorsque surexprimés en systèmes hétérologues d'expression et exprimés de manière endogène en cellules DI-TNC1. Nous avons de plus généré des évidences suggérant que les récepteurs GABA-B1 peuvent former des homodimères localisés au RE en absence de la sous-unité GABA-B2. Ces résultats montrent que les récepteurs hétérodimériques GABA-B1/B2 ne sont pas la seule forme de récepteurs GABA-B fonctionnels. Des études récentes ont montré que la surface membranaire n'est pas le seul endroit où les récepteurs 7-TMs sont fonctionnels, nombre de récepteurs étant en effet fonctionnels sur la membrane nucléaire [revu dans Gobeil, 2006 et Boivin et al., 2008]. GPR30 est par exemple un récepteur 7-TMs localisé au RE et activé par l'œstrogène [Revankar et al. 2005].

### **3.6 Couplage des récepteurs GABA-B1 à la voie MAPK-ERK1/2**

Nous avons montré la capacité des récepteurs GABA-B1 à coupler la voie MAPK-ERK1/2 en cellules HEK293 transfectées. L'effet est rapide, avec un pic d'activation à 5 min de stimulation et dose-dépendant. L'effet est sensible à la PTX et requiert une activité MEK. La haute concentration de GABA (100 $\mu$ M) utilisée est compatible avec les paramètres de liaison rapportés précédemment pour ce récepteur lorsqu'exprimé sans GABA-B2 [Kaupmann et al. 1997 ; Kaupmann et al. 1998]. La dépendance du couplage à  $G_{i/o}$  est en accord avec les données originalement présentées dans l'article de clonage

moléculaire de GABA-B1, et qui montrent la capacité à inhiber la formation d'AMPc en absence de GABA-B2 [Kaupmann et al. 1997]. On a par ailleurs déjà fait état du couplage du récepteur GABA-B à la voie MAPK-ERK1/2 dans des tranches hippocampales CA1 [Vanhoose et al. 2002], mais l'on ne peut attribuer l'effet aux récepteurs GABA-B1 ou GABA-B1/2 puisque les deux sous-unités sont exprimées.

Le ratio d'expression GABA-B1/GABA-B2 est très élevé dans l'hippocampe, comme dans d'autres régions du cerveau, ce qui supporte la notion de récepteurs GABA-B1 fonctionnels. En effet, même dans un contexte cellulaire où les deux récepteurs sont exprimés, un équilibre dans le ciblage de GABA-B1 à la surface membranaire se crée probablement selon les proportions de récepteurs GABA-B1 hétérodimérisés avec GABA-B2 ou à des protéines non-identifiées.

Une observation inespérée effectuée lors de cette étude est celle de l'augmentation du couplage du récepteur GABA-B1A à la voie MAPK-ERK1/2 suite à l'inhibition de PKC dans la lignée DI-TNC1. Notre compréhension de cette régulation par PKC, qui demeure parcellaire à ce moment-ci, nous a permis de détecter un effet de la stimulation de GABA-B1 en absence de GABA-B2 en contexte endogène. Des résultats ultérieurs obtenus par notre groupe suggèrent toutefois que la dépendance du couplage GABA-B1-MAPK1/2 à l'inhibition PKC n'est pas absolue. L'activation de MAPK-ERK1/2 dans le contexte d'inhibition de PKC s'est réverbérée jusqu'à eIF4E, facteur d'initiation de la traduction impliqué dans le recrutement des ARNs messagers, et régulé par la voie MAPK-ERK1/2 via les eIF4E kinases MNK1/2. PKC exerce généralement un effet



activateur sur ERK1/2 à travers diverses voies dont l'influence varie d'une lignée cellulaire à l'autre. Un couplage du récepteur angiotensine II à MAPK-ERK1/2 dépendant de Ras et modulé négativement par PKC a toutefois été décrit dans des cellules épithéliales GN4 de rat [Li et al. 1998]. Un mécanisme similaire pourrait expliquer la potentiation du couplage de GABA-B1 à MAPK-ERK1/2 suite à l'inhibition de PKC et pourrait expliquer les difficultés à détecter l'activation d'ERK1/2 dans d'autres lignées cellulaires HEK293 [Balasubramanian et al. 2004]. Par extension, nos résultats suggèrent que la régulation croisée avec les récepteurs 7-TMs couplés à  $G_q$  pourrait être un déterminant important du couplage de GABA-B1 à MAPK-ERK1/2. En dernier lieu, PKC peut réguler directement le récepteur GABA-B1, ce qui pourrait également influencer le couplage de GABA-B1 à MAPK-ERK1/2 [Pontier et al. 2006]. L'inhibition de PKC a permis de démasquer l'effet activateur d'antagonistes GABA-B reconnus. Alors qu'on s'attendrait à ce qu'un ligand soit agoniste, agoniste partiel, agoniste inverse ou antagoniste neutre avec la même efficacité toutes voies confondues, les évidences s'accumulent dans la littérature à l'effet que la pharmacologie des récepteurs n'est pas aussi simple qu'anticipé [Kenakin, 2003 ; Violin et Lefkowitz 2007]. Certains ligands, appelés «ligands biaisés», sont en effet en mesure de stabiliser les récepteurs dans des conformations qui stimulent ou inhibent sélectivement seulement certaines des voies en aval de ceux-ci. Le concept a été initialement étudié du côté du récepteur muscarinique acétylcholine M1 (mAChR M1), qui peut stimuler tant la production d'AMP<sub>c</sub> via  $G_s$  que des réponses PLC via  $G_q$ . Plusieurs ligands de ce récepteur peuvent en effet bloquer les réponses AMP<sub>c</sub> mais activer les réponses PLC [Fisher et al 1993; Gurwitz et al. 1994]. Le concept a ensuite été élargi pour inclure le recrutement de  $\beta$ -arrestine, suivant la

découverte de ligands non-désensibilisants. Ces ligands sont capables d'activer la signalisation via des protéines G, mais cette activation n'est pas suivie de la phosphorylation du récepteur, du recrutement de  $\beta$ -arrestine et de l'internalisation [Whistler et von Zastrow 1998; Lewis et al. 1998; Kohout et al. 2004]. À l'opposé, des ligands RCPGs en mesure de recruter  $\beta$ -arrestine sans activer une protéine G ont également été identifiés [Wei et al. 2003; Blanpain et al. 2002; Gesty-Palmer et al. 2006]. Il s'agit, à notre connaissance, du premier cas rapporté de ligands biaisés GABA-B.

### **3.7 Comment les ligands GABAergiques atteignent-ils ces récepteurs?**

Nos données suggèrent que le récepteur GABA-B1 demeure localisé sur les endomembranes mais nous ne pouvons exclure qu'il y ait une circulation rapide entre les endomembranes et la surface membranaire. Le récepteur GABA-B1 fut originalement identifié par clonage d'expression [Kaupmann et al. 1997], ce qui implique qu'il accède transitoirement à la surface membranaire ou encore que le ligand passe efficacement à l'intérieur de la cellule. En contexte réel, des transporteurs GABA, opérationnels tant dans les neurones que les cellules gliales, sont en mesure de fournir un ligand aux récepteurs intracellulaires. Il y a deux réservoirs de GABA dans les neurones [Martin et Barke, 1998 ; Soghomonian et Martin, 1998], soit un réservoir vésiculaire relâché extracellulairement suite à l'arrivée de potentiels d'actions aux terminaisons synaptiques, et un réservoir métabolique, cytosolique, qui pourrait activer les récepteurs GABA-B toniquement, à condition que l'orientation du domaine de liaison du ligand soit favorable ou que les endomembranes soient perméables au GABA. L'entrée du baclofen dans la cellule est probablement moins contraignant puisqu'il est un variant lipophile du

GABA. Il est par ailleurs possible que des antagonistes GABA-B puissent être des ligands biaisés en mesure d'activer la signalisation ERK1/2, un phénomène démontré pour un nombre croissant de ligands RCPGs [Kenakin 2003 ; Violin et Lefkowitz, 2007].

### **3.8 Homodimérisation de récepteurs**

L'homodimérisation des récepteurs de la famille C de récepteurs 7-TMs est bien décrite pour mGluRs et CaSR, qui interagissent notamment par des ponts disulfides formés entre les domaines N-terminaux extracellulaires [Bai et al. 1998 ; Kunishima et al. 2000 ; Robbins et al. 1999 ; Romano et al. 1996]. Dans le cas des récepteurs GABA-B toutefois, la nécessité de l'hétérodimérisation GABA-B1/B2 pour le couplage des effecteurs classiques, de même que la faible affinité de la queue C-terminale de GABA-B1 pour elle-même a fait oublier l'existence possible d'homodimères GABA-B1, interagissant via les domaines transmembranaires ou N-terminaux et couplés à des effecteurs autres que des canaux  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  ou l'adénylate cyclase. Nos données confirment la capacité des récepteurs GABA-B1 à former des récepteurs homodimères en absence de GABA-B2, ce qui a également été rapporté par un autre groupe [Villemure et al. 2005]. Il est peu probable que cette interaction n'implique le domaine « coiled-coil » C-terminal, non seulement à cause de sa faible affinité pour lui-même mais également parce que cela masquerait les motifs de rétention RE et résulterait probablement en un ciblage des multimères GABA-B1 à la surface membranaire, ce qui n'est pas observé. La coimmunoprécipitation du variant d'épissage GABA-B1E, qui consiste seulement du domaine extracellulaire de GABA-B1, ou d'un récepteur GABA-B1B tronqué, avec GABA-B2, nous informait déjà de l'existence de régions additionnelles impliquées dans

la dimérisation GABA-B1/B2 [Calver et al. 2001 ; Schwarz et al. 2000]. L'existence de motifs spécifiques régulant l'homodimérisation versus l'hétérodimérisation, à l'image de ceux trouvés pour les récepteurs ErbB1 et ErbB2, peut maintenant être envisagée [Gerber et al. 2004].

En somme, nous démontrons dans ce premier projet le couplage  $G_{i/o}$  et PKC-dépendant de la voie pro-prolifératrice et pro-différentiatrice MAPK-ERK1/2 par des récepteurs GABA-B1 réticulaires homomériques en absence de GABA-B2, tant en contexte endogène que de surexpression. Cette nouvelle voie de signalisation pourrait être pertinente dans des contextes cellulaires tels que celui des astrocytes du cerveau adulte ou encore celui des cellules précurseurs neuronales et astrocytaires du cerveau en développement, deux contextes où l'expression de GABA-B1 l'emporte sur celle de GABA-B2. Dans le cas du cerveau en développement, on sait en effet que le GABA régule de manière importante les étapes de prolifération, migration et différenciation neuronale [Owens et Kriegstein, 2002 ; Manent et Represa, 2007].

Ces récepteurs sont présumément situés à proximité de la machinerie traductionnelle. Le couplage direct de récepteurs GABA-B1 au contrôle de la traduction et du ciblage d'ARNs messagers trouverait niche temporelle entre les contrôles relativement rapide de l'activité enzymatique et relativement lent de l'expression génique via la régulation transcriptionnelle et ajouterait une spécificité additionnelle au système. Le RE joue de plus un rôle essentiel dans la synthèse et la maturation protéique, et toute perturbation de son homéostasie (accumulation de protéines mal-repliées, déprivation en nutriments,

infection virale, altérations de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$ , changement du potentiel oxido-réducteur, etc...) peut résulter en un arrêt de la traduction des transcrits chapeautés de  $\text{m}^7\text{GpppN}$ , lesquels représentent la majorité des ARNs messagers. L'activation de la réponse aux protéines mal repliées (UPR) résulte en l'induction d'un certain nombre de transcrits contenant de multiples cadres de lecture ouverts, notamment ATF-4, un facteur de transcription dont l'expression contribue au rétablissement de l'homéostasie du RE. ATF-4 interagit directement avec le domaine C-terminal de GABA-B1 [Nehring 2000 ; Vernon 2001 ; White 2000]. Il sera intéressant de déterminer l'implication des récepteurs GABA-B1 dans l'intégration des signaux de stress du RE.

### **3.9 Les cellules DI-TNC1 sont un modèle utile dans l'étude des récepteurs GABA-B1 endogènes.**

Afin d'approfondir notre compréhension des récepteurs GABA-B1 en conditions natives, nous avons confirmé l'expression de GABA-B1 et l'absence de GABA-B2 dans la lignée cellulaire gliale DI-TNC1 par RT-PCR, immunobuvardage de type western et immunohistochimie confocale. La capacité du baclofen à augmenter la phosphorylation d'ERK1/2 dans cette lignée cellulaire a confirmé les données obtenues en cellules HEK293 transfectées. L'activation d'ERK1/2 fut plus lente et plus soutenue dans les cellules DI-TNC1, une observation potentiellement tributaire du type cellulaire utilisé. Par ailleurs, nous ne connaissons pas pour le moment les sous-types GABA-B1 exprimés par les cellules DI-TNC1. Ces cellules seront utiles dans l'étude future des événements de signalisation GABA-B1.



## **Chapitre IV - Le ligand pseudo-PDZ C-terminal du récepteur GABA-B1 est essentiel dans la régulation du décompte cellulaire et du ciblage nucléaire d'ATF-4 dans la lignée cellulaire gliale DI-TNC1**

### **Résultats**

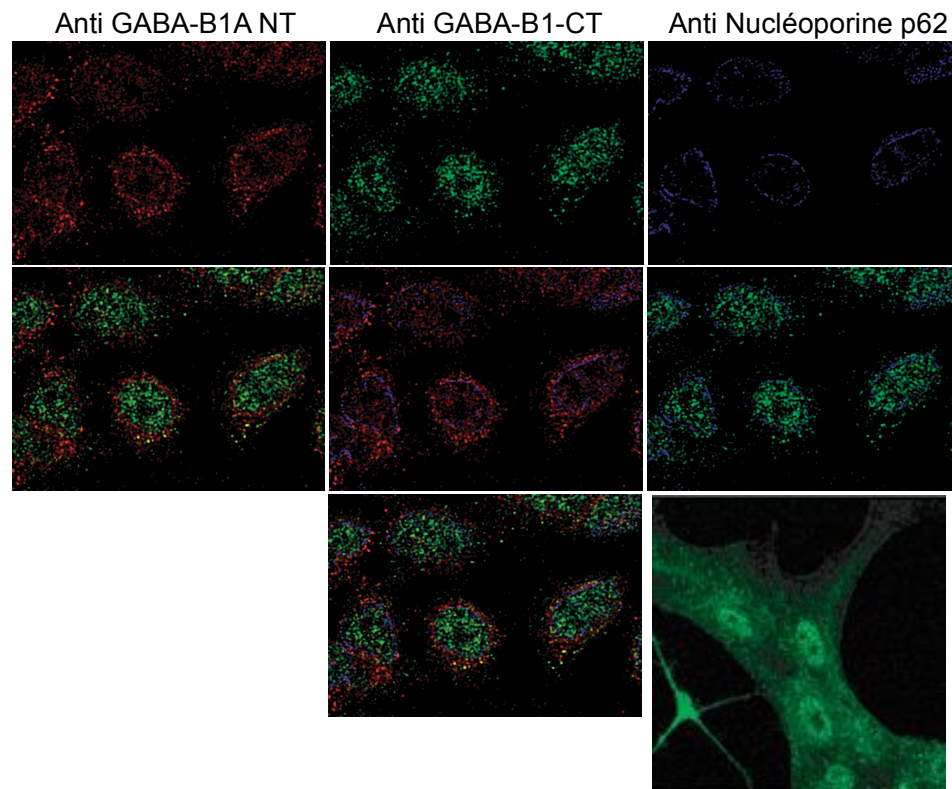
#### **4.1 Absence de colocalisation des signaux GABA-B1 N- et C-terminaux dans la lignée gliale DI-TNC1 et dans des cultures primaires astrocytaires.**

Nous avons poursuivi la caractérisation de la localisation sous-cellulaire de GABA-B1 dans la lignée DI-TNC1, débutée dans le cadre du projet précédent (fig. 9 et 10), par des expériences en immunohistochimie confocale en utilisant des anticorps commerciaux reconnaissant les domaines N-terminaux divergents de GABA-B1A (fig. 14A ; rouge) et GABA-B1B (fig. 14B ; vert), de même que le domaine C-terminal commun aux deux isoformes (fig. 14A ; vert). Une localisation périnucléaire et vésiculaire, correspondant au RE, a été perçue avec anti-GABA-B1A, ce qui est cohérent avec les rapports précédents de localisation GABA-B1 au RE, causée par la présence d'un motif de rétention RSRR, ainsi qu'avec nos propres observations présentées à la fig. 9 [Calver et al. 2001 ; Couve et al. 1998 ; Margeta-Mitrovic et al. 2000]. Le marquage anti-GABA-B1A-NT observé colocalisait toutefois faiblement avec le marquage anti-GABA-B1-CT, essentiellement intranucléaire. Les deux marquages sont clairement délimités par la membrane nucléaire, telle qu'identifiée par le marquage de la protéine de la membrane nucléaire nucléoporine p62 (fig. 14A, images fusionnées). Une localisation semblable de GABA-B1-CT a été observée dans des cultures primaires astrocytaires (fig. 14A, image inférieure droite). Le marquage de vésicules intracellulaires par GABA-B1-CT a également été noté, avec une intensité variable selon les lots d'anticorps utilisés (fig. 14A vs fig. 15).

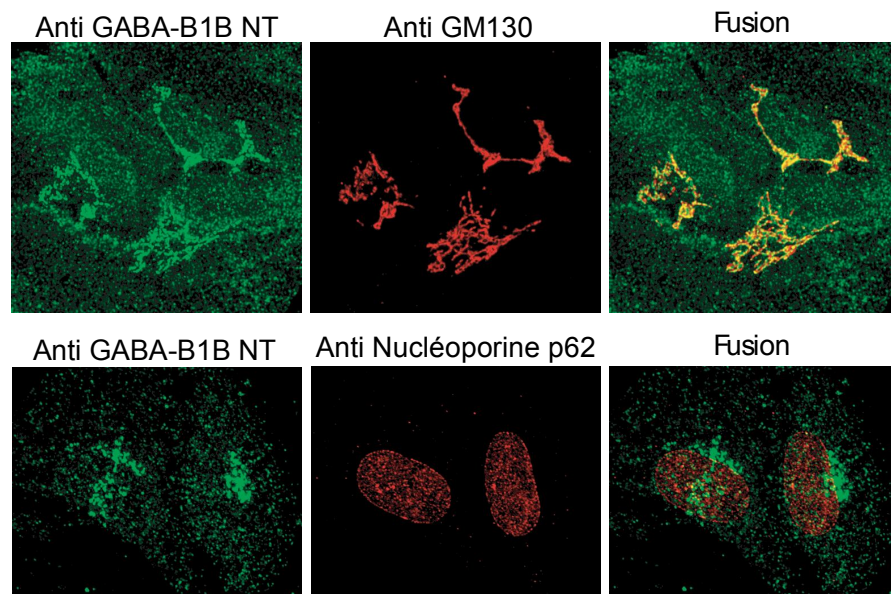
Une forte colocalisation (fig. 14B ; image fusionnée) a été obtenue lorsque des cultures primaires astrocytaires ont été sondées avec anti-GABA-B1B (vert) et le marqueur golgien GM130 (rouge). En revanche, aucune colocalisation n'a été observée entre les marquages anti-GABA-B1B et anti-nucléopore p62 (fig. 14B ; rangée inférieure). Une localisation semblable du signal GABA-B1B a été observée en cellules DI-TNC1 (données non-présentées). Nous n'avons pu évaluer la colocalisation entre anti-GABA-B1B et anti-GABA-B1-CT à cause de l'incompatibilité des anticorps utilisés. Une colocalisation partielle entre GABA-B1-CT et GM130 a toutefois été observée (Fig. 15), ce qui suggère qu'une part des récepteurs GABA-B1 localisés à la membrane golgienne possèdent un domaine C-terminal intact. En rétrospective, il y a une discordance entre les marquages endomembranaires N-terminaux des isoformes GABA-B1A et GABA-B1B d'une part, et le marquage GABA-B1-CT d'autre part, qui suggère un ciblage sous-cellulaire distinct des deux extrémités du récepteur et l'existence possible de fragments protéolytiques GABA-B C-terminaux endogènes dans une lignée cellulaire et des cultures cellulaires astrocytaires.



A-



B-

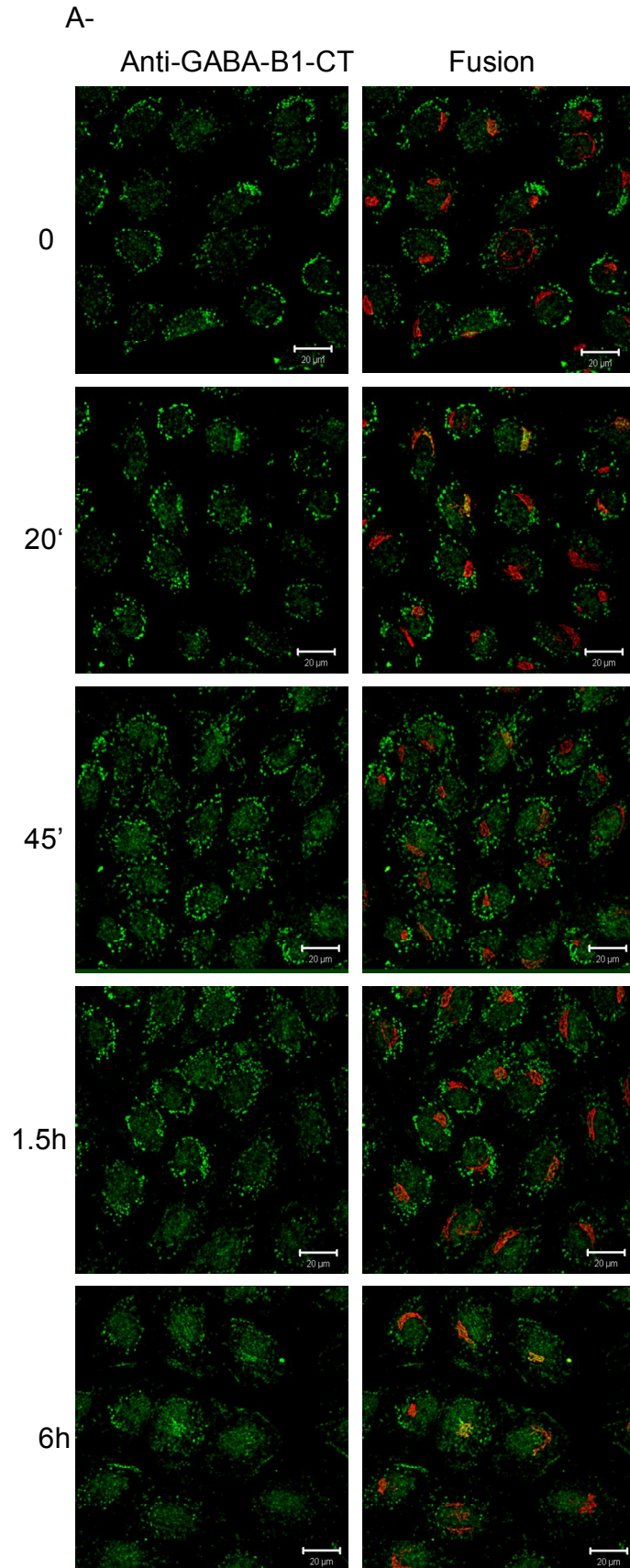


**Figure 14. Absence de colocalisation des signaux GABA-B1 N- et C-terminaux dans la lignée gliale DI-TNC1.** **A-** Images confocales déconvoluées montrant les marquages RE et intranucléaires de cellules DI-TNC1 lorsque sondées avec des anticorps dirigés contre les parties N-terminale de GABA-B1A (rouge) et C-terminales (vert), respectivement. La membrane nucléaire a été délimitée en sondant avec anti-nucléopore p62 (bleu). Des marquages GABA-B1 C-terminaux intranucléaires ont également été observés dans des cultures primaires astrocytaires (panneau inférieur, image de droite). **B- Localisation de l'isoforme GABA-B1B à l'appareil de Golgi.** Colocalisation des marquages de l'isoforme GABA-B1B (vert) et de la protéine golgienne GM130 (rouge). Aucune colocalisation n'a été perçue entre GABA-B1B (vert) et la nucléopore p62 (rouge). Les données sont représentatives d'au moins 3 expériences différentes.

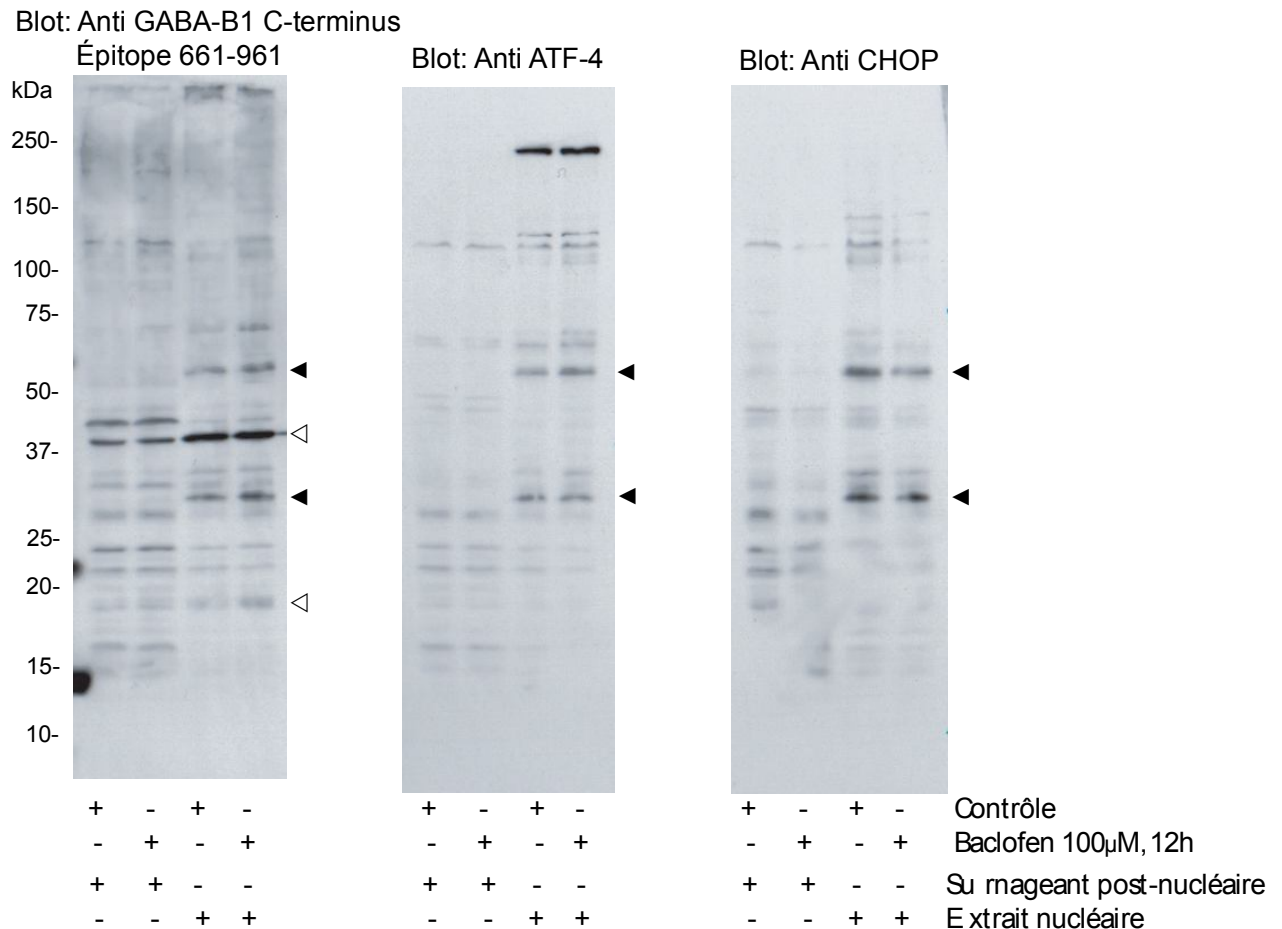
## **4.2 Augmentation du marquage GABA-B1-CT intranucléaire endogène et réduction du marquage vésiculaire réticulaire par le traitement agoniste au baclofen**

Afin de déterminer si la localisation des récepteurs GABA-B1 endogènes est modifiée par leur activation, nous avons stimulé les cellules, avec 100 $\mu$ M de l'agoniste GABA-B baclofen, pour des temps de traitement variables, et avons procédé avec l'immunohistochimie confocale. Une augmentation reproductible mais de faible amplitude du marquage intranucléaire a été notée à partir de 45min de traitement avec l'agoniste (fig. 15A). Elle a été accompagnée par une importante diminution du réservoir réticulaire et vésiculaire du récepteur, observée à 6h de traitement agoniste. En immunobuvardage de type western d'extraits nucléaires, nous avons observé, suite à 12h de traitement avec 100 $\mu$ M baclofen, une augmentation dans l'intensité d'une bande de 18kDa (le poids moléculaire prédit de la queue C-terminale de GABA-B1 est de 12kDa) reconnue par anti-GABA-B1-CT (fig. 15B, tête de flèche vide). Une bande fortement immunoréactive, non-affectée par le traitement agoniste, a également été perçue à 40kDa. Des membranes indépendantes ont été sondées avec des anticorps dirigés contre 2 facteurs de transcription interagissant avec GABA-B1, ATF-4 et CHOP [Nehring 2000 ; Vernon 2001 ; White 2000 ; Sauter et al. 2005]. Aucune de ces deux protéines n'a été

perçue, que ce soit constitutivement ou suite au traitement agoniste. Les anticorps anti-ATF-4 et anti-CHOP ont reconnu de plus un profil de bandes non-spécifiques semblable à celui d'anti-GABA-B1-CT (fig. 15B, têtes de flèche noires), lequel exclut les bandes de 18 et 40kDa. Ces résultats obtenus en immunohistochimie confocale et en immunobuvardage de type western sont compatibles avec la protéolyse agoniste-dépendante et le relâchement subséquent de la queue C-terminale des récepteurs GABA-B1 réticulaires endogènes.



