

Université de Montréal

La pluridimensionalité de l'efficacité des ligands des récepteurs  
couplés aux protéines G; Les récepteurs  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -adrénergiques en  
tant que modèles d'étude.

par

Sékolène Galandrin

Département de Biochimie

Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de docteur  
en Biochimie

Octobre 2007

© Sékolène Galandrin, 2007



W  
4  
058  
2008  
v. 053



**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

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

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

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

**NOTICE**

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

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

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

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

La pluridimensionalité de l'efficacité des ligands des récepteurs  
couplés aux protéines G; Les récepteurs  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -adrénergiques en  
tant que modèles d'étude.

présentée par :  
Sékolène Galandrin

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Gerardo Ferbeyre, président-rapporteur  
Michel Bouvier, directeur de recherche  
Nikolaus Heveker, membre du jury  
Richard Leduc, examinateur externe  
Annie Angers, représentante du doyen de la FES



## Résumé

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) représentent sans conteste la plus importante classe de protéines transmembranaires, capables de transmettre une grande variété de signaux extracellulaires à travers la membrane plasmique. De ce fait, ils sont des cibles de choix pour le développement de nouveaux composés à visée thérapeutique.

Traditionnellement, l'efficacité des ligands des RCPGs est considérée comme issue d'un mode « on »/ « off » du récepteur. Dans un tel modèle, un composé stimulant le récepteur est alors considéré comme agoniste, activant une protéine G hétérotrimérique qui module à son tour des effecteurs et la production de seconds messagers. En revanche, un composé bloquant cette signalisation est alors considéré comme antagoniste. Toutefois, plusieurs observations ces dix dernières années ont permis d'élargir cette vision. En effet, les récepteurs peuvent posséder une activité constitutive, qui peut être inhibée par certains composés, dénommés alors agonistes inverses. De plus, des observations récentes suggèrent que l'efficacité des ligands peut aussi être influencée par les effecteurs engagés par un même récepteur. Ainsi, l'efficacité ne serait pas nécessairement une propriété du couple ligand/récepteur.

Premièrement, en utilisant deux récepteurs de la même famille-les récepteurs  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -adrénergiques ( $\beta_1$ AR et  $\beta_2$ AR), et en combinant l'utilisation d'un panel de ligand, nous avons testé de manière systématique l'efficacité des ligands sur deux voies de signalisation modulées par ces récepteurs : la voie de l'adénylate cyclase (AC) et la voie des protéines kinases activées par des signaux mitogéniques (MAPK). Dans cette étude, plusieurs ligands ont démontré un profil d'efficacité complexe, démontrant dans certains cas une régulation opposée des deux voies de signalisations modulées par un même récepteur. De plus, des composés considérés comme non sélectifs en fonction de leur affinité, ont démontré des profils d'efficacité distincts envers la voie AC et la voie MAPK. Ainsi, l'ensemble de ces résultats a révélé un nouveau niveau de complexité dans la définition de l'efficacité de

signalisation et sélectivité des composés : l'efficacité est un paramètre pluridimensionnel, qui ne devrait plus être considérée comme une propriété intrinsèque d'un couple ligand/récepteur mais qui devrait inclure, dans sa définition les effecteurs spécifiques considérés.

Deuxièmement, nous nous sommes intéressés aux déterminants moléculaires menant à la stimulation de la voie MAPK par le  $\beta_1$ AR par trois ligands (l'isoproterenol, le bucindolol et le propranolol) agonistes sur cette voie mais à l'efficacité distincte sur la voie AC. En parallèle, nous avons évalué les conformations du récepteur lié aux différents ligands en mesurant les changements conformationnels au sein du complexe récepteur/protéine G par la technique de transfert par résonance d'énergie de bioluminescence (BRET). Les données obtenues suggèrent que les agonistes partiels que sont le bucindolol et le propranolol activent la voie MAPK de manière indépendante de la protéine  $G_i$  alors que l'isoproterenol active cette voie à la fois par l'intermédiaire de  $G_i$  mais aussi par une voie indépendante. De plus, les changements conformationnels récepteur/protéine G induits par le bucindolol et le propranolol sont distincts de ceux induits par l'isoproterenol. Ainsi, l'ensemble de ces résultats démontre que différents ligands peuvent engager de manière sélective des effecteurs distincts afin d'activer une même voie de signalisation, et ce, en induisant des réarrangements conformationnels du récepteur.

Ainsi, nous croyons que les résultats présentés dans cette thèse ont contribué de manière significative à élargir notre vision de l'efficacité et de la sélectivité des composés et auront certainement un impact sur le développement de médicaments aux propriétés souhaitées.

**Mots-clés** : RCPG, efficacité, sélectivité, conformation des récepteurs, adénylate cyclase, MAPK, récepteur  $\beta_1$  adrénergique, récepteur  $\beta_2$  adrénergique.

## Abstract

G-protein-coupled receptors (GPCRs) constitute the largest family of integral membrane proteins involved in transmitting a wire array of extracellular signals across the plasma membrane. Therefore, they are attractive drug targets for the development of new compounds with therapeutic purposes.

The efficacy of drugs acting on GPCRs has traditionally been considered to be an active property of an on-off mode of the receptor. In such a model, agonists are defined as compounds that activate the receptor, thus leading to heterotrimeric G protein activation and subsequent production of second messengers. In contrast, antagonists are defined as compounds that block GPCR signalling. However, over the past decade a growing body of evidence suggests that GPCRs can exhibit spontaneous activity that can be inhibited by so-called inverse agonists. In addition, recent observations suggest that efficacy may also be influenced by the signaling effectors engaged by a unique receptor and then, is not necessarily an intrinsic property of a ligand/receptor couple.

First, using two receptors of the same family -the  $\beta_1$  and  $\beta_2$  adrenergic receptors ( $\beta_1$ AR and  $\beta_2$ AR)- and combining the use of multiple ligands, we directly and systematically test ligand efficacy for two pathways modulated by these receptors: the adenylyl cyclase (AC) pathway and the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway. In this study, several ligands showed a complex efficacy profile resulting in some cases in the opposite regulation of the two pathways modulated by the same effector. In addition, compounds considered as non-selective for  $\beta_1$  and  $\beta_2$ AR, based on their binding affinities, showed distinct relative efficacy profiles toward AC and MAPK. Taken together our results revealed a novel level of complexity in the definition of signalling efficacy and selectivity: efficacy is a pluridimensional parameter that can no longer be taken as an intrinsic characteristic of a ligand/receptor but needs to include the specific effector(s)

considered. Moreover, this study suggests that binding of different ligands promote distinct receptor conformational changes leading to specific signaling outcomes.

Secondly, using three ligands (isoproterenol, bucindolol and propranolol) that all activate MAPK but that display opposite efficacy toward AC through the  $\beta_1$ AR, we investigated pathways leading to the  $\beta_1$ AR-mediated activation of MAPK. In parallel, the conformations of the liganded receptor were assessed by bioluminescence resonance energy transfer (BRET) measurements monitoring structural rearrangements within receptor-G protein complexes. The data obtained suggest that partial agonists bucindolol and propranolol activated ERK1/2 in a Gi-independent manner while both Gi-dependent and -independent pathways contributed to the isoproterenol-stimulated response. Moreover, we distinguished distinct conformational rearrangements of the receptor/G protein induced by isoproterenol in contrast from those promoted by either bucindolol or propranolol. Taken together, our results demonstrate that distinct ligands could selectively engage distinct effectors to activate a single signalling output by promoting discrete conformational rearrangements.

Hence, we believe that the results presented in this thesis significantly contributed to enlarge our vision of drug efficacy and selectivity and should certainly have important implications for the development of drugs with desired efficacy profile.

**Keywords** : GPCR, efficacy, selectivity, receptor conformation, adenylate cyclase, MAPK,  $\beta_1$  adrenergic receptor,  $\beta_2$  adrenergic receptor.

## Table des matières

1. INTRODUCTION .....	1
1.1 Les récepteurs couplés aux protéines G : .....	2
1.1.1 Organisation structurale .....	4
1.1.2 Classification des RCPGs : .....	6
1.2. Signalisation .....	9
1.2.1 Les effecteurs des RCPGs : .....	9
1.2.1.1 Les Protéines G hétérotrimériques et leurs effecteurs : .....	9
1.2.1.2 Les effecteurs et les cascades de signalisation traditionnels activés par les protéines G : .....	17
1.2.1.2.1 : Exemple d'une cascade de signalisation « classique », la voie de l'adénylate cyclase/AMPC: .....	18
1.2.1.3 : Infidélité des RCPG envers les protéines G : autres effecteurs .....	22
1.2.1.3.1 La $\beta$ arrestine .....	23
1.2.1.3.2 Les protéines Homer .....	24
1.2.1.3.3 Les protéines NHERF (EBP50) .....	24
1.2.1.3.4 Src .....	25
1.2.1.4 Les MAPK de type ERK1/2, un exemple d'intégration de différents signaux .....	26
1.2.2 La régulation de la signalisation .....	36
1.2.2.1 La désensibilisation et le découplage fonctionnel récepteur / protéine G hétérotrimérique .....	36
1.2.2.2 L'internalisation et la régulation négative : .....	39
1.3 Efficacité des ligands aux RCPG .....	43
1.3.1 L'activité constitutive et la notion d'agonisme inverse .....	44
1.3.2 Modèles théoriques .....	46

1.3.3 Complexité de l'efficacité des ligands aux RCPGs / Evidences de la multitude de conformations des RCPGs .....	48
1.3.3.1 Les inversions de puissances et de réponses maximales .....	49
1.3.3.2 Les réversions de l'efficacité .....	50
1.3.3.3 Sélectivité de propriétés de régulation, l'efficacité collatérale .....	51
1.3.4 La multitude de conformations adoptées par les RCPGs: .....	52
1.4 Les récepteurs beta-1 et beta-2-adrénergiques en tant que modèles d'études: .....	54
1.4.1 Importance physiologique / Pharmacologie .....	54
1.4.2 Structure des récepteurs .....	57
1.4.2.1 Domaines et résidus importants .....	58
1.4.2.2 Modifications post-traductionnelles .....	61
1.4.3 Signalisation et régulation .....	65
1.4.3.1 La voie de l'adénylate cyclase .....	66
1.4.3.2 La voie des MAPKs de type ERK1/2 .....	69
1.4.3.2.1 Activation de la voie MAPK de type ERK1/2 par le $\beta_2$ AR.....	69
1.4.3.2.2 Activation de la voie MAPK de type ERK1/2 par le $\beta_1$ AR.....	71
1.4.3.3 La voie de la PI3K .....	71
1.4.3.4 Les autres voies de signalisation et les protéines d'interaction des récepteurs béta-adrénergiques.....	72
2. Objectifs de la thèse : .....	74
3. RÉSULTATS .....	75
3.1 Article 1.....	
Des profils signalétiques distincts de ligands aux récepteurs $\beta_1$ et $\beta_2$ -adrénergiques envers la voie adénylate cyclase et la voie MAPK révèlent la pluridimensionnalité de l'efficacité. ....	76
3.2 Article 2.....	

Distinctes conformations de récepteurs et distinctes cascades de signalisation sont impliquées dans l'activation biaisée des ligands pour la voie MAPK par le récepteur $\beta_1$ -adrénergique. ....	118
4. DISCUSSION.....	160
5.CONCLUSION .....	182

## Liste des tableaux

Tableau I : Liste des différentes familles de sous-unités des protéines G, leurs sous-types et leur fonction signalétique

Tableau II : Expression tissulaire des récepteurs  $\beta_1$ AR et  $\beta_2$ AR chez l'humain

Tableau III : Protéines d'interaction des récepteurs  $\beta_1$ AR et  $\beta_2$ AR



## Liste des figures

- Figure 1 : Modèle classique, linéaire, de signalisation via les RCPG
- Figure 2 : Topologie et structure des RCPG
- Figure 3 : Les trois principaux modes de liaison des ligands aux RCPG
- Figure 4 : Structure tridimensionnelle d'une protéine G hétérotrimérique
- Figure 5 : Modèle d'activation des protéines G hétérotrimériques par les RCPG et régulation du cycle d'activation par les protéines régulatrices de type RGS ou AGS
- Figure 6 : Les acteurs de voie de l'adénylate cyclase
- Figure 7 : Cascade de signalisation de la voie MAPK
- Figure 8 : Exemple de la multitude de voies menant à l'activation de la voie ERK1/2 par les RCPG
- Figure 9 : Rôle de l'AMPc dans la modulation de la voie ERK1/2
- Figure 10 : Modèle TMPS de transactivation des RTK par les RCPG
- Figure 11 : Modèle classique de désensibilisation et d'internalisation
- Figure 12 : Modèle structural générique d'une molécule d'arrestine, et ses domaines d'interaction
- Figure 13 : Les différents modèles théoriques d'états des récepteurs développés
- Figure 14 : Classification des ligands selon leur efficacité sur une voie donnée
- Figure 15 : La famille des récepteurs adrénérgiques : différentes sous-familles et sous-types
- Figure 16 : Représentation schématique de la structure du récepteur  $\beta_2$ AR humain et indication des résidus importants
- Figure 17 : Représentation schématique de la structure du récepteur  $\beta_1$ AR humain et indication des résidus importants
- Figure 18 : Pléiotropie dans la signalisation médiée par les RCPG
- Figure 19 : Cinétique d'internalisation du récepteur  $\beta_1$ AR

## Liste des sigles et abréviations

### Acides aminés :

C	Cys	Cystéine
D	Asp	Aspartate
F	Phe	Phénylalanine
I	Iso	Isoleucine
K	Lys	Lysine
L	Leu	Leucine
N	Asn	Asparagine
P	Pro	Proline
R	Arg	Arginine
S	Ser	Sérine
T	Thr	Thréonine
Y	Tyr	Tyrosine

5HT2A, 2C	Récepteur à la sérotonine de type 2A, 2C
AC, AC1-9	Adénylate cyclase, Adénylate cyclase de type 1 à 9
ADAM	Métalloprotéase 'A Disintegrin And Metalloprotease'
ADP	Adénosine diphosphate
AGS et AGS1-8	Activateur de la Signalisation par les protéines G
AKAP	Protéine d'ancrage de la PKA
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AP2	Adaptine2
ARNO	facteur d'échange de la petite GTPase ARF6
ARF	facteur d'ADP ribosylation
ASK1	Kinase de signalisation apoptotique
AT1AR	Récepteur à l'angiotensin de type 1A

$\beta_1$ AR, $\beta_2$ AR, $\beta_3$ AR	Récepteur adrénergique de type $\beta_1$ , $\beta_2$ , $\beta_3$
$\beta$ ARK	Kinase du $\beta_2$ AR ou GRK2
BRET	Transfert d'énergie par bioluminescence
CAR	Récepteur à l'AMPc
CASR	Récepteur de sensibilité au calcium
CNG	Canal ionique dépendant des nucléotides cycliques
CCK1R	Récepteur à la cholécystokinine de type 1
CCR5	Récepteur des chimiokines CC de type 5
COS-7	Fibroblaste de rein de singe 'African Green' transfecté par SV40
CRE	Élément de réponse à l'AMPc
CTC	Complexe ternaire cubique
Cter	Domaine COOH, terminal
CTR	Récepteur à la calcitonine
DAG	Diacylglycérol
DOI	1-(2,5-Dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane
$\delta$ OR	Récepteur $\delta$ -opioïde
e1, e2, e3	boucles extracellulaires 1, 2, 3
EBP50	Phosphoprotéine 50, de liaison EMR (ezrin-radixin-moesin)
EGF, EGFR	Facteur de croissance épidermique et son récepteur
EPAC, EPAC1-2	Protéine d'échange, activée par l'AMPc, de type 1-2
ERK, ERK1-5	Kinases régulées par des signaux extra-cellulaires, de type 1 à 5
ETC	Complexe ternaire étendu
FGFR1	Récepteur des facteurs de croissance des fibroblastes de type 1
GABA	Acide- $\gamma$ -amino-butyrique
GAP	Protéine activatrice de la GTPase
GCGR	Récepteur au glucagon
GDP	Guanosine diphosphate
GEF	Facteur d'échange du GDP

GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
GPR (motif)	(motif) régulateur des protéines G
GRK	Kinase des RCPGs
GTP	Guanosine triphosphate
GTPase	Enzyme hydrolysant le GTP
HB-EGF	EGF liant l'héparine
HCMV	Cytomégalovirus humain
HEK293	Cellules embryonnaires de rein humain 293
i1, i2, i3	boucles intra-cellulaires 1, 2, 3
IGF	Facteur de croissance semblable à l'insuline
IPR	Récepteur aux inositols phosphate
Jak	Kinase Janus ou "juste une autre kinase"
JNK	Kinase au domaine N-terminal semblable à c-Jun ou SAPK
$\kappa$ OR	Récepteur kopioïde
MAPK	Protéine kinase activée par des mitogènes
MAPKK	MAPK kinase
MAPKKK	MAPKK kinase
MC3, MC4	(récepteur) mélanocortine 3, 4
MEK	MAPK kinase pour ERK
MKP	Phosphatase des MAPK
MP	Métalloprotéase
mGluR	Récepteur métabotrope du glutamate
Nter	Domaine amino, terminal
NHE3	Échangeur $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$ de type 3
NHERF	Facteur de régulation de l'échange $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$
NK2	Récepteur à la neurokinine de type 2
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NRTK	Protéine tyrosine kinase qui n'est pas un récepteur

NSF	Facteur sensible au N-éthylmaléimide
P2Y1, P2Y2	Récepteur purinergique de type 1, 2
PACAP	Peptide activateur de l'AC pituitaire
PAR	Récepteur activé par une protéase
PDE	Phosphodiesterase
PDGF, PDGFR	Facteur de croissance dérivé des plaquettes et son récepteur
PDZ	Domaine semblable à PSD-95/Discs-large/ZO-1
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PKA	Protéine kinase dépendante de l'AMPc
PKC	Protéine kinase dépendante du Ca <sup>2+</sup>
PLA <sub>2</sub> , PLC, PLD	Phospholipase de type A <sub>2</sub> , C, ou D
PP2A	Phosphatase de type 2A
PSD	Protéine de densité synaptique
PTH, PTHR	Hormone parathyroïdienne et son récepteur
PYK2	Tyrosine kinase riche en proline de type 2
R	Récepteur
R*	Récepteur actif
R7TM	Récepteur à 7 domaines transmembranaires.
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G hétéro-trimériques
RGS	Régulateur de la signalisation des protéines G
RTK	Récepteur à activité tyrosine kinase
SAPK	Protéine kinase activée par le stress
SH1-3	Domaine d'homologie à Src de type 1, 2, ou 3
TFMPP	1-(3-trifluoro-méthyl-phényl)pipérazine
TM	Domaine transmembranaire
TnI	Troponine I
TRH, TRHR	Hormone de relâche des thyrotropines et son récepteur
TSH, TSHR	Hormone stimulatrice de la thyroïde et son récepteur

$\mu$ OR	Récepteur $\mu$ -opioïde
V2R	Récepteur de la vasopressine de type 2
VEGFR	Récepteur aux facteurs de croissance vasculaire endothélial
VIP, VIPR	Peptide vasoactif intestinal et son récepteur

## Remerciements

Durant ces cinq années de doctorat, je me suis souvent imaginée en train d'écrire les remerciements de mon mémoire. En effet, les personnes essentielles à la réalisation de ces travaux sont nombreuses, je leur suis d'une immense reconnaissance et je tiens à les remercier.

Avant tout, il y a mon directeur de thèse, Michel Bouvier. Un grand merci de m'avoir donné la chance d'intégrer ton laboratoire, ta « famille », comme tu me l'avais dit le premier jour où nous nous sommes rencontrés à Sanofi. Je ne savais pas dans quelle aventure je m'engageais à l'époque mais je savais qu'elle serait riche et elle le fut. Grâce à toi, j'ai découvert le monde de la recherche scientifique sous un des meilleurs angles : richesse intellectuelle, ouverture d'esprit, curiosité, communication. Merci pour la liberté donnée et la confiance apportée. C'est donc avec plaisir et fierté que j'ai fait partie de la « famille Bouvier »!

La deuxième personne qui me vient immédiatement à l'esprit c'est Monique Lagacé. C'est certain, Monique, c'est à toi que j'ai dit le plus de fois « merci » durant ces cinq années! Alors encore une dernière fois (même si je suis sûre que ce ne sera pas la dernière), MERCI ! Merci pour ton dévouement, ta compétence, ta gentillesse extrême, ta bonne humeur. On dit que personne n'est irremplaçable... je n'en suis plus si sûre!

Il y a aussi mes deux amies « Pause Café », qui se sont succédées et avec qui les échanges scientifiques et humains ont été des sources de plaisirs journaliers.

Sonia Terrillon, toujours là pour me soutenir dans les coups durs de début de thèse. Tu as été pour moi un exemple en recherche, alliant ténacité, intégrité, clairvoyance, intelligence, générosité... Je te suis infiniment reconnaissante.

Geneviève Oligny-Longpré, avec qui les échanges scientifiques ont été nombreux et d'une richesse incroyable. Côtayer ton intelligence et ton ouverture d'esprit, en science mais aussi de façon générale m'a procuré beaucoup de plaisir. Je te souhaite tout le succès que tu mérites. Enfin, merci pour ton amitié québécoise, si précieuse à mes yeux!

Aussi, je tiens à remercier Céline Galés. Céline, ta passion sans borne pour la science m'a souvent transportée mais aussi impressionnée et intimidée... ton énergie débordante et communicative m'a été précieuse.

Hélène Bonin, je te remercie d'avoir bien voulu travailler à mes côtés. Ta rigueur, la confiance absolue que j'ai pu avoir en toi m'ont été d'une aide précieuse. Aussi, ton grand sens de l'humour et ta « folie » passagère ont égayé les journées où la science se présentait sous son mauvais jour.

Je tiens aussi à remercier tous les membres du laboratoire et en particulier ceux dont la gentillesse extrême et la disponibilité m'ont été d'un grand secours... Mireille, tu te reconnaîtras certainement dans ces personnes... Enfin, votre diversité, vos caractères uniques ont été d'une grande richesse. J'ai vraiment eu beaucoup de plaisir à vous cotoyer!

Il y a aussi mes amis, qui ont fait de ces cinq années québécoises des années formidables, sans nul doute parmi les plus belles: Grégory Clément, Xavier Mascle, Christophe Santoro...

Particulièrement,... merci à mes parents, pour leur soutien incommensurable, dans tous les choix et toutes les décisions que j'ai pu prendre au cours de mes années d'études.

Finalement, Thomas...



# 1. INTRODUCTION

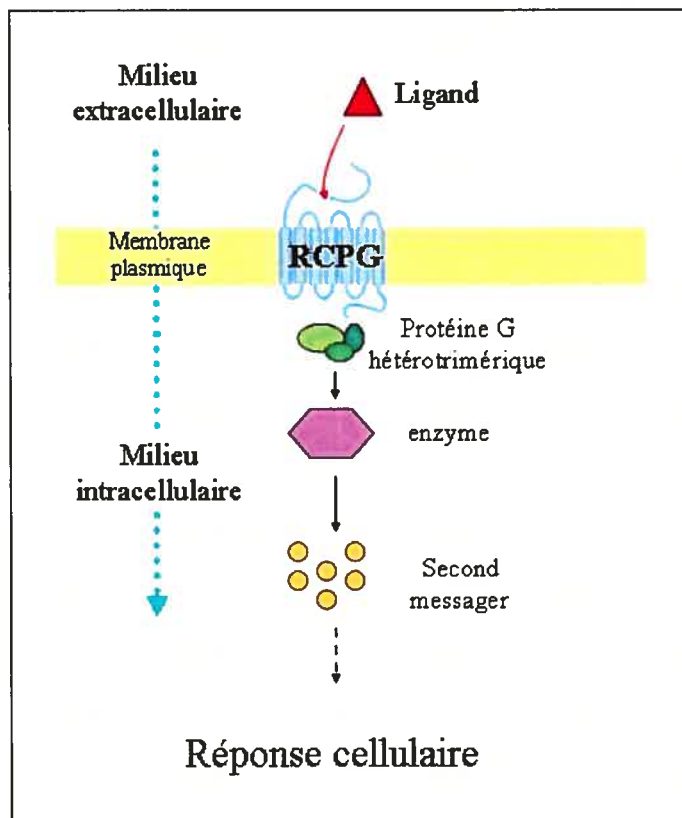
Dans un environnement en perpétuel changement, les organismes vivants doivent pouvoir percevoir l'ensemble des signaux qui les entoure afin de s'y adapter et d'assurer ainsi leurs fonctions vitales. Chez chaque être vivant, un système de perception du monde extérieur s'est développé, permettant la réception d'informations aussi vitales que la quantité d'eau, de nutriments, de lumière ou d'oxygène. Les êtres unicellulaires, tels les bactéries ou les levures sont ainsi capables de reconnaître un grand nombre de molécules provenant de leur environnement et de s'y adapter. Avec l'évolution et la présence de colonies de cellules puis d'êtres multicellulaires complexes organisés en tissus spécialisés, la communication entre cellules, c'est-à-dire la transmission d'informations devient essentielle afin d'assurer coordination et synchronisation des réponses. De ce fait, les cellules doivent posséder à leur surface des capteurs, ou récepteurs, afin de recueillir les différentes informations ou stimuli provenant du milieu qui les entoure, puis de les transmettre à l'intérieur de la cellule.

L'existence de telles entités a été soupçonnée dès le début du XX<sup>ème</sup> siècle avec l'étude des effets de différentes drogues sur un organisme, et même si aucune molécule n'avait clairement été identifiée, le nom de « substance réceptrice » est apparu (Langley, 1907). Enfin, dans les années 70-80, avec l'arrivée des méthodes de purification et de clonage, on a pu isoler et identifier ces molécules présentes à la surface membranaire des cellules et les diviser en 3 principales classes : les canaux ioniques, les récepteurs à activité tyrosine kinase intrinsèque ou associée et enfin, la plus vaste des classes : les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs). Chez l'humain, les RCPGs représentent une des plus larges familles de protéines du génome (Lander *et al.*, 2001; Venter *et al.*, 2001) et sont capables de reconnaître une très grande diversité de signaux : lumière, ions, odeurs, hormones, petits peptides, etc. Il n'est donc pas étonnant que l'on retrouve la présence de tels récepteurs chez de nombreux organismes, tels que la levure, dictyostelium, les plantes, le vers caenorhabditis elegans et enfin les vertébrés. L'importance de cette famille en fait

donc une cible pharmaceutique de choix, et on estime en effet à plus de 50% des médicaments actuellement sur le marché qui réguleraient la fonction des RCPGs et 30% qui les cibleraient de manière directe (Vassilatis *et al.*, 2003; Jacoby, 2006). Dans un tel contexte, l'étude de cette famille de protéines apparaît essentiel afin de comprendre les mécanismes par lesquels l'information est reconnue et transmise au sein de la cellule et par là même comprendre et améliorer l'efficacité de molécules agissant sur ces récepteurs. Durant les trente dernières années, conscientes de l'importance de cette famille, un nombre grandissant d'études sur les RCPG ont permis d'apporter une information riche sur ces récepteurs, que ce soit du point de vue structural, physiologique, moléculaire ou encore pharmacologique. Dans cette section d'introduction, nous résumerons les données et les concepts développés pertinents afin d'appréhender les travaux présentés dans cette thèse qui porte sur l'efficacité des ligands se liant aux RCPGs, et plus particulièrement sur l'efficacité des ligands aux récepteurs  $\beta_1$  adrénergique ( $\beta_1$ AR) et  $\beta_2$  adrénergique ( $\beta_2$ AR).

## 1.1 Les récepteurs couplés aux protéines G :

Traditionnellement, les RCPGs sont décrits comme des unités signalétiques monomériques à sept domaines transmembranaires capables de transmettre l'information extracellulaire à l'intérieur de la cellule via l'activation de GTPases hétérotrimériques (les protéines G). Une fois le ligand lié au récepteur, celui-ci subit un changement structural qui se traduit au niveau de la protéine G par un échange de GDP-GTP, la faisant ainsi passer d'un état inactif à un état actif. La protéine G module alors à son tour certaines enzymes, entraînant la régulation de seconds messagers à l'origine de la réponse cellulaire (cf Fig. 1).



**Fig. 1** : Modèle classique, linéaire, de signalisation via les RCPG

En marge de ce modèle linéaire, dans lequel un récepteur régule l'activité d'une unique protéine G et par là même la cascade de signalisation qui lui est associée; de plus en plus d'études ont révélé ces dix dernières années un modèle de signalisation via les RCPG plus complexe, et ce aux différents niveaux de la cascade de signalisation.

Ainsi, la structure monomérique de l'unité signalétique que représente le couple récepteur/protéine G a été remise en question par de nombreuses études pharmacologiques, biochimiques et biophysiques, montrant que la plupart des RCPGs existent sous forme de dimères ou même d'oligomères d'ordre plus élevé, et que cet assemblage est nécessaire à leur fonctionnalité (Terrillon and Bouvier, 2004). D'autre part, bien que le couplage à la protéine G semble être un trait commun aux RCPGs, certains n'ont pas encore été identifiés comme pouvant coupler les protéines G. Enfin, de plus en plus d'études visent à démontrer

qu'il existe une signalisation indépendante des protéines G, par l'intermédiaire de nombreux autres effecteurs. (Hall *et al.*, 1999a).

Il serait donc plus judicieux d'utiliser une autre terminologie, qui ne présuppose pas le couplage unique aux protéines G mais qui s'appuie sur la structure de ces récepteurs : « les récepteurs à 7 domaines transmembranaires » (R7TM), trait structural commun de cette famille.

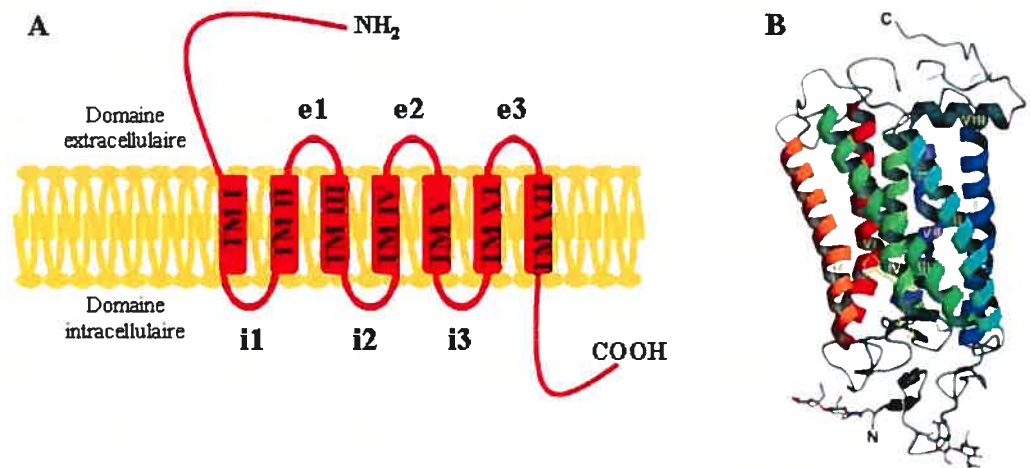
### 1.1.1 Organisation structurale

Les informations structurales concernant les RCPG s'appuient essentiellement sur les données de cristallisation du récepteur Rhodopsine, premier et seul RCPG dont la cristallographie en 3 dimensions, à 2.2Å de résolution, a à ce jour été établie (Palzcewski *et al.*, 2000; Okada *et al.*, 2004) (Cf Fig. 2B). De nombreuses données de mutagenèse dirigée et d'accessibilité des cystéines semblent néanmoins démontrer que ce modèle est aisément transposable aux autres RCPGs, ou tout au moins à ceux de la même famille (Balesteros *et al.* 2001).

Toutes les protéines de la famille des RCPGs présentent une organisation structurale identique : on retrouve **7 domaines transmembranaires** (TMI-VII), possédant un haut degré d'homologie, un domaine N-terminal (Nter) extracellulaire et un domaine C-terminal (Cter) intracellulaire. Enfin, 3 boucles extracellulaires (e1-3) et 3 boucles intracellulaires (i1-3) séparent les TM (Cf Fig. 2A).