B-

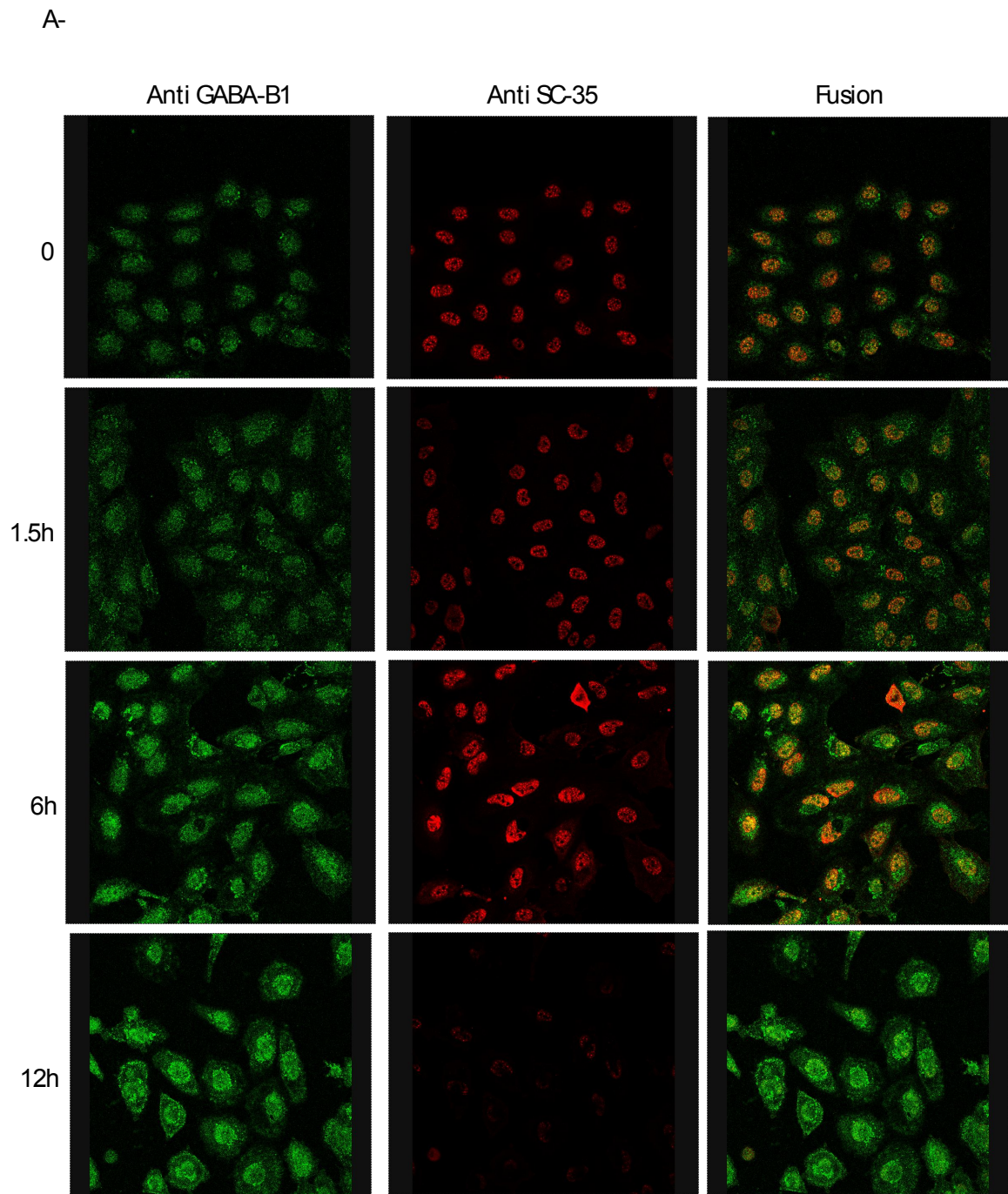


**Figure 15. Accumulation intranucléaire d'un fragment GABA-B1 C-terminal endogène potentiel de 18kDa et réduction des récepteurs GABA-B1 réticulaires suite au traitement agoniste des cellules DI-TNC1.** A- Immunohistochimie confocale de cellules déprivées de FBS pendant 12h, puis traitée avec 100µM baclofen pendant 0, 20, 45, 90 et 360 min (6h). Des anticorps primaires anti-GABA-B1-CT, anti-GM-130 et secondaire décorés d'Alexa Fluor 488 et 555 ont été utilisés. B- Immunobuvardage western de cellules assujetties à un schéma expérimental semblable, mais traitée avec 100µM baclofen pendant 12h. Suite à l'extraction nucléaire, les extraits nucléaires et lysats post-nucléaires (75µg) ont été résolus sur des gels polyacrylamide SDS-PAGE à gradient linéaire 10-20%. Des membranes indépendantes ont respectivement été sondées avec anti-GABA-B1, anti-ATF-4 et anti-CHOP. Les têtes de flèches vides montrent les bandes reconnues spécifiquement par anti-GABA-B1-CT tandis que les têtes de flèches foncées montrent des bandes reconnues non-spécifiquement par les 3 anticorps. Ces données sont représentatives d'au moins 3 expériences indépendantes.

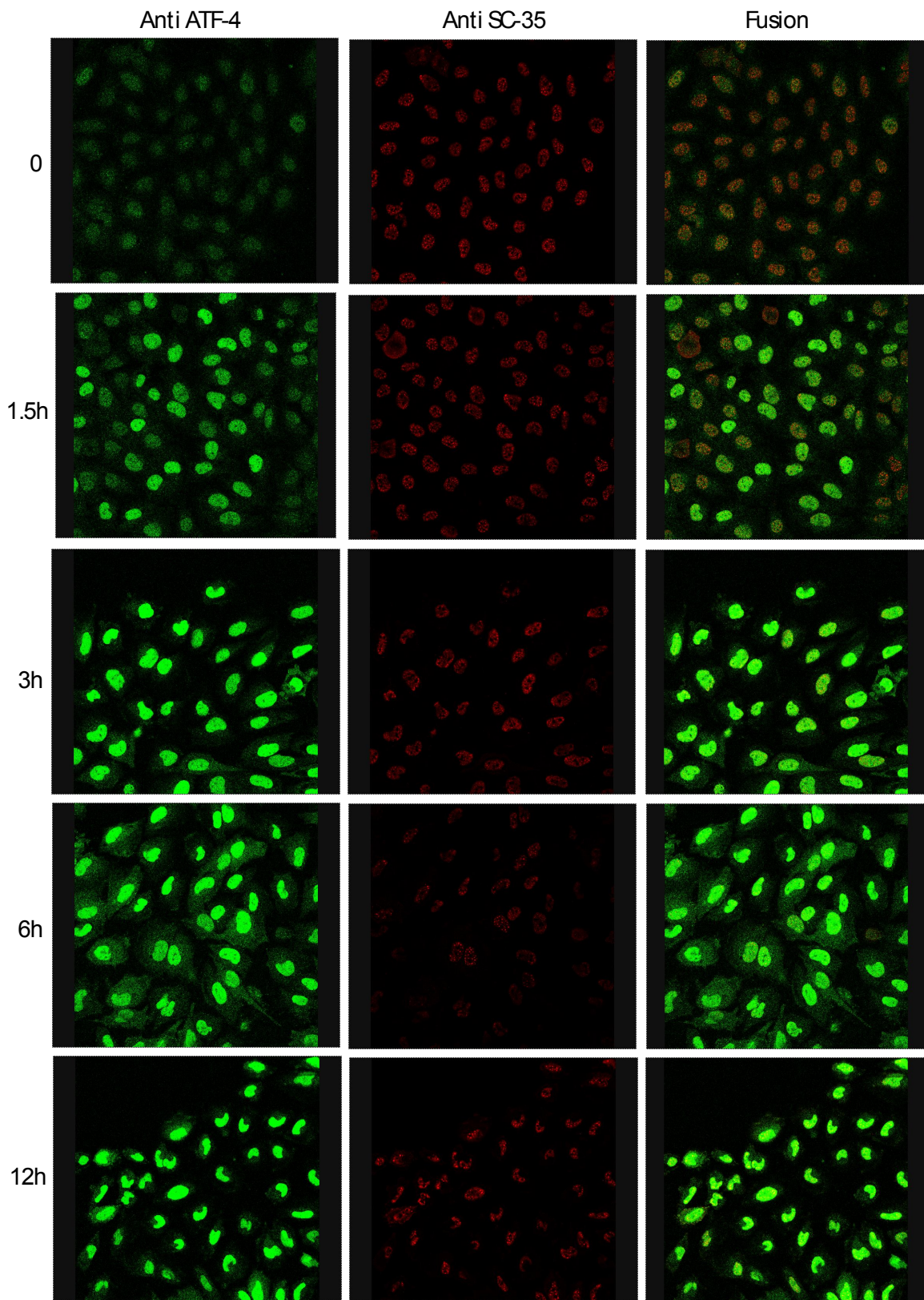
### **4.3 Régulation à la hausse de GABA-B1 et du facteur de transcription ATF-4, protéine interactrice de GABA-B1, par l'inhibition pharmacologique du protéasome**

Afin d'approfondir sur la régulation mutuelle du fragment GABA-B1 potentiel et du facteur de transcription ATF-4, des protéines prédites comme étant instables, nous avons traité les cellules avec 1 $\mu$ M de l'inhibiteur du protéasome epoxomicine. En immunohistochimie confocale, nous avons observé une augmentation progressive du marquage GABA-B1-CT dans le temps, perceptible à 6h de traitement. Cette augmentation du marquage s'est avérée à la fois intranucléaire et périnucléaire, telle qu'inférée de la colocalisation avec le marqueur nucléaire SC35 (fig. 16A). Des noyaux aux formes irrégulières ont été notés à partir de 6h de traitement, ce qui peut toutefois être compatible avec la toxicité connue de l'epoxomicine. L'augmentation du signal GABA-B1-CT a été concomitante avec l'importante augmentation d'ATF-4 intranucléaire suivant l'inhibition du protéasome (fig. 16B). L'immunobuvardage western d'extraits nucléaires a confirmé l'augmentation nucléaire d'ATF-4 mais non celle du fragment GABA-B1-CT de 18kDa (fig. 16C). Les limites des gels à gradient linéaire 10-20% SDS-polyacrylamide dans la résolution des protéines de bas poids moléculaire nous ont peut-être empêché d'apprécier pleinement d'éventuels changements dans la migration de la bande GABA-B1-CT de 18kDa.



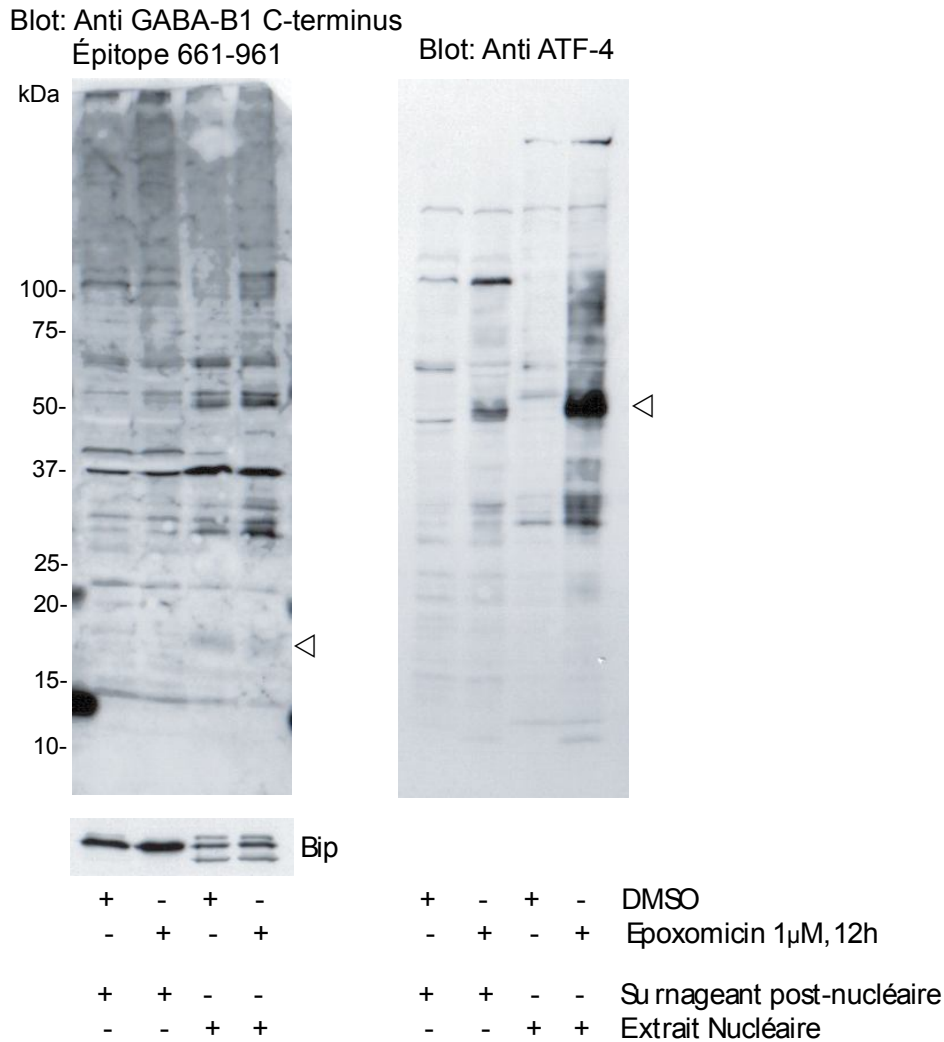


B-





C-

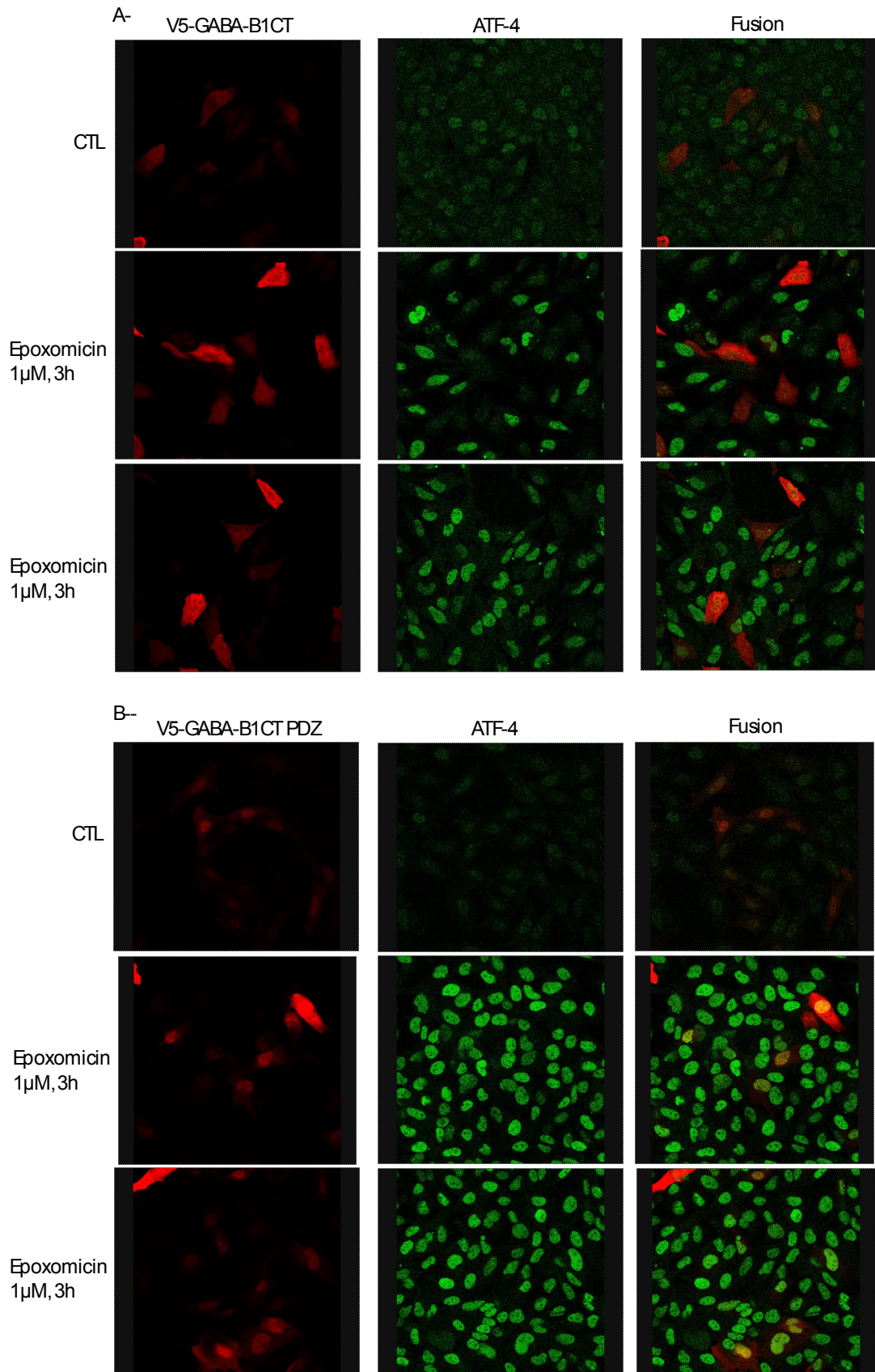


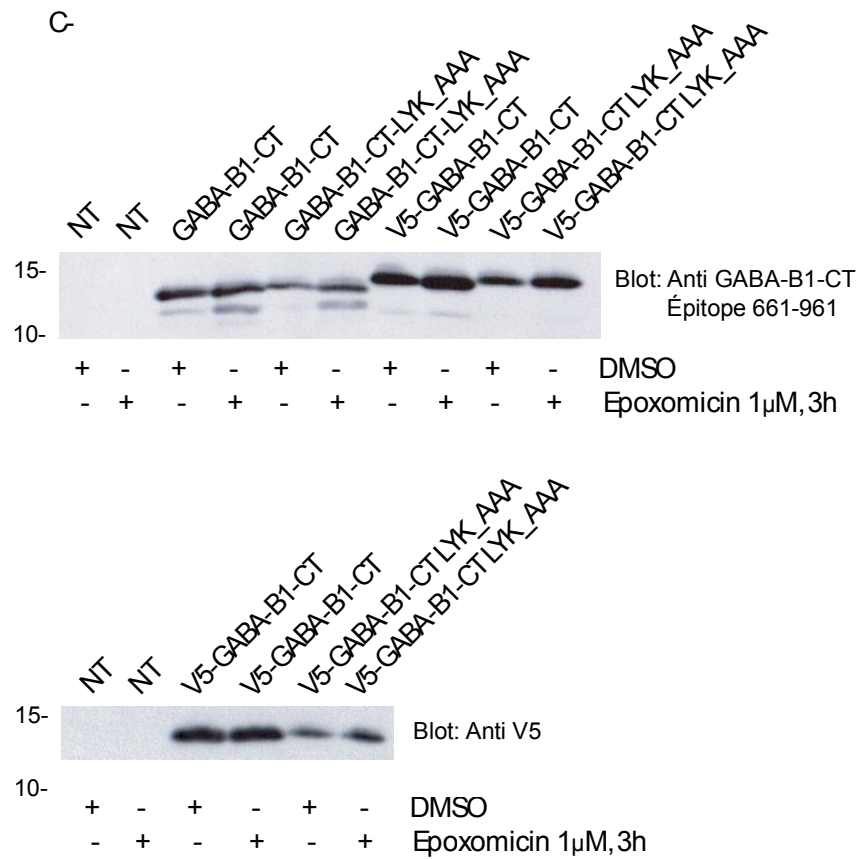
**Figure 16. Régulation à la hausse de GABA-B1 et du facteur de transcription ATF-4, protéine interagtrice du récepteur GABA-B1, par l'inhibition pharmacologique du protéasome.** A,B- Les cellules ont été déprivées de FBS pendant 12h, puis traitées avec 1µM epoxomicine pendant 0, 1.5, 6 et 12h (A- anti-GABA-B1-CT), et pendant 0, 1.5, 3, 6 et 12h (B- anti-ATF-4). Anti-SC-35 a été utilisé comme marqueur nucléaire. Des anticorps secondaires décorés d'Alexa Fluor 488 et 555 ont été employés. C- Immunobuvardage de type western de cellules déprivées de FBS pendant 12h, puis traitées pendant 12h avec 1µM epoxomicine. Suite à l'extraction nucléaire, les extraits nucléaires et lysats post-nucléaires (50µg) ont été résolus sur des gels polyacrylamide SDS-PAGE à gradient linéaire 10-20%. Des membranes indépendantes ont été sondées avec anti-GABA-B1 et anti-ATF-4. La membrane sondée avec anti-GABA-B1-CT a été décapée et resondée avec anti-Bip (panneau inférieur, côté gauche), afin de contrôler les quantités de protéines chargées. Les têtes de flèche vides indiquent le fragment GABA-B1 CT potentiel et ATF-4. Ces données sont représentatives d'au moins 3 expériences indépendantes.

#### **4.4 Le ligand pseudo-PDZ C-terminal extrême du récepteur GABA-B1 est nécessaire à l'abolition de l'induction d'ATF-4 dans les cellules DI-TNC1**

Afin de vérifier l'influence de GABA-B1-CT sur le ciblage d'ATF-4 au noyau cellulaire, les cellules DI-TNC1 ont été transfectées pendant 24h avec le plasmide pcDNA3.1 V5-GABA-B1-CT, qui ne code que la queue C-terminale de GABA-B1 (résidus 861-961). Cela a été suivi d'un traitement de 3h avec epoxomicine 1 $\mu$ M, afin d'augmenter l'expression ATF-4, et d'immunohistochimie confocale. Les queues C-terminales d'une variété de protéines signalisatrices sont munies de ligands PDZ, motifs de 3 à 5 résidus, lesquels régulent la localisation sous-cellulaire et la stabilité des protéines qui en sont affublées via l'interaction avec des protéines d'échaffaudage ou chaperones à domaines PDZ. Les trois derniers résidus de GABA-B1, LYK, ne dévient des séquences consensus des domaines PDZ classes II et III que par le dernier résidu lysine [Songyang et al. 1997]. Pour cette raison, nous avons transfecté également une version du plasmide portant une mutation des trois derniers résidus LYK en alanines (V5-GABA-B1-CT LYK\_AAA) afin de vérifier le rôle de ce ligand potentiel sur la régulation d'ATF-4 par GABA-B1-CT. Les deux constructions ont été retrouvées au cytoplasme et au noyau (fig. 17A). L'immunobuvardage de type western de lysats DI-TNC1 transfectés avec GABA-B1-CT, GABA-B1-CT LYK\_AAA, V5-GABA-B1-CT et V5-GABA-B1-CT LYK\_AAA (sondés avec anti-GABA-B1-CT ou anti-V5) montre toutefois des niveaux d'expression légèrement inférieurs pour les constructions portant la mutation LYK\_AAA. L'induction d'ATF-4, qui suit normalement le traitement epoxomicine, n'a pas été observée dans aucune des cellules n'exprimant V5-GABA-B1-CT (fig. 17A, panneaux moyen et inférieur). La même observation a été notée en l'absence de traitement à l'epoxomicine,

quoique le signal ATF-4 était beaucoup plus faible (fig. 17A, panneau supérieur). Cet effet de la surexpression de la queue C-terminale de GABA-B1 sur l'induction ATF-4 a été entièrement renversé par la mutation LYK\_AAA (fig. 17B, panneau supérieur, moyen et inférieur). En somme, la queue C-terminale de GABA-B1 abolit l'induction du facteur de transcription ATF-4 par l'époxomicine et ses résidus C-terminaux extrêmes sont nécessaires à l'accomplissement de cette tâche.

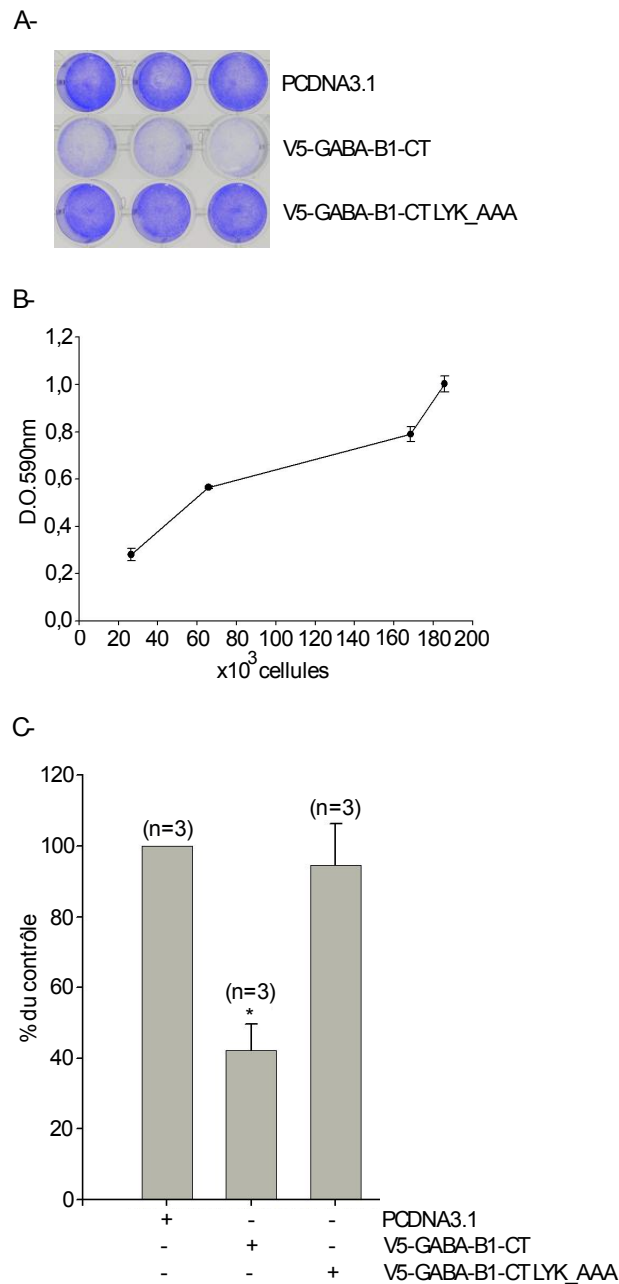




**Figure 17. Le ligand pseudo-PDZ C-terminal extrême du récepteur GABA-B1 est nécessaire à l'abolition de l'induction d'ATF-4 dans les cellules DI-TNC1.** A, B- Images confocales de cellules DI-TNC1 transfectées avec pcDNA3.1 V5-GABA-B1-CT (A, panneau supérieur, moyen et inférieur) ou V5-GABA-B1-CT LYK\_AAA (B, panneau supérieur, moyen et inférieur), traitées pendant 3h avec du DMSO ou 1 $\mu$ M epoxomicine, et sondées avec anti-V5 (rouge) et anti-ATF-4 (vert). Deux champs sont montrés pour les conditions expérimentales epoxomicine. C- Immunobuvardage de type western de lysats cellulaires entiers de cellules DI-TNC1 préparés suivant le même schéma expérimental. Ces données sont représentatives d'au moins 3 expériences indépendantes.

#### **4.5 La surexpression de GABA-B1-CT diminue le décompte cellulaire DI-TNC1 de manière LYK\_AAA-dépendante**

Le facteur de transcription ATF-4 régule de manière positive la survie cellulaire [Harding et al. 2003]. Nous avons effectué un essai de décompte cellulaire au crystal violet afin de vérifier si la surexpression de GABA-B1-CT influence le décompte cellulaire, étant donné leur capacité à interférer avec l'expression d'ATF-4. 48h post-transfection, une diminution de 60% de la D.O 590nm des extraits colorés de cellules transfectées avec V5-GABA-B1-CT a été noté (fig. 18A et B). Cet effet de l'expression de V5-GABA-B1-CT sur le décompte cellulaire DI-TNC1 a entièrement été renversé par la mutation LYK\_AAA.



**Figure 18. La surexpression de GABA-B1-CT diminue le décompte cellulaire DI-TNC1 de manière LYK\_AAA-dépendante.** **A-** Des cellules DI-TNC1 transfectées ont été photographiées en leurs plateaux de culture cellulaire suivant la fixation et le marquage avec 0.1% crystal violet (1-3, pcDNA3.1 ; 4-6, V5-GABA-B1-CT ; 7-9, V5-GABA-B1-CT LYK\_AAA) **B-** Courbe standard de la relation entre le décompte cellulaire et la densité optique 590nm des extraits Triton X-100 colorés au crystal violet **C-** Densité optique 590nm des extraits Triton X-100 colorés issus de cellules DI-TNC1 transfectées (1-pcDNA3.1, 2-V5-GABA-B1-CT et 3-V5-GABA-B1-CT LYK\_AAA). Les données sont présentées en pourcentage du contrôle et sont représentatives de deux expériences indépendantes. P=0.001 a été considéré significatif.

## **Le ligand pseudo-PDZ C-terminal du récepteur GABA-B1 est essentiel dans la régulation du décompte cellulaire et l'accumulation nucléaire d'ATF-4 dans la lignée cellulaire gliale DI-TNC1**

### **Discussion**

#### **4.6 Discordance entre les marquages GABA-B1 N- et C-terminaux endogènes**

GABA-B1A et GABA-B1B divergent significativement par leurs domaines N-terminaux constitués respectivement de 147 et 18 résidus, ce qui est exceptionnel pour des récepteurs à 7-TMs [Bettler, 2004]. Le domaine N-terminal de GABA-B1A se distingue de celui de GABA-B1B par la présence de deux modules d'interaction protéine-protéine de type Sushi. Il a récemment été montré que ces modules sont impliqués dans la régulation du ciblage dendritique versus axonal du récepteur dans les neurones glutamatergiques [Biermann et al. 2010]. Il est également possible qu'ils influencent le ciblage RE versus Golgi. Les motifs protéiques de localisation à l'appareil de Golgi demeurent mal définis [Tu et al. 2008]. Des déterminants N-terminaux favorisant le ciblage à cette organelle ont tout de même été identifiés chez plusieurs protéines. La localisation golgienne de GAD65, enzyme de synthèse du GABA, dépend par exemple d'un signal localisé dans ses 23 premiers résidus [Solimena et al. 1994 ; Kanaani et al. 2002]. Il est ainsi possible qu'un signal de ciblage à l'appareil de Golgi soit localisé dans la partie N-terminale de GABA-B1.

La discordance entre les marquages N-terminaux RE et golgiens, d'une part, et C-terminaux intranucléaires, d'autre part, suggère la possibilité que le récepteur soit protéolysé. Le RE et l'appareil de Golgi sont d'ailleurs des lieux établis de protéolyse



[Hampton et Garza, 2009 ; Seidah et al. 2008]. La spécificité de l'anticorps GABA-B1-CT pour sa cible n'est toutefois pas absolue. L'anticorps reconnaît malgré tout fortement le récepteur GABA-B1 surexprimé tant en immunohistochimie (données non-présentées) qu'en immunobuvardage de type western (fig. supplémentaire 1). Ainsi, malgré une spécificité imparfaite, on s'attendrait à ce que cet anticorps reconnaisse davantage de récepteurs GABA-B1 endomembranaires ce qui n'est pas le cas. Il est également possible que l'épitope C-terminal des récepteurs GABA-B1 endomembranaires soit masqué par l'interaction à une ou des protéines partenaires. On note par ailleurs que les marquages intranucléaires obtenus en cellules DI-TNC1 et cultures primaires d'astrocytes sont conséquents avec les marquages GABA-B1-CT intranucléaires neuronaux rapportés par plusieurs groupes en immunohistochimie confocale et en microscopie électronique [Sloviter 1999 ; Charles 2001 ; Gonchar 2001 Lopez-Bendito, 2004 ; Panzanelli et al. 2004 ; Lee et al. 2006].