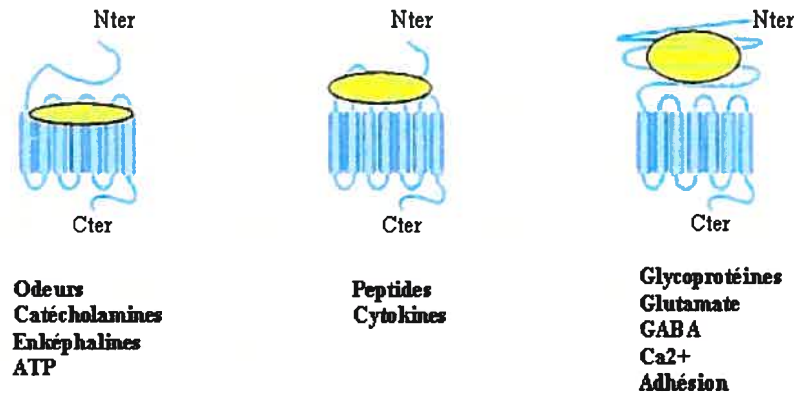
Les RCPG partagent une grande homologie structurale au niveau des sept TM, d'environ 25-35 acides aminés, qui possèdent un haut degré d'hydrophobicité. Ces sept TM forment 7 hélices  $\alpha$  traversant de part en part la membrane plasmique et qui, vus du côté extracellulaire sont arrangés dans le sens inverse des aiguilles d'une montre. (Cf Fig. 2B). A l'inverse de cette structure très conservée, signature structurale des RCPG, une grande diversité est observée au niveau du Cter et de la boucle i3 et cette diversité prend toute son

ampleur au niveau du Nter dont la séquence peut varier de 10 à 50 acides aminés pour les récepteurs des peptides et des monoamines, à 350-600 acides aminés pour les récepteurs au glutamate ou aux hormones de type glycoprotéines.



**Fig. 2 : Topologie et structure des RCPGs.** (A) Topologie d'un RCPG et dénomination de ses différents domaines, (B) Structure tridimensionnelle du récepteur rhodopsine bovin d'après Okada and Palczewski, 2001

Les ligands utilisent différents modes de liaisons qui peuvent être séparés en trois catégories : les ligands qui se lient au creux des domaines transmembranaires et n'utilisent pas le domaine Nter, ceux qui utilisent certains domaines extracellulaires ainsi qu'une partie du Nter du récepteur pour leur liaison, et enfin, ceux qui se lient uniquement au niveau du domaine Nter (Cf Fig. 3)



**Fig. 3 :** Les trois principaux modes de liaison des ligands aux RCPGs

### 1.1.2 Classification des RCPGs :

De nombreux systèmes de classification sont utilisés afin de séparer cette super famille, constituée de plus de 1000 membres, en différentes sous-familles. Certaines sont basées sur la façon dont les ligands se lient, d'autres sur des aspects à la fois physiologiques et structuraux (Bockaert and Pin, 1999). Une des plus connues et des plus utilisées est la classification en A-F (ou en 1-5) qui attribue une lettre à chaque famille et qui permet de classer les RCPG appartenant aux vertébrés et aux invertébrés selon leur homologie de séquence en acides aminés (Vassilatis *et al.*, 2003). Dans cette classification certaines familles ne se retrouvent pas chez l'humain comme les familles D, E et F. Une nouvelle classification (GRAFS) a été proposée en 2003 par Fredriksson *et al.* (Fredriksson *et al.*, 2003), se basant sur une analyse phylogénique très étendue, comprenant plus de 300 RCPG encodés par le génome humain uniquement, permettant ainsi de s'affranchir des grandes différences de séquences entre le génome des mammifères et celui des invertébrés. Néanmoins, cette classification semble pouvoir être généralisée à l'ensemble des RCPG

(Schiøth and Fredriksson, 2005). Ainsi, les RCPG sont divisés en 5 principales familles: Glutamate, Rhodopsine, Adhésion, Frizzled/Taste 2 et Sécrétine (donnant l'acronyme GRAFS), chaque membre de chaque famille ayant une origine d'évolution commune. On retrouve cependant de grandes similarités avec la classification en A-F.

La famille « Glutamate » correspond en partie à la famille C de la classification A-F. La plupart des membres de cette famille présentent un très important domaine Nter d'environ 280 à 580 acides aminés, formant deux lobes distincts, séparés par une cavité où est reconnu le ligand. Une fois cette reconnaissance effectuée, les deux lobes se referment autour du ligand tels les lobes de la plante carnivore dionée autour de sa proie, d'où le nom de « Venus Fly Trap » donné à cette structure. On retrouve dans cette famille les récepteurs métabotropiques au glutamate, deux récepteurs au GABA (GABA<sub>a</sub> et GABA<sub>b</sub>), ainsi que le récepteur du goût de type (TAS1) et le récepteur de sensibilité au calcium (CASR).

La famille « Rhodopsine » est sans conteste celle qui regroupe le plus de membres (plus de 200 récepteurs). Celle-ci correspond à quelques exceptions près à la famille A de la classification en A-F et porte le nom de Rhodopsine en référence au premier récepteur cloné de cette famille. On retrouve d'importantes sous-familles telles que les récepteurs adrénergiques, les récepteurs à la prostaglandine, à la mélatonine, ou encore les récepteurs aux chimiokines. Parmi les caractéristiques de cette famille se trouve la conservation d'un motif DRY ou D(E)-R-Y(F) entre le TMIII et la boucle i2 ainsi que d'un motif NSxxNPxxY au niveau du TMVII. D'autre part, la plupart des ligands de cette famille utilisent la cavité formée par les différents TM comme site de liaison du ligand. Les ligands des récepteurs de cette famille sont d'une grande diversité (protéines, peptides, amines, etc.).

La famille « Adhésion » est une nouvelle famille de 24 récepteurs, dont certains appartiennent à la classe B de la classification en A-F. La caractéristique principale de cette

famille est leur très long domaine Nter (de 200 à 2800 acides aminés), qui contient des motifs impliqués dans l'adhésion cellulaire ainsi que de nombreux sites de glycosylation.

La famille Frizzled/Taste 2, dans cette nouvelle classification, rassemble 2 groupes de récepteurs : les récepteurs frizzled et smoothened, appartenant à la famille F. Ces récepteurs sont impliqués dans les processus d'embryogénèse et de polarisation cellulaire et ont seulement récemment été considérés faisant partie de la famille des RCPGs (Foord *et al.*, 2005). En effet, malgré leur topologie à 7TM, l'interaction directe des récepteurs frizzled avec les protéines G n'a pas, à ce jour, été démontrée. Néanmoins, un nombre grandissant d'évidences indirectes amènent à penser l'importance des protéines G dans la signalisation de ces récepteurs (Malbon, 2004). Les récepteurs smoothened, quant à eux sont activés de manière constitutive et peuvent se coupler aux protéines G hétérotrimériques.

La famille « Sécrétine » : elle correspond essentiellement à la famille B, aussi appelée « Secretin-like receptor », du nom du premier récepteur cloné dans cette famille. Les récepteurs lient des peptides de grande taille, qui partagent une importante identité en acides aminés. Leur Nter, d'environ 60 à 80 acides aminés, est pour beaucoup de récepteurs le site de liaison du ligand comme par exemple chez les récepteurs du peptide intestinal vasoactif (VIPR) ou du peptide d'activation d'adénylate cyclase pituitaire (PACAPR). On y retrouve aussi les récepteurs à la calcitonine (CTR) et les récepteurs au glucagon (GCGR).



## 1.2. Signalisation

### 1.2.1 Les effecteurs des RCPGs :

Les protéines G hétérotrimériques sont les effecteurs de choix des RCPG, et jusqu'à récemment ont été considérées comme l'unique effecteur direct des récepteurs. Toutefois, de plus en plus d'études visent désormais à démontrer que de nombreuses autres protéines peuvent interagir avec le récepteur et entraîner une signalisation qui leur est propre.

#### 1.2.1.1 Les Protéines G hétérotrimériques et leurs effecteurs :

Une des premières observations quant à la signalisation des RCPG a été l'élévation de l'AMPc intracellulaire en réponse à un agoniste  $\beta$ adrénergique. Ainsi donc, un des premiers effecteur à avoir été identifié fut l'adénylate cyclase et non pas les protéines G hétérotrimériques, comme on pourrait éventuellement le penser. C'est par l'étude de l'influence d'un traitement à la toxine cholérique sur les niveaux d'AMPc, et l'isolation de mutants résistants à ces toxines (cellules S49 dites cyc-) que l'identification des protéines G hétérotrimériques (G pour « guanine nucléotide binding protein ») a débutée. Ainsi, la protéine  $G_{\alpha s}$  (s pour stimulatory protein) a été purifiée, migrant à 45KDa, ainsi que deux autres protéines associées : la protéine  $G_{\beta}$  (35KDa) et la protéine  $G_{\gamma}$  (8-10 KDa) (Northup *et al.*, 1980). Néanmoins, quelques années auparavant, l'importance du GTP dans la signalisation cellulaire avait été démontrée par l'équipe de Rodbell. En effet, de l'ATP non purifié, contaminé par des traces de GTP était capable de déplacer la liaison cellulaire du glucagon et en utilisant du GTP purifié, ce processus était beaucoup plus rapide. De même, sans GTP, le glucagon n'était plus capable de stimuler l'adénylate cyclase. Ainsi, le GTP

fut considéré comme le facteur biologique responsable de la dissociation du ligand et de l'activation de la signalisation (Rodbell *et al.*, 1971a; Rodbell *et al.*, 1971b).

A l'heure actuelle, chez les mammifères, 16 gènes codant pour des protéines  $G\alpha$ , 5 pour des protéines  $G\beta$  et 12 pour des protéines  $G\gamma$  ont été identifiés. De manière purement aléatoire, il peut donc exister une très grande diversité d'hétérotrimères et bien que de nombreuses associations entre sous-unités aient été identifiées, toutes les combinaisons ne semblent pas être possibles pour des questions notamment de profil d'expression tissulaire, et de structure (Robishaw and Berlot, 2004).



**Fig. 4 : Structure tridimensionnelle d'une protéine G hétérotrimérique ( $G\alpha_1\beta_1\gamma_2$ ) sous forme inactive** : en rouge, l'hélice  $\alpha$  du domaine N-ter, en bleu, la région C-ter de contact avec le récepteur. La molécule de GDP est enfouie entre le domaine GTPasique et le domaine hélicoïdal de la sous-unité  $\alpha$  (en vert). La sous-unité  $\beta$  est en jaune et la sous-unité  $\gamma$  en orange. D'après Milligan and Kostenis, 2006

- Les sous-unités  $\alpha$  :

D'une taille d'environ 39-46KDa, elles sont au nombre de 16 et sont divisées, selon leur similarité de séquence en 4 grandes familles: les protéines  $G\alpha_s$ , les protéines  $G\alpha_{i/o}$ , les protéines  $G\alpha_{q/11}$  et les protéines  $G\alpha_{12/13}$  (Cf Tableau I).

Ces protéines possèdent deux principaux domaines : le domaine GTPase et le domaine en hélice  $\alpha$  (Cf Fig. 4). Elles sont de nature soluble mais se retrouvent toutefois à la membrane cellulaire grâce à des modifications post-traductionnelles. Ainsi, toutes les familles de protéines  $G\alpha$  sont palmitylées (16 carbones) en Nter à l'exception du sous-type  $G\alpha_t$ . Les protéines  $G\alpha_s$  et  $G\alpha_{q/11}$  possèdent deux sites de palmylation alors que les protéines  $G\alpha_{i/o}$  n'en possèdent qu'un, mais sont la cible de myristoylation (14 carbones). Ces acylations permettent un ancrage à la membrane plasmique, la protéine G se retrouvant ainsi à proximité du récepteur (Wedegaertner, 1998). Elles peuvent aussi permettre la localisation dans des compartiments lipidiques spécialisés de type « raft » (Ostrom and Insel, 2004).

- Les sous-unités  $\beta\gamma$  :

On retrouve 5 sous-unités  $\beta$  et 12 sous-unités  $\gamma$  différentes. Ces 2 sous-unités interagissent de manière forte par l'intermédiaire d'une structure « coiled-coiled » et semblent ne pas pouvoir se dissocier, à l'exception de la sous-unité  $\beta_5$  qui est capable de se dissocier de la sous-unité  $\gamma$ , suggérant ainsi un rôle particulier à cette sous-unité (Sondek and Siderovski, 2001).

Malgré le caractère relativement hydrophobe de la sous-unité  $\gamma$ , que l'on pourrait penser suffisante pour une localisation membranaire, il existe aussi un motif Cys-A-A-X en Cter de cette protéine qui lui permet d'être isoprénylée (farnésylation ou géranylgeranylation selon la séquence du dernier acide aminé), et ainsi d'être ancrée fortement à la membrane plasmique.

<b>Famille</b>	<b>Sous-type</b>	<b>Principaux Effecteurs</b>	
<b><u>G<math>\alpha</math>s</u></b>	G $\alpha$ s	↗ Adenylate cyclase, ↗ Canaux K, ↗ Src tyrosine kinases	
	G $\alpha$ olf	↗ Tubulin	
<b><u>G<math>\alpha</math>i/o</u></b>	G $\alpha$ i1	↘ Adenylate cyclase, Canaux Ca <sup>2+</sup> (↘), K <sup>+</sup> (↘)	
	G $\alpha$ i2	↗ Src tyrosine kinases, activation ERK/MAPK	
	G $\alpha$ i3	↗ Tubulin, ↗ Rap1GAP, ↗ cGMP-PDE	
	G $\alpha$ o1		
	G $\alpha$ o2		
	G $\alpha$ z		
	G $\alpha$ t1		
	G $\alpha$ t2		
<b><u>G<math>\alpha</math>q/11</u></b>	G $\alpha$ q	↗ Phospholipase C $\beta$ isoforms, ↗ Bruton's tyrosine kinase	
	G $\alpha$ 11	↗ RhoGEF, ↗ Canaux K <sup>+</sup>	
	G $\alpha$ 14		
	G $\alpha$ 15		
	G $\alpha$ 16		
<b><u>G<math>\alpha</math>12/13</u></b>	G $\alpha$ 12	↗ Phospholipase D, ↗ Phospholipase C $\epsilon$ , ↗ NHE-1, iNOS,	
	G $\alpha$ 13	↗ RhoGEF, ↗ Radixin, ↗ PPS	
<b><u>G<math>\beta</math>\gamma</u></b>	G $\beta$ 1	G $\gamma$ 1	↗ ↘ adénylate cyclase, ↗ phospholipase C $\beta$ , ↗ PI3K,
	G $\beta$ 2	G $\gamma$ 2	↗ Canaux K <sup>+</sup> , ↘ Canaux Ca <sup>2+</sup> , ↗ JNK, ↗ Src kinases,
	G $\beta$ 3	G $\gamma$ 3	↗ Rho-GEF, ↗ Bruton's tyrosine kinase, ↗ Tubulin,
	G $\beta$ 4	...	↗ GRK recruitment
	G $\beta$ 5	...	
		...	
		G $\gamma$ 12	

**Tableau I :** Liste des différentes familles de sous-unités des protéines G, leurs sous-types et leur fonction signalétique.

- Activation des protéines G-hétérotrimériques :

La théorie classique établit qu'un récepteur possède une spécificité de couplage envers une famille de protéine G. Toutefois, en marge de cette théorie, de plus en plus de récepteurs ont été identifiés comme pouvant se coupler à une ou plusieurs autres familles (Hermans, 2003). Ainsi, par exemple, le récepteur humain de l'hormone thyroïdienne (TSHR) est capable de stimuler les protéines des quatre familles de protéines G dans des conditions physiologiques normales (Laugwitz *et al.*, 1996). Ce couplage à plusieurs protéines G est pour certains récepteurs (VIPR,  $\beta_1$ AR,  $\beta_2$ AR, IPR) souvent attribué à un mécanisme de changement de spécificité de couplage, souvent appelé « switch » Gs/Gi. Le récepteur, une fois phosphorylé par PKA change sa spécificité de couplage envers Gs, se couplant préférentiellement à Gi plutôt qu'à Gs (Luo *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 2004; Daaka *et al.*, 1997; Lawler *et al.*, 2001). Il est à noter que ce mécanisme est toutefois controversé, et que de nombreux groupes ne semblent pas l'observer (Friedman *et al.*, 2002, Hill and Baker, 2003).

Les domaines de spécificité de reconnaissance Récepteur/Protéine G ne sont pas clairement identifiés. Les boucles i2 et i3 du récepteur sont les domaines les plus décrits comme jouant un rôle clé mais les boucles i2 et i4 peuvent aussi moduler l'interaction entre les RCPG et les protéines G. D'autre part, des mutations dans divers autres domaines du récepteur ont été proposées comme affectant le couplage des protéines G, suggérant ainsi que la conformation globale du récepteur serait aussi importante que certaines régions spécifiques du récepteur dans cette spécificité d'interaction (Oldham and Hamm, 2007).