Le relâchement de morceaux de protéines membranaires par protéolyse suivi de leur translocation au noyau est un mécanisme de signalisation connu pour une variété de protéines membranaires (majoritairement à un domaine transmembranaire) et qui agit en parallèle à la transmission de signaux via des cascades de messagers intermédiaires (présenté à l'annexe I) [révisé par Kopan et Ilagan, 2004]. Il a par exemple été montré que les récepteurs Notch et ErbB4 relâchent des fragments C-terminaux bioactifs grâce à l'action combinée des métalloprotéases ADAMs et des aspartylprotéases comme préséniline, et que ces fragments peuvent réguler le destin cellulaire et la différenciation astrocytaire, respectivement, en agissant en tant qu'adaptateurs au sein de complexes

transcriptionnels multiprotéiques. Le récepteur p75 pour le NGF, les protéines précurseurs APP et SREBP, ainsi que le facteur de transcription lié à la membrane ATF-6 sont d'autres exemples de protéines activées par protéolyse. La liste des protéines régulées de cette manière ne cesse de s'allonger. Quoique la plupart des substrats connus à ce moment-ci possèdent un seul domaine transmembraire, SREBP fait exception avec ses deux domaines transmembranaires. Le clivage du récepteur 7-TMs DFizzled2 par une métalloprotéase ADAM, dans des cellules musculaires larvaires de *Drosophila*, et celui de mGluR1 $\alpha$  par Calpain dans des neurones corticaux de rat ont également été rapportés [Mathew et al. 2005 ; Xu et al. 2007]. Les peptides relâchés par ces récepteurs réguleraient la formation des jonctions neuromusculaires et l'excitotoxicité neuronale du glutamate, respectivement.

Nos résultats suggèrent que l'accumulation intranucléaire de GABA-B1-CT suit le traitement avec le baclofen, un variant lipophile du GABA, agoniste spécifique des récepteurs GABA-B1 et susceptible d'atteindre plus facilement le réservoir de récepteurs GABA-B1 intracellulaire [Bettler, 2004]. Les changements observés sont faibles, tels qu'attendus de protéines endogènes faiblement exprimées, mais reproductibles. L'inhibition concomitante du protéasome n'a pas été tentée et pourrait permettre de mieux observer la régulation du fragment GABA-B1 potentiel de 18kDa intranucléaire par l'agonisme du récepteur. Cela a été notamment observé dans le cas de la protéolyse du récepteur à l'EGF p75 [Domeniconi et al. 2005].

L'augmentation du marquage GABA-B1-CT intranucléaire observée en immunohistochimie confocale se produit sur une échelle de temps semblable à celle rapportée pour mGluR1 $\alpha$  et ce, concomitamment à la disparition du réservoir membranaire réticulaire de récepteurs GABA-B1 [Xu et al. 2007]. La stimulation de récepteurs pour une longue période de temps amène un questionnement sur la désensibilisation éventuelle. À cet égard, il a été montré que les récepteurs GABA-B1 surexprimés en cellules hétérologues ne désensibilisent qu'en situation de coexpression avec GRK4 [Perroy et al. 2003]. Il est ainsi possible que la cinétique de désensibilisation des récepteurs endomembranaires diffère de celle des récepteurs de surface.

L'identité de l'activité protéolytique initiatrice impliquée demeure à ce moment-ci indéterminée. Les fragments GABA-B1 endogènes éventuels sont nécessairement présents en faible quantité dans la cellule, à l'image des récepteurs membranaires entiers. Ils risquent de plus d'être finement régulés par des endopeptidases de faible capacité. Ces éléments compliquent l'étude du clivage de GABA-B1 tant endogène que surexprimé. Le système ubiquitine-protéasome, qui dégrade une grande quantité de protéines nucléaires, pourrait être impliqué dans la protéolyse du récepteur GABA-B1, tant dans le cytosol que le noyau [von Mikecz, 2006]. Son inhibition a résulté en l'accumulation intranucléaire de fragments GABA-B1 potentiels en immunohistochimie confocale, toutefois non-corroborée en immunobuvardage de type western. Il demeure possible que son inhibition mène à l'apparition de sous-produits GABA-B1-CT non-détectés dans nos conditions d'électrophorèse et d'immunobuvardage.

## 4.7 Régulation d'ATF-4

L'accumulation intranucléaire de GABA-B1-CT par le traitement epoxomycin en immunohistochimie est difficile à interpréter étant donné l'absence de confirmation en immunobuvardage de type western. L'optimisation des méthodes de détection pourrait permettre d'apprécier des changements plus subtils de la migration du fragment GABA-B1 intranucléaire potentiel de 18kDa. Une forte accumulation intranucléaire d'ATF-4 est toutefois notée suivant le même traitement. Cela est peut-être expliqué dans un premier temps par l'inhibition de la dégradation d'une protéine instable dont la demi-vie est estimée à 30min [Lassot et al. 2001]. À cet égard, la reconnaissance d'ATF-4 par la machinerie protéasomale est un paramètre déterminant dans la régulation de sa stabilité. La dégradation d'ATF-4 par le protéasome est notamment modulée par deux de ses interacteurs,  $\beta$ TrCP et p300, qui agissent respectivement en activateur et inhibiteur [Lassot et. 2001, 2005].  $\beta$ TrCP est une composante du complexe ubiquitine ligase E3 SCF <sup>$\beta$ TrCP</sup> responsable du ciblage de substrats au protéasome par ubiquitination. p300 est quant à elle une histone acétyl-transférase nucléaire, possédant également une activité E3/E4 ubiquitine ligase [Grossman et al. 2003]. Son interaction avec ATF-4 augmente toutefois la stabilité d'ATF-4 indépendamment de son activité catalytique.

Il est également possible que l'accumulation intranucléaire d'ATF-4 suivant le traitement epoxomycin résulte de l'activation de la voie du stress RE par l'activation de protéines mal-repliées [Schröder et Kaufman, 2005]. Cette voie inhibe la synthèse de la plupart des protéines cellulaires par inhibition de composantes de la machinerie traductionnelle. Les transcripts de quelques protéines de l'homéostasie, dont ATF-4, sont toutefois traduits

davantage en contexte d'activation de la voie RE, via un mécanisme de type « leaky-scanning » de multiples cadres de lecture ouverts [Hinnebusch et al. 2002].

La surexpression de la queue C-terminale de GABA-B1 abolit l'expression d'ATF-4 en conditions basales et suivant son induction par l'epoxomicine. Le ratio GABA-B1-CT/ATF-4 observé dans le cadre de ces expériences est peut-être différent du ratio observé en contexte physiologique. Il est ainsi possible que cette régulation d'ATF-4 par GABA-B1-CT ne soit observée qu'en contexte de surexpression. Un scénario plausible pour expliquer cette régulation d'ATF-4 par GABA-B1-CT, inféré de sa régulation par  $\beta$ TrCP et p300, implique la prévention de sa translocation au noyau et sa dégradation subséquente par le protéasome. On peut ainsi envisager que la stabilité d'ATF-4 dépende de la régulation de son interaction avec différentes protéines partenaires régulant positivement ( $\beta$ TrCP et GABA-B1-CT) et négativement (p300) sa dégradation. La question d'une éventuelle dégradation protéosomale nucléaire d'ATF-4, envisagée sur la base de la localisation essentiellement nucléaire de  $\beta$ TrCP surexprimé ainsi que de la présence des autres éléments de la machinerie d'ubiquitination au noyau [von Mikecz, 2006], demeure quant à elle ouverte. GABA-B1-CT, par sa localisation tant cytosolique que nucléaire, pourrait influencer sur la dégradation protéosomale d'ATF-4 dans les deux compartiments.

#### **4.8 Rôle du ligand pseudo-PDZ de GABA-B1**

Le renversement de l'effet de GABA-B1-CT sur ATF-4 suivant la mutation des trois derniers résidus de GABA-B1, lesquels représentent un ligand pseudo-PDZ, était

inattendue. L'expression du mutant GABA-B1-CT LYK\_AAA est légèrement plus faible que celle de GABA-B1-CT WT, ce qui réduit théoriquement la capacité du fragment GABA-B1-CT à titrer ATF-4 et à le diriger vers les voies de dégradation. Le renversement de l'effet anti-inducteur de GABA-B1-CT sur ATF-4 par la mutation ne peut toutefois être entièrement expliqué par l'effet déstabilisateur de la mutation, puisque l'effet demeure renversé à des niveaux semblables d'expression, tel qu'observés en immunohistochimie confocale.

Le rôle régulateur des interactions réversibles entre domaines et ligands PDZ C-terminaux est mieux connu dans le contexte de la formation de complexes membranaires de signalisation [Harris et Lim, 2001 ; Kreienkamp, 2002]. Le rôle de ces interactions dans la localisation intranucléaire a également été montré. Par exemple, la diminution de l'expression de la protéine PDZ dGRIP par interférence de l'ARN régule négativement le nombre de punctae DFizzled2 intranucléaires de cellules musculaires larvaires de *Drosophila* [Ataman et al. 2006]. Ces interactions régulent également la protéolyse de certaines protéines. RseA, une protéine membranaire anti- $\sigma^E$  chez *E. coli*, est ainsi protégée de la protéolyse par le domaine PDZ de la métalloprotéase YaeL [Kanehara et al. 2003]. L'homologue de YaeL chez les mammifères, S2P, participe d'ailleurs à l'activation protéolytique des facteurs de transcription SREBP et ATF-6 [Brown et al. 2000 ; Weihofen et Martoglio, 2003].

On peut spéculer que la capacité de GABA-B1-CT à empêcher l'induction d'ATF-4 puisse dépendre d'une protéine interactrice cytoplasmique ou nucléaire (PDZ ou autre)

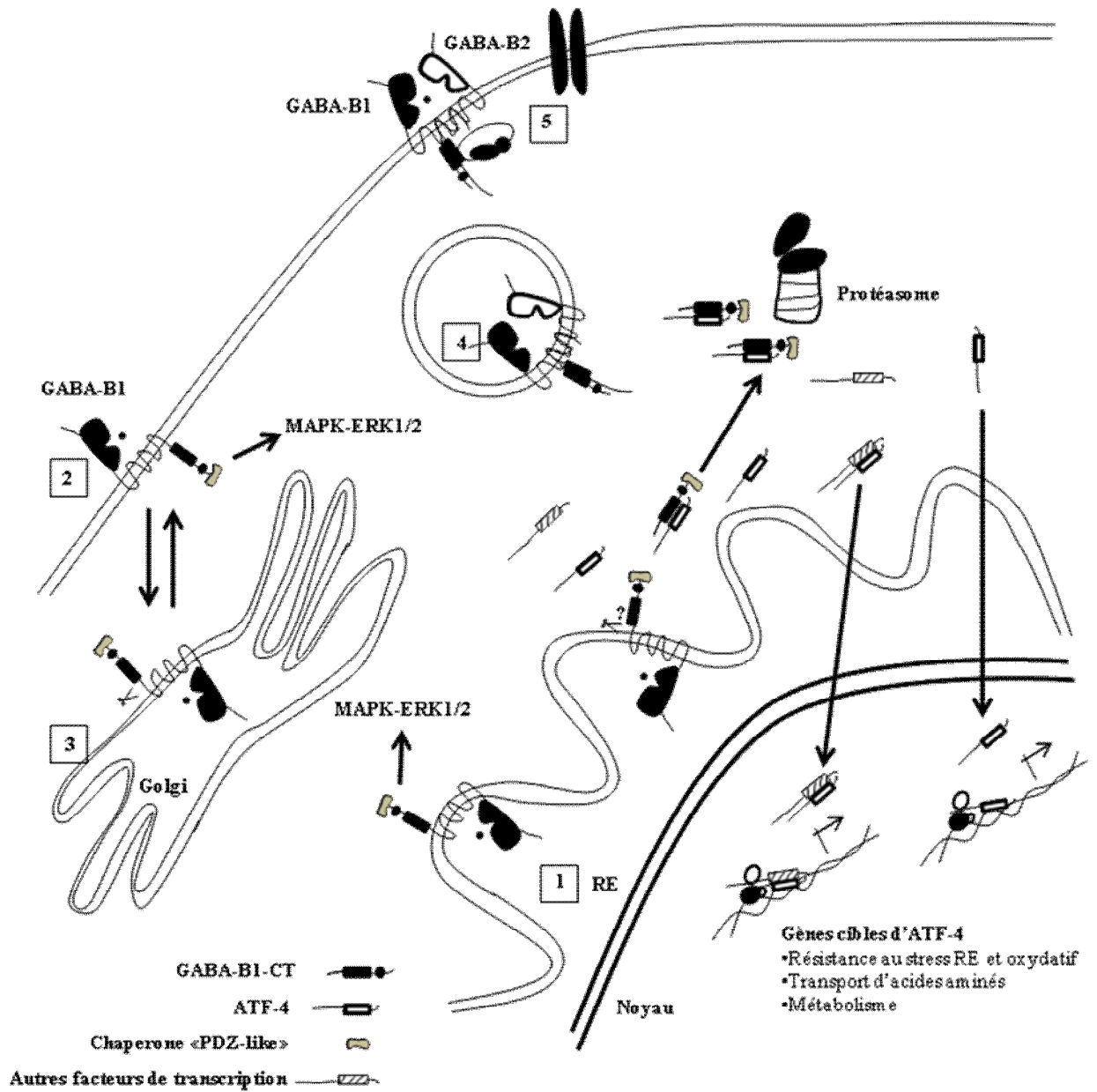
stabilisant la dimérisation entre GABA-B1-CT et ATF-4. Les complexes GABA-B1-CT-ATF-4-protéine interactrice seraient ensuite plus facilement éliminés par le protéasome cytosolique ou nucléaire. L'interaction de GABA-B1-CT avec cette protéine ralentirait de plus la dégradation de GABA-B1-CT, ce qui contribuerait également à son effet anti-inducteur d'ATF-4. À cet égard, les résidus 927-939 de GABA-B1, qui suivent immédiatement le domaine d'interaction « coiled-coil » et le motif de rétention réticulaire RSRR, représentent une région déstructurée qui remplit les critères d'une région PEST [Rogers et al. 1986 ; PESTfind Analysis Webtool, <https://embl.bcc.univie.ac.at/toolbox/pestfind/pestfind-analysis-webtool.htm>]. ATF-4 possède également une région PEST. La présence de ces régions, à forte prévalence en résidus proline (P), acide glutamique (E), sérine (S) et thréonine (T), a été liée, par approche bio-informatique et mutationnelle, à la courte demi-vie de plusieurs protéines, parmi lesquelles une variété de facteurs de transcription et de régulateurs du cycle cellulaire (Myc, Fos, Jun, p53, etc.) [Rechsteiner et Rogers, 1996]. Le masquage de la région protéolytique PEST de GABA-B1 par une protéine chaperone pourrait ainsi influencer positivement sur la stabilité de la queue C-terminale de GABA-B1. Il n'y est pour le moment aucun interacteur connu liant GABA-B1 par l'entremise de son ligand pseudo-PDZ [Balasubramanian et al. 2007]. Il diffère des ligands classiques par la présence d'un résidu lysine en position 0. On note que la présence de cet acide aminé chargé positivement n'empêche pas l'interaction avec des protéines à domaines PDZ puisque des interactions ont été rapportées entre des peptides artificiels possédant un tel résidu en position 0 et le 5<sup>ème</sup> domaine PDZ de la protéine tyrosine phosphatase PTP 5bas/FAP-1 [Songyang et al. 1997].

#### **4.9 Effet de la surexpression de GABA-B1-CT sur le décompte cellulaire**

La surexpression de GABA-B1-CT réduit le décompte cellulaire de cellules DI-TNC1 non-traitées avec epoxomycin. Cela peut être expliqué par un effet spécifique sur les voies intracellulaires de la croissance ou de la survie cellulaire que l'essai ne peut distinguer. L'expression du facteur de transcription pro-survie ATF-4 est augmentée par régulation traductionnelle dans les situations de stress cellulaire, ce qui permet l'activation transcriptionnelle de gènes de l'homéostasie parmi lesquels des protéines chaperones du RE. L'inhibition de l'expression d'ATF-4 ayant résulté de la présence de GABA-B1-CT pourrait ainsi avoir causé la diminution du décompte cellulaire que nous avons observé. Il est également possible que l'effet soit toxique et non-spécifique. La titration d'autres interacteurs GABA-B1-CT, tels que Marlin-1, protéine de liaison des ARNs messagers, NSF, protéine impliquée dans la formation de vésicules ou encore ATF-5, facteur de transcription surexprimé dans une variété de tumeurs gliales et dont l'interférence engendre la mort cellulaire, pourrait par exemple être contributive [Couve et al. 2004 ; Pontier et al. 2006 ; Angelastro et al. 2006]. On ne sait rien de la sensibilité de la voie du stress RE, qui peut être initiée par la surcharge protéique, dans les cellules DI-TNC1 [Ma et Hendershot, 2001]. L'abolition totale du phénomène par la mutation LYK\_AAA ne supporte pas cette explication. Un effet similaire de GABA-B1 LYK\_AAA sur le décompte cellulaire a d'ailleurs été observé, alors que celui-ci est exprimé à des niveaux presque semblables à GABA-B1-CT (données non présentées). Il ne semble donc pas y avoir de corrélation entre quantité des protéines exprimées et décompte cellulaire.



En conclusion, l'existence de récepteurs GABA-B réticulaires et golgiens, sensibles au réservoir intracellulaire de GABA et capables de réguler les programmes génétiques ATF-4-dépendants, si bien réelle, élargirait les horizons de la signalisation intracellulaire médiée par les récepteurs 7-TMs. La figure récapitulative 1 résume cette possible voie de signalisation initiée depuis les endomembranes qui pourrait contribuer aux actions retardées de l'activation des récepteurs GABA-B, tant dans le contexte du cerveau mature (plasticité synaptique) que de celui en développement (prolifération et migration cellulaire, formation et stabilisation de réseaux). Dans un contexte de coexpression de la sous-unité GABA-B2, de tels mécanismes pourraient bien évidemment être opérationnels en parallèle avec les mécanismes de signalisation rapide impliquant le couplage, via une protéine G, des effecteurs classiques que sont les canaux Kir3 et Ca<sup>2+</sup> voltage-dépendants ainsi que l'adénylate cyclase. On peut par extension envisager une double fonction pour GABA-B2 de couplage des effecteurs classiques à la membrane de surface et d'inhibiteur de la dégradation endomembranaire de la queue C-terminale de GABA-B1.



**Figure récapitulative 1. Multiples réservoirs de récepteurs GABA-B1 intracellulaires.** Cette figure illustre les différents réservoirs de récepteurs GABA-B1 dans les contextes astrocytaire ou neuronal. Le réservoir réticulaire (1) apparaît le plus important dans le contexte astrocytaire. Nos travaux montrent que ces récepteurs peuvent coupler la voie MAPK-ERK1/2 dans un contexte d'inhibition de PKC. Le couplage de cette voie par des récepteurs GABA-B1 ciblés transitoirement à la surface (2) demeure également une possibilité. Le deuxième mode de signalisation des récepteurs GABA-B1 réticulaires suggéré par nos travaux implique l'interférence avec le ciblage nucléaire d'ATF-4, facteur de transcription partenaire de GABA-B1 et régulateur de gènes impliqués dans le stress cellulaire, le transport d'acides aminés et le métabolisme. Cette interférence, qui amènerait une dégradation accélérée d'ATF-4 par le protéasome, empêcherait la régulation de gènes-cibles par ATF-4 (dimérisé ou non à d'autres facteurs de transcription partenaires) et aurait un impact négatif sur la survie cellulaire. Que cette régulation d'ATF-4 par GABA-B1 dépende d'un motif pseudo-PDZ C-terminal LYK pourrait suggérer l'implication hypothétique d'une tierce protéine, stabilisatrice de GABA-B1 et/ou de l'interaction GABA-B1-ATF-4. Le mode de signalisation proposé est susceptible d'impliquer des récepteurs GABA-B1 réticulaires intègres ou encore assujettis à la protéolyse régulée. Cela reste à être déterminé formellement. Le réservoir GABA-B1 golgien (3), constitué essentiellement de l'isoforme GABA-B1B et moins important que le réservoir réticulaire, pourrait également opérer par les mécanismes sus-mentionnés. En dernier lieu, les réservoirs vésiculaire (4) et membranaire (5) sont quant à eux vraisemblablement constitués de dimères GABA-B1/B2. Les récepteurs GABA-B de surface intègrent des signaux extracellulaires par le couplage  $G_{i/o}$  –dépendant de canaux  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  et de l'adénylate cyclase.

## **Chapitre V – Directions futures GABA-B1 et MAPK-ERK1/2**

### **5.1 Identification des isoformes PKC impliquées dans la modulation de la voie MAPK-ERK1/2 par GABA-B1**

Il serait intéressant de définir quelles isoformes PKC sont impliquées dans la modulation de la voie MAPK-ERK1/2 par les récepteurs GABA-B1 localisés au RE. Cela pourrait être accompli par des études de surexpression ou de «knock-out» (utilisation d'ARNs interférentiels) des différentes isoformes PKC.

### **5.2 Cibles cytosoliques et nucléaires de la voie MAPK-ERK1/2 en aval de GABA-B1**

La cinétique d'activation (transitoire vs soutenue) de la voie-MAPK-ERK1/2 régule la translocation nucléaire d'ERK1/2 et ainsi la nature des substrats (cytosoliques ou nucléaires) phosphorylés par cette dernière. Il serait ainsi intéressant de caractériser avec plus de détails les substrats régulés par la voie MAPK-ERK1/2 en aval de GABA-B1, par l'utilisation de kits ELISA conçus avec des phospho-anticorps d'une série de substrats connus d'ERK1/2. L'immunoprécipitation de la chromatine pourrait également contribuer à mieux définir les substrats nucléaires.

### **5.3 Régulation directe de la traduction par les récepteurs GABA-B1 localisés au réticulum endoplasmique**

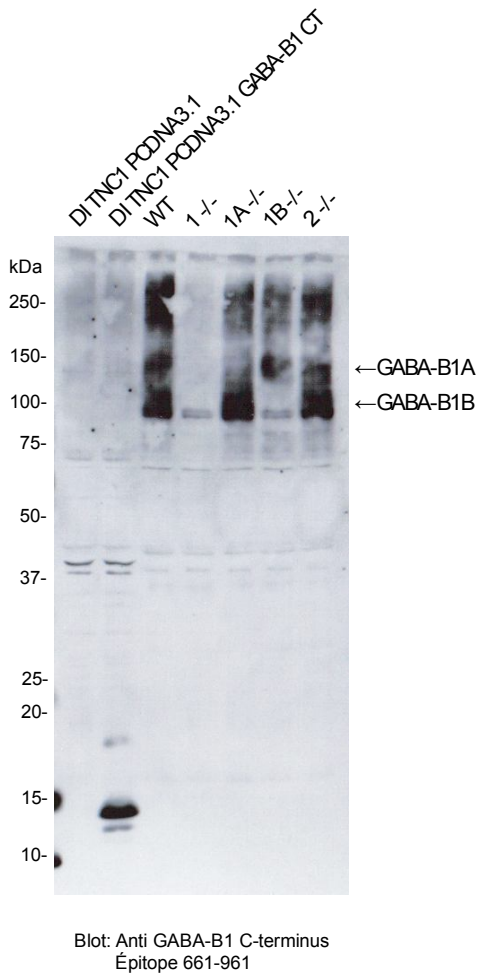
Nos travaux ont montré la capacité du récepteur GABA-B1 localisé au RE à activer eIF4E, facteur d'initiation de la traduction. La possibilité d'une régulation directe de la traduction par des récepteurs à 7-TMs localisés à la membrane du RE, chef-lieu de la synthèse protéique cellulaire, nous apparait d'intérêt. L'éventualité qu'elle soit tributaire

de complexes multiprotéiques incluant récepteur GABA-B1 réticulaires et composantes de la machinerie traductionnelle (sous-unités ribosomales, facteurs d'initiation, etc..) mérite d'être évaluée.

## **GABA-B1 intranucléaire**

### **5.4 Confirmation de l'identité du fragment 18kDa**

Il nous faudra prouver que le fragment de GABA-B1-CT potentiel de 18kDa est bel et bien la queue C-terminale du récepteur GABA-B1. Les limites de l'anticorps polyclonal utilisé en matière de spécificité l'imposent. Nous avons tenté d'enrichir le fragment GABA-B1 potentiel de 18kDa par immunoprécipitation et « GST pulldowns », dans le dessein d'une identification finale en spectrométrie de masse, mais sans succès (données non-présentées). L'utilisation de la chromatographie par échange de cations apparaît plus prometteuse étant donné le pI prédit relativement élevé de GABA-B1-CT (8,94). Un autre moyen tenté a été l'immunobuvardage de type western de lysats de cerveaux de souris « knock-out » GABA-B1<sup>-/-</sup>, GABA-B1A<sup>-/-</sup>, GABA-B1B<sup>-/-</sup> et GABA-B2<sup>-/-</sup> avec anti-GABA-B1-CT (fig. suppl. 1). Nous n'avons toutefois pu détecter GABA-B1-CT dans ces conditions. L'utilisation d'extraits nucléaires issus de ces cerveaux pourrait faciliter la détection. En somme, la confirmation de l'identité du fragment GABA-B1-CT de 18kDa nécessitera l'optimisation des approches classiques de purification des protéines de même que l'optimisation des conditions de détection.



**Figure supplémentaire 1. Absence de détection du fragment GABA-B1 de 18kDa en lysats cellulaires entiers de cerveaux de souris « knock-out »  $GABA-B1^{-/-}$ ,  $GABA-B1A^{-/-}$ ,  $GABA-B1B^{-/-}$  et  $GABA-B2^{-/-}$ .** Immunobuvardage de type western de lysats de cerveaux entiers de souris WT (puit 3), « knock-out »  $GABA-B1^{-/-}$  (puit 4),  $GABA-B1A^{-/-}$  (puit 5),  $GABA-B1B^{-/-}$  (puit 6) et  $GABA-B2^{-/-}$  (puit 7). Des lysats entiers de cellules DI-TNC1 transfectées avec pcDNA3.1 (puit 1) et pcDNA3.1-V5-GABA-B1-CT (puit 2) ont également analysés. Les données sont représentatives d'au moins 3 expériences indépendantes.

## 5.5 Détermination des endopeptidases impliquées

Il faudrait également préciser les endopeptidases responsables des événements protéolytiques initiaux et terminaux de GABA-B1, à l'image de ce qui a par exemple été fait pour le récepteur mGluR1 $\alpha$ , donc par caractérisation pharmacologique approfondie

combinée à l'utilisation de protéases recombinantes en essais *in vitro* [Xu et al. 2007]. L'identification d'un motif précis de clivage à l'aide de récepteurs GABA-B1 mutés est également envisageable.

## **5.6 Clarification du rôle du ligand pseudo-PDZ et du domaine PEST de GABA-B1**

La recherche d'une protéine à domaines PDZ capable d'interagir avec le motif pseudo-PDZ de GABA-B1 et ainsi de réguler la dégradation de la queue C-terminale, puis de favoriser la formation de complexes multiprotéiques incluant ATF-4 apparaît toute indiquée. Cela serait envisageable par l'utilisation des approches classiques de l'étude des interactions protéine-protéine. Le 5<sup>ème</sup> domaine PDZ de la phosphotyrosine phosphatase PTPbas/ FAP-1, protéine promotrice ou suppresseur de tumeur selon le contexte cellulaire, est un candidat potentiel, sur la base de son affinité pour les ligands PDZ artificiels portant des résidus lysine en position 0 [Songyang et al. 1997].

La queue C-terminale de GABA-B1 contient un motif PEST, lié à la courte demi-vie d'une variété de protéines signalisatrices intracellulaires tels que mentionné précédemment [Belizario et al. 2008]. Les motifs PEST, des segments protéiques désordonnés, seraient facilement reconnus par le protéasome, quoique les mécanismes de dégradation protéosomiaux ubiquitine-dépendants et indépendants des protéines portant ces motifs demeurent mal définis. Il serait ainsi intéressant d'explorer ces mécanismes dans le contexte de GABA-B1. Il serait tout d'abord possible de vérifier l'ubiquitination de GABA-B1 en conditions *in vitro*. On peut envisager que le complexe ubiquitine ligase E3 SCF<sup>βTrCP</sup>, impliqué dans l'ubiquitination d'ATF-4, soit également responsable de

l'ubiquitination de GABA-B1. Il serait par la suite possible d'étudier le lien entre l'occupation du motif pseudo-PDZ, l'ubiquitination et l'initiation des mécanismes de dégradation protéosomiaux. La détermination de l'endroit où se produit tous ces événements (cytosol versus noyau) serait de plus pertinente étant donné l'existence d'une machinerie protéosomale nucléaire [von Mikecz, 2006].

### **5.7 Clarification de l'effet de la surexpression de GABA-B1-CT sur le décompte cellulaire**

La surexpression de GABA-B1 diminue le décompte cellulaire des cellules DI-TNC1. Il sera important de déterminer quel processus physiologique est impliqué (augmentation de l'apoptose, ralentissement du cycle cellulaire, etc.). Le décompte cellulaire des cellules précurseurs neuronales et gliales est finement régulé dans les zones ventriculaires et sous-ventriculaires du cerveau embryonnaire lors des étapes de prolifération et de migration. Une meilleure compréhension des mécanismes de régulation du décompte cellulaire par le récepteur GABA-B contribuerait à expliquer les effets du signal GABA lors de ces étapes critiques du développement cérébral.

### **5.8 Impact sur la transcription ATF-4**

Le facteur de transcription ATF-4 régule la transcription de gènes-cibles par interaction avec le site consensus ATF/CREB "TGACGTCA", présent dans les séquences promotrices de ses gènes-cibles et partagé avec plusieurs autres membres de la famille des facteurs de transcription de type « glissière à leucine et domaine basique ». L'influence de GABA-B1 sur la régulation transcriptionnelle d'ATF-4 pourrait donc être étudiée à l'aide de gènes rapporteurs. L'influence de GABA-B1 sur l'interaction



physique entre ATF-4, les autres membres des complexes transcriptionnels ATF-4 de même qu'avec les séquences promotrices pourrait quant à elle être évaluée à l'aide d'approches telles que des essais de retard sur gel ou des immunoprécipitations de chromatine.

Nos données suggèrent à ce moment-ci une régulation de la stabilité d'ATF-4 par GABA-B1-CT. Nous n'avons pas d'évidences à l'effet que des hétéromères GABA-B1-CT/ATF-4 nucléaires régulateurs de la transcription existent. Cette éventualité n'est toutefois pas exclue. De tels hétéromères pourraient posséder leur propre profil de gène-cibles, et pourraient être étudiés à l'aide des approches expérimentales qui viennent d'être mentionnées.

## Bibliographie

1. Andrade, R., R.C. Malenka, and R.A. Nicoll, A G protein couples serotonin and GABAB receptors to the same channels in hippocampus. *Science*, 1986. 234(4781): p. 1261-5.
2. Andreev, J., et al. Src and Pyk2 mediate G-protein-coupled receptor activation of epidermal growth factor receptor (EGFR) but are not required for coupling to the mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling cascade. *J Biol Chem*, 2001. 276(23): p. 20130-5.
3. Angelastro, J.M., et al. Selective destruction of glioblastoma cells by interference with the activity or expression of ATF5. *Oncogene*, 2006. 25(6): p. 907-16.
4. Anliker, B. and J. Chun, Cell surface receptors in lysophospholipid signaling. *Semin Cell Dev Biol*, 2004. 15(5): p. 457-65.
5. Antonopoulos, J., I.S. Pappas, and J.G. Parnavelas, Activation of the GABAA receptor inhibits the proliferative effects of bFGF in cortical progenitor cells. *Eur J Neurosci*, 1997. 9(2): p. 291-8.
6. Asakura, M., et al. Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: metalloproteinase inhibitors as a new therapy. *Nat Med*, 2002. 8(1): p. 35-40.
7. Asano, T. and N. Ogasawara, Uncoupling of gamma-aminobutyric acid B receptors from GTP-binding proteins by N-ethylmaleimide: effect of N-ethylmaleimide on purified GTP-binding proteins. *Mol Pharmacol*, 1986. 29(3): p. 244-9.
8. Ataman, B., et al. Nuclear trafficking of Drosophila Frizzled-2 during synapse development requires the PDZ protein dGRIP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(20): p. 7841-6.
9. Avishai-Eliner, S., et al. Stressed-out, or in (utero)? *Trends Neurosci*, 2002. 25(10): p. 518-24.
10. Azuma, H., et al. Gamma-aminobutyric acid as a promoting factor of cancer metastasis; induction of matrix metalloproteinase production is potentially its underlying mechanism. *Cancer Res*, 2003. 63(23): p. 8090-6.
11. Badran, S., M. Schmutz, and H.R. Olpe, Comparative in vivo and in vitro studies with the potent GABAB receptor antagonist, CGP 56999A. *Eur J Pharmacol*, 1997. 333(2-3): p. 135-42.
12. Bai, M., S. Trivedi, and E.M. Brown, Dimerization of the extracellular calcium-sensing receptor (CaR) on the cell surface of CaR-transfected HEK293 cells. *J Biol Chem*, 1998. 273(36): p. 23605-10.
13. Bak, L.K., A. Schousboe, and H.S. Waagepetersen, The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J Neurochem*, 2006. 98(3): p. 641-53.
14. Balasubramanian, S., S.R. Fam, and R.A. Hall, GABAB receptor association with the PDZ scaffold MUPP-1 alters receptor stability and function. *J Biol Chem*, 2007. 282(6): p. 4162-71.
15. Balasubramanian, S., et al. Hetero-oligomerization between GABAA and GABAB receptors regulates GABAB receptor trafficking. *J Biol Chem*, 2004. 279(18): p. 18840-50.
16. Balazs, R., et al. The operation of the gamma-aminobutyrate bypath of the tricarboxylic acid cycle in brain tissue in vitro. *Biochem J*, 1970. 116(3): p. 445-61.
17. Balcar, V.J. and G.A. Johnston, High affinity uptake of transmitters: studies on the uptake of L-aspartate, GABA, L-glutamate and glycine in cat spinal cord. *J Neurochem*, 1973. 20(2): p. 529-39.
18. Bayer, S.A., et al. Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. *Neurotoxicology*, 1993. 14(1): p. 83-144.
19. Beart, P.M. and G.A. Johnston, GABA uptake in rat brain slices: inhibition by GABA analogues and by various drugs. *J Neurochem*, 1973. 20(2): p. 319-24.
20. Behar, T.N., et al. GABA stimulates chemotaxis and chemokinesis of embryonic cortical neurons via calcium-dependent mechanisms. *J Neurosci*, 1996. 16(5): p. 1808-18.
21. Behar, T.N., et al. GABA receptor antagonists modulate postmitotic cell migration in slice cultures of embryonic rat cortex. *Cereb Cortex*, 2000. 10(9): p. 899-909.
22. Behar, T.N., et al. GABA(B) receptors mediate motility signals for migrating embryonic cortical cells. *Cereb Cortex*, 2001. 11(8): p. 744-53.
23. Belcheva M. et al., Novel opioid binding sites associated with nuclei of NG108-15 neurohybrid cells. *J Neurosci*, 1993. 13(1): p. 104-14.
24. Belcheva, M.M. and C.J. Coscia, Diversity of G protein-coupled receptor signaling pathways to ERK/MAP kinase. *Neurosignals*, 2002. 11(1): p. 34-44.
25. Belhage, B., G.H. Hansen, and A. Schousboe, Depolarization by K<sup>+</sup> and glutamate activates different neurotransmitter release mechanisms in GABAergic neurons: vesicular versus non-vesicular release of GABA. *Neuroscience*, 1993. 54(4): p. 1019-34.

26. Belizario, J.E., et al. Coupling caspase cleavage and proteasomal degradation of proteins carrying PEST motif. *Curr Protein Pept Sci*, 2008. 9(3): p. 210-20.
27. Benardo, L.S., Separate activation of fast and slow inhibitory postsynaptic potentials in rat neocortex in vitro. *J Physiol*, 1994. 476(2): p. 203-15.
28. Ben-Ari, Y., Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci*, 2002. 3(9): p. 728-39.
29. Benke, D., et al. Analysis of the presence and abundance of GABAA receptors containing two different types of alpha subunits in murine brain using point-mutated alpha subunits. *J Biol Chem*, 2004. 279(42): p. 43654-60.
30. Bernath, S., Calcium-independent release of amino acid neurotransmitters: fact or artifact? *Prog Neurobiol*, 1992. 38(1): p. 57-91.
31. Berthele, A., et al. Expression of GABA(B1) and GABA(B2) mRNA in the human brain. *Neuroreport*, 2001. 12(15): p. 3269-75.
32. Bettler, B., et al. Molecular structure and physiological functions of GABA(B) receptors. *Physiol Rev*, 2004. 84(3): p. 835-67.
33. Bhattacharya M. et al., Nuclear localization of prostaglandin E2 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998. 95(26): p. 15792-7.
34. Bhattacharya M. et al., Localization of functional prostaglandin E2 receptors EP3 and EP4 in the nuclear envelope. *J Biol Chem*, 1999. 274(22): p. 15719-24.
35. Bichet, D., et al. The I-II loop of the Ca<sup>2+</sup> channel alpha1 subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the beta subunit. *Neuron*, 2000. 25(1): p. 177-90.
36. Biscardi, J.S., et al. c-Src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on Tyr845 and Tyr1101 is associated with modulation of receptor function. *J Biol Chem*, 1999. 274(12): p. 8335-43.
37. Bkaily G. et al., Presence of functional endothelin-1 receptors in nuclear membranes of human aortic vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2000. 36(5 Suppl 1): S414-7.
38. Bkaily G. et al., Angiotensin II AT1 receptor internalization, translocation and de novo synthesis modulate cytosolic and nuclear calcium in human vascular smooth muscle cells. *Can J Physiol Pharmacol*, 2003. 81(3): p. 274-87.
39. Black, R.A., et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature*, 1997. 385(6618): p. 729-33.
40. Boer P.A. and J.A. Gontijo, Nuclear localization of SP, CGRP, and NK1R in a subpopulation of dorsal root ganglia subpopulation cells in rats. *Cell Mol Neurobiol*, 2006. 26(2): p. 191-207.
41. Boivin B. et al., Functional endothelin receptors are present on nuclei in cardiac ventricular myocytes. *J Biol Chem*, 2003. 278(31): p. 29153-63.
42. Boivin B. et al., Functional beta-adrenergic receptor signalling on nuclear membranes in adult rat and mouse ventricular cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*, 2006. 71(1): p. 69-78.
43. Boivin, B., et al. G protein-coupled receptors in and on the cell nucleus: a new signaling paradigm? *J Recept Signal Transduct Res*, 2008. 28(1-2): p. 15-28.
44. Booz G.W. et al., Angiotensin-II-binding sites on hepatocyte nuclei. *Endocrinology*, 1992. 130(6): p. 3641-9.
45. Borden, L.A., et al. Molecular heterogeneity of the gamma-aminobutyric acid (GABA) transport system. Cloning of two novel high affinity GABA transporters from rat brain. *J Biol Chem*, 1992. 267(29): p. 21098-104.
46. Bordey, A., Enigmatic GABAergic networks in adult neurogenic zones. *Brain Res Rev*, 2007. 53(1): p. 124-34.
47. Bowery, N.G., et al. International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian gamma-aminobutyric acid(B) receptors: structure and function. *Pharmacol Rev*, 2002. 54(2): p. 247-64.
48. Bowery, N.G., et al. (-)Baclofen decreases neurotransmitter release in the mammalian CNS by an action at a novel GABA receptor. *Nature*, 1980. 283(5742): p. 92-4.
49. Bridges, D. and G.B. Moorhead, 14-3-3 proteins: a number of functions for a numbered protein. *Sci STKE*, 2004. 2004(242): p. re10.
50. Brock, C., et al. Assembly-dependent surface targeting of the heterodimeric GABAB Receptor is controlled by COPI but not 14-3-3. *Mol Biol Cell*, 2005. 16(12): p. 5572-8.

51. Brooks-Kayal, A.R., et al. Selective changes in single cell GABA(A) receptor subunit expression and function in temporal lobe epilepsy. *Nat Med*, 1998. 4(10): p. 1166-72.
52. Brown, M.S., et al. Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell*, 2000. 100(4): p. 391-8.
53. Brucato, F.H., et al. Hippocampal long-term potentiation and spatial learning in the rat: effects of GABAB receptor blockade. *Neuroscience*, 1996. 74(2): p. 331-9.
54. Buckley A.R., P.D. Crowe, and D.H. Russell, Rapid activation of protein kinase C in isolated rat liver nuclei by prolactin, a known hepatic mitogen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. 85(22): p. 8649-53.
55. Burke, P., K. Schooler, and H.S. Wiley, Regulation of epidermal growth factor receptor signaling by endocytosis and intracellular trafficking. *Mol Biol Cell*, 2001. 12(6): p. 1897-910.
56. Buu N.T., R. Hui, and P. Falardeau, Norepinephrine in neonatal rat ventricular myocytes: association with the cell nucleus and binding to nuclear alpha 1- and beta-adrenergic receptors. *J Mol Cell Cardiol*, 1993. 25(9): p. 1037-46.
57. Calver, A.R., et al. Molecular cloning and characterisation of a novel GABAB-related G-protein coupled receptor. *Brain Res Mol Brain Res*, 2003. 110(2): p. 305-17.
58. Calver, A.R., et al. The C-terminal domains of the GABA(b) receptor subunits mediate intracellular trafficking but are not required for receptor signaling. *J Neurosci*, 2001. 21(4): p. 1203-10.
59. Campbell, V., N. Berrow, and A.C. Dolphin, GABAB receptor modulation of Ca<sup>2+</sup> currents in rat sensory neurones by the G protein G(0): antisense oligonucleotide studies. *J Physiol*, 1993. 470: p. 1-11.
60. Cao, X. and T.C. Sudhof, A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science*, 2001. 293(5527): p. 115-20.
61. Carpenter, G., EGF receptor transactivation mediated by the proteolytic production of EGF-like agonists. *Sci STKE*, 2000. 2000(15): p. PE1.
62. Carpenter, G., Nuclear localization and possible functions of receptor tyrosine kinases. *Curr Opin Cell Biol*, 2003. 15(2): p. 143-8.
63. Castellano, C., et al. Strain-dependent effects of post-training GABA receptor agonists and antagonists on memory storage in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 1993. 111(2): p. 134-8.
64. Cavanagh H.D. and A.M. Colley, The molecular basis of neurotrophic keratitis. *Acta Ophthalmol Suppl*, 1989. 192: p. 115-34.
65. Chabot J.G. et al., Evidence for a direct action of neuropeptide Y in the rat pituitary gland. *Neuroendocrinology*, 1988. 47(6): p. 511-7.
66. Chang, X.B., et al. Removal of multiple arginine-framed trafficking signals overcomes misprocessing of delta F508 CFTR present in most patients with cystic fibrosis. *Mol Cell*, 1999. 4(1): p. 137-42.
67. Charles, K.J., et al. Comparative immunohistochemical localisation of GABA(B1a), GABA(B1b) and GABA(B2) subunits in rat brain, spinal cord and dorsal root ganglion. *Neuroscience*, 2001. 106(3): p. 447-67.
68. Chen, A., et al. Inducible enhancement of memory storage and synaptic plasticity in transgenic mice expressing an inhibitor of ATF4 (CREB-2) and C/EBP proteins. *Neuron*, 2003. 39(4): p. 655-69.
69. Chen, H.J., et al. A synaptic Ras-GTPase activating protein (p135 SynGAP) inhibited by CaM kinase II. *Neuron*, 1998. 20(5): p. 895-904.
70. Chen, Q., N. Olashaw, and J. Wu, Participation of reactive oxygen species in the lysophosphatidic acid-stimulated mitogen-activated protein kinase kinase activation pathway. *J Biol Chem*, 1995. 270(48): p. 28499-502.
71. Chieng, B. and J.M. Bekkers, GABA(B), opioid and alpha2 receptor inhibition of calcium channels in acutely-dissociated locus coeruleus neurones. *Br J Pharmacol*, 1999. 127(7): p. 1533-8.
72. Chiu, V.K., et al. Ras signalling on the endoplasmic reticulum and the Golgi. *Nat Cell Biol*, 2002. 4(5): p. 343-50.
73. Choy, E., et al. Endomembrane trafficking of ras: the CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi. *Cell*, 1999. 98(1): p. 69-80.
74. Clark, J.A., et al. Distribution of the GABA(B) receptor subunit gb2 in rat CNS. *Brain Res*, 2000. 860(1-2): p. 41-52.
75. Conigrave, A.D., S.J. Quinn, and E.M. Brown, L-amino acid sensing by the extracellular Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(9): p. 4814-9.
76. Connolly, J.L., S.A. Green, and L.A. Greene, Pit formation and rapid changes in surface morphology of sympathetic neurons in response to nerve growth factor. *J Cell Biol*, 1981. 90(1): p. 176-80.

77. Connor, M., et al. Mu-opioid receptor modulation of calcium channel current in periaqueductal grey neurons from C57B16/J mice and mutant mice lacking MOR-1. *Br J Pharmacol*, 1999. 126(7): p. 1553-8.
78. Conti, F., A. Minelli, and M. Melone, GABA transporters in the mammalian cerebral cortex: localization, development and pathological implications. *Brain Res Brain Res Rev*, 2004. 45(3): p. 196-212.
79. Corbit, K.C., D.A. Foster, and M.R. Rosner, Protein kinase Cdelta mediates neurogenic but not mitogenic activation of mitogen-activated protein kinase in neuronal cells. *Mol Cell Biol*, 1999. 19(6): p. 4209-18.
80. Cook J.L. et al., Intracellular angiotensin II fusion protein alters AT1 receptor fusion protein distribution and activates CREB. *J Mol Cell Cardiol*, 2004. 36(1): p. 75-90.
81. Cook J.L. et al., Nuclear accumulation of the AT1 receptor in a rat vascular smooth muscle cell line: effects upon signal transduction and cellular proliferation. *J Mol Cell Cardiol*, 2006. 40(5): p. 696-707.
82. Couve, A., et al. Intracellular retention of recombinant GABAB receptors. *J Biol Chem*, 1998. 273(41): p. 26361-7.
83. Couve, A., et al. Association of GABA(B) receptors and members of the 14-3-3 family of signaling proteins. *Mol Cell Neurosci*, 2001. 17(2): p. 317-28.
84. Couve, A., et al. Marlin-1, a novel RNA-binding protein associates with GABA receptors. *J Biol Chem*, 2004. 279(14): p. 13934-43.
85. Couve, A., et al. Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation facilitates GABA(B) receptor-effector coupling. *Nat Neurosci*, 2002. 5(5): p. 415-24.
86. Crespo, P., et al. Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein beta gamma subunits. *Nature*, 1994. 369(6479): p. 418-20.
87. Crunelli, V. and N. Leresche, A role for GABAB receptors in excitation and inhibition of thalamocortical cells. *Trends Neurosci*, 1991. 14(1): p. 16-21.
88. Cupers, P., et al. The amyloid precursor protein (APP)-cytoplasmic fragment generated by gamma-secretase is rapidly degraded but distributes partially in a nuclear fraction of neurones in culture. *J Neurochem*, 2001. 78(5): p. 1168-78.
89. Curtis, D.R. and G.A. Johnston, Amino acid transmitters in the mammalian central nervous system. *Ergeb Physiol*, 1974. 69(0): p. 97-188.
90. Daaka, Y., L.M. Luttrell, and R.J. Lefkowitz, Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature*, 1997. 390(6655): p. 88-91.
91. Dalbey, R.E., et al. The chemistry and enzymology of the type I signal peptidases. *Protein Sci*, 1997. 6(6): p. 1129-38.
92. Daub, H., et al. Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature*, 1996. 379(6565): p. 557-60.
93. Davies, C.H. and G.L. Collingridge, Regulation of EPSPs by the synaptic activation of GABAB autoreceptors in rat hippocampus. *J Physiol*, 1996. 496 ( Pt 2): p. 451-70.
94. De Mello W.C., Intracellular angiotensin II regulates the inward calcium current in cardiac myocytes. *Hypertension*, 1998. 32(6): p. 976-82.
95. Deuss, M., K. Reiss, and D. Hartmann, Part-time alpha-secretases: the functional biology of ADAM 9, 10 and 17. *Curr Alzheimer Res*, 2008. 5(2): p. 187-201.
96. Dhanasekaran, D.N. and G.L. Johnson, MAPKs: function, regulation, role in cancer and therapeutic targeting. *Oncogene*, 2007. 26(22): p. 3097-9.
97. Dhanasekaran, D.N., et al. Scaffold proteins of MAP-kinase modules. *Oncogene*, 2007. 26(22): p. 3185-202.
98. Dhillon, A.S., et al. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*, 2007. 26(22): p. 3279-90.
99. Di Guglielmo, G.M., et al. Compartmentalization of SHC, GRB2 and mSOS, and hyperphosphorylation of Raf-1 by EGF but not insulin in liver parenchyma. *Embo J*, 1994. 13(18): p. 4269-77.
100. Dignam, J.D., R.M. Lebovitz, and R.G. Roeder, Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res*, 1983. 11(5): p. 1475-89.
101. Diverse-Pierluissi, M., et al. Novel form of crosstalk between G protein and tyrosine kinase pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(10): p. 5417-21.
102. Domeniconi et al. MAG induces regulated intramembrane proteolysis of the p75 neurotrophin receptor to inhibit neurite outgrowth. *Neuron*, 2005. 46(6):849-55.

103. Downward, J., Control of ras activation. *Cancer Surv*, 1996. 27: p. 87-100.
104. Drell, T.L.t., et al. Effects of neurotransmitters on the chemokinesis and chemotaxis of MDA-MB-468 human breast carcinoma cells. *Breast Cancer Res Treat*, 2003. 80(1): p. 63-70.
105. Dunlap, K., Two types of gamma-aminobutyric acid receptor on embryonic sensory neurones. *Br J Pharmacol*, 1981. 74(3): p. 579-85.
106. Dunlap, K. and G.D. Fischbach, Neurotransmitters decrease the calcium conductance activated by depolarization of embryonic chick sensory neurones. *J Physiol*, 1981. 317: p. 519-35.
107. Durkin, M.M., et al. An in situ hybridization study of the distribution of the GABA(B2) protein mRNA in the rat CNS. *Brain Res Mol Brain Res*, 1999. 71(2): p. 185-200.
108. Duthey, B., et al. A single subunit (GB2) is required for G-protein activation by the heterodimeric GABA(B) receptor. *J Biol Chem*, 2002. 277(5): p. 3236-41.
109. Eggena P. et al., Nuclear angiotensin receptors induce transcription of renin and angiotensinogen mRNA. *Hypertension*, 1993. 22(4): p. 496-501.
110. Eggena P. et al., Hepatic angiotensin II nuclear receptors and transcription of growth-related factors. *J Hypertens*, 1996. 14(8): p. 961-8.
111. Erdmann B., K. Fuxe, and D. Ganten, Subcellular localization of angiotensin II immunoreactivity in the rat cerebellar cortex. *Hypertension*, 1996. 28(5): p. 818-24.
112. Ernst, M., et al. Comparative modeling of GABA(A) receptors: limits, insights, future developments. *Neuroscience*, 2003. 119(4): p. 933-43.
113. Estevez, M.A., et al. The neuronal RhoA GEF, Tech, interacts with the synaptic multi-PDZ-domain-containing protein, MUPP-1. *J Neurochem*, 2008.
114. Faucheux C., M.A. Horton, and J.S. Price, Nuclear localization of type I parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptors in deer antler osteoclasts: evidence for parathyroid hormone-related protein and receptor activator of NF-kappaB-dependent effects on osteoclast formation in regenerating mammalian bone. *J Bone Miner Res*, 2002. 17(3): p. 455-64.
115. Faure, M., T.A. Voyno-Yasenskaya, and H.R. Bourne, cAMP and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins stimulate the mitogen-activated protein kinase pathway in COS-7 cells. *J Biol Chem*, 1994. 269(11): p. 7851-4.
116. Fiszman, M.L., L.N. Borodinsky, and J.H. Neale, GABA induces proliferation of immature cerebellar granule cells grown in vitro. *Brain Res Dev Brain Res*, 1999. 115(1): p. 1-8.
117. Fortini, M.E., Gamma-secretase-mediated proteolysis in cell-surface-receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002. 3(9): p. 673-84.
118. Freedman, N.J., et al. Phosphorylation and desensitization of the human beta 1-adrenergic receptor. Involvement of G protein-coupled receptor kinases and cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, 1995. 270(30): p. 17953-61.
119. Fritschy, J.M., et al. GABAB-receptor splice variants GB1a and GB1b in rat brain: developmental regulation, cellular distribution and extrasynaptic localization. *Eur J Neurosci*, 1999. 11(3): p. 761-8.
120. Gahwiler, B.H. and D.A. Brown, GABAB-receptor-activated K<sup>+</sup> current in voltage-clamped CA3 pyramidal cells in hippocampal cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985. 82(5): p. 1558-62.
121. Galvez, T., et al. Allosteric interactions between GB1 and GB2 subunits are required for optimal GABA(B) receptor function. *Embo J*, 2001. 20(9): p. 2152-9.
122. Gao, Y. and S.W. Pimplikar, The gamma -secretase-cleaved C-terminal fragment of amyloid precursor protein mediates signaling to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(26): p. 14979-84.
123. Gerber, D., N. Sal-Man, and Y. Shai, Two motifs within a transmembrane domain, one for homodimerization and the other for heterodimerization. *J Biol Chem*, 2004. 279(20): p. 21177-82.
124. Getova, D., N.G. Bowery, and V. Spassov, Effects of GABAB receptor antagonists on learning and memory retention in a rat model of absence epilepsy. *Eur J Pharmacol*, 1997. 320(1): p. 9-13.
125. Ghorbel, M.T., K.G. Becker, and J.M. Henley, Profile of changes in gene expression in cultured hippocampal neurones evoked by the GABAB receptor agonist baclofen. *Physiol Genomics*, 2005. 22(1): p. 93-8.
126. Gillies, R.J., N. Didier, and M. Denton, Determination of cell number in monolayer cultures. *Anal Biochem*, 1986. 159(1): p. 109-13.
127. Gilman, A.G., Nobel Lecture. G proteins and regulation of adenylyl cyclase. *Biosci Rep*, 1995. 15(2): p. 65-97.

128. Gobeil F. Jr et al., Regulation of eNOS expression in brain endothelial cells by perinuclear EP(3) receptors. *Circ Res*, 2002. 90(6): p. 682-9.
129. Gobeil F. Jr et al., Modulation of pro-inflammatory gene expression by nuclear lysophosphatidic acid receptor type-1. *J Biol Chem*, 2003. 278(40): p. 38875-83.
130. Gobeil F. Jr et al. (a), Nitric oxide signaling via nuclearized endothelial nitric-oxide synthase modulates expression of the immediate early genes iNOS and mPGES-1. *J Biol Chem*, 2006. 281(23): p. 16058-67.
131. Gobeil F. et al. (b), G-protein-coupled receptors signalling at the cell nucleus: an emerging paradigm. *Can J Physiol Pharmacol*, 2006. 84(3-4): p. 287-97.
132. Goetz, T., et al. GABA(A) receptors: structure and function in the basal ganglia. *Prog Brain Res*, 2007. 160: p. 21-41.
133. Gonchar, Y., et al. Subcellular localization of GABA(B) receptor subunits in rat visual cortex. *J Comp Neurol*, 2001. 431(2): p. 182-97.
134. Greif, G.J., et al. Altered regulation of potassium and calcium channels by GABA(B) and adenosine receptors in hippocampal neurons from mice lacking Galpha(o). *J Neurophysiol*, 2000. 83(2): p. 1010-8.
135. Grossman, S.R., et al. Polyubiquitination of p53 by a ubiquitin ligase activity of p300. *Science*, 2003. 300(5617): p. 342-4.
136. Guastella, J., et al. Cloning and expression of a rat brain GABA transporter. *Science*, 1990. 249(4974): p. 1303-6.
137. Hall, A., Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*, 1998. 279(5350): p. 509-14.
138. Haller H. et al., Intracellular actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *J Am Soc Nephrol*, 1999. Suppl 11: S75-83.
139. Hammerland, L.G., et al. Domains determining ligand specificity for Ca<sup>2+</sup> receptors. *Mol Pharmacol*, 1999. 55(4): p. 642-8.
140. Hampton RY, Garza RM. Protein quality control as a strategy for cellular regulation: lessons from ubiquitin-mediated regulation of the sterol pathway. *Chem Rev*, 2009. 109(4):1561-74.
141. Harding, H.P., et al. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell*, 2000. 6(5): p. 1099-108.
142. Harding H.P. et al., An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell*. 2003. 11(3):619-33.
143. Harris, B.Z. and W.A. Lim, Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. *J Cell Sci*, 2001. 114(Pt 18): p. 3219-31.
144. Hashimoto, T. and K. Kuriyama, In vivo evidence that GABA(B) receptors are negatively coupled to adenylate cyclase in rat striatum. *J Neurochem*, 1997. 69(1): p. 365-70.
145. Havlickova, M., et al. The intracellular loops of the GB2 subunit are crucial for G-protein coupling of the heteromeric gamma-aminobutyrate B receptor. *Mol Pharmacol*, 2002. 62(2): p. 343-50.
146. Haydar, T.F., et al. Differential modulation of proliferation in the neocortical ventricular and subventricular zones. *J Neurosci*, 2000. 20(15): p. 5764-74.
147. Hebert, T.E., C. Gales, and R.V. Rebois, Detecting and imaging protein-protein interactions during G protein-mediated signal transduction in vivo and in situ by using fluorescence-based techniques. *Cell Biochem Biophys*, 2006. 45(1): p. 85-109.
148. Henderson J.E. et al., Nucleolar localization of parathyroid hormone-related peptide enhances survival of chondrocytes under conditions that promote apoptotic cell death. *Mol Cell Biol*, 1995. 15(8): p. 4064-75.
149. Henn, F.A. and A. Hamberger, Glial cell function: uptake of transmitter substances. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1971. 68(11): p. 2686-90.
150. Hinshaw JE and Schmid SL. Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. *Nature*, 1995. 374(6518):190-2.
151. Hinnebusch, A.G. and K. Natarajan, Gcn4p, a master regulator of gene expression, is controlled at multiple levels by diverse signals of starvation and stress. *Eukaryot Cell*, 2002. 1(1): p. 22-32.
152. Hiron, M., T. Yoshioka, and S. Konishi, GABA(B) receptor activation enhances mGluR-mediated responses at cerebellar excitatory synapses. *Nat Neurosci*, 2001. 4(12): p. 1207-16.
153. Hocher B. et al., Intracellular distribution of endothelin-1 receptors in rat liver cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992. 184(1): p. 498-503.