Le modèle classique de transduction du signal implique que suite à la liaison du ligand le récepteur change de conformation et s'associe de manière plus efficace avec la protéine hétérotrimérique G. Le récepteur sert alors de GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor) et induit la libération du GDP associé à la sous-unité  $\alpha$  et son remplacement par un

GTP. Ces réarrangements conformationnels conduisent à la dissociation entre les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta\gamma$ , qui se dissocient du récepteur et deviennent actives. Elles pourront alors chacune agir sur de nouveaux effecteurs et réguler des cascades de signalisation qui leur sont spécifiques. Ensuite, la sous-unité  $\alpha$ , qui possède sa propre activité GTPasique, hydrolyse le dernier phosphate du GTP et restaure ainsi la forme GDP- $\alpha$ , cette conformation permettant sa réassociation avec le complexe  $\beta\gamma$ , et assurant ainsi la fin du cycle d'activation. (Fig.5) Toutefois, ce modèle de recrutement des protéines G au récepteur suite à son activation, puis de dissociation du récepteur des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta\gamma$  a été remis en cause par de nombreuses études qui démontrent que la protéine G serait déjà à proximité du récepteur et que la liaison du ligand n'entraînerait pas une réelle dissociation récepteur/protéine G mais plutôt des changements conformationnels au sein de ce complexe, permettant l'échange GDP/GTP (Bunemann *et al.*, 2003, Gales *et al.*, 2006).

Deux types de protéines peuvent réguler ce cycle d'activation des protéines G et ainsi moduler les voies de signalisation en découlant : les protéines RGS (regulators of G-protein signaling) et les protéines AGS (activators of G-protein signaling) (Fig.5).

- Les RGS (regulators of G-protein signaling):

Plus de 25 protéines RGS, de taille et de nature variable, ont été identifiées à ce jour chez les mammifères. Elles ont en commun un domaine RGS, aussi appelé « RGS box », d'environ 120-125 acides aminés. Ces protéines agissent sur le cycle d'activation des protéines G par deux mécanismes, qui peuvent s'opérer indépendamment ou conjointement :

- par leur activité GAP (GTPase activating protein), elles permettent d'augmenter l'activité GTPasique intrinsèque aux protéines  $G\alpha$ , l'hydrolyse du GTP en GDP est ainsi accélérée, les protéines G passent alors d'un état actif (lié au GTP) à un état inactif (lié au GDP). Il y a alors régulation négative de la signalisation via les protéines G.

- en rentrant en compétition avec les molécules effectrices des sous-unités  $G\alpha$  actives, c'est à dire liées au GTP (Willars, 2006), réduisant ainsi la signalisation qui leur est associée. Ainsi, RGS2 et RGS3, malgré leur fonction GAP, ont été démontrées pour agir principalement par compétition (Anger *et al.*, 2004).

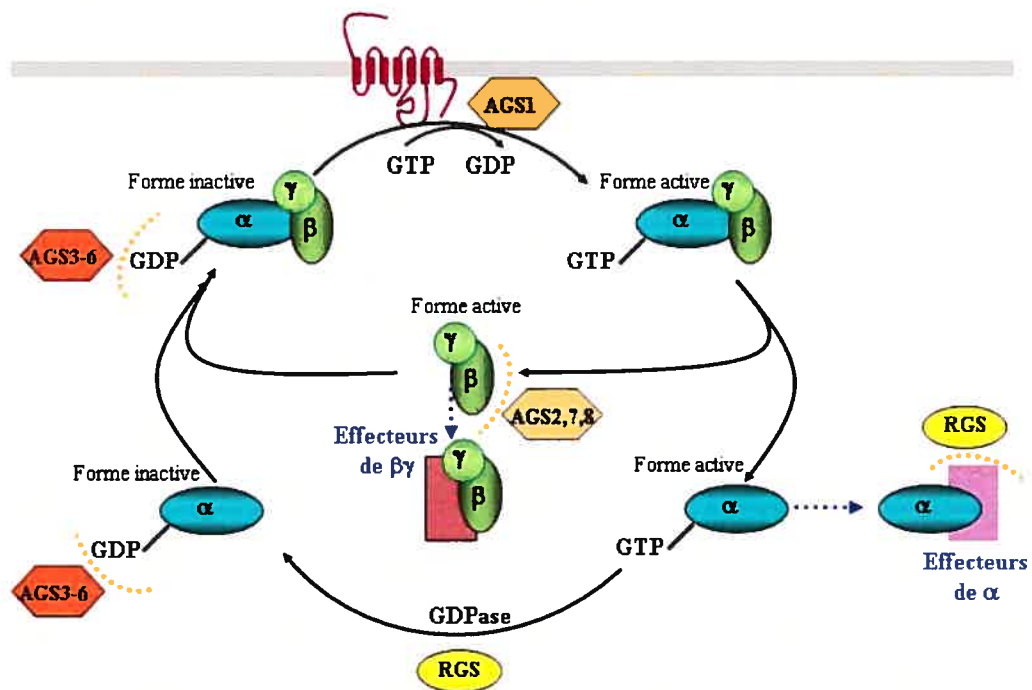
Il est intéressant de noter que les RGS régulent de manière sélective les voies de signalisation activées par les RCPGs. En effet, il a été démontré que certaines RGS peuvent réguler de manière sélective un type de protéine G. Un des premiers exemples provient de l'étude de RGS4 et RGS19 sur l'activité GTPasique de plusieurs types de protéines G. Ces deux RGS sont en effet capables d'accélérer l'activité GTPasique des protéines de type  $G\alpha i/o$  mais ne peuvent agir sur les protéines  $G\alpha s$  (Berman *et al.*, 1996). D'autre part, les RGS peuvent agir de manière sélective sur un récepteur. Par exemple, RGS4 est capable de réguler différemment la voie de signalisation de trois récepteurs (récepteurs à la bombésine, récepteur muscarinique et récepteur à la cholécystokinine) pourtant couplés à une même protéine G, la protéine  $G\alpha q$  (Xu *et al.*, 1999).

L'expression et la localisation de ces protéines est hautement régulée, assurant ainsi sélectivité et spécificité d'action par une expression spatio-temporelle spécifique mais aussi par des domaines de reconnaissance ou d'interaction avec d'autres protéines (Xie and Palmer, 2007).

- Les AGS (receptor independent Activators of G proteins signalling):

Découvertes plus récemment (Cismowski *et al.*, 1999; Takesono *et al.*, 1999), ces protéines, contrairement aux RGS n'ont pas de domaine commun mais possèdent une activité commune, à savoir la régulation de la signalisation induite par les protéines G. Les AGS se classent selon leur mode d'action, en trois groupes. Le premier comprend les AGS1, qui peuvent activer les protéines  $G\alpha i$  et  $G\alpha o$  en agissant comme GEF (guanine

nucleotide exchange factor). Le deuxième groupe comprend les AGS3-6 qui sont caractérisées par la présence d'un ou plusieurs motifs de 20-25 acides aminés nommé motif GPR (G-protein regulatory motif) ou motif GoLoco. Par ce motif, ce groupe de protéines interagit principalement avec les formes  $G\alpha$  liées au GDP, stabilisant ainsi la forme  $G\alpha$  inactive mais favorisant aussi par là même la forme libre des sous-unités  $\beta\gamma$ . Ainsi, ce groupe de protéine AGS inhibent la signalisation dépendante de  $G\alpha$  mais favorisent la signalisation dépendante du complexe  $\beta\gamma$ . Le groupe III, quant à lui, comprend les AGS2, 7 et 8 qui se lient aux sous-unités  $\beta\gamma$  mais leur fonctionnalité signalétique n'est pas encore établie (Blumer *et al.*, 2005).



**Fig. 5 :** Modèle d'activation des protéines G hétérotrimériques par les RCPGs et régulation du cycle d'activation par les protéines régulatrices de type RGS ou AGS



### **1.2.1.2 Les effecteurs et les cascades de signalisation traditionnels activés par les protéines G :**

D'après le dogme, une fois activées, les sous-unités des protéines G hétérotrimériques activent à leur tour des molécules effectrices, générant ainsi une série de second messagers, donnant lieu à diverses réponses cellulaires (Cf Fig. 1 ). Contrairement au grand nombre de RCPG existants et au grand nombre de protéines G hétérotrimériques possibles, la quantité d'effecteurs pouvant être activés par les RCPG est limitée. On retrouve principalement trois types de molécules effectrices : des enzymes, des canaux ioniques ou des transporteurs. Ainsi, selon le/les type(s) de sous-unités de protéine G activées par le récepteur (Cf Tableau I) l'adénylate cyclase (AC), la guanylate cyclase, les phosphodiésterases ou la phospholipase A2 (PLA2) activeront ou inhiberont ainsi des seconds messagers tels que l'AMPc, le GMPc, le Diacylglycérol (DAG), l'inositol (1,4,5)-triphosphate, l'acide arachidonique. Il pourra y avoir augmentation de la concentration intracellulaire de  $Ca^{2+}$  et l'ouverture ou la fermeture d'une grande variété de canaux ioniques.

Toutefois, dans les dix dernières années, de plus en plus d'études ont élargi la vision classique et linéaire de transduction du signal « RCPG / protéineG / seconds messagers ». En effet, comme nous l'avons vu précédemment un même récepteur peut activer un éventail de protéines G et ainsi mener à l'activation simultanée de plusieurs voies de signalisation distinctes. D'autre part, les protéines G ne sont pas les seules molécules effectrices interagissant avec le récepteur. Ainsi, la plupart des réponses biologiques induites par les RCPG ne découlent pas nécessairement d'une seule voie de signalisation mais sont le résultat de l'intégration des activités fonctionnelles d'un réseau intracellulaire de cascades de signalisation sophistiqué.

Nous allons voir ci-dessous l'exemple d'une voie classique linéaire, celle de l'AC et de l'AMPc (cf Fig. 6A), et nous prendrons ensuite connaissance des autres voies de signalisation possibles, avec comme exemple, la voie des MAPK de type ERK1/2.

*1.2.1.2.1 : Exemple d'une cascade de signalisation « classique », la voie de l'adénylate cyclase/AMPc:*

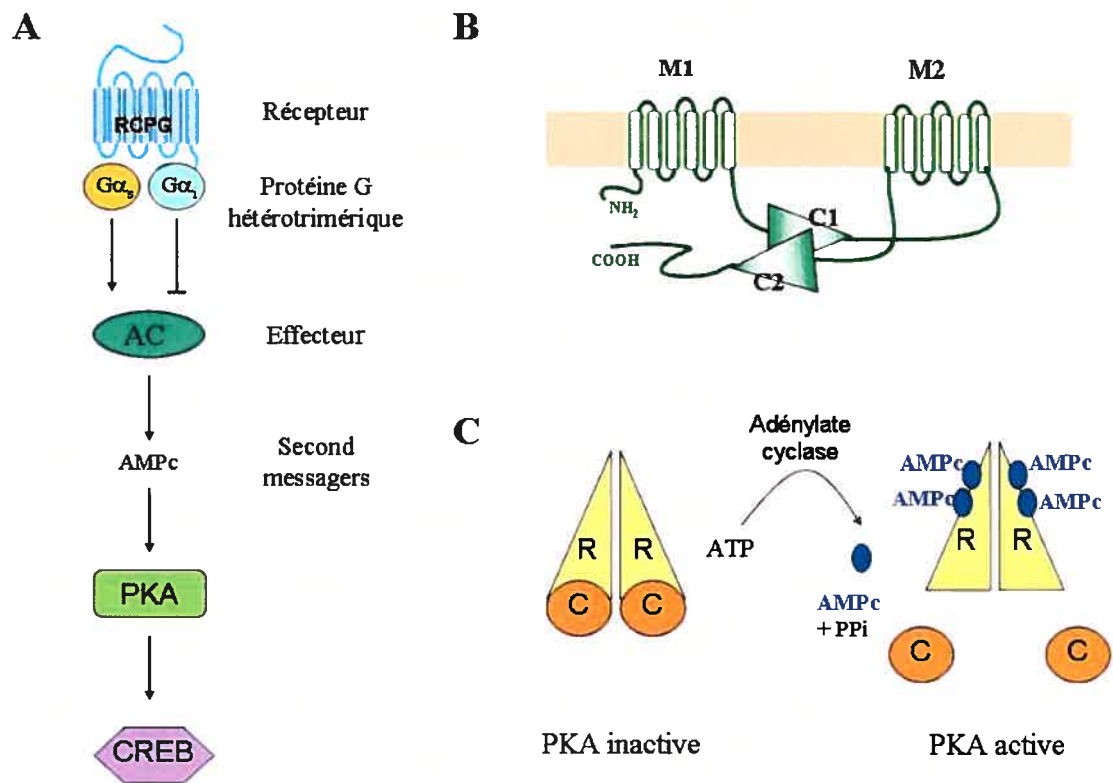
L'AMPc est un des plus ubiquitaires et des plus ancestraux second messenger intracellulaire identifié, présent à la fois chez les procaryotes, les eucaryotes unicellulaires, les plantes et les mammifères. Le niveau intracellulaire d'AMPc au niveau de la cellule est hautement régulé via l'action l'adénylate cyclase (AC), qui permettent la formation d'AMPc à partir d'ATP; mais aussi via les phosphodiesterases (PDE) qui assurent sa dégradation.

On retrouve 9 isoformes d'**adénylate cyclase** (AC1-9), dont les profils d'expression différent selon les tissus, et qui sont régulés par un éventail spécifique de protéines. Chaque isoforme présente une topologie conservée (Gao and Gilman, 1991): une région Nter, un domaine hydrophobe de 6 hélices transmembranaires (M1), un important domaine cytoplasmique (C1), un second domaine hydrophobe (M2) et enfin un second domaine cytoplasmique homologue au premier (C2). Le site catalytique de l'enzyme, qui permet la catalyse d'ATP en AMPc est formé par les domaines C1 et C2. (Cf Fig. 6B). Chaque type d'adénylate cyclase sera régulé par un éventail spécifique de protéines. Ainsi, alors que tous les sous-types pourront être régulés de manière positive par la sous-unité Gs, seules AC1, AC3, AC5 et AC6 pourront être régulées négativement par Gi. Les sous-unités  $\beta\gamma$  pourront elles aussi agir sur l'adénylate cyclase, soit de manière positive (AC2 et AC4) soit de manière négative (AC1). D'autres protéines, non nécessairement reliées aux RCPG pourront également réguler l'activité adénylate cyclase de manière positive ou négative,

comme la calmoduline, la PKC (stimulation), le  $\text{Ca}^{2+}$ , ou encore la PKA (inhibition) (Simonds, 1999).

La dégradation d'AMPC au sein de la cellule est effectuée par l'action des **phosphodiésterases**, qui assurent l'hydrolyse de l'AMPC en AMP. Chez les mammifères, ce sont les sous-familles PDE1, 2, 3, 4, 7 et 8 qui ont cette fonction. Leur localisation stratégique, par l'intermédiaire d'interactions spécifiques avec des protéines d'échafaudage assure une compartimentation de l'AMPC au sein de la cellule. Ainsi, par exemple, la protéine d'échafaudage  $\beta$ arrestine est capable de recruter PDE4D aux récepteurs  $\beta_2$ AR activés de la membrane plasmique, assurant ainsi une dégradation localisée de l'AMPC (Perry *et al.*, 2002). Une des protéines les plus connues pour recruter les PDE est la protéine d'ancrage AKAP (Anchoring Kinase A Protein) qui permet le regroupement de protéines telles que PKA ou PDE4D3, permettant ainsi une régulation locale des flux d'AMPC (Smith *et al.*, 2006).

Le développement de techniques d'imagerie par fluorescence a permis de suivre les flux d'AMPC en cellule individuelle et ainsi de mettre en évidence cette régulation spatio-temporelle de l'AMPC intracellulaire (Zaccolo *et al.*, 2000; Adams *et al.*, 1991).



**Fig. 6 : Les acteurs de voie de l'adénylate cyclase :** A) Exemple d'une voie classique, linéaire, de signalisation. B) Topologie de l'adénylate cyclase. C) Topologie et mode d'activation de la PKA

L'AMPc intracellulaire, régulera à son tour plusieurs cibles intracellulaires.