154. Holthoff, K., Y. Kovalchuk, and A. Konnerth, Dendritic spikes and activity-dependent synaptic plasticity. *Cell Tissue Res*, 2006. 326(2): p. 369-77.
155. Hosli, E. and L. Hosli, Evidence for GABAB-receptors on cultured astrocytes of rat CNS: autoradiographic binding studies. *Exp Brain Res*, 1990. 80(3): p. 621-5.
156. Howard, T.D., et al. Association of a disintegrin and metalloprotease 33 (ADAM33) gene with asthma in ethnically diverse populations. *J Allergy Clin Immunol*, 2003. 112(4): p. 717-22.
157. Hu, Y., et al. Molecular characterization of a metastatic neuroendocrine cell cancer arising in the prostates of transgenic mice. *J Biol Chem*, 2002. 277(46): p. 44462-74.
158. Huang, C.S., et al. Common molecular pathways mediate long-term potentiation of synaptic excitation and slow synaptic inhibition. *Cell*, 2005. 123(1): p. 105-18.
159. Huang, E.J. and L.F. Reichardt, Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem*, 2003. 72: p. 609-42.
160. Huang, H., et al. Gene expression profiling and subgroup identification of oligodendrogliomas. *Oncogene*, 2004. 23(35): p. 6012-22.
161. Huang Y. et al., An alpha1A-adrenergic-extracellular signal-regulated kinase survival signaling pathway in cardiac myocytes. *Circulation*, 2007. 115(6): p. 763-72.
162. Hubbard, S.R. and J.H. Till, Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu Rev Biochem*, 2000. 69: p. 373-98.
163. Huovila, A.P., et al. Shedding light on ADAM metalloproteinases. *Trends Biochem Sci*, 2005. 30(7): p. 413-22.
164. Ishibe, S., et al. Phosphorylation-dependent paxillin-ERK association mediates hepatocyte growth factor-stimulated epithelial morphogenesis. *Mol Cell*, 2003. 12(5): p. 1275-85.
165. Ishii, I., et al. Lysophospholipid receptors: signaling and biology. *Annu Rev Biochem*, 2004. 73: p. 321-54.
166. Iversen, L.L. and F.E. Bloom, Studies of the uptake of 3 H-gaba and ( 3 H)glycine in slices and homogenates of rat brain and spinal cord by electron microscopic autoradiography. *Brain Res*, 1972. 41(1): p. 131-43.
167. Izumi, Y., et al. A metalloprotease-disintegrin, MDC9/meltrin-gamma/ADAM9 and PKCdelta are involved in TPA-induced ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *Embo J*, 1998. 17(24): p. 7260-72.
168. Jacobson, L.H., et al. Behavioral evaluation of mice deficient in GABA(B(1)) receptor isoforms in tests of unconditioned anxiety. *Psychopharmacology (Berl)*, 2007. 190(4): p. 541-53.
169. Jacques D. et al., Presence of neuropeptide Y and the Y1 receptor in the plasma membrane and nuclear envelope of human endocardial endothelial cells: modulation of intracellular calcium. *Can J Physiol Pharmacol*, 2003. 81(3): p. 288-300.
170. Jacques D. et al., The distribution and density of ET-1 and its receptors are different in human right and left ventricular endocardial endothelial cells. *Peptides*, 2005. 26(8): p. 1427-35.
171. Ji, F., N. Kanbara, and K. Obata, GABA and histogenesis in fetal and neonatal mouse brain lacking both the isoforms of glutamic acid decarboxylase. *Neurosci Res*, 1999. 33(3): p. 187-94.
172. Jiang, X. and A. Sorkin, Coordinated traffic of Grb2 and Ras during epidermal growth factor receptor endocytosis visualized in living cells. *Mol Biol Cell*, 2002. 13(5): p. 1522-35.
173. Johnson, J.W. and P. Ascher, Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature*, 1987. 325(6104): p. 529-31.
174. Jones, K.A., et al. GABA(B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA(B)R1 and GABA(B)R2. *Nature*, 1998. 396(6712): p. 674-9.
175. Joseph, J., et al. The neurotransmitter gamma-aminobutyric acid is an inhibitory regulator for the migration of SW 480 colon carcinoma cells. *Cancer Res*, 2002. 62(22): p. 6467-9.
176. Jura, N., et al. Differential modification of Ras proteins by ubiquitination. *Mol Cell*, 2006. 21(5): p. 679-87.
177. Kahn, B.B., et al. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab*, 2005. 1(1): p. 15-25.
178. Kajikawa, Y., N. Saitoh, and T. Takahashi, GTP-binding protein beta gamma subunits mediate presynaptic calcium current inhibition by GABA(B) receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(14): p. 8054-8.
179. Kanehara, K., K. Ito, and Y. Akiyama, YaeL proteolysis of RseA is controlled by the PDZ domain of



- Yael and a Gln-rich region of RseA. *Embo J*, 2003. 22(23): p. 6389-98.
180. Kang, J., et al. Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat Neurosci*, 1998. 1(8): p. 683-92.
181. Kaupmann, K., et al. Expression cloning of GABA(B) receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. *Nature*, 1997. 386(6622): p. 239-46.
182. Kaupmann, K., et al. GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature*, 1998. 396(6712): p. 683-7.
183. Kaupmann, K., et al. Human gamma-aminobutyric acid type B receptors are differentially expressed and regulate inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(25): p. 14991-6.
184. Keely, S.J., S.O. Calandrella, and K.E. Barrett, Carbachol-stimulated transactivation of epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinase in T(84) cells is mediated by intracellular ca(2+), PYK-2, and p60(src). *J Biol Chem*, 2000. 275(17): p. 12619-25.
185. Kenakin, T., Ligand-selective receptor conformations revisited: the promise and the problem. *Trends Pharmacol Sci*, 2003. 24(7): p. 346-54.
186. Khakh, B.S., et al. State-dependent cross-inhibition between transmitter-gated cation channels. *Nature*, 2000. 406(6794): p. 405-10.
187. Kim, J.H., et al. SynGAP: a synaptic RasGAP that associates with the PSD-95/SAP90 protein family. *Neuron*, 1998. 20(4): p. 683-91.
188. Kim, M.O., et al. Early fetal expression of GABA(B1) and GABA(B2) receptor mRNAs on the development of the rat central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res*, 2003. 143(1): p. 47-55.
189. Kimberly, W.T., et al. The intracellular domain of the beta-amyloid precursor protein is stabilized by Fe65 and translocates to the nucleus in a notch-like manner. *J Biol Chem*, 2001. 276(43): p. 40288-92.
190. Kniazeff, J., et al. No ligand binding in the GB2 subunit of the GABA(B) receptor is required for activation and allosteric interaction between the subunits. *J Neurosci*, 2002. 22(17): p. 7352-61.
191. Knight, A.R. and N.G. Bowery, The pharmacology of adenylyl cyclase modulation by GABAB receptors in rat brain slices. *Neuropharmacology*, 1996. 35(6): p. 703-12.
192. Koch, W.J., et al. Direct evidence that Gi-coupled receptor stimulation of mitogen-activated protein kinase is mediated by G beta gamma activation of p21ras. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(26): p. 12706-10.
193. Kogkopoulou, O., et al. Conditional up-regulation of IL-2 production by p38 MAPK inactivation is mediated by increased Erk1/2 activity. *J Leukoc Biol*, 2006. 79(5): p. 1052-60.
194. Kopan, R. and M.X. Ilagan, Gamma-secretase: proteasome of the membrane? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004. 5(6): p. 499-504.
195. Kranenburg et al. Gi-mediated activation of the Ras/MAP kinase pathway involves a 100 kDa tyrosine-phosphorylated Grb2 SH3 binding protein, but not Src nor Shc. *EMBO J*, 1997. 16(11):3097-105.
196. Kranenburg, O. and W.H. Moolenaar, Ras-MAP kinase signaling by lysophosphatidic acid and other G protein-coupled receptor agonists. *Oncogene*, 2001. 20(13): p. 1540-6.
197. Krapivinsky, G., et al. SynGAP-MUPP-1-CaMKII synaptic complexes regulate p38 MAP kinase activity and NMDA receptor-dependent synaptic AMPA receptor potentiation. *Neuron*, 2004. 43(4): p. 563-74.
198. Kreienkamp, H.J., Organisation of G-protein-coupled receptor signalling complexes by scaffolding proteins. *Curr Opin Pharmacol*, 2002. 2(5): p. 581-6.
199. Kronenwett, R., et al. Distinct molecular phenotype of malignant CD34(+) hematopoietic stem and progenitor cells in chronic myelogenous leukemia. *Oncogene*, 2005. 24(34): p. 5313-24.
200. Kubo, Y., T. Miyashita, and Y. Murata, Structural basis for a Ca<sup>2+</sup>-sensing function of the metabotropic glutamate receptors. *Science*, 1998. 279(5357): p. 1722-5.
201. Kuner, R., et al. Role of heteromer formation in GABAB receptor function. *Science*, 1999. 283(5398): p. 74-7.
202. Kunishima, N., et al. Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature*, 2000. 407(6807): p. 971-7.
203. Lambrecq, V., et al. [Intrathecal baclofen in hereditary spastic paraparesis: benefits and limitations.]. *Ann Readapt Med Phys*, 2007.
204. Lanoix D., R. Ouellette, and C. Vaillancourt, Expression of melatonergic receptors in human placental choriocarcinoma cell lines. *Hum Reprod*, 2006. 21(8): p. 1981-9.
205. Larsson, O.M., et al. Effect of homo-beta-proline and other heterocyclic GABA analogues on GABA

- uptake in neurons and astroglial cells and on GABA receptor binding. *J Neurochem*, 1981. 37(6): p. 1509-16.
206. Lassot, I., et al. p300 modulates ATF4 stability and transcriptional activity independently of its acetyltransferase domain. *J Biol Chem*, 2005. 280(50): p. 41537-45.
207. Lassot, I., et al. ATF4 degradation relies on a phosphorylation-dependent interaction with the SCF(betaTrCP) ubiquitin ligase. *Mol Cell Biol*, 2001. 21(6): p. 2192-202.
208. Lee D.K. et al., Agonist-independent nuclear localization of the Apelin, angiotensin AT1, and bradykinin B2 receptors. *J Biol Chem*, 2004. 279(9): p. 7901-8.
209. Lee, F.S., et al. The uniqueness of being a neurotrophin receptor. *Curr Opin Neurobiol*, 2001. 11(3): p. 281-6.
210. Lee, F.S., R. Rajagopal, and M.V. Chao, Distinctive features of Trk neurotrophin receptor transactivation by G protein-coupled receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2002. 13(1): p. 11-7.
211. Lefkowitz, R.J. and S.K. Shenoy, Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science*, 2005. 308(5721): p. 512-7.
212. Lefkowitz, R.J. and E.J. Whalen, beta-arrestins: traffic cops of cell signaling. *Curr Opin Cell Biol*, 2004. 16(2): p. 162-8.
213. Leissring, M.A., et al. A physiologic signaling role for the gamma -secretase-derived intracellular fragment of APP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(7): p. 4697-702.
214. Letourneur, F., et al. Coatamer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum. *Cell*, 1994. 79(7): p. 1199-207.
215. Leung P.K. et al., The truncated ghrelin receptor polypeptide (GHS-R1b) acts as a dominant-negative mutant of the ghrelin receptor. *Cell Signal*, 2007. 19(5): p. 1011-22.
216. Levi, G. and M. Raiteri, GABA and glutamate uptake by subcellular fractions enriched in synaptosomes: critical evaluation of some methodological aspects. *Brain Res*, 1973. 57(1): p. 165-85.
217. Lewthwaite, J.C., et al. A specific mechanomodulatory role for p38 MAPK in embryonic joint articular surface cell MEK-ERK pathway regulation. *J Biol Chem*, 2006. 281(16): p. 11011-8.
218. Li, S.P., et al. Differential distribution of GABA(B1) and GABA(B2) receptor mRNAs in the rat brain. *Mol Cells*, 2003. 16(1): p. 40-7.
219. Li, X., et al. Angiotensin II stimulates ERK via two pathways in epithelial cells: protein kinase C suppresses a G-protein coupled receptor-EGF receptor transactivation pathway. *Embo J*, 1998. 17(9): p. 2574-83.
220. Liebmann, C., Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: paradigms of multiplicity. *Cell Signal*, 2001. 13(11): p. 777-85.
221. Lind G.J. and H.D. Cavanagh, Nuclear muscarinic acetylcholine receptors in corneal cells from rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1993. 34(10): p.2943-52.
222. Lind G.J. and H.D. Cavanagh, Identification and subcellular distribution of muscarinic acetylcholine receptor-related proteins in rabbit corneal and Chinese hamster ovary cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1995. 36(8): p.1492-507.
223. Liu, Q.R., et al. Molecular characterization of four pharmacologically distinct gamma-aminobutyric acid transporters in mouse brain [corrected]. *J Biol Chem*, 1993. 268(3): p. 2106-12.
224. Liu, X., et al. Nonsynaptic GABA signaling in postnatal subventricular zone controls proliferation of GFAP-expressing progenitors. *Nat Neurosci*, 2005. 8(9): p. 1179-87.
225. Lopez-Bendito, G., et al. Blockade of GABA(B) receptors alters the tangential migration of cortical neurons. *Cereb Cortex*, 2003. 13(9): p. 932-42.
226. Lopez-Bendito, G., et al. Expression and distribution of metabotropic GABA receptor subtypes GABABR1 and GABABR2 during rat neocortical development. *Eur J Neurosci*, 2002. 15(11): p. 1766-78.
227. Lopez-Bendito, G., et al. Distribution of metabotropic GABA receptor subunits GABAB1a/b and GABAB2 in the rat hippocampus during prenatal and postnatal development. *Hippocampus*, 2004. 14(7): p. 836-48.
228. Lopez-Illasaca, M., et al. Linkage of G protein-coupled receptors to the MAPK signaling pathway through PI 3-kinase gamma. *Science*, 1997. 275(5298): p. 394-7.
229. LoTurco, J.J., et al. GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. *Neuron*, 1995. 15(6): p. 1287-98.

230. Loup, F., et al. Selective alterations in GABAA receptor subtypes in human temporal lobe epilepsy. *J Neurosci*, 2000. 20(14): p. 5401-19.
231. Lee D.K. et al., Agonist-independent nuclear localization of the Apelin, angiotensin AT1, and bradykinin B2 receptors. *J Biol Chem*, 2004. 279(9): p. 7901-8.
232. Lu D. et al., Angiotensin II-induced nuclear targeting of the angiotensin type 1 (AT1) receptor in brain neurons. *Endocrinology*, 1998. 139(1): p. 365-75.
233. Lujan, R., R. Shigemoto, and G. Lopez-Bendito, Glutamate and GABA receptor signalling in the developing brain. *Neuroscience*, 2005. 130(3): p. 567-80.
234. Luscher, C., et al. G protein-coupled inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels (GIRKs) mediate postsynaptic but not presynaptic transmitter actions in hippocampal neurons. *Neuron*, 1997. 19(3): p. 687-95.
235. Luttrell, L.M., Activation and targeting of mitogen-activated protein kinases by G-protein-coupled receptors. *Can J Physiol Pharmacol*, 2002. 80(5): p. 375-82.
236. Luttrell, L.M., et al. Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science*, 1999. 283(5402): p. 655-61.
237. Luttrell, L.M., et al. Role of c-Src tyrosine kinase in G protein-coupled receptor- and Gbetagamma subunit-mediated activation of mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem*, 1996. 271(32): p. 19443-50.
238. Ma, D. and L.Y. Jan, ER transport signals and trafficking of potassium channels and receptors. *Curr Opin Neurobiol*, 2002. 12(3): p. 287-92.
239. Ma, Y. and L.M. Hendershot, The unfolding tale of the unfolded protein response. *Cell*, 2001. 107(7): p. 827-30.
240. Machiyama, Y., et al. The metabolism of gamma-aminobutyrate and glucose in potassium ion-stimulated brain tissue in vitro. *Biochem J*, 1970. 116(3): p. 469-81.
241. Madsen, K.K., O.M. Larsson, and A. Schousboe, Regulation of excitation by GABA neurotransmission: focus on metabolism and transport. *Results Probl Cell Differ*, 2008. 44: p. 201-21.
242. Malcangio, M. and N.G. Bowery, GABA and its receptors in the spinal cord. *Trends Pharmacol Sci*, 1996. 17(12): p. 457-62.
243. Mamane, Y., et al. eIF4E--from translation to transformation. *Oncogene*, 2004. 23(18): p. 3172-9.
244. Manent, J.B. and A. Represa, Neurotransmitters and brain maturation: early paracrine actions of GABA and glutamate modulate neuronal migration. *Neuroscientist*, 2007. 13(3): p. 268-79.
245. Margeta-Mitrovic, M., Y.N. Jan, and L.Y. Jan, A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization. *Neuron*, 2000. 27(1): p. 97-106.
246. Margeta-Mitrovic, M., Y.N. Jan, and L.Y. Jan, Ligand-induced signal transduction within heterodimeric GABA(B) receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(25): p. 14643-8.
247. Margeta-Mitrovic, M., Y.N. Jan, and L.Y. Jan, Function of GB1 and GB2 subunits in G protein coupling of GABA(B) receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(25): p. 14649-54.
248. Martin, D.L. and K. Rimvall, Regulation of gamma-aminobutyric acid synthesis in the brain. *J Neurochem*, 1993. 60(2): p. 395-407.
249. Martin, S.C., S.J. Russek, and D.H. Farb, Human GABA(B)R genomic structure: evidence for splice variants in GABA(B)R1 but not GABA(B)R2. *Gene*, 2001. 278(1-2): p. 63-79.
250. Mathew, D., et al. Wingless signaling at synapses is through cleavage and nuclear import of receptor DFizzled2. *Science*, 2005. 310(5752): p. 1344-7.
251. McCubrey et al. Emerging MEK inhibitors. *Expert Opin Emerg Drugs*, 2010 [publication seulement disponible en ligne à ce moment-ci].
252. McKay, M.M. and D.K. Morrison, Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene*, 2007. 26(22): p. 3113-21.
253. Meier, S.D., K.W. Kafitz, and C.R. Rose, Developmental profile and mechanisms of GABA-induced calcium signaling in hippocampal astrocytes. *Glia*, 2008.
254. Meng, T.C., T. Fukada, and N.K. Tonks, Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo. *Mol Cell*, 2002. 9(2): p. 387-99.
255. Menon-Johansson, A.S., N. Berrow, and A.C. Dolphin, G(o) transduces GABA(B)-receptor modulation of N-type calcium channels in cultured dorsal root ganglion neurons. *Pflugers Arch*, 1993. 425(3-4): p. 335-43.
256. Miguel B.G. et al., Increase of phosphoinositide hydrolysis and diacylglycerol production by PAF in isolated rat liver nuclei. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2001. 65(4): p. 159-66.

257. Miller, F.D. and D.R. Kaplan, Neurobiology. TRK makes the retrograde. *Science*, 2002. 295(5559): p. 1471-3.
258. Mody, I., Distinguishing between GABA(A) receptors responsible for tonic and phasic conductances. *Neurochem Res*, 2001. 26(8-9): p. 907-13.
259. Mombereau, C., et al. Genetic and pharmacological evidence of a role for GABA(B) receptors in the modulation of anxiety- and antidepressant-like behavior. *Neuropsychopharmacology*, 2004. 29(6): p. 1050-62.
260. Mombereau, C., et al. Altered response to benzodiazepine anxiolytics in mice lacking GABA B(1) receptors. *Eur J Pharmacol*, 2004. 497(1): p. 119-20.
261. Mondadori, C., H.J. Moebius, and M. Zingg, CGP 36,742, an orally active GABAB receptor antagonist, facilitates memory in a social recognition test in rats. *Behav Brain Res*, 1996. 77(1-2): p. 227-9.
262. Mor, A. and M.R. Philips, Compartmentalized Ras/MAPK signaling. *Annu Rev Immunol*, 2006. 24: p. 771-800.
263. Morishita, R., K. Kato, and T. Asano, GABAB receptors couple to G proteins Go, Go\* and Gi1 but not to Gi2. *FEBS Lett*, 1990. 271(1-2): p. 231-5.
264. Morrison, D.K. and R.J. Davis, Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2003. 19: p. 91-118.
265. Moss, M.L., et al. Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature*, 1997. 385(6618): p. 733-6.
266. Moughal, N.A., et al. Nerve growth factor signaling involves interaction between the Trk A receptor and lysophosphatidate receptor 1 systems: nuclear translocation of the lysophosphatidate receptor 1 and Trk A receptors in pheochromocytoma 12 cells. *Cell Signal*, 2004. 16(1): p. 127-36.
267. Mumm, J.S. and R. Kopan, Notch signaling: from the outside in. *Dev Biol*, 2000. 228(2): p. 151-65.
268. Mumm, J.S., et al. A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1. *Mol Cell*, 2000. 5(2): p. 197-206.
269. Murshid, A. and J.F. Presley, ER-to-Golgi transport and cytoskeletal interactions in animal cells. *Cell Mol Life Sci*, 2004. 61(2): p. 133-45.
270. Nash, M.S., et al. Reassessment of the Ca<sup>2+</sup> sensing property of a type I metabotropic glutamate receptor by simultaneous measurement of inositol 1,4,5-trisphosphate and Ca<sup>2+</sup> in single cells. *J Biol Chem*, 2001. 276(22): p. 19286-93.
271. Nehring, R.B., et al. The metabotropic GABAB receptor directly interacts with the activating transcription factor 4. *J Biol Chem*, 2000. 275(45): p. 35185-91.
272. New, D.C., et al. GABAB heterodimeric receptors promote Ca<sup>2+</sup> influx via store-operated channels in rat cortical neurons and transfected Chinese hamster ovary cells. *Neuroscience*, 2006. 137(4): p. 1347-58.
273. Newberry, N.R. and R.A. Nicoll, A bicuculline-resistant inhibitory post-synaptic potential in rat hippocampal pyramidal cells in vitro. *J Physiol*, 1984. 348: p. 239-54.
274. Newman, J.R. and A.E. Keating, Comprehensive identification of human bZIP interactions with coiled-coil arrays. *Science*, 2003. 300(5628): p. 2097-101.
275. Ng, G.Y., et al. Identification of a GABAB receptor subunit, gb2, required for functional GABAB receptor activity. *J Biol Chem*, 1999. 274(12): p. 7607-10.
276. Nguyen, L., et al. Autocrine/paracrine activation of the GABA(A) receptor inhibits the proliferation of neurogenic polysialylated neural cell adhesion molecule-positive (PSA-NCAM+) precursor cells from postnatal striatum. *J Neurosci*, 2003. 23(8): p. 3278-94.
277. Nguyen, L., et al. Neurotransmitters as early signals for central nervous system development. *Cell Tissue Res*, 2001. 305(2): p. 187-202.
278. Nicoll, R.A., My close encounter with GABA(B) receptors. *Biochem Pharmacol*, 2004. 68(8): p. 1667-74.
279. Nielsen C.K. et al., A novel localization of the G-protein-coupled CysLT1 receptor in the nucleus of colorectal adenocarcinoma cells. *Cancer Res*, 2005. 65(3): p. 732-42.
280. Nilius, B., Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry channels: still elusive! *Sci STKE*, 2004. 2004(243): p. pe36.
281. Obrietan, K. and A.N. van den Pol, GABAB receptor-mediated regulation of glutamate-activated calcium transients in hypothalamic and cortical neuron development. *J Neurophysiol*, 1999. 82(1): p. 94-102.
282. O'Kelly, I., et al. Forward transport. 14-3-3 binding overcomes retention in endoplasmic reticulum by dibasic signals. *Cell*, 2002. 111(4): p. 577-88.

283. O'Malley K.L. et al., Activation of metabotropic glutamate receptor mGlu5 on nuclear membranes mediates intranuclear Ca<sup>2+</sup> changes in heterologous cell types and neurons. *J Biol Chem*, 2003. 278(30): p. 28210-9.
284. Omary M.B. and M.F. Kagnoff, Identification of nuclear receptors for VIP on a human colonic adenocarcinoma cell line. *Science*, 1987. 238(4833): p. 1578-81.
285. Ossum, C.G., T. Wulff, and E.K. Hoffmann, Regulation of the mitogen-activated protein kinase p44 ERK activity during anoxia/recovery in rainbow trout hypodermal fibroblasts. *J Exp Biol*, 2006. 209(Pt 9): p. 1765-76.
286. Otsuka, M., Establishment of GABA as an inhibitory neurotransmitter at Crustacean neuromuscular junction and in the mammalian central nervous system. *GABA: Receptors, transporters and Metabolism*, ed. C.a.B. Tanaka, N. G. 1996, Basel, Switzerland: Birkhäuser. pp. 1-6.
287. Owens, D.F. and A.R. Kriegstein, Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat Rev Neurosci*, 2002. 3(9): p. 715-27.
288. Owens, D.F. and A.R. Kriegstein, Developmental neurotransmitters? *Neuron*, 2002. 36(6): p. 989-91.
289. Owens, D.M. and S.M. Keyse, Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene*, 2007. 26(22): p. 3203-13.
290. Patel, S., et al. The effects of GABA(B) agonists and gabapentin on mechanical hyperalgesia in models of neuropathic and inflammatory pain in the rat. *Pain*, 2001. 90(3): p. 217-26.
291. Pawson, T. and P. Nash, Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. *Science*, 2003. 300(5618): p. 445-52.
292. Penzes, P., et al. The neuronal Rho-GEF Kalirin-7 interacts with PDZ domain-containing proteins and regulates dendritic morphogenesis. *Neuron*, 2001. 29(1): p. 229-42.
293. Perez-Garci, E., et al. The GABAB1b isoform mediates long-lasting inhibition of dendritic Ca<sup>2+</sup> spikes in layer 5 somatosensory pyramidal neurons. *Neuron*, 2006. 50(4): p. 603-16.
294. Perroy et al. Phosphorylation-independent desensitization of GABA(B) receptor by GRK4. *EMBO J.*, 2003. 22(15):3816-24.
295. Pfaff, T., et al. Alternative splicing generates a novel isoform of the rat metabotropic GABA(B)R1 receptor. *Eur J Neurosci*, 1999. 11(8): p. 2874-82.
296. Pin, J.P. and J. Bockaert, Two distinct mechanisms, differentially affected by excitatory amino acids, trigger GABA release from fetal mouse striatal neurons in primary culture. *J Neurosci*, 1989. 9(2): p. 648-56.
297. Plowman, S.J. and J.F. Hancock, Ras signaling from plasma membrane and endomembrane microdomains. *Biochim Biophys Acta*, 2005. 1746(3): p. 274-83.
298. Pontier, S.M., et al. Coordinated action of NSF and PKC regulates GABAB receptor signaling efficacy. *Embo J*, 2006. 25(12): p. 2698-709.
299. Pouyssegur, J., V. Volmat, and P. Lenormand, Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Biochem Pharmacol*, 2002. 64(5-6): p. 755-63.
300. Praefcke GJ, McMahon HT. The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004. 5(2):133-47.
301. Prenzel, N., et al. EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature*, 1999. 402(6764): p. 884-8.
302. Pullikuth, A., et al. The MEK1 scaffolding protein MP1 regulates cell spreading by integrating PAK1 and Rho signals. *Mol Cell Biol*, 2005. 25(12): p. 5119-33.
303. Quilliam, L.A., et al. Guanine nucleotide exchange factors: activators of the Ras superfamily of proteins. *Bioessays*, 1995. 17(5): p. 395-404.
304. Radany, E.H., et al. Directed establishment of rat brain cell lines with the phenotypic characteristics of type I astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. 89(14): p. 6467-71.
305. Radeff-Huang, J., et al. G protein mediated signaling pathways in lysophospholipid induced cell proliferation and survival. *J Cell Biochem*, 2004. 92(5): p. 949-66.
306. Rae, C., et al. Group I and II metabotropic glutamate receptors alter brain cortical metabolic and glutamate/glutamine cycle activity: a 13C NMR spectroscopy and metabolomic study. *J Neurochem*, 2005. 92(2): p. 405-16.
307. Rakhit, S., S. Pyne, and N.J. Pyne, Nerve growth factor stimulation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase in PC12 cells: role of G(i/o), G protein-coupled receptor kinase 2, beta-arrestin I, and endocytic processing. *Mol Pharmacol*, 2001. 60(1): p. 63-70.
308. Raman, M., W. Chen, and M.H. Cobb, Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*,

2007. 26(22): p. 3100-12.
309. Re R.N., R.A. LaBiche, and S.E. Bryan, Nuclear-hormone mediated changes in chromatin solubility. *Biochem Biophys Res Commun*, 1983. 110(1): p. 61-8.
310. Re R.N. et al., Angiotensin II receptors in chromatin fragments generated by micrococcal nuclease. *Biochem Biophys Res Commun*, 1984. 119(1): p. 220-7.
311. Rebecchi, M.J. and S.N. Pentylala, Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol Rev*, 2000. 80(4): p. 1291-335.
312. Rebois, R.V., et al. Heterotrimeric G proteins form stable complexes with adenylyl cyclase and Kir3.1 channels in living cells. *J Cell Sci*, 2006. 119(Pt 13): p. 2807-18.
313. Rechsteiner, M. and S.W. Rogers, PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci*, 1996. 21(7): p. 267-71.
314. Revankar, C.M., et al. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science*, 2005. 307(5715): p. 1625-30.
315. Rhee, S.G., et al. Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation. *Sci STKE*, 2000. 2000(53): p. PE1.
316. Richer M et al. GABA-B(1) receptors are coupled to the ERK1/2 MAP kinase pathway in the absence of GABA-B(2) subunits. *J Mol Neurosci*, 2009(1):67-79.
317. Ridley, A.J. and A. Hall, Signal transduction pathways regulating Rho-mediated stress fibre formation: requirement for a tyrosine kinase. *Embo J*, 1994. 13(11): p. 2600-10.
318. Robbins, M.J., et al. GABA(B2) is essential for g-protein coupling of the GABA(B) receptor heterodimer. *J Neurosci*, 2001. 21(20): p. 8043-52.
319. Robbins, M.J., et al. Characterization of the dimerization of metabotropic glutamate receptors using an N-terminal truncation of mGluR1alpha. *J Neurochem*, 1999. 72(6): p. 2539-47.
320. Roberts, E. and S. Frankel, gamma-Aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid. *J Biol Chem*, 1950. 187(1): p. 55-63.
321. Robertson A.L. Jr and P.A. Khairallah, Angiotensin II: rapid localization in nuclei of smooth and cardiac muscle. *Science*, 1971. 172(988): p. 1138-9.
322. Roche, K.W., et al. Characterization of multiple phosphorylation sites on the AMPA receptor GluR1 subunit. *Neuron*, 1996. 16(6): p. 1179-88.
323. Rogers, S., R. Wells, and M. Rechsteiner, Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science*, 1986. 234(4774): p. 364-8.
324. Romano, C., W.L. Yang, and K.L. O'Malley, Metabotropic glutamate receptor 5 is a disulfide-linked dimer. *J Biol Chem*, 1996. 271(45): p. 28612-6.
325. Rossi, D.J., M. Hamann, and D. Attwell, Multiple modes of GABAergic inhibition of rat cerebellar granule cells. *J Physiol*, 2003. 548(Pt 1): p. 97-110.
326. Rossi, P., et al. Inhibition of constitutive inward rectifier currents in cerebellar granule cells by pharmacological and synaptic activation of GABA receptors. *Eur J Neurosci*, 2006. 24(2): p. 419-32.
327. Roy S, Wyse B, Hancock JF. H-Ras signaling and K-Ras signaling are differentially dependent on endocytosis. *Mol Cell Biol*, 2002. 22(14):5128-40.
328. Rutkowski, D.T. and R.J. Kaufman, All roads lead to ATF4. *Dev Cell*, 2003. 4(4): p. 442-4.
329. Saha, N., et al. Effects of post-training administration of (-)-baclofen and chlordiazepoxide on memory retention in ICRC Swiss mice: interactions with GABAA and GABAB receptor antagonists. *Pharmacol Toxicol*, 1993. 72(3): p. 159-62.
330. Sakaba, T. and E. Neher, Direct modulation of synaptic vesicle priming by GABA(B) receptor activation at a glutamatergic synapse. *Nature*, 2003. 424(6950): p. 775-8.
331. Sakai, J., et al. Molecular identification of the sterol-regulated luminal protease that cleaves SREBPs and controls lipid composition of animal cells. *Mol Cell*, 1998. 2(4): p. 505-14.
332. Santos, A.E., et al. Regulation of intracellular [Ca<sup>2+</sup>] and GABA release by presynaptic GABAB receptors in rat cerebrocortical synaptosomes. *Neurochem Int*, 1995. 27(4-5): p. 397-406.
333. Sardi, S.P., et al. Presenilin-dependent ErbB4 nuclear signaling regulates the timing of astrogenesis in the developing brain. *Cell*, 2006. 127(1): p. 185-97.
334. Saunders, R., S.R. Nahorski, and R.A. Challiss, A modulatory effect of extracellular Ca<sup>2+</sup> on type 1alpha metabotropic glutamate receptor-mediated signalling. *Neuropharmacology*, 1998. 37(2): p. 273-6.

335. Sauter, K., et al. Subtype-selective interaction with the transcription factor CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) homologous protein (CHOP) regulates cell surface expression of GABA(B) receptors. *J Biol Chem*, 2005. 280(39): p. 33566-72.
336. Sawynok, J., GABAergic mechanisms of analgesia: an update. *Pharmacol Biochem Behav*, 1987. 26(2): p. 463-74.
337. Seidah NG et al. The activation and physiological functions of the proprotein convertases. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40(6-7):1111-25.
338. Schousboe, A., V. Lisy, and L. Hertz, Postnatal alterations in effects of potassium on uptake and release of glutamate and GABA in rat brain cortex slices. *J Neurochem*, 1976. 26(5): p. 1023-7.
339. Schousboe, A., G. Svenneby, and L. Hertz, Uptake and metabolism of glutamate in astrocytes cultured from dissociated mouse brain hemispheres. *J Neurochem*, 1977. 29(6): p. 999-1005.
340. Schousboe, A. and H.S. Waagepetersen, GABA: homeostatic and pharmacological aspects. *Prog Brain Res*, 2007. 160: p. 9-19.
341. Schousboe, I., B. Bro, and A. Schousboe, Intramitochondrial localization of the 4-aminobutyrate-2-oxoglutarate transaminase from ox brain. *Biochem J*, 1977. 162(2): p. 303-7.
342. Schröder M and Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem*, 2005. 74:739-89.
343. Schuler, V., et al. Epilepsy, hyperalgesia, impaired memory, and loss of pre- and postsynaptic GABA(B) responses in mice lacking GABA(B(1)). *Neuron*, 2001. 31(1): p. 47-58.
344. Schwartz, R.H., R. Milteer, and M.A. LeBeau, Drug-facilitated sexual assault ('date rape'). *South Med J*, 2000. 93(6): p. 558-61.
345. Schwarz, D.A., et al. Characterization of gamma-aminobutyric acid receptor GABAB(1e), a GABAB(1) splice variant encoding a truncated receptor. *J Biol Chem*, 2000. 275(41): p. 32174-81.
346. Scott, D.B., et al. An NMDA receptor ER retention signal regulated by phosphorylation and alternative splicing. *J Neurosci*, 2001. 21(9): p. 3063-72.
347. Serrano, A., et al. GABAergic network activation of glial cells underlies hippocampal heterosynaptic depression. *J Neurosci*, 2006. 26(20): p. 5370-82.
348. Shenoy, S.K. and R.J. Lefkowitz, Multifaceted roles of beta-arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling. *Biochem J*, 2003. 375(Pt 3): p. 503-15.
349. Shibuta K. et al., Regional expression of CXCL12/CXCR4 in liver and hepatocellular carcinoma and cell-cycle variation during in vitro differentiation. *Jpn J Cancer Res*, 2002. 93(7): p. 789-97.
350. Simonds, W.F., G protein regulation of adenylate cyclase. *Trends Pharmacol Sci*, 1999. 20(2): p. 66-73.
351. Sloviter, R.S., et al. Localization of GABA(B) (R1) receptors in the rat hippocampus by immunocytochemistry and high resolution autoradiography, with specific reference to its localization in identified hippocampal interneuron subpopulations. *Neuropharmacology*, 1999. 38(11): p. 1707-21.
352. Soghomonian, J.J. and D.L. Martin, Two isoforms of glutamate decarboxylase: why? *Trends Pharmacol Sci*, 1998. 19(12): p. 500-5.
353. Songyang, Z., et al. Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science*, 1997. 275(5296): p. 73-7.
354. Sorkin, A. and M. Von Zastrow, Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002. 3(8): p. 600-14.
355. Spano J.P. et al., Chemokine receptor CXCR4 and early-stage non-small cell lung cancer: pattern of expression and correlation with outcome. *Ann Oncol*, 2004. 15(4): p. 613-7.
356. Speese, S.D. and V. Budnik, Wnts: up-and-coming at the synapse. *Trends Neurosci*, 2007. 30(6): p. 268-75.
357. Standley, S., et al. PDZ domain suppression of an ER retention signal in NMDA receptor NR1 splice variants. *Neuron*, 2000. 28(3): p. 887-98.
358. Stephens, R.M., et al. Trk receptors use redundant signal transduction pathways involving SHC and PLC-gamma 1 to mediate NGF responses. *Neuron*, 1994. 12(3): p. 691-705.
359. Stephens, R.M., et al. Trk receptors use redundant signal transduction pathways involving SHC and PLC-gamma 1 to mediate NGF responses. *Neuron*, 1994. 12(3): p. 691-705.
360. Suzdak, P.D. and J.A. Jansen, A review of the preclinical pharmacology of tiagabine: a potent and selective anticonvulsant GABA uptake inhibitor. *Epilepsia*, 1995. 36(6): p. 612-26.
361. Tabata, T., et al. Ca<sup>2+</sup> activity at GABAB receptors constitutively promotes metabotropic glutamate signaling in the absence of GABA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(48): p. 16952-7.

362. Tang, W.J. and A.G. Gilman, Type-specific regulation of adenylyl cyclase by G protein beta gamma subunits. *Science*, 1991. 254(5037): p. 1500-3.
363. Taylor, J. and P.R. Gordon-Weeks, Calcium-independent gamma-aminobutyric acid release from growth cones: role of gamma-aminobutyric acid transport. *J Neurochem*, 1991. 56(1): p. 273-80.
364. Teis, D., W. Wunderlich, and L.A. Huber, Localization of the MP1-MAPK scaffold complex to endosomes is mediated by p14 and required for signal transduction. *Dev Cell*, 2002. 3(6): p. 803-14.
365. Torii, S., et al. Sef is a spatial regulator for Ras/MAP kinase signaling. *Dev Cell*, 2004. 7(1): p. 33-44.
366. Traverse, S., et al. Sustained activation of the mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade may be required for differentiation of PC12 cells. Comparison of the effects of nerve growth factor and epidermal growth factor. *Biochem J*, 1992. 288 ( Pt 2): p. 351-5.
367. Tu L, Tai WC, Chen L, Banfield DK. Signal-mediated dynamic retention of glycosyltransferases in the Golgi. *Science*, 2008. 321(5887):404-7.
368. Turjanski, A.G., J.P. Vaque, and J.S. Gutkind, MAP kinases and the control of nuclear events. *Oncogene*, 2007. 26(22): p. 3240-53.
369. Ueda, T., et al. Mnk2 and Mnk1 are essential for constitutive and inducible phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E but not for cell growth or development. *Mol Cell Biol*, 2004. 24(15): p. 6539-49.
370. Ueda, T., et al. Mnk2 and Mnk1 are essential for constitutive and inducible phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E but not for cell growth or development. *Mol Cell Biol*, 2004. 24(15): p. 6539-49.
371. Ullmer, C., et al. Cloning and characterization of MUPP-1, a novel PDZ domain protein. *FEBS Lett*, 1998. 424(1-2): p. 63-8.
372. Ulrich, D. and B. Bettler, GABA(B) receptors: synaptic functions and mechanisms of diversity. *Curr Opin Neurobiol*, 2007. 17(3): p. 298-303.
373. Urwyler, S., et al. Selected amino acids, dipeptides and arylalkylamine derivatives do not act as allosteric modulators at GABAB receptors. *Eur J Pharmacol*, 2004. 483(2-3): p. 147-53.
374. Vadakkadath Meethal S et al., Identification of a gonadotropin-releasing hormone receptor orthologue in *Caenorhabditis elegans*. *BMC Evol Biol*, 2006. 29;6: p. 103.
375. Vanhoose, A.M., et al. ERK activation by G-protein-coupled receptors in mouse brain is receptor identity-specific. *J Biol Chem*, 2002. 277(11): p. 9049-53.
376. Varju, P., et al. GABA signalling during development: new data and old questions. *Cell Tissue Res*, 2001. 305(2): p. 239-46.
377. Vassar, R., et al. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science*, 1999. 286(5440): p. 735-41.
378. Vaudry, D., et al. Signaling pathways for PC12 cell differentiation: making the right connections. *Science*, 2002. 296(5573): p. 1648-9.
379. Ventura C. et al., Nuclear opioid receptors activate opioid peptide gene transcription in isolated myocardial nuclei. *J Biol Chem*, 1998. 273(22): p. 13383-6.
380. Vernon, E., et al. GABA(B) receptors couple directly to the transcription factor ATF4. *Mol Cell Neurosci*, 2001. 17(4): p. 637-45.
381. Vidal, R.L., et al. Marlin-1 and conventional kinesin link GABAB receptors to the cytoskeleton and regulate receptor transport. *Mol Cell Neurosci*, 2007. 35(3): p. 501-12.
382. Vigot, R., et al. Differential compartmentalization and distinct functions of GABAB receptor variants. *Neuron*, 2006. 50(4): p. 589-601.
383. Villemure, J.F., et al. Subcellular distribution of GABA(B) receptor homo- and hetero-dimers. *Biochem J*, 2005. 388(Pt 1): p. 47-55.
384. Von Mikecz, A., The nuclear ubiquitin-proteasome system. *J Cell Sci*, 2006. 119(Pt 10): p. 1977-84.
385. Wallace, R.H., et al. Mutant GABA(A) receptor gamma2-subunit in childhood absence epilepsy and febrile seizures. *Nat Genet*, 2001. 28(1): p. 49-52.
386. Wallasch, C., et al. Helicobacter pylori-stimulated EGF receptor transactivation requires metalloprotease cleavage of HB-EGF. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. 295(3): p. 695-701.
387. Wang, X., et al. The phosphorylation of eukaryotic initiation factor eIF4E in response to phorbol esters, cell stresses, and cytokines is mediated by distinct MAP kinase pathways. *J Biol Chem*, 1998. 273(16): p. 9373-7.



388. Watson P.H. et al. (a), Nuclear localization of the type 1 PTH/PTHrP receptor in rat tissues. *J Bone Miner Res*, 2000. 15(6): p. 1033-44.
389. Watson P.H. et al. (b), Nuclear localization of the type 1 parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor in MC3T3-E1 cells: association with serum-induced cell proliferation. *Bone*, 2000. 26(3): p. 221-5.
390. Wei, H., et al. Independent beta-arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(19): p. 10782-7.
391. Wei, J. and J.Y. Wu, Post-translational regulation of L-glutamic acid decarboxylase in the brain. *Neurochem Res*, 2008. 33(8): p. 1459-65.
392. Weihofen, A. and B. Martoglio, Intramembrane-cleaving proteases: controlled liberation of proteins and bioactive peptides. *Trends Cell Biol*, 2003. 13(2): p. 71-8.
393. Wellbrock, C., M. Karasarides, and R. Marais, The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004. 5(11): p. 875-85.
394. Wetzker, R. and F.D. Bohmer, Transactivation joins multiple tracks to the ERK/MAPK cascade. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003. 4(8): p. 651-7.
395. White, J.H., et al. The GABAB receptor interacts directly with the related transcription factors CREB2 and ATFx. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(25): p. 13967-72.
396. White, J.H., et al. Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor. *Nature*, 1998. 396(6712): p. 679-82.
397. Whitmarsh, A.J. and R.J. Davis, A central control for cell growth. *Nature*, 2000. 403(6767): p. 255-6.
398. Willoughby, D. and D.M. Cooper, Organization and Ca<sup>2+</sup> regulation of adenylyl cyclases in cAMP microdomains. *Physiol Rev*, 2007. 87(3): p. 965-1010.
399. Wonders, C.P. and S.A. Anderson, The origin and specification of cortical interneurons. *Nat Rev Neurosci*, 2006. 7(9): p. 687-96.
400. Wong, C.G., T. Bottiglieri, and O.C. Snead, 3rd, GABA, gamma-hydroxybutyric acid, and neurological disease. *Ann Neurol*, 2003. 54 Suppl 6: p. S3-12.
401. Xia, H., Z.D. Hornby, and R.C. Malenka, An ER retention signal explains differences in surface expression of NMDA and AMPA receptor subunits. *Neuropharmacology*, 2001. 41(6): p. 714-23.
402. Xiang, Y., et al. Nerve growth cone guidance mediated by G protein-coupled receptors. *Nat Neurosci*, 2002. 5(9): p. 843-8.
403. Xu, J. and W.J. Wojcik, Gamma aminobutyric acid B receptor-mediated inhibition of adenylate cyclase in cultured cerebellar granule cells: blockade by islet-activating protein. *J Pharmacol Exp Ther*, 1986. 239(2): p. 568-73.
404. Xu, W., et al. Calpain-mediated mGluR1alpha truncation: a key step in excitotoxicity. *Neuron*, 2007. 53(3): p. 399-412.
405. Yamauchi, A., et al. Cloning of a Na<sup>(+)</sup>- and Cl<sup>(-)</sup>-dependent betaine transporter that is regulated by hypertonicity. *J Biol Chem*, 1992. 267(1): p. 649-52.
406. Yang R, Piperdi S, Gorlick R. Activation of the RAF/mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway mediates apoptosis induced by chelerythrine in osteosarcoma. *Clin Cancer Res*, 2008. 14(20):6396-404.
407. Yuan, H., K. Michelsen, and B. Schwappach, 14-3-3 dimers probe the assembly status of multimeric membrane proteins. *Curr Biol*, 2003. 13(8): p. 638-46.
408. Zerangue, N., et al. A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels. *Neuron*, 1999. 22(3): p. 537-48.

## Abréviations

14-3-3	protéine 14-3-3
<sup>32</sup> P	isotope phosphore radioactif 32
5'AMP	adénosine monophosphate
5-HT <sub>2C</sub>	récepteur sérotonine type 2C
7-TMs	7 domaines transmembranaires
AAA	« ATPase Associated to various cellular Activities »
acétyl-CoA	acétyl-coenzyme A
ADAM	protéase de la famille « A Disintegrin and Metalloproteinase »
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
AKT	protéine sérine/thréonine kinase AKT
α <sub>2</sub> -AR	récepteur α <sub>2</sub> -adrénergique
AMPA	récepteur ionotropique glutamate acide α-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique
AMP <sub>c</sub>	adénosine monophosphate cyclique
AMPK	protéine kinase AMP-dépendante
ADN	acide désoxyribonucléique
AP-1	facteur de transcription « activator protein 1 »
Aph-1	protéine du complexe γ-sécrétase PEN-2
APP	protéine précurseur amyloïde
ARN	acide ribonucléique
AT1A	« angiotensin II receptor, type 1A »
ATF-4	facteur de transcription « activating transcription factor 4 »
ATF-5	facteur de transcription « activating transcription factor 5 »
ATF-6	facteur de transcription « activating transcription factor 6 »
ATP	adénosine triphosphate
BCL-2	protéine régulatrice de l'apoptose « B-cell lymphoma 2 »
bFGF	« fibroblast growth factor splice b variant »
BGT-1	« betaine/GABA transporter 1 »
bHLH	domaine « basic helix-loop-helix »
β <sub>2</sub> -AR	récepteur β <sub>2</sub> -adrénergique
Bip	protéine chaperone « binding immunoglobulin protein »
BMP	facteur de croissance « bone morphogenetic protein »
C/EBP	famille de facteurs de transcription « CCAAT enhancer binding protein »
C3G	« Crk SH3 domain-binding guanine nucleotide-releasing factor »
CA	corne d'Ammon
Ca <sup>2+</sup>	ion calcium
CaDAG-GEFI	« calcium and diacylglycerol-regulated guanine nucleotide exchange factor »
cAMP-GEFII	« cAMP-guanine nucleotide exchange factor II »
CaSR	« calcium-sensing receptor »
Ca <sub>v</sub>	canal Ca <sup>2+</sup> voltage-dépendant
CBP	coactivateur transcriptionnel « CREB-binding protein »
CD	« cluster of differentiation »
CD44	molécule d'adhésion CD44
CFTR	« cystic fibrosis transmembrane conductance regulator »
CIR	corépresseur transcriptionnel « CBF1 interacting corepressor »
CK2	caséine kinase II
Cl <sup>-</sup>	ion chlore
c-Myb	facteur de transcription c-Myb
CNK-1	« connector enhancer of KSR-1 »
CNrasGEF	« CN-Ras- guanine nucleotide exchange factor »
COP-1	« coatomer protein 1 »
CREB	« cAMP response element binding »

CSL	facteur de transcription ( « C-promoter binding factor 1 (CBF-1), suppressor of hairless (Su(H)), lin-12 and glp-1 (Lag-1) »)
DAG	diacylglycérol
DUSP	« dual-specificity phosphatase »
EGF	« epidermal growth factor »
eIF	« eukaryotic initiation factor »
Elk-1	facteur de transcription « ets like gene 1 »
EPAC	« exchange protein directly activated by cAMP »
Eph	récepteur tyrosine kinase Eph
ErbB	récepteur tyrosine protéine kinase ErbB
Erbin	« ErbB2 interacting protein »
ERGIC	ER-Golgi intermediate compartment
Erk	« extracellular signal-regulated kinase »
FAK	protéine tyrosine kinase « focal adhesion kinase »
FBS	« fetal bovine serum »
Fe65	protéine neuronale adaptatrice Fe65
FGF	« fibroblast growth factor »
Fos	facteur de transcription Fos
FRS	protéine adaptatrice « FGF receptor substrate adapter »
Gab/Dok	protéine adaptatrice « GRB2-associated-binding protein/downstream of kinases »
GABA	acide $\gamma$ -aminobutyrique
GABA-T	GABA transaminase
GAD	L-glutamate décarboxylase
GAP	« GTPase activating protein »
GAT	« GABA transporter »
GCN5	protéine histone acétyltransférase GCN5
GDP	guanosine diphosphate
GEF	« guanine nucleotide exchange factor »
GFP	« green fluorescent protein »
GIRK	« G protein-activated inwardly rectifying K <sup>+</sup> channel »
GluR1	sous-unité récepteur ionotropique glutamate 1
GRASP1	protéine Ras-GEF « GRIP-associated scaffolding protein 1 »
Grb2	« growth factor receptor-bound protein 2 »
GRF1	« Ras-guanine nucleotide-releasing factor 1 »
GRIP	« glutamate receptor interacting protein »
GRK2	« G protein-coupled receptor kinase 2 »
GST	glutathione S-transférase
GST-GABA-B1-CT	protéine de fusion GST et domaine COOH-terminal du récepteur GABA-B1
GTP	guanosine triphosphate
GTPase	guanosine triphosphatase
GTP $\gamma$ [ <sup>35</sup> S]	guanosine 5'-O-[gamma-thio]triphosphate[ <sup>35</sup> S]
G <sub>ai</sub>	sous-unité protéine G <sub>ai</sub>
G <sub>ao</sub>	sous-unité protéine G <sub>ao</sub>
G <sub>aq</sub>	sous-unité protéine G <sub>aq</sub>
G <sub>as</sub>	sous-unité protéine G <sub>as</sub>
G <sub><math>\beta\gamma</math></sub>	sous-unité protéine G <sub><math>\beta\gamma</math></sub>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peroxyde d'hydrogène
HB-EGF	« heparin-binding EGF-like growth factor »
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	ion bicarbonate
HDAC	protéine histone déacétylase
HEK293	cellules « human embryonic kidney 293 »
HER2	« human epidermal growth factor receptor 2 »
HES	facteur de transcription « Hairy/Enhancer of Split/ Lag-1 »
IAP	« islet activating protein »
i-CLIPS	« intramembrane cleaving proteases »
IMP	protéine d'échaffaudage MAPK « impedes mitogenic signal propagation »

IP <sub>3</sub>	inositol triphosphate
IP <sub>3</sub>	inositol triphosphate
IQGAP1	protéine multifonctionnelle « ras GTPase-activating-like protein »
IRS	protéine adaptatrice « insulin receptor substrate »
JNK	« c-Jun N-terminal kinase »
Jun	facteur de transcription Jun
K <sup>+</sup>	ion potassium
K <sub>ATP</sub>	« ATP-sensitive K <sup>+</sup> channel »
KCNK3 (TASK-1)	canal « acid-sensitive K <sup>+</sup> channel of the tandem P-domain K <sup>+</sup> -channel family 1 »
Kir	canaux K <sup>+</sup> « inwardly rectifying »
KSR	protéine d'échaffaudage MAPK « kinase suppressor of Ras »
LBP	« leucine-binding protein »
lip35	facteur de transcription C/EBPβ, variant de traduction lip35
Liprin/syd2	« LAR protein-tyrosine phosphatase-interacting protein/Syd2 »
LIVBP	« leucine isoleucine valine-binding protein »
LPA	acide lysophosphatidique
MAF-A	facteur de transcription « musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A »
MAP2K (MEK, MKK)	« mitogen-activated protein kinase kinase »
MAP3K (MEKK)	« mitogen-activated protein kinase kinase kinase »
MAPK	« mitogen-activated protein kinase »
Marlin-1	protéine de liaison de l'ARN « multiple alpha helices and RNA-linker protein 1 »
mGluR	récepteur métabotrope glutamate
MKP	« MAPK phosphatase »
MORG1	protéine d'échaffaudage MAPK « MAPK organizer 1 »
MP1	protéine d'échaffaudage MAPK « MEK-partner 1 »
MUPP-1	protéine d'échaffaudage « multi-PDZ domain protein-1 »
Na <sup>+</sup>	ion sodium
NcoR	corépresseur transcriptionnel « nuclear receptor corepressor »
NEM	N-ethylmaleimide
NFAT4	facteur de transcription « nuclear factor of activated T-cells 4 »
NGF	« nerve growth factor »
NMDA	récepteur ionotropique glutamate acide N-méthyl-D-aspartique
nNOS	« neuronal nitric oxide synthase »
Notch	récepteur Notch
NR2B	« ionotropic glutamate receptor subunit 2B »
NSF	« N-ethylmaleimide-sensitive factor »
p14	p14 (ARF), isoforme 4 du gène CDKN2A
p38	MAPK p38
p53	protéine suppresseur de tumeur « tumor protein 53 »
PAG	« phosphate-activated glutaminase »
PAPIN	« plakophilin-related armadillo-repeat protein-interacting protein »
PAR2	« protease-activated receptor 2 »
PCAF	coactivateur transcriptionnel « P300/CBP-associated factor »
PDGF	« platelet-derived growth factor »
PDK	« 3-phosphoinositide dependent protein kinase »
PDZ	domaine ou ligand « PSD-95/Discs-large/ZO-1 »
PEN-2	protéine du complexe γ-sécrétase PEN-2
PH	domaine « pleckstrin homology »
Phox	« phagocytic oxidase »
PI-3,4-P2	phosphatidylinositol (3,4)-bisphosphate
PI3K	PI-3-kinase
PIP <sub>2</sub>	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PKA	protéine kinase A
PKC	protéine kinase C
PLC	phospholipase

PLC	phospholipase C
PMA	phorbol 12-myristate 13-acétate
PP2A	« protein phosphatase 2 »
PSA-NCAM	« polysialic acid- neural cell adhesion molecule »
PSD95	« human postsynaptic density 95 »
PTB	domaine « p-Tyr binding »
PTP-SL	« polypyrimidine tract-binding protein »
PTX	toxine <i>pertussis</i>
pTyr	phospho-tyrosine
Pyk2 (PTK2B)	protéine tyrosine kinase 2 beta
Rab18	petite protéine GTPase Rab18
Rac-GEF	« Rac-guanine nucleotide exchange factor protein »
Raf	MAP3K Raf
RAM	domaine « RBP-J associated molecule »
Rap	petite protéine GTPase Rap
Rap	petite protéine GTPase Rap
Rap1GAPII	« Rap1 GTPase-activating protein II »
Ras	petite protéine GTPase Ras
Ras-GEF mSOS	« Ras-guanine nucleotide exchange factor son of sevenless »
RCPGs	récepteurs couplés aux protéine G
RE	réticulum endoplasmique
Rim	
RIP	« regulated intramembrane proteolysis »
ROCK	« Rho associated coiled coil-containing protein kinase »
RTKs	récepteurs tyrosine kinase
S1P	« site-1 protease »
S2P	« site-2 protease »
SAP30	corépresseur transcriptionnel « Sin3A-associated protein, 30kDa »
Sef	protéine inhibitrice de la signalisation RTKs « similar expression to FGF »
SH2	domaine « Src homology 2 »
SH3	domaine « Src homology 3 »
Shc	protéine adaptatrice « Src homology 2 domain containing transforming protein »
Shp-2	protéine tyrosine phosphatase Shp-2
SKIP	coactivateur/corépresseur transcriptionnel « ski interacting protein »
SMAD	facteur de transcription « drosophila, mothers against decapentaplegic »
SMRT	corépresseur transcriptionnel « silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor »
SNC	système nerveux central
SOC	« store-operated channels »
Sos	facteur d'échange de nucléotides guanyliques « son of sevenless »
Sp1	facteur de transcription SP1
SPP	« signal peptide peptidase »
Src	protéine tyrosine kinase Src
SREBP	facteur de transcription « sterol-regulatory-binding-element »
SSA	semialdéhyde succinique
SSADH	« succinic acid semialdehyde dehydrogenase »
SUR	« sulfonyleurea receptor »
synGAP	« synaptic Ras GTPase activating protein »
Tech	« RhoA-guanine nucleotide exchange factor protein Tech »
TGF- $\alpha$	« transforming growth factor $\alpha$ »
TGF- $\beta$	« transforming growth factor $\beta$ »
TIP60	protéine histone acétyltransférase « Tat interactive protein 60 »
Trk A	« high affinity nerve growth factor receptor »
TRP	canaux « large transient receptor protein »
VEGF	« vascular endothelial growth factor »
VGAT	« vesicular GABA transporter »

## Abréviations

---

VIP	peptide vasoactif intestinal
WD-40	domaine WD-40
Wg	ligand Wnt « Wingless »
Wnt	récepteur 7-TMs Wnt

**Annexe 1- La protéolyse régulée comme mode de signalisation  
des récepteurs membranaires**

Il est admis que les RCPGs relaient les signaux chimiques extracellulaires aux canaux ioniques membranaires et aux voies de signalisation intracellulaires grâce à leur capacité de favoriser l'échange des guanines nucléotides (activité GEF) sur les protéines G hétérotrimériques [Gilman, 1995]. Ce mécanisme explique bien les actions rapides médiées par les RCPGs à la surface cellulaire. Un mécanisme effecteur alternatif des protéines transmembranaires, impliquant la protéolyse régulée et s'exerçant sur une plus longue échelle de temps que le couplage aux protéines G, est toutefois connu depuis quelques années pour plus d'une trentaine de protéines transmembranaires, essentiellement de type I, parmi lesquelles les récepteurs NOTCH, régulateurs du destin cellulaire des cellules eukaryotes, la protéine précurseur amyloïde (APP), impliquée dans la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer ainsi que des récepteurs TKs (ErbB4, p75) et molécules d'adhésion cellulaire (CD44, N-cadhérine) [Fortini, 2004 ; Kopan et Ilagan, 2004]. SREBP (« sterol-regulatory-binding-element ») et ATF-6 (« activating transcription factor 6 ») sont des protéines transmembranaires du RE, respectivement à 2 domaines transmembranaires et de type II, qui possèdent des domaines cytosoliques agissant en facteurs de transcription et qui régulent à la hausse des gènes de la biosynthèse du cholestérol et de la réponse aux protéines mal-repliées suivant la libération de leur segments cytosoliques par des protéases de la famille S2P. Nous nous attarderons plus particulièrement à la protéolyse de NOTCH, ErbB4 et APP, protéines pour lesquelles la protéolyse régulée est relativement bien caractérisée, notamment dans le SNC.



Les différents substrats qui viennent d'être mentionnés ont suffisamment de caractéristiques en commun en ce qui a trait à leur protéolyse pour qu'on fasse référence au mécanisme sous l'appellation de « protéolyse intramembranaire régulée » (RIP). Ces caractéristiques communes empêchent l'attaque désorganisée de ces protéines et permettent la libération contrôlée de produits de clivage, souvent bioactifs, par l'action successive de deux endopeptidases. Il y a d'abord nécessité d'un premier clivage de la protéine en sa face luminale ou extracellulaire, par des protéases telles que les métalloprotéases de la famille ADAM [Mumm et al. 2000; Huovila et al. 2005]. Le déstaging par les protéases ADAMs d'une variété de récepteurs et de protéines précurseurs liée à la membrane telles que des cytokines, facteurs de croissance et protéines d'adhésion est bien connu. Ces protéines à un domaine transmembranaire possédant un site métalloprotéase en leur ectodomaine sont d'ailleurs impliquées dans la transactivation des récepteurs TKs par les récepteurs 7-TMs, tel que revu à l'annexe II. Elles raccourcissent le segment extracytosolique des substrats sujets à la RIP à moins de 30 résidus, étape nécessaire à l'accomplissement d'un deuxième événement de clivage. On note que le clivage initial peut également être médié par d'autres protéases telles que S1P [Sakai et al. 1998], signal peptidases [Dalbey et al. 1997] et  $\beta$ -sécrétase [Vassar et al. 1999].

Dans le cas des récepteurs NOTCH et ErbB4, le clivage initial par ADAM10 et ADAM17 requiert leur activation respective par les ligands peptidiques de la famille Delta/Serrate/Jagged et les facteurs de croissance heregulin/neuregulin, betaregulin, epieregulin et « heparin-binding epidermal growth factor » [Mumm et al. 2000 ; Carpenter,

2001 ; Deuss et al 2008]. Le clivage initial d'ErbB4 est également initié suivant l'activation de PKC par le PMA.

Le deuxième clivage des protéines transmembranaires assujetties à la RIP peut être accompli par quatre classes de protéases intramembranaires (i-CLIPS; « intramembrane cleaving proteases ») soit les S2Ps (« site-2 proteases »), les SPPs (« signal peptide peptidases »), rhomboïdes et présénilines [Weihofen et Martoglio, 2003]. L'activité préséniline est la mieux comprise à ce moment-ci. Elle est tributaire des protéines présénilines 1 et 2, aspartyl protéases à 8 segments transmembranaires, centres catalytiques de complexes  $\gamma$ -sécrétase prédominamment localisés à l'appareil de Golgi ou au RE mais également actifs à la surface membranaire et dont la composition est encore mal définie [Fortini et al. 2002]. Elles sont mutées dans les formes précoces de la maladie d'Alzheimer. Les complexes  $\gamma$ -sécrétase incluent également les protéines à simple domaine transmembranaire Nicastrin et PEN-2, de même que la protéine à 7-TMs Aph-1.