Parmi celles-ci, la **PKA** est la protéine kinase la plus connue pour être activée par l'AMPc (cAMP-dependent protein kinase) et certainement la mieux caractérisée des protéines kinases. Elle est composée de deux sous-unités catalytiques (C) actives assemblées en complexe d'holoenzyme inactive, et d'un dimère de sous-unités régulatrices (R). L'AMPc se lie sur les sous-unités régulatrices et rend ainsi actives les sous-unités catalytiques (Cf Fig. 6C). Les substrats de cette enzyme sont multiples et dépendent du type

cellulaire mais aussi de la localisation de la PKA au sein de la cellule, cette localisation étant souvent assurée par la protéine AKAP qui cible les protéines PKA dans certains compartiments cellulaires (Smith *et al.*, 2006).

Une multitude de fonctions cellulaires sont régulées par l'action de la PKA, telles que la contraction cardiaque, la régulation du cycle cellulaire, le transport des flux ioniques au sein de la cellule, la polarisation des cellules épithéliales, l'expression de certains gènes, la biosynthèse des stéroïdes. La PKA est aussi impliquée dans les fonctions reproductives ou encore lors de réponses immunitaires. Ainsi, par exemple, afin d'assurer contraction et excitation cardiaques, de nombreuses protéines seront la cible de la PKA, telles que la troponine I (TnI), les phospholambans (Pln), les canaux calciques de type L, les récepteurs ryanodine (RyR), ou encore la protéine de liaison à la myosine de type C (MyBP-C). (Tasken and Aandahl, 2004)

L'AMPc peut aussi se lier sur **EPAC** (exchange protein activated by cAMP), bien que son affinité soit plus faible que celle pour PKA. Les 2 isoformes d'EPAC (EPAC1 et EPAC2) sont des GEF pour les petites GTPases Rap1 et Rap2, et la liaison de l'AMPc sur EPAC résulte en l'ouverture de la protéine et l'exposition de son domaine d'interaction avec Rap. Il y aura ainsi conversion de la forme inactive RapGDP en la forme active RapGTP. Toutefois, le rôle exact de Rap dans la signalisation intracellulaire demeure encore élitif (Bos, 1998).

Les canaux ioniques dépendants des nucléotides cycliques (**CNG**, cyclic nucleotide-gated) sont aussi régulés par l'AMPc. Ces canaux, que l'on retrouve au niveau du rein, des testicules, du cœur ou encore dans le système nerveux central ont été premièrement identifiés pour être activés en réponse au GMPc. Toutefois, plus récemment, l'AMPc s'est avéré un régulateur des CNG dans le système olfactif et lors de la motilité du sperme (Bradley *et al.*, 2005).

### 1.2.1.3 : Infidélité des RCPG envers les protéines G : autres effecteurs

Bien que la signalisation par les RCPGs soit classiquement associée à leur couplage avec les protéines G hétérotrimériques, de nombreuses évidences, chez les invertébrés comme chez les vertébrés montrent qu'il existe une signalisation qui peut être indépendante des protéines G.

Un des premiers exemples provient de l'étude de la signalisation des récepteurs CAR (cAMP receptors) chez *Dictyostelium*. Ces récepteurs, qui reconnaissent les gradients d'AMPc, pourraient en effet induire une signalisation en absence des protéines G. Ainsi, des voies de signalisation telles que l'activation de ERK2 ou l'influx de Calcium sont présentes dans des organismes mutants pour la protéine G $\beta$ , laissant penser à une signalisation indépendante des protéines G (Gavin R. *et al.*; 1995; Milne JL *et al.* 1995; Maeda *et al.*, 1996). Toutefois, la molécule effectrice, interagissant avec le récepteur n'est à ce jour pas connue.

Chez les vertébrés, un nombre grandissant de molécules ont été identifiées comme interagissant de manière directe avec les RCPG (Bockaert *et al.*, 2004); (Brady and Limbird, 2002). Ces protéines peuvent avoir un rôle dans l'acheminement ou la stabilité des récepteurs à la surface cellulaire, ou encore influencer leur signalisation. Récemment, certaines d'entre elles ont été décrites comme pouvant induire leur propre signalisation, de façon indépendante des protéines G. Parmi ces molécules, une des plus étudiée est certainement la molécule d'échafaudage  $\beta$ arrestine, capable d'interagir avec la plupart des RCPGs. On retrouve toutefois aussi d'autres protéines telles que NHERF, qui interagit avec les récepteurs  $\beta_2$ AR, PTHR1, P2Y1 et  $\kappa$ OR et aussi la molécule Homer1a qui interagit avec les récepteurs de la famille G de la classification GRAFS. Récemment, la molécule Src a

aussi été impliquée dans une signalisation qui serait indépendante des protéines G. Nous allons décrire ci-dessous ces quelques exemples.

#### 1.2.1.3.1 La $\beta$ arrestine :

Initialement identifiée comme molécule « d'arrêt » du signal induit par les RCPGs (cf §1.2.2.2), cette molécule a ensuite été décrite comme protéine d'échafaudage pour l'activation de nombreuses voies de signalisation. Et, au regard d'une étude récente, un grand nombre de protéines interagissant avec la  $\beta$ arrestine auraient des fonctions signalétiques. En effet, seulement 15% des protéines d'interaction de la  $\beta$ arrestine auraient un rôle dans l'organisation cellulaire contre plus 25% qui auraient un rôle dans la transduction du signal (Xiao *et al.*, 2007). La voie signalétique la plus étudiée concerne la voie des MAPK avec une interaction identifiée entre la  $\beta$ arrestine et les protéines ERK1/2, JNK3, p38 ou encore la voie Akt. La  $\beta$ arrestine réunit ainsi les molécules nécessaires à l'activation de ces voies assurant ainsi spécificité de signalisation mais aussi de localisation puisque la  $\beta$ arrestine exclue souvent une localisation nucléaire. Ainsi, par exemple Raf-1, MEK-1 et ERK1/2 peuvent interagir avec la  $\beta$ arrestine2 afin d'aménager un module signalétique chargé de la stimulation des ERK1/2 par le récepteur AT1<sub>A</sub>R au niveau du cytoplasme (Luttrell *et al.*, 2001). De manière similaire, la  $\beta$ arrestine2 peut recruter les protéines ASK1, MKK7, MKP7, et JNK3 et la formation de ce complexe assure ainsi la stimulation de JNK3 mais aussi sa régulation négative via l'action de la phosphatase MKP7 (McDonald *et al.*, 2000; Willoughby and Collins, 2005). Ce complexe s'avère aussi exclu du noyau (Scott *et al.*, 2002). Un autre module signalétique a été identifié plus récemment, regroupant la  $\beta$ arrestine2, PP2A et Akt (Beaulieu *et al.*, 2005) et le nombre grandissant de partenaires identifiés pour la  $\beta$ arrestine laisse envisager l'existence d'une grande diversité de modules signalétiques possibles (Xiao *et al.*, 2007).

D'autre part, la stimulation de certaines de ces cascades peut être totalement ou en partie indépendante des protéines G. Le premier cas identifié fut celui de l'activation de la

voie ERK1/2 par le récepteur  $\beta_2$ AR. Dans leur étude, Luttrell et al ont démontré que cette voie est dépendante de Ras et de la tyrosine kinase Src mais peut être indépendante des protéines G. Désormais, de nombreux exemples ont confirmé ce rôle clé de la  $\beta$ arrestine dans la signalisation ERK1/2 indépendante des protéines G (Azzi *et al.*, 2003; Wei *et al.*, 2003; Ren *et al.*, 2005; Shenoy *et al.*, 2006a; Gesty-Palmer *et al.*, 2006; Charest *et al.*, 2007).

#### 1.2.1.3.2 Les protéines Homer :

Les protéines de la famille Homer sont des protéines d'échafaudage de type PSD, critiques pour la transmission glutaminergique. Il existe plusieurs isoformes d'Homer, issus de 3 gènes différents (Homer1-3), qui partagent tous un domaine EVH1 en Cter, ce qui leur permet de s'associer avec un motif riche en proline (PPXXFR) que l'on trouve en Cter des récepteurs mGluR, des récepteurs NMDA ainsi que des canaux calciques. Toutes les protéines Homer, à l'exception de Homer1a contiennent aussi en Cter un domaine « Coiled coil » assurant leur dimérisation et permettant ainsi la formation de complexes homo-oligomériques ou hétéro-oligomériques, responsables de la stimulation des récepteurs IP3. Par contre, Homer1a ne possède pas ce domaine Coiled coil et ainsi agit en tant que dominant négatif pour la formation de ces complexes oligomériques. Ainsi, la quantité de Homer1a présente au sein de la cellule régule l'activité constitutive des canaux calciques liés aux récepteurs mGluR1a, de manière indépendante des protéines G hétérotrimériques (Fagni *et al.*, 2004)

#### 1.2.1.3.3 Les protéines NHERF (EBP50)

Cette famille de protéines adaptatrices est caractérisée par la présence de deux domaines d'interaction de type PDZ en Nter, et en Cter un domaine qui se lie aux protéines



du cytosquelette de type ezrin, radixin, moesin et merlin. Elles ont été premièrement identifiées comme des molécules favorisant la formation de complexe multiprotéiques qui médient la phosphorylation des échangeurs sodium/hydrogène de type 3 (NHE3) par PKA et leur régulation négative. Récemment ces protéines ont été décrites comme s'associant avec plusieurs RCPG tels que le  $\beta_2$ AR, le  $\kappa$ OR, P2Y1R et le PTHR (Weinman *et al.*, 2006). En 1998, Hall *et al.* ont montré que l'interaction de NHERF avec les 10 derniers acides aminés en Cter du récepteur  $\beta_2$ AR permet la stimulation de NHE3 de manière indépendante des protéines G (Hall *et al.*, 1998a). Désormais, le rôle clé de NHERF dans la modulation indépendante des protéines G de NHE3 a été confirmé pour les récepteurs P2Y1 et KOR (Hall *et al.*, 1998b; Huang *et al.*, 2004). Il est aussi intéressant de noter que parallèlement, la liaison de NHERF au récepteur  $\beta_2$ AR a été identifiée comme nécessaire pour le recyclage du récepteur à la membrane plasmique (Cao *et al.*, 1999).

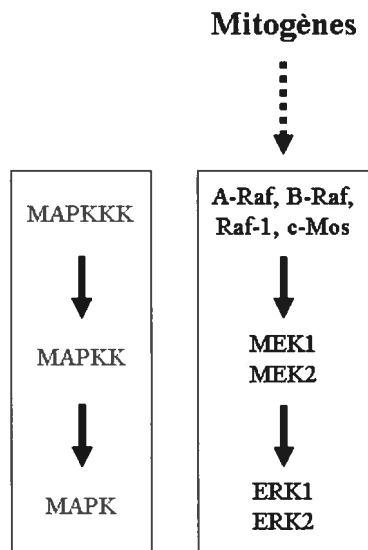
#### 1.2.1.3.4 Src

Cette famille de protéines tyrosine kinase est impliquée notamment dans la prolifération, la survie et l'adhésion cellulaire. Classiquement stimulées par les récepteurs aux facteurs de croissances, les protéines Src sont aussi décrites depuis plus d'une dizaine d'années comme pouvant aussi être stimulées par les RCPG (van Biesen *et al.*, 1995; Luttrell *et al.*, 1996). Dans certains cas, ces protéines peuvent s'associer de manière directe avec les régions intracellulaires des RCPG. En effet, de nombreux RCPG possèdent un site consensus de liaison des domaines SH3 (Src Homology) dans leur boucle i3 ou au niveau du Cter. Par exemple le récepteur  $\beta_3$ AR possède en son Cter ce type de site (région riche en Proline) et la liaison de l'agoniste au récepteur induit la formation d'un complexe entre le récepteur et Src qui serait responsable de l'activation de la voie ERK1/2 (Cao *et al.*, 2000). De manière similaire, les récepteurs P2Y1 possèdent eux aussi en Cter un site de liaison des domaines SH3 responsable du recrutement de Src au récepteur activé. Toutefois, cette

liaison n'apparaît pas impliquée dans la stimulation de la voie ERK1/2 (Liu *et al.*, 2004). Ce n'est que récemment que la liaison de Src à un RCPG a été décrite comme étant à l'origine d'une signalisation totalement indépendante des protéines G. En effet, contrairement au récepteur  $\beta_3$ AR pour lequel la liaison de Src au récepteur est dépendante de la protéine  $G_i$ , le récepteur  $\beta_2$ AR, en réponse à de fortes concentrations d'agoniste, est capable de recruter Src de manière indépendante des protéines G et ce recrutement mène à une stimulation de la voie ERK1/2 (Sun *et al.*, 2007).

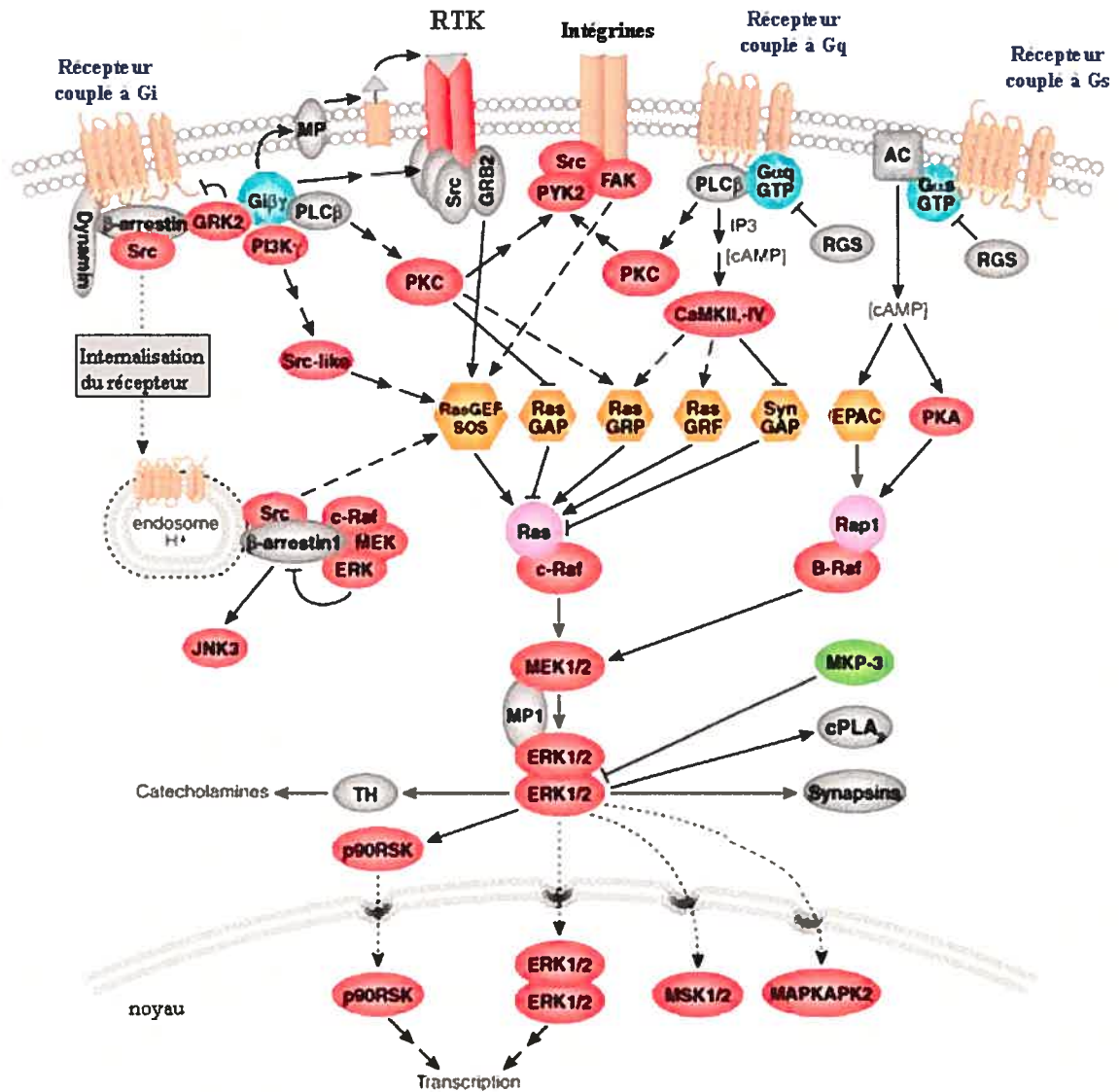
#### **1.2.1.4 Les MAPK de type ERK1/2, un exemple d'intégration de différents signaux**

Les RCPG sont capables d'induire la croissance cellulaire, la différenciation et la survie cellulaire dans de nombreux types cellulaires et ces effets sont largement attribués à leur capacité de réguler la voie des MAPK (Volmat and Pouyssegur, 2001). Cette cascade de signalisation se retrouve à travers toutes les espèces eucaryotes et comprend au moins quatre groupes distincts chez les mammifères : les ERK1/2 sont les plus classiques ; mais on retrouve aussi c-JNK 1-3, les isoformes  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , et  $\delta$  de p38 et les ERK 3, 4 et 5. Chaque cascade est composée d'une série de 3 kinases très conservées au cours de l'évolution, agissant de manière séquentielle par phosphorylation: une MAPK, une MAPK kinase (MAPKK) et enfin une MAPKK kinase. Pour les ERK1/2, MEK est la protéine se retrouvant directement en amont, et ce sont les protéines A-Raf, B-Raf, Raf-1 et c-Mos qui agissent en tant que MEK kinases. (Cf Fig. 7).