Une particularité de l'activité  $\gamma$ -sécrétase réside en sa capacité de cliver ses substrats à même la membrane. Un motif de clivage de NOTCH a d'ailleurs été localisé du côté amino-terminal d'un résidu valine, lui-même situé à 3 résidus de la partie cytosolique de la protéine. Des motifs semblables ont également été retrouvés chez APP et ErbB4. Le clivage d'APP par  $\gamma$ -sécrétase n'est toutefois limité à ce motif, une autre région ayant été identifiée, toujours à l'intérieur de la membrane, médialement au site NOTCH-like. La balance entre le clivage de deux sites localisés dans cette région détermine le relâchement des fragments APP A $\beta$ 40 et A $\beta$ 42 et aurait des implications fondamentales dans la

pathogénèse de la maladie d'Alzheimer, puisque l'augmentation du ratio A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 favorise la formation de plaques amyloïdes de par la plus grande hydrophobicité d'A $\beta$ 42.

Suivant les deux événements de clivage, des fragments intracellulaires sont générés puis transloquent au noyau où ils peuvent se joindre à la machinerie transcriptionnelle de gènes cibles et ainsi en activer ou réprimer la transcription. Le fragment NOTCH, par exemple, est rapidement retrouvé dans le noyau suivant son relâchement de par la présence d'un motif de localisation nucléaire. Constitué de 1000 résidus, il agit en adaptateur, interagissant directement avec les cofacteurs transcriptionnels de la famille CSL (« C-promoter binding factor 1 (CBF-1), suppressor of hairless (Su(H)), lin-12 and glp-1 (Lag-1) ») via un domaine RAM et des répétitions ankyrine, une interaction favorisée par la protéine SKIP (« ski interacting protein »), ce qui convertit les cofacteurs CSL de corépresseurs en coactivateurs en empêchant leur interaction avec des complexes répresseurs tels SMRT/NcoR/HDAC1 et CIR/HDAC2/SAP30, et en favorisant possiblement la formation de complexes activateurs qui incluraient les histones acétylases PCAF et GCN5 [Mumm et Kopan, 2000]. Cela mène à l'activation transcriptionnelle de gènes cibles de NOTCH tels les régulateurs transcriptionnels bHLH de la famille HES («Hairy/Enhancer of Split/Lag-1»). Cette voie de signalisation intranucléaire de NOTCH contribue de manière significative à la régulation du destin et de la différenciation cellulaire.

Le fragment APP relâché, beaucoup plus modeste, est constitué de 47 résidus. Il médie l'assemblage d'un complexe transcriptionnel incluant la protéine adaptatrice nucléaire

Fe65 et l'histone déacétyltransférase TIP60 [Cao et Sudhof, 2001 ; Kimberly et al. 2001 ; Cupers et al. 2001 ; Gao et Pimplikar, 2001]. Il atténuerait de plus la signalisation  $Ca^{2+}$  médiée par les phosphoinositides [Leissring et al. 2002]. Des études génétiques supportent le rôle d'APP dans l'axogénèse, l'arborisation dendritique et la différenciation synaptique [Weihofen et Martoglio, 2003].

Dans le cas du récepteur ErbB4, un fragment C-terminal de 80kDa (s80) est relâché [Carpenter, 2003 ; Sardi et al. 2006]. Dans les précurseurs neuronaux indifférenciés, il forme un complexe avec la protéine de signalisation TAB2 et le co-répresseur nCoR et transloque par la suite au noyau. Les complexes s80-TAB2-nCoR inhibent la différenciation astrocytaire par la répression de gènes gliaux. Ce mécanisme de couplage des voies de signalisation intracellulaires d'ErbB4 s'ajoute au mécanisme établi des RTKs et impliquant leur dimérisation et l'activation de leur domaine tyrosine kinase par autophosphorylation.

En somme, la protéolyse régulée des protéines membranaires est un mécanisme de signalisation ubiquitaire qui régule de manière importante la survenue d'une variété de processus cellulaires. La genèse de fragments protéolytiques bioactifs capables de s'inclure au sein de macrocomplexes transcriptionnels a été peu étudiée dans le contexte des récepteurs à 7-TMs. Les deux seuls cas de récepteurs 7-TMs signalant via ce mécanisme sont présentés à la section suivante.

## **DFrizzled2 et mGluR1 $\alpha$ , deux cas de RCPGs protéolysés**

Le premier RCPG protéolysé a été découvert chez la *drosophile*. Il s'agit du récepteur DFrizzled2, sensible au facteur Wg (« Wingless »), un homologue Wnt, sécrété par les cellules présynaptiques des jonctions neuromusculaires glutamatergiques larvaires (fig. 3B) [Mathew et al. 2005]. La signalisation Wg – DFrizzled2 est nécessaire à la formation des zones actives et des spécialisations postsynaptiques des synapses matures. Les auteurs ont retrouvé des marquages intranucléaires avec un anticorps reconnaissant la partie C-terminale mais non pas la partie N-terminale de DFrizzled2 dans les cellules musculaires larvaires. En immunobuvardage de type western de cellules S2 et musculaires larvaires transfectées avec le récepteur DFrizzled2, une bande de 8 kDa a de plus été reconnue par l'anticorps C-terminal, en plus du récepteur entier. Le fragment de 8 kDa n'a toutefois pas été retrouvé dans des lysats de cellules musculaires larvaires non-transfectées.

Un motif de clivage spécifique aux métalloprotéases de la famille ADAM a été retrouvé dans la partie cytoplasmique du récepteur, proximement à son dernier domaine transmembranaire. Constitué de cinq résidus KTLES, sa mutation abolit le clivage de la queue C-terminale du récepteur en cellules S2 transfectées. Contrairement aux protéines membranaires assujetties à la RIP, La protéolyse de ce RCPG ne serait donc pas intramembranaire mais plutôt cytoplasmique.

La régulation du clivage de DFrizzled2 par son agoniste a été vérifiée. La surexpression de Wg dans les cellules présynaptiques a résulté en une augmentation des marquages

intranucléaires pour la partie C-terminale de DFrizzled2. Les auteurs ont ensuite vérifié si la protéolyse des récepteurs DFrizzled2 de la jonction neuromusculaire requérait l'endocytose du récepteur ou son transport rétrograde. Le blocage de ces étapes par la surexpression de transgènes dominant-négatifs de la dynamine et de composantes du complexe dynéine-dynactine a résulté en une diminution des marquages intranucléaires pour la partie C-terminale de DFrizzled2.

Les jonctions neuromusculaires des larves « knock-out » pour le récepteur DFrizzled2 présentent un nombre réduit de boutons et une morphologie anormale. Ces anomalies ont été entièrement renversées par la surexpression du récepteur DFrizzled2 sauvage mais non pas sa version présentant une mutation du motif de clivage ADAM.

En somme, le mécanisme de signalisation du récepteur DFrizzled2 chez la *drosophile*, suivant sa stimulation par Wg, impliquerait son endocytose et son transport rétrograde en direction du noyau cellulaire. Lors de ces étapes, la protéolyse du récepteur par une métalloprotéase de la famille ADAM se produirait et amènerait le relâchement d'un fragment C-terminal, subséquent transporté au noyau où il pourrait réguler la transcription de gènes impliqués dans la formation des jonctions neuromusculaires.

Fait intéressant, DFrizzled2 est affublé d'un motif PDZ C-terminal VSHV. Ces motifs d'interaction sont impliqués dans la formation de complexes de signalisation membranaires. Dans le contexte particulier d'un fragment protéolytique nucléaire, il a toutefois été envisagé que les protéines à domaines PDZ puissent plutôt moduler la

translocation et ainsi la formation de synapses [Ataman et al. 2006]. La régulation à la baisse des niveaux de la protéine à domaines PDZ dGRIP dans des cellules musculaires larvaires, à l'aide d'ARNs interférentiels, diminue drastiquement la quantité de points DFrizzled2 intranucléaires observés en immunohistochimie confocale. La réduction de dGRIP mime de plus les phénotypes observés suivant la réduction de Wg ou DFrizzled2. Ces effets de dGRIP dépendent d'une interaction directe entre ses domaines PDZ 4 et 5 et DFrizzled2, tel que montrée par immunoprécipitation de cellules S2 transfectées et en système de double hybride chez la levure. Ces résultats suggèrent un rôle des protéines à domaines PDZ dans la régulation du ciblage de protéines de signalisation nucléaire, complémentaire à leur rôle dans la formation de complexes de signalisation à la surface membranaire.

La protéolyse d'un autre RCPG, mGluR1 $\alpha$  (récepteur métabotropique glutamate 1 $\alpha$ ), a également été démontrée récemment (fig. 3C) [Xu et al. 2007]. La stimulation de cellules corticales cultivées avec 100  $\mu$ M Glutamate pour 1-60 min a en effet résulté en l'apparition progressive d'un fragment de 38kDa reconnu par un anticorps mGluR1 $\alpha$  C-terminal. Des bandes de 140 et 100kDa, correspondant aux récepteurs intacts et clivés, ont ensuite été retrouvées en immunobuvardage de type western de cellules corticales transfectées avec le récepteur mGluR1 $\alpha$  muni d'un épitope myc N-terminal. La caractérisation pharmacologique du clivage des récepteurs mGluR1 $\alpha$  endogènes a montré que leur clivage dépend de l'activation des récepteurs NMDA plutôt que des récepteurs mGluR1 $\alpha$ , l'apparition du fragment C-terminal étant bloquée lors du co-traitement des cellules avec glutamate et l'antagoniste NMDA MK-801, mais non pas lors du co-

traitement avec glutamate et l'antagoniste mGluR1 $\alpha$  LY367385. Le traitement avec le NMDA a également mené au clivage du récepteur mGluR1 $\alpha$ .

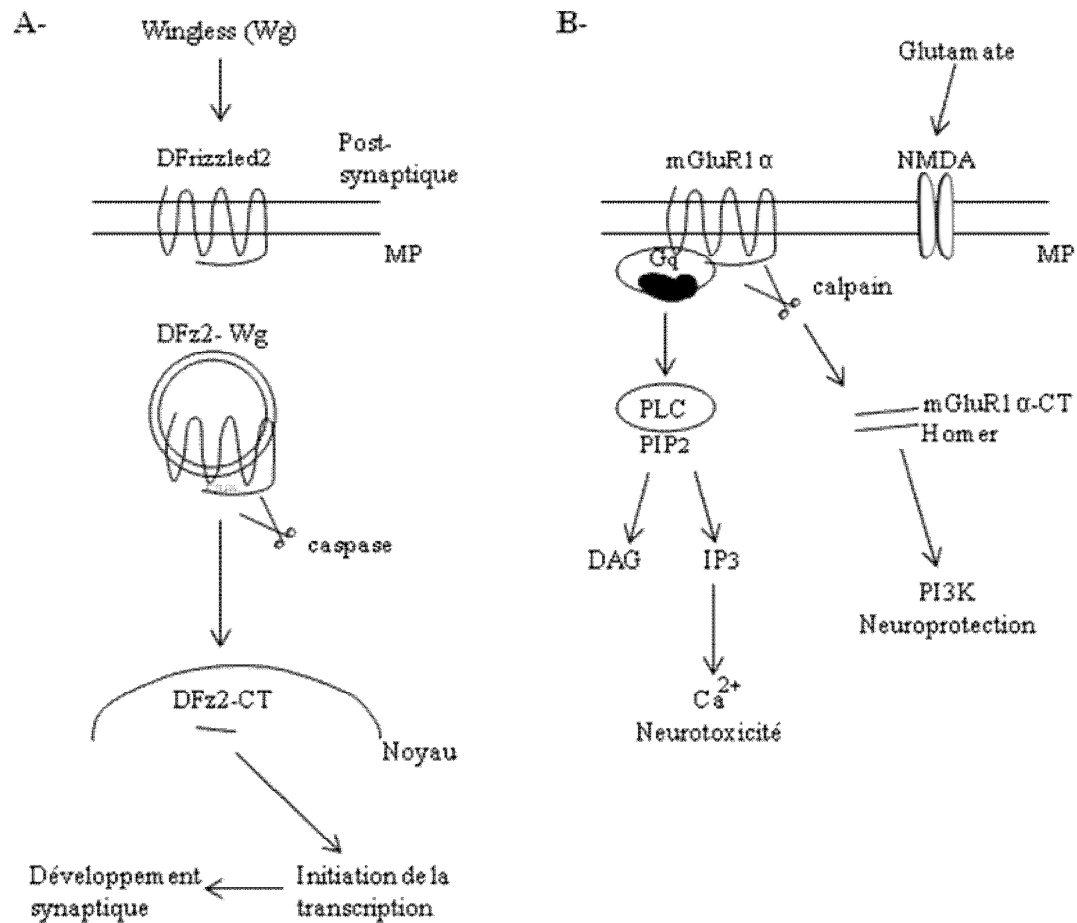
Les auteurs sont ensuite partis à la recherche d'une protéase responsable de la protéolyse du fragment C-terminal endogène de mGluR1 $\alpha$ . Le clivage de mGluR1 $\alpha$  médié par le NMDA en cultures neuronales a été aboli par le pré-traitement avec l'inhibiteur calpain « calpain inhibitor III ». Le pré-traitement avec l'inhibiteur caspase cpm-VAD-CHO fut sans effet. Le clivage a également été retrouvé en conditions *in vitro*, suivant l'incubation de récepteurs mGluR1 $\alpha$  transfectés en cellules HEK293 et immunoprécipités avec des quantités variables de  $\gamma$ -calpain recombinante. Le traitement de fractions membranaires issues de culture neuronales avec un peptide codant pour la région de mGluR1 $\alpha$  incluant le site de clivage calpain, dans le but de limiter la disponibilité de calpain pour les récepteurs mGluR1 $\alpha$  endogènes, a mené à une diminution de l'abondance des fragments mGluR1 $\alpha$  endogènes. Ces résultats convergent tous vers l'implication d'une protéase de la famille calpain. Un site de clivage a même été localisé entre les résidus S936 et Y937 par séquençage d'un fragment mGluR1 $\alpha$  C-terminal, généré sous forme de protéines de fusion GST et protéolysé *in vitro* avec  $\gamma$ -calpain recombinante.

À la recherche d'un rôle physiologique, les auteurs ont ensuite vérifié la capacité du récepteur mGluR1 $\alpha$  dépouillé de sa queue C-terminale à coupler ses effecteurs reconnus que sont les canaux TRPC1, GIRK1 et Ca<sup>2+</sup>. L'amplitude des courants générés suivant la stimulation du récepteur mGluR1 $\alpha$  mutant est fortement diminuée pour les canaux TRPC1 et GIRK1, mais la capacité à mobiliser le Ca<sup>2+</sup> cytosolique demeure préservée. Le



couplage de mGluR1 $\alpha$  à la voie de signalisation PI3K-AKT, régulatrice de la survie cellulaire, a également été vérifié. Les cellules neuronales ont été pré-traitées au NMDA, dans le but de cliver le récepteur mGluR1 $\alpha$ , puis traitées avec l'agoniste mGluR1 $\alpha$  DHPG. Les niveaux de phosphorylation d'AKT ont été fortement diminués, ce qui est considéré comme un effet pro-apoptotique. Cela suggère que seuls les récepteurs intègres sont en mesure de coupler la voie AKT. La réduction de la phosphorylation d'AKT causée par le pré-traitement avec le NMDA a été partiellement renversée par l'incubation initiale des cellules avec le peptide mGluR1 $\alpha$  compétiteur, démontrant encore une fois l'importance de la queue C-terminale de mGluR1 $\alpha$  dans le couplage de ses effecteurs. Le relâchement de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire et l'activation de la voie PI3K-AKT ayant des implications dans l'excitotoxicité, les auteurs ont envisagé que le clivage de mGluR1 $\alpha$  puisse contribuer significativement aux effets neurotoxiques de l'activation des canaux NMDA. L'hypothèse a été corroborée par l'observation de la plus grande mortalité cellulaire de cellules transfectées avec le récepteur mGluR1 $\alpha$  tronqué suivant la stimulation avec le NMDA, puis le renversement de cette observation par le peptide mGluR1 $\alpha$  compétiteur. Le peptide mGluR1 $\alpha$  a de plus un effet neuroprotecteur lorsqu'exprimé dans le cerveau de souris chez qui des convulsions sont induites par un traitement à l'acide kainique. En somme, il est conclu que le clivage calpain-dépendant du récepteur mGluR1 $\alpha$  suivant l'activation des récepteurs NMDA favorise l'excitotoxicité par la préservation du couplage aux voies de signalisation Ca<sup>2+</sup> et par l'abolition du couplage PI3K-AKT. Les récepteurs DFrizzled2 et mGluR1 $\alpha$  sont d'éloquents exemples de récepteurs à 7-TMs utilisant la protéolyse régulée comme mode

de signalisation, en parallèle avec le couplage de protéines G. La fig. 1 résume le mode de fonctionnement de ces deux récepteurs.



**Figure 1. Mécanismes alternatifs de signalisation des récepteurs à 7-TMs.** A) Récepteur DFz2 chez la *drosophile*. Suivant l'activation par le ligand Wingless (Wg), la partie C-terminale des récepteurs DFz2 endocytosés est protéolysée par une endopeptidase de la famille Caspase. Les domaines C-terminaux de 8kDa qui sont générés transloquent ensuite au noyau où ils influent sur la formation de jonctions neuromusculaires par régulation présumée de la transcription. B) Récepteur mGluR1α des neurones corticaux glutamatergiques chez le rongeur. L'activation des récepteurs-canaux NMDA par le glutamate est suivie de la protéolyse du récepteur mGluR1α par Calpain. Les fragments C-terminaux de 38kDa générés favorisent l'excitotoxicité par la préservation du couplage aux voies de signalisation Ca<sup>2+</sup> et par l'abolition du couplage PI3K-AKT.

**Annexe 2- Composantes de la voie MAPK-ERK1/2, couplage des récepteurs TKs et à 7-TMs par transactivation des récepteurs tyrosine kinase**

Dans le cadre de cette section supplémentaire, nous élaborons sur la nature même des composantes de la voie intracellulaire de signalisation MAPK-ERK1/2, régulatrice de la différenciation et de la prolifération cellulaire, décrite précédemment dans le contexte de son activation par les protéines G hétérotrimériques. Nous poursuivons avec la description du couplage de cette voie par les récepteurs TKs, activés directement par leurs ligands ou encore transactivés par des récepteurs à 7-TMs.

### **Protéines Ras**

Les protéines Ras sont des GTPases associées aux différentes membranes cellulaires qui, dans un état activé par la liaison de GTP, sont en mesure d'activer différents effecteurs dont la MAPK3K Raf. La famille Ras est constituée de quatre isoformes soit H-Ras, N-Ras, K-Ras 4A et K-Ras 4B (les deux dernières étant des variants d'épissage de K-Ras), ciblées différenciellement à la membrane plasmique et aux endomembranes selon la séquence et les modifications post-traductionnelles de régions C-terminales hypervariables de 23-24 acides aminés [McKay et Morrison, 2007]. Même si toutes les protéines Ras sont farnésylées et carboxylméthylées en cette région, ce qui les ciblent au RE, des motifs de localisation secondaires situés à proximité peuvent permettre leur ciblage à la membrane plasmique [Choy et al. 1999]. K-Ras 4B est, par exemple, ciblée à la surface membranaire grâce à une série de résidus polybasiques C-terminaux tandis que H-Ras et N-Ras, qui contiennent des résidus cystéine en constante dépalmitoylation/palmitoylation en cette même région, font la navette entre les membranes plasmiques et golgiennes [Hancock et al. 1990]. L'ubiquitination de la partie C-terminale contribue également à la localisation sous-cellulaire. Elle stabilise en effet la

localisation aux endosomes de H-Ras et N-Ras (mais pas de K-Ras) et permet l'activation de la voie MAPK-ERK1/2 depuis ce lieu [Jura et al. 2006]. Car si le mécanisme d'activation le mieux caractérisé de Ras a pour lieu la membrane plasmique et dépend de la catalyse par le facteur d'échange guanine nucléotide SOS du remplacement de la GDP de Ras par une GTP [Quilliam et al. 1995; Downward, 1996], les évidences s'accumulent à l'effet que les protéines Ras peuvent aussi être activées à l'appareil de Golgi, au RE et sur les endosomes, selon des paramètres différents en terme d'amplitude et de cinétique [Chiu et al. 2002; Jiang et Sorkin, 2002; Burke et al. 2001; Di Guglielmo et al. 1994]. Ras-GTP peut de plus activer des complexes de signalisation différents selon les compartiments cellulaires et ainsi élargir le répertoire de réponses biologiques sous-tendues par les voies de signalisation (MAPK ou autres) qu'elle active [Sorkin et Von Zastrow, 2002; Plowman et Hancock, 2005; Mor et Phillips, 2006].

### **Protéines Raf**

Les MAP3K Raf (Raf-1, B-Raf, A-Raf) trônent au sommet de la voie MAPK-ERK1/2. Quoiqu'elles partagent des caractéristiques structurales communes, elles varient par leur mode de régulation, leur distribution tissulaire et leur capacité à activer les MAP2K MEK1/2 [Wellbrock et al. 2004]. Raf-1 est l'activateur principal de MEK1/2. À l'état inactif, les protéines Raf seraient localisées dans le cytosol, avec leur domaine N-terminal agissant en auto-inhibiteur de leur domaine kinase C-terminal, le tout stabilisé par l'interaction à des dimères de la protéine d'échaffaudage 14-3-3. L'activation de récepteurs TKs stimule le recrutement aux membranes via Ras de Raf, le relâchement de 14-3-3 puis l'activation de Raf par une suite complexe d'événements de phosphorylation

qui augmentent son activité catalytique en neutralisant son auto-inhibition et en facilitant l'activation de son domaine kinase. Ils incluent, dans le cas de Raf-1, la déphosphorylation du site inhibiteur S259, la phosphorylation du site activateur S338 et la phosphorylation de la boucle d'activation, laquelle procure une activité maximale.

## **MEK1/2**

Les MAP2Ks MEK1 et MEK2 sont activées par phosphorylation des sérines 218 et 222 de leurs boucles d'activation, ce qui leur permet de phosphoryler subséquemment les résidus Thr202 et Tyr 204 d'ERK1 (Thr185 et Tyr187 d'ERK2). Elles demeurent les éléments les moins bien étudiés de la triade MAPK-ERK1/2. Aucune mutation MEK1/2 n'a été détectée dans les cancers humains, ce qui n'empêche pas que ces kinases soient considérées d'intéressantes cibles thérapeutiques, puisqu'elles sont situées à un point de convergence de plusieurs voies mitogéniques et qu'ERK1/2 en sont les seuls substrats connus. Cet état de fait a stimulé le développement d'inhibiteurs pharmacologiques MEK1/2 capables de bloquer l'activation d'ERK.

## **ERK1/2**

Les MAPK ERK1 et ERK2, également connues sous les noms de p44<sup>MAPK</sup> et p42<sup>MAPK</sup>, sont des protéines sérine/thréonine kinases ciblant les résidus proline et partageant 83% d'homologie de séquence. Elles ont été les premières MAPKs décrites chez les mammifères. Une fois activées, elles phosphorylent une variété de substrats nucléaires et cytosoliques qui promeuvent de manière concertée la synthèse de nucléotides, la transcription d'ARNs messagers, la traduction protéique et le cycle cellulaire [Pouyssegur

et al. 2002 ; Traverse et al. 1992]. Les voies MAPKs ont une variété de facteurs de transcription comme substrats [Turjanski et al. 2007]. Les sites de phosphorylation sont souvent localisés dans les domaines de transactivation et peuvent ainsi moduler l'activité transcriptionnelle par régulation de l'affinité de liaison des facteurs de transcription à des coactivateurs transcriptionnels tels que CBP (« CREB-binding protein ») ou encore par régulation de leur stabilité par interférence avec la dégradation ubiquitine-dépendante. Elk-1 (« ets like gene 1 ») est un substrat d'ERK1/2 particulièrement bien étudié à cet égard. Son activité transcriptionnelle est en effet augmentée par la phosphorylation de multiples sites par ERK1/2. Les facteurs de transcription des familles Jun (c-Jun, JunB et JunD) et Fos (c-Fos, FosB et JunD), lesquels peuvent homodimériser ou hétérodimériser et ainsi former les complexes protéiques AP-1 (« activator protein 1 »), sont également des substrats d'ERK1/2. La phosphorylation multi-site de c-Fos et de c-Myc en sérine 62 par ERK1/2 augmente leur activité et leur stabilité. La liste des facteurs de transcription qui sont substrats d'ERK1/2 inclut également SMAD1-4 (« drosophila, mothers against decapentaplegic 1-4 »), MAF-A, p53 (« tumor protein 53 »), c-Myb et Sp1. La phosphorylation des facteurs de transcription SMAD1 et NFAT4 (« nuclear factor of activated T-cells 4 ») par ERK1/2 a par ailleurs un effet inhibiteur sur leur activité qui impliquerait leur rétention cytoplasmique. Bien évidemment, les facteurs de transcription substrats d'ERK1/2 sont également substrats d'autres kinases, MAPK ou autres, activées par des signaux potentiellement distincts de ceux activant la voie MAPK-ERK1/2. Ils représentent le lieu de convergence d'une variété de signaux extracellulaires.



Deux variants d'épissage d'ERK1 ont été caractérisés jusqu'à présent. ERK1b est une forme d'ERK1 de 46kDa, trouvée chez les rongeurs, résultat d'une insertion dans la partie C-terminale qui diminuerait sa sensibilité aux phosphatases PTP-SL et MKP3, par disruption d'un site d'amarrage de type CD. Cette caractéristique pourrait lui permettre de transmettre des signaux plus soutenus dans le temps et ainsi de médier des réponses cellulaires distinctes aux plans qualitatif et quantitatif. Le profil d'activation de cette forme d'ERK1 est par ailleurs semblable à celui de la la forme de 44kDa, hormis une activation plus robuste par le stress osmotique et une interaction plus faible avec MEK1. Une autre forme d'ERK, ERK1c, de 42kDa, est caractérisée à la fois par une délétion et une insertion. Elle est monoubiquitinée en conditions de haute densité cellulaire et enrichie dans l'appareil de Golgi. La localisation particulière de cette forme d'ERK1 pourrait lui permettre d'être régulée spécifiquement par des formes de Ras également localisées aux endomembranes, associées à la signalisation MAPK dite soutenue. D'autres variants d'épissage sont également susceptibles d'exister.

## **Phosphatases**

Les réponses cellulaires associées à l'activation des voies MAPKs dépendent de l'amplitude et de la durée du signal, des paramètres qui influencent la distribution sous-cellulaire d'ERK1/2 activé (cytosolique vs nucléaire), l'association des composantes MAPK à des protéines d'échaffaudage et ainsi la phosphorylation des protéines-cibles. La cinétique de la déphosphorylation contribue à la détermination de l'amplitude et de la durée d'activation des MAPKs. Les mécanismes de la déphosphorylation des MAPKs sont moins bien définis que les mécanismes de sa phosphorylation. Une famille de

MAPK phosphatases double spécificité (Thr/Tyr) (MKPs), constituée de 10 membres, accomplit une part importante de la déphosphorylation des MAPKs chez les mammifères [Owens et Keyse, 2007]. Ces phosphatases peuvent être séparées en 3 sous-familles selon leur structure génique, leur homologie de séquence et leur localisation sous-cellulaire. Le premier groupe inclut DUSP1/MKP-1, DUSP2/PAC-1, DUSP4/MKP-2 et DUSP5, toutes de localisation intranucléaire. Le deuxième groupe inclut DUSP6/MKP-3, DUSP7/MKP-X, DUSP9/MKP-4, de localisation cytosolique. Les MKPs du troisième groupe, soit DUSP8, DUSP10/MKP-5 et DUSP16/MKP-7, se démarquent quant à elles par leur spécificité pour les MAPK activées par le stress (JNK et p38). La régulation des différentes MKPs est mal connue à ce moment. On sait qu'elles sont régulées à la hausse par des stimuli activateurs des voies MAPK, ce qui suggère que l'activité des voies MAPK est assujettie à une boucle de rétrocontrôle négatif. Une meilleure compréhension des signaux régulateurs des MKPs permettra de déterminer l'importance du réseau de régulation négative des MAPKs.

### **Protéines d'échaffaudage**

Les protéines d'échaffaudage agissent en plate-formes d'amarrage des différentes kinases d'une voie MAPK donnée et facilitent ainsi l'activation de celle-ci [Dhanasekaran et al. 2007]. Elles régulent l'amplitude et la durée des signaux, augmentent leur spécificité en isolant les modules de signalisation MAPK et en diminuant ainsi l'influence de stimuli impertinents. Elles influencent également la localisation sous-cellulaire des modules. Les protéines « kinase suppressor of Ras 1/2 » (KSR1/2), « MEK-partner-1 » (MP1), « MAPK organizer 1 » (MORG1) et  $\beta$ -arrestine sont des exemples caractérisés de protéines

d'échaffaudage spécifiques aux voies MAPKs chez les mammifères. Par exemple, KSR1 interagit directement avec Raf, MEK et ERK suivant son ciblage membranaire RTK-dépendant, ce qui facilite l'activation de MAPK-ERK1/2 à cet endroit. La protéine MP1, identifiée comme protéine interactrice de MEK1 en système de double hybride chez la levure, promeut quant à elle la localisation et l'activation de complexes MAPK-ERK endosomaux [Teiss et al. 2002].

MORG1 est une protéine de 35kDa, de la famille des protéines WD-40, interactrice de MP1, Raf-1, B-Raf, MEK1, MEK2, ERK1/2. Elle augmente les réponses ERK médiées par le FBS (sérum fœtal bovin), les phorbols esters, l'acide lysophosphatidique (LPA) mais non pas l'EGF. Un rôle facilitateur de MORG1 dans le couplage des RCPGs à la voie MAPK-ERK1/2 a ainsi été proposé, étant donné la dépendance des réponses LPA et EGF à l'activation respective de RCPGs et de RTKs.

La protéine  $\beta$ -arrestine a initialement été étudiée dans le contexte de la désensibilisation des réponses membranaires des RCPGs [Lefkowitz et Shenoy, 2005]. Elle interagit en effet avec des RCPGs, tels que  $\beta_2$ -AR, PAR2 et AT1A, qui sont phosphorylés suivant leur activation, ce qui favorise leur endocytose [Lefkowitz et Whallen, 2004].  $\beta$ -arrestine interagit de plus avec les différentes composantes de la triade MAPK-ERK1/2 et favorise la formation de complexes de signalisation MAPK endocytiques n'incluant pas de protéine G. Cette signalisation ERK médiée par  $\beta$ -arrestine se distingue par une cinétique d'activation relativement lente mais soutenue et par l'absence de propagation au noyau. Il a par ailleurs été rapporté que l'activation du récepteur NGF Trk A amène l'interaction

PTX-dépendante avec  $\beta$ -arrestine 1, une observation liant  $\beta$ -arrestine à une voie de transactivation RCPGs-RTKs impliquant  $G_{i/o}$  [Rakhit et al. 2001]. La surexpression de  $\beta$ -arrestine 1 augmente de plus l'activation de MAPK-ERK1/2 par le NGF.