**Fig. 7: Cascade de signalisation de la voie MAPK**, à gauche, modèle séquentiel très conservé d'activation des MAPK chez les eucaryotes; à droite, les kinases correspondantes, impliquées dans la stimulation de voie ERK1/2 chez les mammifères

Bien que cette séquence d'activation soit très conservée, les voies empruntées par les RCPG pour moduler en amont cette séquence d'activation des ERK sont multiples et font intervenir une grande variété de protéines de différentes familles (cf Fig.8). L'éventail de protéines impliquées est spécifique du type de RCPG mais aussi largement dépendant du contexte cellulaire : concentration cellulaire des différentes protéines et compartimentation de ces protéines.



**Fig. 8 :** Exemple de la multitude de voies d'activation menant à la modulation de la voie ERK1/2 par les RCPG.

Des récepteurs couplés aux différentes classes de protéines G ont été démontrés comme pouvant activer les ERK1/2 via leurs **protéines G**.

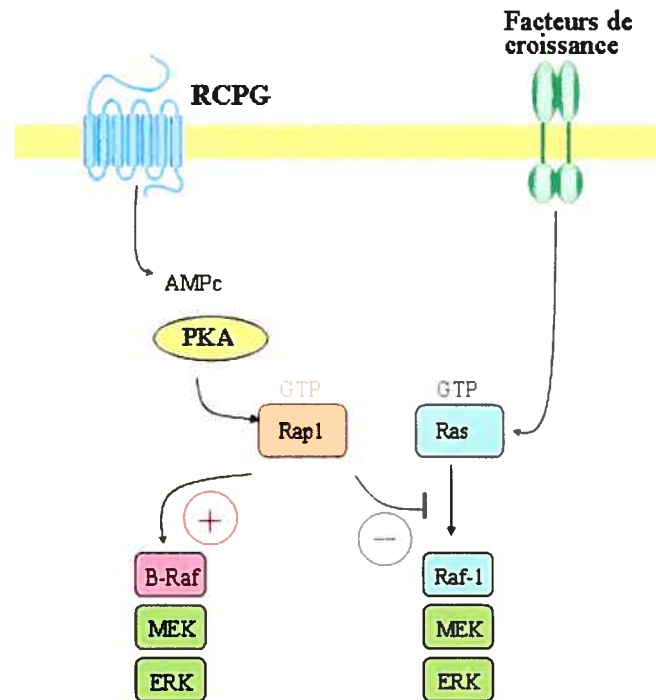
Ainsi, les sous-unités  $\beta\gamma$  issues de  $\text{G}\alpha_i$  ainsi que celles issues de  $\text{G}\alpha_q$  sont dans de nombreux cas à l'origine d'une stimulation de la voie des ERK. Le mécanisme le plus

connu implique la protéine kinase Src comme intermédiaire de signalisation, celle-ci pourrait en effet stimuler de manière directe les métalloprotéases de la famille ADAM via leur domaine SH3 et ainsi transactiver les récepteurs aux tyrosine kinase (cf §suivant).

Les récepteurs couplés à **G $\alpha$ q** peuvent aussi via la PLC stimuler les ERK de manière dépendante ou indépendante de PKC.

En ce qui concerne les récepteurs couplés à **G $\alpha$ s**, ils peuvent réguler la voie des ERK via la voie de l'adénylate cyclase. Toutefois, selon le contexte cellulaire, l'activation de l'adénylate cyclase mènera soit à une activation de la croissance cellulaire (dans les lignées d'origine neuronale notamment), soit à une inhibition (dans la plupart des cas) (Gudermann *et al.*, 2000). La petite protéine G Rap-1, une petite GTPase de la famille Ras serait à l'origine de la plupart de ces mécanismes. Cette protéine est activée par PKA, et une fois active, inhibe la protéine Raf-1 mais active la protéine B-Raf. Or ces deux protéines stimulent la voie des ERK. Ainsi, la concentration et la localisation cellulaire de B-Raf détermineront alors le niveau de stimulation/inhibition des MAPK : une forte concentration en B-Raf, que l'on retrouve dans les lignées neuronales, mènera à une stimulation de la voie ERK alors qu'une faible concentration conduira à une inhibition, mécanisme majoritaire lié à la présence ubiquitaire de la protéine Raf-1 (Cf Fig. 9) (Stork and Schmitt, 2002). Ces mécanismes démontrent bien l'importance du contexte cellulaire dans l'activation de la voie MAPK.

Même si aucune étude n'a démontré le rôle de **G $\alpha$ i** dans la modulation de la voie ERK1/2 via la voie de l'adénylate cyclase, on peut tout à fait imaginer que celle-ci pourrait agir, au même titre que G $\alpha$ s.



**Fig. 9 : Rôle de l'AMPc dans la modulation de la voie ERK1/2.** Dans des cellules privées de B-Raf, l'AMPc inhibe la voie ERK1/2 alors que dans des cellules possédant en quantité suffisante B-Raf, l'AMPc possèdera un rôle d'activation de la voie ERK1/2, qui prendra le dessus sur la voie normalement inhibitrice, dépendante de Raf-1. D'après Stork and Schmitt, 2002.

En plus des classiques protéines G hétérotrimériques, d'autres protéines ont été démontrées comme responsables de la stimulation des ERK par les RCPG, et ce de manière indépendante des protéines G. Une des protéines les plus étudiées dans cette voie de signalisation est la protéine d'échafaudage  **$\beta$ arrestine**. Cette protéine est en effet impliquée dans de nombreux réseaux de signalisation cellulaire, et particulièrement au niveau de la voie des MAPK (Cf § 1.2.1.3.1 & DeWire *et al.*, 2007). Les premières indications sur le rôle de la  $\beta$ arrestine proviennent d'études sur l'internalisation des récepteurs. Dans ces études, certains dominants négatifs de la  $\beta$ arrestine1 et de la dynamine, ou encore certains

inhibiteurs chimiques de l'internalisation étaient capables d'inhiber la voie ERK1/2, suggérant qu'un ou plusieurs composants de la voie d'internalisation était nécessaire à l'activation des ERK1/2 (Pierce *et al.* 2000). En démontrant ensuite que c-Src, une protéine largement impliquée dans les voies mitogéniques, peut être recruté de manière directe à la  $\beta$ arrestine1 en réponse à l'activation du récepteur  $\beta_2$ AR, le groupe de Lefkowitz a identifié la  $\beta$ arrestine comme nécessaire lors de la stimulation des ERK1/2 (Lefkowitz and Shenoy, 2005).

En effet, la  $\beta$ arrestine peut aussi servir de protéine d'échafaudage pour assurer spécificité et fidélité de signalisation de la voie ERK1/2 via la formation de modules de signalisation. Ainsi, la  $\beta$ arrestine1 permet le regroupement de Raf-1 et de pERK suite à l'activation du récepteur PAR2. De manière similaire, suite à la stimulation du récepteur AT1<sub>A</sub>R, on retrouve la  $\beta$ arrestine2 dans un complexe comprenant Raf-1 / MEK1 / ERK1/2 (DeFea *et al.*, 2000, Luttrell *et al.*, 1999a).

Il est à noter que les deux isoformes de la  $\beta$ arrestine peuvent posséder des rôles distincts et antinomiques. En effet, pour certains récepteurs comme les récepteurs AT1<sub>A</sub>R ou le V2R la  $\beta$ arrestine1 possède un rôle activateur alors que la  $\beta$ arrestine2 a un rôle inhibiteur, certainement en favorisant l'internalisation et la désensibilisation du récepteur (Ahn *et al.*, 2004; Ren *et al.*, 2005). Toutefois, ces rôles distincts ne peuvent être généralisables. En effet, pour les récepteurs PAR2, PTH1R et  $\beta_2$ AR, les deux isoformes de la  $\beta$ arrestine sont impliqués dans la stimulation de la voie ERK1/2 (Shenoy *et al.*, 2006b; Gesty-Palmer *et al.*, 2006; Milano *et al.*, 2006). D'autre part, pour le récepteur PAR1, c'est la  $\beta$ arrestine1 qui possède un rôle inhibiteur alors que la  $\beta$ arrestine2 a un rôle activateur (Lee *et al.*, 2003)

L'implication de la  $\beta$ arrestine dans l'activation des ERK a divers rôles fonctionnels. La formation de complexes comprenant les ERK permettrait la rétention de ces kinases au niveau du cytoplasme et on retrouve souvent une colocalisation entre la  $\beta$ arrestine et les marqueurs des endosomes. Ainsi, alors qu'une stimulation de la voie ERK1/2 par

l'intermédiaire des protéines G induira une réponse mitogénique, souvent attribuée à une phosphorylation du facteur de transcription Elk; une stimulation des ERK via la  $\beta$ arrestine est souvent associée à une inhibition des réponses mitogéniques (Luttrell *et al.*, 2001).

Outre un rôle dans la localisation des ERKs, la  $\beta$ arrestine influence aussi la cinétique de stimulation des ERKs. En effet, la signalisation via les protéines G est souvent décrite comme transitoire alors qu'une signalisation via la  $\beta$ arrestine est plus soutenue dans le temps.

Dans de nombreux cas, la stimulation des ERK par les RCPGs dépend à la fois des protéines G et de la  $\beta$ arrestine. Toutefois, il a été démontré pour le récepteur V2R, dans des cellules HEK293, que la stimulation des ERK est entièrement dépendante de cette protéine, confirmant l'importance de son rôle dans l'activation de cette voie de signalisation (Charest *et al.*, 2007).

Récemment la protéine **c-Src** a aussi été démontrée pour les récepteurs  $\beta_2$ AR (Sun *et al.*, 2007) et 5-HT4R (Barthet *et al.*, 2007) comme pouvant stimuler la voie des ERK par un recrutement au récepteur activé, et ce de manière indépendante des protéines G et de la  $\beta$ arrestine.

En aval de ces protéines (protéines G hétérotrimériques,  $\beta$ arrestine, Src) se trouve une grande variété de molécules impliquées dans l'activation des ERK par les RCPGs dont les protéines activées par les différents seconds messagers (telles la PKA, EPAC, la PKC, ou la PI3K) et des protéines à activité tyrosine kinase de type NRTK (non-receptor tyrosine kinase) ou RTK (récepteurs tyrosine kinase).

Parmi les NRTK on retrouve principalement les protéines de la famille Src. Ces protéines oncogènes ont tout d'abord été identifiées dans de nombreux cancers (Erikson, 1981) et sont impliquées à différents niveaux des voies de signalisation liant les récepteurs membranaires aux MAPK (Thomas and Brugge, 1997). Src peut être activé par interaction avec les protéines G telles que  $G_{\alpha i}$  et  $G_{\alpha s}$  (Hausdorff *et al.*, 1992; Ma *et al.*, 2000), mais



peut aussi se lier à de nombreuses autres protéines telles que la  $\beta$ arrestine (Luttrell *et al.*, 1999a), certains RCPG (Cao *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2004; Barthet *et al.*, 2007) ou encore les RTK (Luttrell *et al.*, 1999b), formant ainsi des complexes de signalisation spécifiques. Il est à noter que selon le type cellulaire, d'autres NRTK tels que Csk, PYK2, Btk, Fyn ont été proposés comme intermédiaires des voies de signalisation MAPK stimulées par les RCPG (Gudermann *et al.*, 2000).

L'observation que les RCPG et les RTK empruntent des cascades de signalisation communes a mené à la découverte du phénomène de « transactivation » appelé ainsi par le groupe de Axel Ullrich (Daub *et al.*, 1996). Cette transactivation, c'est-à-dire l'activation d'un récepteur donné (un RCPG) qui mène à l'activation d'un récepteur hétérologue (un RTK), peut se présenter de 2 manières différentes :

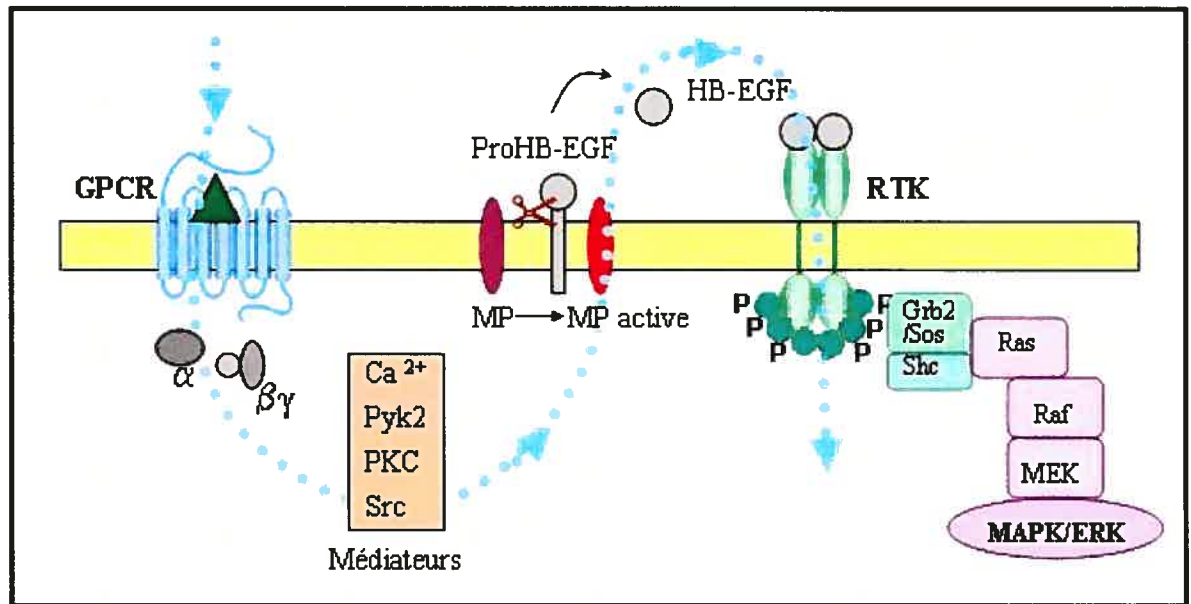
- par activation directe du RTK : Les NRTKs tels que Src et Pyk peuvent s'associer avec les RTKs et ainsi phosphoryler les résidus clés, nécessaires à l'activation. Ainsi par exemple, c-Src activé peut phosphoryler l'EGFR au niveau de résidus clés du domaine intracellulaire (Tyr845, Tyr1101), permettant ainsi une stimulation du RTK (Biscardi *et al.*, 1999). Un autre mécanisme d'activation directe des RTK pourrait provenir de la formation de complexes protéiques RCPG / NRTK / RTK. En effet, par exemple, le  $\beta_2$ AR a pu être immunoprécipité avec l'EGFR, et cette interaction a été démontrée comme nécessaire dans l'activation des ERK (Maudsley *et al.*, 2000). Toutefois, les données ne permettent pas d'affirmer que l'activation de l'EGFR se fait de manière directe.

- par relargage de ligands aux RTK dans le milieu extracellulaire. Ce phénomène est aussi appelé TMPS pour « Triple Membrane Passing Signaling » et a été premièrement identifié pour le récepteur EGFR (Daub *et al.*, 1996). Ce terme fait référence à la séquence de trois signalisations transmembranaires : l'activation du RCPG, suivie par l'activation d'une métalloprotéinase qui clive le précurseur membranaire de l'HB-EGF (proHB-EGF) et

le ligand ainsi libéré dans le milieu extracellulaire initie un mécanisme d'activation autocrine-paracrine de l'EGFR (Cf Fig. 10).

De nombreux autres RTK ont été identifiés comme pouvant être transactivés par les RCPG, parmi eux, PDGFR, VEGFR, IGF-1R, FGFR1 et la liste ne cesse d'augmenter (Waters *et al.*, 2004). Il est intéressant de noter qu'un même récepteur peut utiliser différents RTK selon le type cellulaire. Ainsi, par exemple, l'acide lysophosphatidique (LPA) induit la transactivation de EGFR dans des cellules COS-7 (qui ne possèdent pas de PDGFR) alors qu'il induit la transactivation de PDGFR dans des cellules L, qui ne possèdent pas d'EGFR. Enfin, dans des cellules Rat-1 qui possèdent les deux types de RTK, la voie EGFR est choisie (Herrlich *et al.*, 1998). De même les métalloprotéinases activées peuvent aussi être de natures différentes mais semblent être principalement de la famille ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase Domain) en ce qui concerne la production de ligands de l'EGFR. (Ohtsu *et al.*, 2006).

Une fois le RTK transactivé, la voie de signalisation stimulée est identique à la voie naturelle empruntée par le RTK, il y a ainsi phosphorylation ou autophosphorylation des résidus clés du domaine Cter, la molécule adaptatrice Grb2 se lie de façon directe ou indirecte sur la molécule Shc et permet le recrutement de la molécule Sos au récepteur qui à son tour permet l'activation de Ras, et active ainsi la cascade classique de stimulation de la voie MAPK (cf Fig.10).



**Fig. 10 : Modèle TMPS de transactivation des RTKs par les RCPGs :** Le mécanisme d'activation requiert trois phases distinctes : 1) activation du RCPG, 2) activation d'une métalloprotéase (MP) par les protéines activées par le RCPG et enfin, 3) activation du RTK par le ligand produit grâce à l'action de la MP. Le signal passe ainsi trois fois au niveau de la membrane plasmique.

Les voies de signalisation empruntées par les RCPG pour réguler la voie MAPK/ERK sont donc de nature très diverse : protéines G, molécules d'échafaudage telles que la  $\beta$ arrestine et multiples molécules intermédiaires de signalisation. Et pour de nombreux récepteurs plusieurs mécanismes peuvent mener à la régulation des ERK au sein d'un même type cellulaire. Ainsi, la modulation de cette voie de signalisation est alors souvent le fruit de l'intégration de ces différents mécanismes.

A travers cette section, nous avons pu constater la grande diversité des voies de signalisation que les RCPG sont capables d'induire avec comme exemple la voie de l'adénylate cyclase et la voie des MAPK. Dans la section suivante, nous allons essayer de comprendre comment ces voies de signalisation sont régulées au sein de la cellule.

## 1.2.2 La régulation de la signalisation

Comme tout processus biologique, les voies de signalisation activées par les RCPGs doivent être régulées de manière à prévenir une stimulation excessive et à adapter la réponse cellulaire au contexte biologique dans lequel se trouve la cellule. En effet, la stimulation des cascades se trouve modulée rapidement par un ensemble de mécanismes de rétrocontrôle négatif. Il peut y avoir désensibilisation du récepteur par phosphorylation, découplage fonctionnel du récepteur avec les protéines G hétérotrimériques, ou régulation négative, c'est-à-dire diminution du nombre de récepteurs à la surface cellulaire soit par dégradation des récepteurs, soit par une inhibition de la transcription des ARN messagers codant pour les récepteurs. Enfin, de nombreuses autres protéines interviennent à divers niveaux des cascades de signalisation afin de moduler celles-ci.

### 1.2.2.1 La désensibilisation et le découplage fonctionnel récepteur / protéine G hétérotrimérique

On distingue deux types de protéines capables de désensibiliser les RCPGs par phosphorylation : les protéines kinases liées aux second messagers telles que la PKA ou la PKC, et les GRK (G-protein coupled receptor kinase).

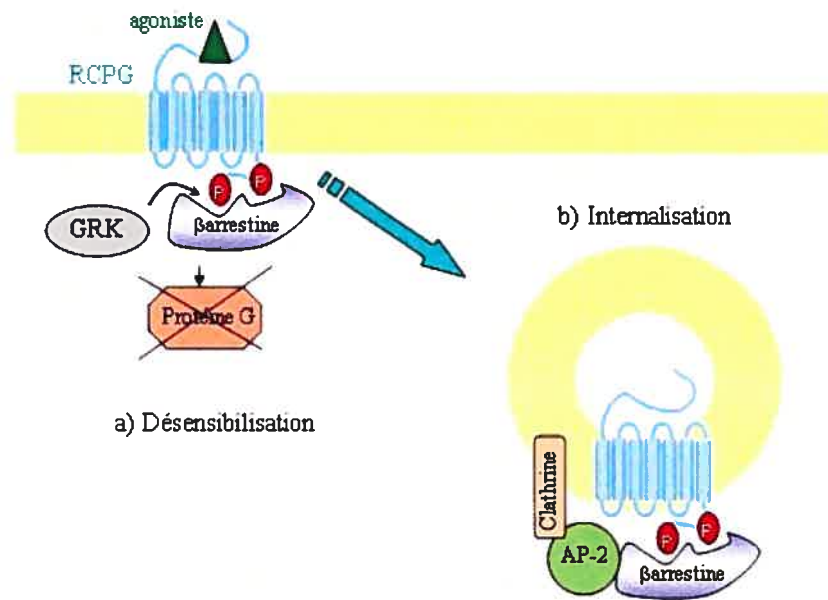
- **Les protéines kinases issues des seconds messagers** peuvent à la fois phosphoryler les récepteurs activés par le ligand mais aussi les récepteurs non stimulés, induisant ainsi une désensibilisation qui peut être soit homologue ou hétérologue. La désensibilisation est dite homologue lorsque ce sont les récepteurs activés qui sont désensibilisés; alors que la désensibilisation est dite hétérologue lorsqu'elle touche d'autres

récepteurs que ceux qui ont été activés. Ce type de désensibilisation peut alors affecter une famille de récepteurs totalement différente. Cette phosphorylation se situe au niveau d'acides aminés Ser/Thr du domaine Cter ou de la boucle i3 des récepteurs (PKA : R/K-R/x-x-S/T; PKC : S/T-x-K/R). Ce type de désensibilisation est rapide (elle se produit en effet quelques secondes ou minutes après stimulation du récepteur) et efficace (une faible concentration d'agoniste suffit en effet à induire la désensibilisation de la population de récepteurs membranaires). Toutefois, les mécanismes moléculaires à l'origine de cette désensibilisation ne sont pas encore bien compris. La phosphorylation du récepteur suffit à induire la désensibilisation du récepteur, certainement en favorisant le découplage des protéines G. D'autre part, la PKA et les GRK ont été décrites comme agissant en synergie, la PKA favorisant la phosphorylation du récepteur par GRK (Moffett *et al.*, 2001) mais cette synergie entre les deux kinases ne semble pas nécessairement observée (Tran *et al.*, 2004).

Il est à noter que tous les récepteurs ne possèdent pas de site consensus pour la phosphorylation par ce type de kinase.

- A contrario, **les GRK** sont capables d'induire une désensibilisation homologue uniquement. Celle-ci est aussi rapide mais moins efficace car seulement une petite fraction de la population de récepteurs est phosphorylée, celle activée par l'agoniste. La famille des GRK est composée de 7 isoformes différents (GRK1-7). Alors que certains isoformes sont exprimés de façon spécifique dans certains tissus (GRK4 est par exemple retrouvé uniquement dans les reins, les testicules et le cervelet alors que GRK1 est exprimée uniquement dans le système visuel), les GRK2, -3, -5 et -6 sont ubiquitaires dans les tissus mammifères. Les GRK2 et -3 sont les deux kinases les plus impliquées dans la phosphorylation des récepteurs et la désensibilisation alors que GRK5 et 6 sembleraient être reliés à l'activation de la voie MAPK (Kim *et al.*, 2005; Ren *et al.*, 2005). Toutefois, dépendamment des récepteurs et des tissus, les GRK impliquées dans la désensibilisation

peuvent varier. Elles phosphorylent la plupart des récepteurs, sur des résidus Ser/Thr du domaine Cter et de la boucle i3 (Pitcher *et al.*, 1998). Une fois les récepteurs liés à l'agoniste et phosphorylés par GRK, ceux-ci possèdent alors une affinité accrue pour la molécule « d'arrêt »  $\beta$ arrestine, ce qui permet un découplage fonctionnel entre le récepteur et la protéine G hétérotrimérique, certainement par encombrement stérique, mais elle permet aussi un acheminement des récepteurs vers les puits de clathrine (Cf Fig.11). Même si la phosphorylation des récepteurs semble être le mécanisme le plus influant sur la désensibilisation des récepteurs, de plus en plus d'études amènent à penser qu'il existe aussi des mécanismes de désensibilisation via les GRK qui sont indépendants de la phosphorylation (Ferguson, 2007). En effet, l'utilisation de mutants pour le site catalytique des GRK suffit dans de nombreux cas à induire la désensibilisation des RCPG. Une des premières études provient du récepteur PTH, dont la désensibilisation homologue, en cellules COS-1 serait dépendante de GRK2 mais indépendante de la phosphorylation. En effet, un récepteur mutant pour les sites de phosphorylation par GRK est tout de même désensibilisé et, d'autre part, un mutant de GRK2 pour le site catalytique peut induire la désensibilisation (Dicker *et al.*, 1999). Similairement, les récepteurs GABA<sub>B</sub> peuvent être désensibilisés par un mutant de GRK4 ne possédant pas de domaine catalytique (Perroy *et al.*, 2003).



**Fig. 11** : Modèle classique de a) désensibilisation : phosphorylation par GRK et découplage fonctionnel par la  $\beta$ arrestine et b) internalisation : endocytose du récepteur par assemblage d'un complexe  $\beta$ arrestine/AP-2/Clathrine.

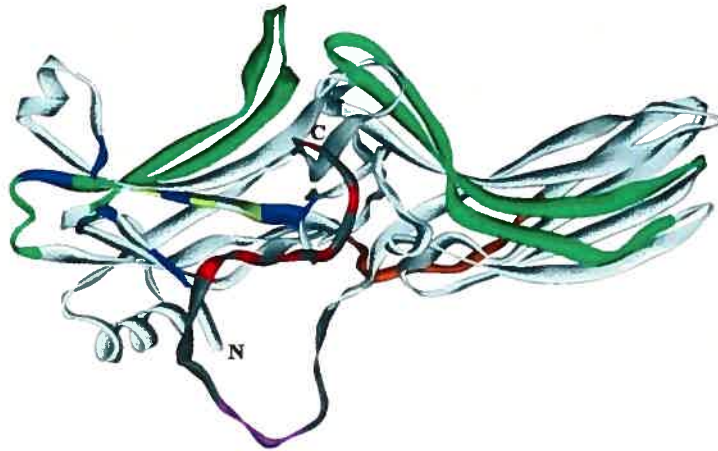
### 1.2.2.2 L'internalisation et la régulation négative :

Suite à leur activation, les RCPG peuvent être internalisés par aux moins deux voies différentes, qui, pour un même récepteur peuvent être combinées ou utilisées seules, et le choix d'une voie semble être dépendant du contexte cellulaire dans lequel se trouve le récepteur (Tsao *et al.*, 2001).

- **Internalisation par les puits tapissés de clathrine:** Cette internalisation permet l'acheminement des récepteurs dans les vésicules d'endocytose. Elle est souvent associée, chez les RCPG, à l'action de la protéine d'échafaudage arrestine. L'arrestine a été premièrement identifiée comme une protéine de 48KDa (visual arrestin) capable de se lier

aux récepteurs Rhodopsine phosphorylés et de désactiver la cascade de signalisation induite (Wilden *et al.*, 1986). Chez les récepteurs  $\beta_2$ AR, un homologue de cette protéine a été ensuite identifié: la  $\beta$ arrestine, qui agit de concert avec  $\beta$ ARK (GRK2) pour induire la désensibilisation des récepteurs (Benovic *et al.*, 1987); (Lohse *et al.*, 1990). A ce jour, la majorité des RCPGs utilisent cette molécule afin de réguler leur signalisation. Il existe 4 membres dans la famille des arrestines qui peuvent être répartis en 2 sous-familles : 2 arrestines visuelles (arrestin-1 et arrestin-4) et 2 arrestines exprimées de façon ubiquitaire (arrestin-2 et arrestin-3 aussi appelées  $\beta$ arrestine 1 et  $\beta$ arrestine 2). La  $\beta$ arrestine, en tant que protéine d'échafaudage, possède de nombreux domaines d'interaction (Cf Fig. 12) et peut interagir avec plus d'une vingtaine de protéines. On retrouve parmi ces protéines, celles responsables de l'endocytose comme les récepteurs phosphorylés, la clathrine, la protéine adaptatrice AP-2 ou encore au facteur d'échange ARNO (ARF nucleotide binding site opener / ARF= ADP, ribosylation factor), mais aussi des protéines responsables de la signalisation comme ERK, Src ou JNK3. Ces trois dernières années, des récepteurs tels que les récepteurs aux tyrosine kinases ont aussi été décrits comme interagissant avec la  $\beta$ arrestine (Lefkowitz and Shenoy, 2005; Lefkowitz *et al.*, 2006). Enfin, une analyse protéomique récente propose même jusqu'à plus de 300 protéines pouvant se lier aux différentes  $\beta$ arrestines (Xiao *et al.*, 2007).





**Fig. 12 : Modèle structural générique d'une molécule d'arrestine, et ses domaines d'interaction** d'après Gurevich and Gurevich, 2006:

- liaison avec le récepteur, en bleu : charges positives interagissant avec les phosphates du récepteur, en jaune : résidus hydrophobes du feuillet $\beta$ , en vert : éléments déterminant la spécificité envers le récepteur
- liaison avec d'autres protéines, en violet : l'élément de liaison à la clathrine, en rouge, les éléments de liaison à AP-2.

L'interaction entre les RCPG et la  $\beta$ arrestine induit une conformation active de celle-ci, libérant notamment son domaine Cter et permettant ainsi la liaison de la clathrine et de AP2. La phosphorylation des récepteurs par les GRK au niveau des Ser/Thr de la boucle i3 favorise ce recrutement de la  $\beta$ arrestine (Lohse *et al.*, 1992) mais n'est pas à l'origine de celui-ci. En effet, la forme active du récepteur ainsi que certaines régions des domaines intracellulaires des RCPGs constituent des éléments structuraux nécessaires au recrutement.

Une fois la  $\beta$ arrestine liée au récepteur, celle-ci engage l'internalisation des récepteurs dans les puits de clathrine. La force d'interaction entre les récepteurs et la  $\beta$ arrestine peut être utilisée pour définir deux classes de récepteurs : les récepteurs de

Classe A (comme par exemple le  $\beta_2$ AR), recrutent la  $\beta$ arrestine 2 de manière transitoire et les récepteurs de classe B (dont font partie par exemple le récepteur  $AT_{1A}R$  et le  $V_2R$ ) recrutent à la fois la  $\beta$ arrestine 1 et la  $\beta$ arrestine 2, et ce, de manière plus stable (Oakley *et al.*, 2000). Les récepteurs de classe A se dissocient rapidement de la  $\beta$ arrestine et recyclent vers la membrane cellulaire étant alors à nouveau sensibles à une future stimulation (resensibilisation), alors que les récepteurs de classe B forment des complexes stables avec la  $\beta$ arrestine et sont dégradés par la voie lysosomiale. Cette différence d'affinité pour la  $\beta$ arrestine entre les récepteurs de classe A et B serait expliquée par des patrons de phosphorylation distincts. Les récepteurs de classe A possèdent en effet des regroupements de Ser/Thr dans leur domaine Cter alors que les récepteurs de classe B ne possèdent pas ce type de regroupement de sites de phosphorylation (Oakley *et al.*, 2001).

Cependant, l'internalisation des RCPG via les puits tapissés de clathrine n'est pas nécessairement dépendante de la  $\beta$ arrestine. En effet, certains récepteurs comme le récepteur 5HT2A (5 hydroxytryptamine 2A) ou le récepteur US28 codé par le virus HCMV (human cytomegalovirus) peuvent être internalisés par un mécanisme indépendant de la  $\beta$ arrestine mais dépendant de la dynamine, et se retrouvent ainsi au sein des puits tapissés de clathrine ((Bhatnagar *et al.*, 2001, Droese *et al.*, 2004).