D'autres protéines d'échaffaudage interagissent avec les différentes composantes de la voie MAPK-ERK1/2 et médient des réponses spécifiques quant à leur contexte. Sef est par exemple une protéine transmembranaire localisée à l'appareil de Golgi, qui lie sélectivement MEK activé et facilite la phosphorylation d'ERK [Torii et al. 2004]. Elle empêche toutefois la translocation nucléaire d'ERK, et ne permet ainsi que la phosphorylation de substrats cytosoliques depuis l'appareil de Golgi. Paxillin est un autre de ces échaffauds MAPK, qui permet cette fois-ci l'activation d'ERK1/2 au sein de complexes MAPK localisés dans les adhésions focales [Ishibe et al. 2003]. Ces complexes contribuent à l'étirement cellulaire en favorisant le recrutement de FAK (« focal adhesion kinase »). La liste des échaffauds MAPK inclut également les protéines CNK-1, CNK-2, MEKK1, IQGAP1 et 14-3-3.

### **Couplage des récepteurs tyrosine kinase à la voie MAPK-ERK1/2**

La voie MAPK-ERK1/2 a initialement été associée à l'activation des RTKs par les différents facteurs de croissance. Ces récepteurs représentent un groupe d'une cinquantaine de récepteurs, sensibles à différents facteurs de croissance (PDGF, VEGF, EGF, FGF, NGF, insuline, etc.), regroupés sous au moins 18 familles et exprimés à la surface d'à peu près toutes les cellules mammifères où ils médient une variété de réponses biologiques, notamment prolifératives ou différenciatrices [Mckay et Morrison,

2007]. À l'image de la voie MAPK-ERK1/2, l'importance critique de ces récepteurs dans la régulation de la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire est témoignée par leur implication fréquente dans le développement de cancers causés par des mutations les rendant constitutivement actifs ou menant à la surexpression de leurs ligands. Ils prennent généralement la forme de simples chaînes polypeptidiques monomériques. Le domaine de liaison du ligand est localisé dans la partie N-terminale, extracellulaire, qui peut également contenir des domaines globulaires du genre immunoglobuline, fibronectine type III, riches en cystéines, etc. La partie C-terminale, intracellulaire, contient quant à elle le domaine tyrosine kinase [Hubbard et Till, 2000].

Ces récepteurs sont donc activés par la liaison de facteurs de croissance à leurs domaines extracellulaires, laquelle induit la dimérisation puis l'autophosphorylation de résidus tyrosines en leurs domaines intracellulaires, qui servent de sites de liaison spécifiques pour des protéines contenant des domaines SH2 et PTB. Ces protéines peuvent être des enzymes directement activées par le récepteur (Src, PLC $\gamma$ , Shp-2, PI3K), des adaptateurs (Grb2, Shc) ou des protéines d'amarrage (IRS, FRS, protéines Gab/Dok). Des complexes de signalisation multiprotéiques sont ainsi assemblés à la membrane plasmique ou sur les endomembranes. Les domaines kinases activés peuvent également phosphoryler directement les protéines des complexes effecteurs en aval du récepteur. Ces événements de phosphorylation coordonnés amènent l'activation de MAPK-ERK1/2, PLC- $\gamma$ 1 et PI3K [Huang et Reichardt, 2003].

Par exemple, la dimérisation ligand-dépendante du récepteur Trk A, sensible au NGF, peut activer la voie de signalisation MAPK-ERK1/2 par le recrutement du domaine PTB de la protéine Shc en un motif NPXY autophosphorylé [Stephens et al. 1994]. La protéine Shc est subséquemment phosphorylée par le récepteur, ce qui lui permet de recruter Grb2 et le facteur d'échange guanine nucléotide SOS, lequel catalyse le relâchement de GDP et son remplacement par le GTP sur la petite protéine G Ras, ce qui active cette dernière et initie la cascade MAPK-ERK1/2.

L'enzyme PLC- $\gamma$ 1 est recrutée à la surface suivant l'activation des RTKs, à proximité de son substrat lipidique phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>), dont elle catalyse le bris en diacylglycérol (DAG) et inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>) qui activeront, respectivement, les isoformes PKCs régulées par DAG et les stocks intracellulaires de Ca<sup>2+</sup> (et par extension les isoformes PKCs sensibles au Ca<sup>2+</sup> de même que la signalisation Ca<sup>2+</sup> en général). Certaines isoformes PKC sont de puissants régulateurs de la voie MAPK-ERK1/2, comme en témoigne l'effet stimulateur MAPK-ERK1/2 de l'activateur PKC et promoteur de tumeur phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA).

Nous mentionnons l'activité lipide kinase de PI3K malgré le fait qu'elle ne soit pas en lien avec la voie MAPK-ERK1/2. Elle promeut la survie cellulaire par la synthèse de composés phosphatidylinositides tels le PI-3,4-P<sub>2</sub>, qui interagit directement avec la protéine sérine/thréonine kinase AKT (PKB) via un domaine PH et permet son recrutement à la membrane puis son activation via PDK-1 et PDK-2 [Huang et Reichardt, 2003]. AKT a parmi ses nombreux substrats toute une série de protéines impliquées dans

la régulation de l'apoptose, dont des membres de la famille BCL-2 et des facteurs de transcription Forkhead, qui supportent sont action anti-apoptotique.

### **Couplage des récepteurs à sept domaines transmembranaires à la voie MAPK-ERK1/2 par transactivation des récepteurs tyrosine kinase**

L'activation de la voie MAPK-ERK1/2 par différents RCPGs couplés à  $G_q$  ou  $G_i$ , en systèmes hétérologues d'expression, a rapidement été hypothétisée comme empruntant le chemin des récepteurs RTKs, les effets médiés par les facteurs de croissance sur la voie MAPK-ERK1/2 étant souvent plus puissants et ayant été démontrés avant ceux des ligands RCPGs. Ce concept de transactivation des RTKs par les RCPGs supporte également bien la notion à l'effet que les différentes familles de protéines réceptrices membranaires et leurs groupes effecteurs associés ne médient généralement pas leurs actions cellulaires, qu'elles soient de nature électrique, proliférative, différenciatrice ou métabolique, en tant qu'entités isolées et que l'interprétation différentielle de signaux chimiques extracellulaires coïncidents permet la régulation de la nature et de la magnitude des réponses cellulaires.

Le potentiel de transactivation des RTKs a été initialement démontré et développé pour le récepteur à l'EGF et son cousin HER2 (« human epidermal growth factor receptor 2 »), qui peuvent être rapidement phosphorylés en leurs résidus tyrosine par l'endothéline-1, le LPA ainsi que la thrombine dans les fibroblastes de rat, ce qui active rapidement MAPK-ERK1/2 [Daub et al. 1996]. Le phénomène est dans ce type cellulaire indépendant de la présence de l'EGF, quoiqu'inhibé par l'antagonisme du récepteur à l'EGF ou par des mutations à effet dominant négatif de ce récepteur. De cette découverte fondamentale ont

germé plusieurs études confirmant l'importance de la transactivation du récepteur à l'EGF en tant que signal activateur de MAPK-ERK1/2 en une variété de types cellulaires.

Une contribution majeure au modèle a été fournie par le même groupe [Prenzel et al. 1999], qui a montré l'implication de métalloprotéases membranaires dans la transactivation du récepteur EGF par les ligands RCPGs LPA, endothéline, thrombine, bombésine et carbachol. La stimulation des RCPGs amène en effet l'activation de métalloprotéinases, ce qui permet le clivage de HB-EGF (« Heparin-binding-EGF »), un des multiples ligands connus du récepteur EGF, et la libération de sa partie active, liée à un domaine transmembranaire lorsque l'agoniste est sous sa forme de précurseur. L'importance physiologique du mécanisme est supportée par des résultats montrant que l'inhibition du clivage du précurseur HB-EGF empêche la transactivation et l'activation des signaux en aval, régulant ainsi la croissance et la migration d'une lignée tumorale de la prostate de même que l'hypertrophie cardiaque [Carpenter, 2000; Asakura et al. 2002]. Le modèle de transactivation clivage-dépendant qui prévaut pour le moment prend donc la forme d'un serpent, le signal passant trois fois la membrane avant d'activer MAPK-ERK1/2. Le signal serait dans un premier temps transmis à l'intérieur de la cellule par la liaison du ligand au RCPG concerné, y activerait la partie intracellulaire d'une métalloprotéinase par un mécanisme inconnu, et la rendrait apte à cliver ses substrats extracellulaires, parmi lesquels les protéines précurseurs EGF, avec comme conséquence la réentrée du signal par la stimulation du récepteur EGF, son autophosphorylation puis l'activation de la voie MAPK-ERK1/2 [Prenzel et al. 1999; Wallasch et al. 2002]. Si les protéases impliquées dans ce phénomène demeurent mal définies, des études génétiques



suggèrent l'implication de métalloprotéinases de la sous-famille ADAM (« A Disintegrin and Metalloproteinase ») dans le clivage des précurseurs membranaires de deux des ligands du récepteur EGF, HB-EGF et TGF- $\alpha$  [Izumi et al. 1998, Black et al. 1997; Moss et al. 1997], une action qui serait de surcroît modulée par la PKC [Carpenter, 2000].

Des voies de transactivation indépendantes du clivage ont également été identifiées pour le récepteur EGF. Les protéines tyrosine kinases Src et Pyk2 semblent occuper une place importante dans ces voies, en aval de l'activation des RCPGs. Il a en effet été déterminé par approche génétique [Andreev et al. 2001] qu'elles sont nécessaires à la phosphorylation du récepteur EGFR induite par le LPA et les autres agonistes RCPGs précédemment mentionnés. Src et Pyk2 ne sont toutefois pas absolument requises à l'activation de la voie MAPK-ERK1/2 par lesdits agonistes, ce qui montre que l'adéquation n'est pas parfaite entre phosphorylation des RTKs et activation de MAPK-ERK1/2 [Luttrell et al. 1996; Biscardi et al. 1999; Keely et al. 2000].

L'inactivation de tyrosines phosphatases pourrait également être impliquée dans la transactivation. Celles-ci régulent en effet de près l'activité RTK et leur inactivation réversible par le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) a été établie [Meng et al. 2002]. Or, la stimulation de plusieurs RCPGs mène à la synthèse d' $H_2O_2$  [Rhee et al. 2000], ce qui pourrait les lier à l'activation des RTKs. Ce rôle du  $H_2O_2$  a d'ailleurs été établi dans le cas de la stimulation de MAPK-ERK1/2 par le LPA [Chen et al. 1995].

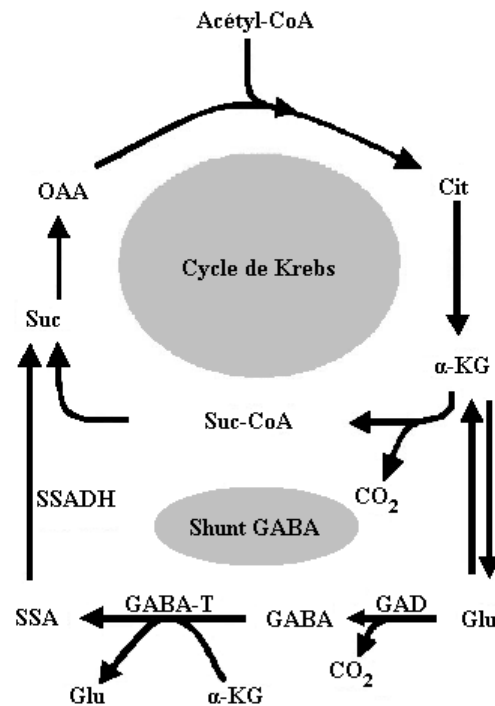
### **Annexe 3 - Neurotransmission GABAergique**

Le GABA est considéré comme le neurotransmetteur inhibiteur le plus important du système nerveux central mature chez les mammifères. Présent en concentrations millimolaires dans plusieurs régions du cerveau, il est sécrété par 20 à 30% des neurones, notamment par la grande majorité des interneurons corticaux et hippocampaux, intégrés à des circuits locaux d'inhibition de neurones de projection excitateurs, pour la plupart glutamatergiques [Wonders et Anderson, 2006]. La place qu'occupe le GABA en tant que neurotransmetteur inhibiteur primaire est étudiée depuis plus d'une cinquantaine d'années; son rôle dans la modulation des signaux générés par le cortex et dans la plasticité du cerveau adulte est majeur. La signalisation GABAergique exerce de plus un rôle régulateur lors du développement du système nerveux, aux étapes de prolifération des cellules souches neuronales, de migration des interneurons et de différenciation [Owens et Kriegstein, 2002 ; Nguyen et al. 2001]. Ces fonctions alternatives du GABA, moins étudiées, surprennent peu lorsque l'on considère l'ancienneté de cet acide aminé. L'existence d'une signalisation GABAergique initiée depuis les endomembranes prendrait tout son sens dans ce contexte.

## **Synthèse**

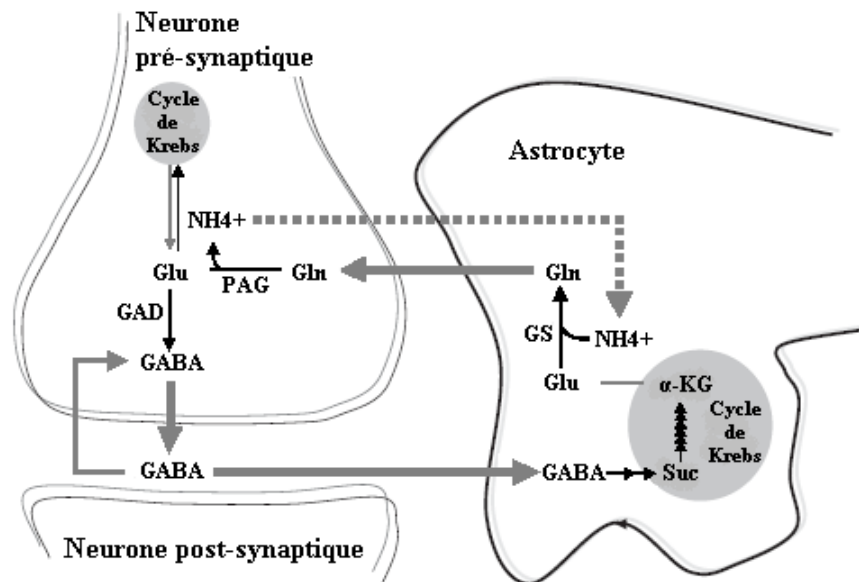
Le GABA est un acide aminé non-protéique à quatre carbones synthétisé par pratiquement tous les organismes de la bactérie à l'humain. Sa synthèse est intimement liée au métabolisme énergétique de la cellule puisqu'il débute par la glycolyse, soit la dégradation cytosolique du glucose en pyruvate puis en acétyl-CoA, et le cycle de Krebs, série de réactions biochimiques mitochondriales menant à la production d'intermédiaires énergétiques qui permettront la production d'adénosine triphosphate (ATP) dans la

chaîne respiratoire [Nguyen et al. 2001]. Le cycle de Krebs est initié par le transfert du groupement acétyl de l'acétyl-CoA à l'oxaloacétate lequel produit le citrate, premier intermédiaire énergétique du cycle. Puisque l'enzyme pyruvate carboxylase (PC), qui permet la genèse d'oxaloacétate depuis le pyruvate, est seulement exprimée par les astrocytes, la synthèse *de novo* de l'acide L-glutamique et du GABA à partir du glucose dépend tant des neurones que des astrocytes. La synthèse du GABA diverge du cycle de Krebs à l'étape de l'intermédiaire  $\alpha$ -kétoglutarate, un acide  $\alpha$ -cétonique (fig. 1). Cette étape est suivie par une réaction de transamination de l' $\alpha$ -kétoglutarate en acide L-glutamique par l'enzyme  $\alpha$ -oxoglutarate ou GABA-transaminase (GABA-T). L'incapacité des neurones à produire le GABA depuis le glucose rend nécessaire le transfert de précurseurs GABA des astrocytes aux neurones afin de compenser la recapture astrocytaire de GABA. Cela est accompli à l'étape du précurseur l'acide L-glutamique, transféré grâce au cycle glutamate/GABA-glutamine en opération entre astrocytes et neurones (fig. 2) [Bak et al. 2006]. L'acide L-glutamique, produit *de novo* ou à partir du GABA recapturé par les astrocytes, est en effet transformé en glutamine par l'enzyme glutamine synthétase, spécifique aux astrocytes. Après son relâchement et sa recapture par les neurones, il est retransformé en acide L-glutamique par l'enzyme « phosphate-activated glutaminase » (PAG). Le GABA neuronal est donc issu en partie de l'acide L-glutamique synthétisé par les astrocytes. Une dernière réaction de décarboxylation, limitante, catalysée par l'enzyme L-glutamate décarboxylase (GAD) et exclusive aux neurones GABAergiques, permet la synthèse finale du GABA.



**Figure 1. Synthèse et dégradation du GABA.** Illustration des quatre réactions qui constituent le « shunt GABA » : 1- synthèse de l'acide L-glutamique (Glu) par transamination de l'intermédiaire du cycle de Krebs  $\alpha$ -kétoglutarate ( $\alpha$ -KG), réaction catalysée par l'enzyme  $\alpha$ -oxoglutarate ou GABA-transaminase (GABA-T); 2- synthèse du GABA par décarboxylation de l'acide L-glutamique (Glu), réaction catalysée par l'enzyme L-glutamate décarboxylase (GAD); 3- dégradation du GABA en semialdéhyde succinique (SSA) par GABA-T; 4- oxydation du semialdéhyde succinique en succinate par l'enzyme « succinic acid semialdehyde dehydrogenase » (SSADH). Le « shunt GABA » est vu comme une voie alternative permettant non seulement la synthèse du GABA mais également sa conservation, puisque la transamination du GABA en SSA par GABA-T ne se produit que lorsque qu'une molécule  $\alpha$ -kétoglutarate est présente pour accepter le groupe amine enlevé et ainsi devenir une molécule d'acide L-glutamique, précurseur GABA.

Les réactions de transamination de l' $\alpha$ -kétoglutarate en acide L-glutamique par l'enzyme GABA-T, de décarboxylation de l'acide L-glutamique en GABA par l'enzyme GAD, de transamination du GABA en semialdéhyde succinique (SSA) par GABA-T et d'oxydation du semialdéhyde succinique en succinate par l'enzyme SSADH (« succinic acid semialdehyde dehydrogenase »), peuvent être vues comme une boucle alternative (fig. 2), fermée, contournant l'étape succinyl-CoA du cycle de Krebs, et appelée le « shunt GABA », puisque le succinate produit à partir du SSA réintègre par la suite le cycle de Krebs [Nguyen et al. 2001]. Le « shunt GABA » est vu comme une voie alternative permettant non seulement la synthèse du GABA mais également sa conservation, puisque la transamination du GABA en SSA ne se produit que lorsque qu'une molécule  $\alpha$ -kétoglutarate est présente pour accepter le groupe amine enlevé et ainsi devenir une molécule d'acide L-glutamique, précurseur GABA. Une molécule d'acide L-glutamique est donc générée pour chaque molécule de GABA métabolisée. La disponibilité du précurseur contribue à la préservation du réservoir neuronal de GABA.



**Figure 2. Cycle glutamate-glutamine.** Illustration de la synthèse astrocytaire *de novo* de l'acide L-glutamique, précurseur GABA, puis de son transfert au compartiment neuronal suivant sa conversion en glutamine (Gln) par l'enzyme glutamine synthétase. La Gln est ensuite retransformée en acide L-glutamique dans le compartiment neuronal grâce à l'enzyme « phosphate-activated glutaminase » (PAG). La synthèse finale de GABA est exclusivement neuronale.

L'activité GAD, propre aux neurones GABAergiques, permet l'accumulation cytosolique et synaptique de GABA à des concentrations jusqu'à 1000 fois plus élevées que celles des neurotransmetteurs monoaminergiques dans certaines régions cérébrales. Elle est tributaire de deux enzymes isoformes, GAD65 et GAD67, codées par des gènes différents et qui se distinguent par leur régulation et leur localisation sous-cellulaire [Nguyen et al. 2001 ; Soghomonian et Martin, 1998 ; Wei et Wu, 2008]. L'analyse de leur séquence protéique met en lumière deux domaines, soit un domaine N-terminal hautement divergent (23% d'homologie de séquence), potentiellement impliqué dans le ciblage sous-cellulaire, l'association aux membranes et la dimérisation, et un domaine C-terminal (72% d'homologie de séquence), plus gros, qui contient le centre catalytique. Les deux isoformes sont à la fois retrouvées dans des fractions solubles et membranaires dans le cerveau. En immunohistochimie, GAD65 apparaît notamment associée à l'appareil de Golgi et aux vésicules synaptiques de terminaisons GABAergiques. Sa localisation synaptique, associée au fait que son activité soit augmentée par l'ajout du cofacteur pyridoxal phosphate dans un contexte de surexpression, suggère qu'elle est surtout présente sous forme d'apoenzyme dormante et qu'elle est une enzyme importante pour la synthèse du GABA synaptique, susceptible d'être régulée selon les niveaux de GABA synaptique ou les signaux reçus par les neurones GABAergiques. GAD67, quant à elle, existe essentiellement sous forme d'holoenzyme catalytiquement active, puisque fortement liée au coenzyme pyridoxal phosphate dans le cytosol, ce qui suggère qu'elle soit davantage liée à la synthèse de GABA via le shunt GABA et davantage associée à un pool GABA cytosolique assumant des fonctions alternatives à la neurotransmission, comme facteur trophique ou source d'énergie [Soghomonian et Martin, 1998 ; Martin et



Rimvall, 1993]. Les études de souris mutantes négatives GAD65 et GAD67 suggèrent que GAD67 est responsable de la majorité de la synthèse du GABA dans le cerveau. Les niveaux de GABA sont en effet normaux chez la souris GAD65<sup>-/-</sup>, alors qu'ils sont diminués de manière importante chez la souris GAD67<sup>+/-</sup>. Cela est conséquent avec l'activité constitutive de GAD67. La présence d'un important pool cytosolique de GABA, tributaire de GAD67, rend pertinente l'idée à l'effet que des récepteurs GABA puissent être fonctionnels à l'intérieur de la cellule.

### **1.1.2 Relâchement vésiculaire et non-vésiculaire**

Il vient d'être brièvement fait mention de l'existence de deux réservoirs de GABA, vésiculaire et cytosolique, potentiellement associés à la neurotransmission rapide et au métabolisme, respectivement. Il est proposé que le relâchement du GABA originant de ces deux réservoirs est médié via des mécanismes distincts. En ce qui à trait au GABA synaptique, l'existence de relâchement vésiculaire, caractéristique essentielle à l'attribution du titre de neurotransmetteur à une molécule chimique endogène, est établie depuis plusieurs années [Curtis et Johnston, 1974 ; Schousboe et al. 1976 ; Otsuka 1996]. Elle dépend à la fois du remplissage vésiculaire, opéré par des transporteurs GABA cytosoliques VGAT (« vesicular GABA transporter ») et de la fusion des membranes vésiculaire et plasmique Ca<sup>2+</sup>-dépendante, suivant la dépolarisation présynaptique. Le GABA relâché via ce mécanisme diffuse et médie ses effets, généralement inhibiteurs, sur les neurones postsynaptiques-cibles par l'entremise d'hétérorécepteurs.

Un autre mode de relâchement du GABA, non-vésiculaire, indépendant de potentiels d'action et du  $Ca^{2+}$  et associé au renversement du flux de molécules passant la membrane plasmique via les transporteurs GABA, a également été décrit et permettrait le relâchement du réservoir cytosolique de GABA dans l'espace extracellulaire [Pin et Bockaert, 1989 ; Bernath 1992 ; Belhage et al. 1993 ; Taylor 1991]. Ce mode de relâchement cohabite à des degrés variables avec le relâchement vésiculaire selon les cellules neuronales étudiées. Il est par exemple bien caractérisé du côté des cellules granulaires du cervelet, dans lequel contexte il contribue à l'activation tonique de récepteurs GABA-A extrasynaptiques [Mody 2001 ; Rossi 2003]. Un rôle important du relâchement non-vésiculaire est également proposé lors des étapes de prolifération et migration neuronale du cerveau en développement, étapes qui se produisent entre les 2<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup> mois de gestation chez l'humain et entre les jours embryonniques 12 et 18 chez le rongeur. L'absence de transmission synaptique lors de cette période n'empêche pas que des neurotransmetteurs classiques, comme le glutamate et le GABA, puissent exercer une influence lors de ces étapes de manière paracrine [Owens et Kriegstein, 2002 ; Manent et Represa, 2007 ; Lujan 2005].

### **1.1.3 Recapture**

Dans le cerveau adulte, les effets postsynaptiques du GABA dépendent de facteurs présynaptiques (probabilité de relâchement, nombre de sites de relâchement, récepteurs), de facteurs au niveau de la fente synaptique (diffusion et transporteurs) et de facteurs postsynaptiques (sous-types de récepteurs, localisation, nombre, interaction avec protéines d'ancrage). Le transport haute affinité du GABA par les terminaisons

neuronales inhibitrices ainsi que les cellules gliales, par son action au niveau de la fente synaptique, régule de manière importante l'inhibition à la fois phasique et tonique médiée par le GABA ainsi que le surplus de GABA relâché [revu dans Nguyen et al. 2001 et Madsen 2008]. La recapture neuronale de GABA, estimée de 3 à 6 fois supérieure à la recapture gliale, permettrait par le fait même le remplissage du pool vésiculaire de GABA. Le GABA recapturé par les terminaisons synaptiques vainc un gradient de concentration défavorable à 200 contre 1 grâce à des transporteurs GABA  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  qui utilisent la force motrice provenant du mouvement du  $\text{Na}^+$  vers l'intérieur de la cellule. Le premier transporteur GABA cloné chez le rat, GAT-1 (« GABA transporter 1 »), est constitué de 599 acides aminés, possède 12 domaines transmembranaires et un  $K_m$  de 3 M pour le GABA [Guastella et al. 1990]. Il appartient à une large famille incluant les transporteurs de la noradrénaline, la dopamine, la sérotonine, la taurine, la créatine, la proline et la glycine. Son clonage fut suivi de celui du transporteur « betaine/GABA transporter 1 », cloné de cellules rénales et constitué de 604 acides aminés, avec un  $K_m$  de 93 M pour le GABA et un  $K_m$  de 398 M pour le bétaine, donc une affinité 4 fois supérieure pour le GABA, mais qui demeure modeste lorsque comparée à celle de GAT-1 [Yamauchi et al. 1992]. Deux autres transporteurs GABA, GAT-2 et GAT-3, constitués de 602 et 627 acides aminés et possédant des  $K_m$  de 8 M et 12 M pour le GABA ont également été identifiés [Borden et al. 1992]. Ils montrent une sensibilité à la  $\beta$ -alanine, un inhibiteur connu du transport glial de GABA. Quatre transporteurs GABA ont également été identifiés chez la souris, soit GAT1, GAT2, GAT3 et GAT4 (sans trait d'union), lesquels correspondent à GAT-1, BGT-1, GAT-2 et GAT-3 respectivement [Liu et al. 1993]. Chez l'humain seul 3 transporteurs ont été identifiés à ce moment-ci, soit

GAT-1, BGT-1 et GAT-3; leur nomenclature suit celle adoptée pour le rat. Les différents transporteurs GABA se distinguent par leurs dépendances ioniques, leurs profils pharmacologiques différents et leur expression dans le SNC. GAT-1 est l'isoforme le plus fortement exprimé dans le SNC, tel que perçu par hybridation in situ, immunohistochimie, microscopie optique et électronique [Madsen et al. 2008 ; Conti et al. 2004]. Il est prédominamment localisé sur les neurones. Pour ces raisons, il est considéré le principal médiateur du transport neuronal de GABA. Les transporteurs GAT-3 astrocytaires sont également impliqués dans la recapture du GABA synaptique, mais dans une moindre mesure.

#### **1.1.4 Réutilisation et métabolisme**

Suivant sa recapture par les neurones, le GABA peut être réemmagasiné dans des vésicules pour un relâchement subséquent ou réintégrer le cycle de Krebs sous forme de succinate suivant l'action de la GABA-T et de la SSADH. Tel que mentionné précédemment, les réactions catalysées par GABA-T, GAD et SSADH constituent le shunt GABA (fig. 1). Le flux du cycle de Krebs passant par ce court-circuit varie selon les cellules et méthodes utilisées et est estimé à 10% [Balaza et al. 1970 ; Machiyama et al. 1970] L'oxydation complète du squelette de carbone dérivé du GABA, qui nécessite la conversion du malate en pyruvate par l'enzyme malique et la conversion du pyruvate en acétyl-CoA et CO<sub>2</sub> par la pyruvate déshydrogénase, se produit dans les astrocytes mais peu dans les neurones. Cela explique que les astrocytes soient considérés comme un chef-lieu du métabolisme oxydatif complet du GABA. Cet état de fait a des implications fondamentales dans le maintien de l'activité GABAergique neuronale, puisque la

dégradation du GABA astrocytaire doit être balancée avec le transfert de précurseurs GABA, sous forme de glutamine, des astrocytes aux neurones.

En somme, l'étude des mécanismes de synthèse et de dégradation du GABA nous rappelle la double fonction de neurotransmetteur et d'intermédiaire du métabolisme énergétique de cette molécule. Cette réalité a d'importantes implications dans la compréhension d'éventuels signaux intracellulaires médiés par le GABA et intégrés par des récepteurs endomembranaires.

**Annexe 4 - Article auquel l'auteur a participé et qui n'est pas inclus dans cette thèse**

Richer M, Hen R, Blier P. Modification of serotonin neuron properties in mice lacking 5-HT1A receptors. Eur J Pharmacol, 2002. 435(2-3): p.195-203.

## **Annexe 5 -**

Richer M, David M, Villeneuve LR, Trieu P, Ethier N, Pétrin D, Mamarbachi AM, Hébert TE. GABA-B(1) receptors are coupled to the ERK1/2 MAP kinase pathway in the absence of GABA-B(2) subunits. *J Mol Neurosci*, 2009. 38(1):67-79.

## **Annexe 6 -**

David M, Richer M, Mamarbachi AM, Villeneuve LR, Dupré DJ, Hebert TE. Interactions between GABA-B1 receptors and Kir 3 inwardly rectifying potassium channels. *Cell Signal*, 2006. 18(12):2172-81.



## **Annexe 7 -**

Dupré DJ, Robitaille M, Richer M, Ethier N, Mamarbachi AM, Hébert TE. Dopamine receptor-interacting protein 78 acts as a molecular chaperone for Ggamma subunits before assembly with Gbeta. *J Biol Chem*, 2007. 282(18):13703-15.