- **Internalisation par les caveolae** : Bien que la plupart des récepteurs internalisent via les puits tapissés de clathrine, certains, après stimulation à l'agoniste, se retrouvent dans les compartiments lipidiques de type caveolae (« petites caves ») (Chini and Parenti, 2004). Toutefois, les mécanismes moléculaires à l'origine de cette internalisation restent à définir.

Après des activations répétées ou prolongées à l'agoniste, un autre type de mécanisme est observé : la régulation négative. Celle-ci est définie par une diminution du nombre total de sites de liaison, qui peut provenir soit de la dégradation des récepteurs soit d'une diminution de la biosynthèse des récepteurs. Celle-ci est observée depuis de nombreuses années dans des systèmes physiologiques et possède un rôle prépondérant lors

de la tolérance aux analgésiques par exemple ou dans des pathologies telles que la défaillance cardiaque (Varga *et al.*, 2004; Lohse *et al.*, 1996).

Pour les récepteurs  $\beta_2$ AR, on observe par exemple une baisse de la transcription des récepteurs, et la stabilité des mRNA codant pour les récepteurs est affaiblie après une stimulation prolongée de la voie de l'adénylate cyclase (Bouvier *et al.*, 1989; Hadcock and Malbon, 1988; Tholanikunnel and Malbon, 1997). Cette diminution de la biosynthèse a été observée pour de nombreux RCPG tels que les récepteurs muscariniques, les récepteurs TRH ou encore les récepteurs adrénergiques  $\alpha_1B$  (Lee *et al.*, 1994; Narayanan *et al.*, 1992; Izzo, Jr. *et al.*, 1994).

### 1.3 Efficacité des ligands aux RCPG

Dès lors que des composés chimiques ont été identifiés comme pouvant induire une réponse pharmacologique plus ou moins importante, les pharmacologistes se sont penchés sur leur classification. Ainsi, le facteur « **activité intrinsèque** » a été introduit afin de permettre de différencier les « agonistes », des « agonistes partiels » et des « antagonistes » (Ariens, 1954). Les agonistes ayant une activité totale, les agonistes partiels une activité partielle et les antagonistes n'ayant pas d'activité intrinsèque propre mais pouvant bloquer l'activité des agonistes.

C'est en 1956, avec les travaux de R. Stephenson sur l'agonisme partiel que le terme d'« **efficacité** » est apparu (Stephenson, 1997). Ainsi, l'activité d'un composé se définit par deux paramètres: l'affinité, qui représente la propension d'un composé à se lier au niveau du récepteur ; et l'efficacité qui représente la capacité de ce composé, une fois lié, à produire une réponse. Alors que l'affinité a pu être quantifiée dans les années 70 par les méthodes de radiolisation, c'est uniquement quelques années plus tard que l'efficacité a pu être quantifiée avec l'introduction des méthodes de quantification des seconds

messagers tels que l'AMPC ou les IP3. L'efficacité est alors considérée comme étant issue d'un mode on/off du récepteur, un composé pouvant induire ou non une réponse biologique mesurable. Le premier modèle établi est alors un modèle à deux états (« Two-state model »); dans lequel les récepteurs peuvent exister sous deux formes : une forme active et une forme inactive. Dans la première formulation de ce modèle, l'état actif ( $R^*$ ) ne peut être obtenu qu'après liaison du ligand, et cet état actif est considéré comme irréversible (Del Castillo and Katz, 1957). Ce modèle fut ensuite considéré comme totalement réversible afin de pouvoir expliquer les différences d'efficacité entre ligands. En l'absence de ligand, il y a isomérisation entre un état actif ( $R^*$ ) et un état inactif ( $R$ ) du récepteur. Un agoniste stabilise alors la forme active en ayant une affinité supérieure pour  $R^*$  par rapport à  $R$ . Et le ratio  $R^*/R$  déterminera l'efficacité du ligand.

### 1.3.1 L'activité constitutive et la notion d'agonisme inverse

Une des premières découvertes qui a amené les pharmacologues à repenser la notion d'efficacité (un composé induit une réponse positive ou n'induit pas de réponse) fut la découverte par Costa and Herz, pour le récepteur delta opioïde, de l'activité constitutive (aussi appelée activité spontanée), c'est-à-dire la capacité des récepteurs à induire une réponse en l'absence de ligand. De plus, cette activité constitutive peut être inhibée par certains ligands précédemment identifiés comme « antagonistes compétitifs ». Ainsi, l'ICI174,864, un antagoniste des récepteurs delta opioïde est capable d'inhiber l'activité basale GTPasique observée dans des cellules de neuroblastome (Costa and Herz, 1989) démontrant ainsi l'existence de ligands possédant une efficacité négative. De manière similaire, l'ICI118,551 et le betaxolol peuvent diminuer l'activité basale d'un récepteur  $\beta_2$ AR constitutivement actif (CAM) (Samama *et al.*, 1994). Ce sont les études de Chidiac et al qui ont amené l'appellation d'« **agonistes inverses** » pour ces composés. En augmentant la quantité de récepteurs  $\beta_2$ AR sauvages en surface des cellules Sf9, Chidiac et al.

observent une augmentation proportionnelle de l'activité adénylate cyclase basale, qui peut aussi être inhibée par certains  $\beta$ bloqueurs, alors dénommés « agonistes inverses » (Chidiac *et al.*, 1994).

Désormais, plus de 80% des composés précédemment identifiés comme des antagonistes aux RCPG se sont révélés être des agonistes inverses et plus de 65 récepteurs sauvages, appartenant aux différentes familles de RCPGs ont été décrits comme possédant une activité constitutive (Seifert and Wenzel-Seifert, 2002).

Ainsi, l'activité constitutive pourrait être une caractéristique commune de la plupart des RCPG sauvages, faisant partie intégrante de leur pharmacologie. L'importance de cette activité constitutive est très bien estimée en système hétérologue mais difficilement appréciable du point de vue physiologique car pouvant résulter de divers facteurs, et notamment de la présence du ligand endogène aux récepteurs. Toutefois, de nombreuses mutations naturelles causant une trop forte activité spontanée des récepteurs sont associées à des pathologies (Seifert and Wenzel-Seifert, 2002) révélant ainsi l'importance physiologique de l'activité constitutive. Ainsi, par exemple, une mutation au niveau du TMVII de la rhodopsine (K292E) entraîne une activité basale élevée du récepteur et est associée à la rétinite pigmentaire, une maladie dégénérative de la vision (Robinson *et al.*, 1992).

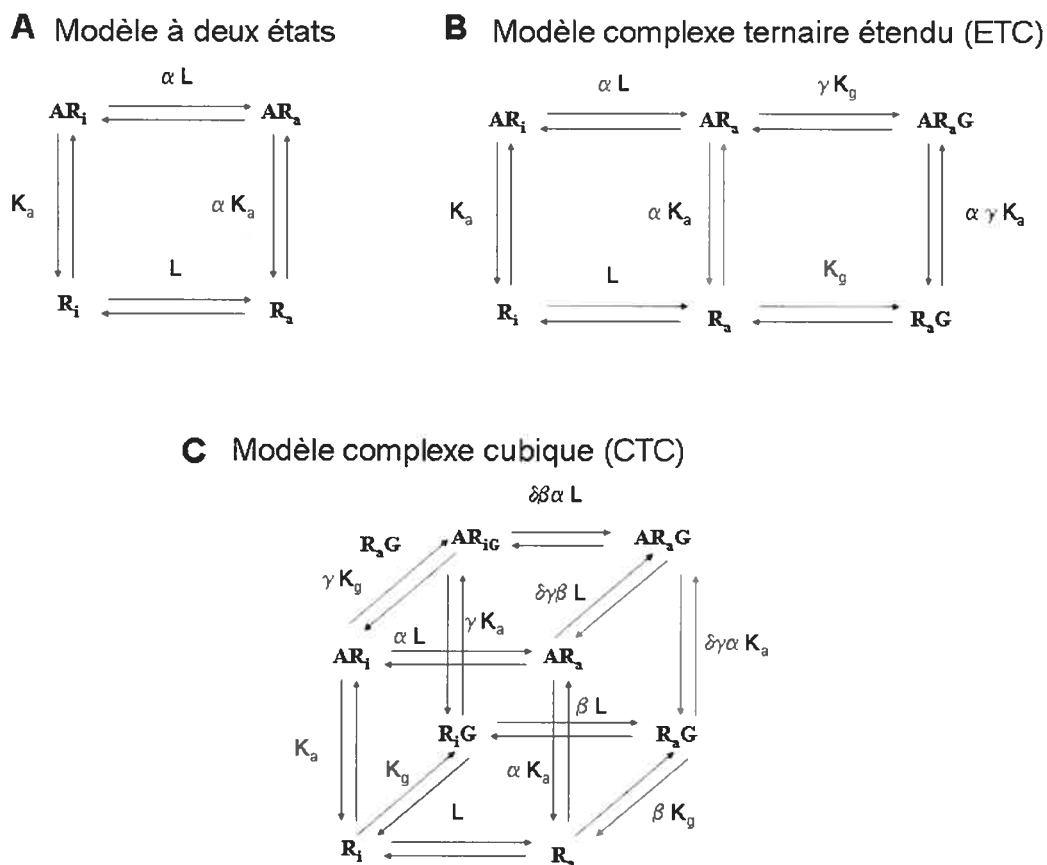
Aussi, récemment, l'agonisme inverse, propriété initialement attribuée aux ligands synthétiques des RCPG, est apparu comme un nouveau principe de régulation endogène de l'activité des récepteurs. En effet, l'AgRP (Agouti Related Protein), le ligand endogène des récepteurs mélanocortine, est un agoniste inverse pour les sous-types MC3 et MC4, inhibant la production spontanée d'AMPc et par là même agissant sur le contrôle de la prise de poids (Adan and Kas, 2003).

### 1.3.2 Modèles théoriques

Après le modèle à deux états (cf Fig. 13A), le modèle mathématique le plus simple du fonctionnement des RCPG est le modèle complexe ternaire étendu (ETC) (Samama *et al.*, 1993) qui est dérivé du modèle complexe ternaire développé par De Lean *et al.* en 1980 (De Lean *et al.*, 1980). Ce modèle permet d'accommoder les observations concernant l'activité constitutive. Le modèle ETC décrit, tout comme le modèle à deux états réversibles, les récepteurs comme des molécules allostériques en équilibre entre deux conformations, mais inclue les protéines G dans sa formulation. Dans ce modèle, il existe une conformation active ( $R_a$ ) et une conformation inactive ( $R_i$ ) et les protéines G (qui induisent la réponse cellulaire) lient uniquement l'état actif du récepteur ( $R_a$ ) alors que les ligands peuvent lier l'état actif (agoniste) ou inactif (agoniste inverse) du récepteur. (Cf Fig. 13 B). Un autre modèle, le modèle complexe ternaire cubique (CTC) plus élaboré du point de vue thermodynamique (Weiss *et al.*, 1996), considère les protéines G comme pouvant aussi lier l'état inactif  $R_i$  du récepteur sans mener à une réponse cellulaire (Cf. Fig. 13C). Dans ces deux modèles, différentes constantes ( $\alpha$  et  $\gamma$  pour le ETC et  $\alpha$ ,  $\gamma$  et  $\delta$  pour le CTC) sont entièrement dépendantes du ligand et reflètent l'affinité du récepteur lié au ligand pour la protéine G, et par là même l'efficacité de ce ligand. Une fois le ligand lié, le récepteur est capable d'adopter une nouvelle conformation présentant une affinité spécifique pour la protéine G. Ainsi, de façon théorique, il peut exister autant d'états ou de conformations du récepteur qu'il existe de ligands. Et ces modèles prédisent donc une multitude de conformations.

D'après ces deux modèles théoriques, un agoniste stabilise un état actif (lié ou non aux protéines G) et un agoniste inverse stabilise un état inactif du récepteur (lié ou non aux protéines G). Un antagoniste, quant à lui a la même affinité pour tous les différents états, actifs ou inactifs, liés ou non aux protéines G. Il n'est donc pas surprenant que rares soient

les ligands ayant ces propriétés, et que très peu de ligands soient donc des antagonistes neutres.



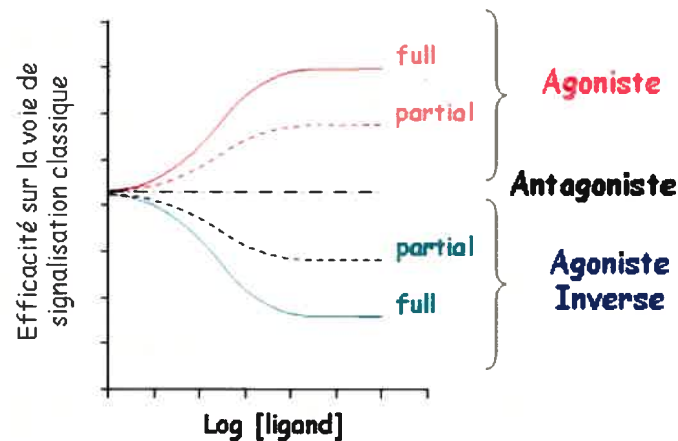
**Fig. 13 :** Les différents modèles développés : A) Modèle à deux états réversible, communément appelé « Two-state model » B) Modèle complexe ternaire étendu (ETC model), incluant l'action des protéines G. C) Modèle complexe cubique (CTC) dans lequel les protéines G peuvent se lier à l'état inactif du récepteur.

Un modèle à trois états (three state model), a aussi été proposé par Leff ou il existe deux populations de récepteurs actifs et une population de récepteurs inactifs (Leff *et al.*,

1997). Le nombre de conformations possibles est donc limité et ce modèle semble être insuffisant afin de réconcilier l'ensemble des observations biologiques mentionnées ci-dessous

### 1.3.3 Complexité de l'efficacité des ligands aux RCPGs / Evidences de la multitude de conformations des RCPGs

Couramment la classification en tant qu'agoniste (partiel ou total), antagoniste neutre ou agonistes inverses (partiel ou total) se fait selon l'efficacité du ligand pour une voie de signalisation donnée, le plus souvent la voie classique dépendante des protéines G. (Cf Fig.1).



**Fig. 14 :** Classification des ligands selon leur efficacité sur une voie donnée.

Toutefois, comme mentionné dans les chapitres précédents, de nombreux récepteurs peuvent stimuler plus d'une voie de signalisation et ne sont pas fidèles envers un unique



sous-type de protéine G mais peuvent se coupler simultanément à plusieurs sous-types (Hermans, 2003) et peuvent aussi interagir avec diverses protéines cytosoliques.

### 1.3.3.1 Les inversions de puissances et de réponses maximales

De nombreuses études ayant testé l'efficacité des ligands aux RCPG non seulement pour la voie classique induite par le récepteur mais aussi pour les autres protéines G / effecteurs modulés ont illustré la complexité de l'efficacité des ligands aux RCPG. Ainsi, deux types d'observations ont notamment mené à une nouvelle considération de l'efficacité : pour plusieurs ligands l'ordre des puissances et des réponses maximales observées peut être différent en fonction des seconds messagers mesurés, et ce pour un même récepteur. Une des premières évidences provient de l'étude de Spengler et al. de deux peptides neurotrophiques (PACAP-27 et PACAP-38) sur deux voies de signalisation stimulées par le récepteur PACAP: la voie adénylate cyclase, reflet de l'activation de  $G_{\alpha s}$  et la voie de la phospholipase C, reflet de l'activation de  $G_{\alpha q}$ . Dans cette étude, le peptide PACAP-27 est plus puissant lorsque l'accumulation d'AMPc est mesurée alors que cette hiérarchie est inversée lorsque c'est l'accumulation des inositols phosphate qui est examinée ; le peptide PACAP-38 démontrant une meilleure puissance pour cette voie (Spengler *et al.*, 1993). Ces deux agonistes possèdent donc des activités intrinsèques différentes selon la voie de signalisation considérée.

De manière similaire, lorsque la réponse maximale de différents ligands est examinée pour différentes voies de signalisation engagées par un même récepteur, des inversions dans la hiérarchie des efficacités ont été observées. Ainsi, Berg KA et al. ont observé que les stimulations du récepteur à la sérotonine 5HT-2C par le TFMPP et la quizapine mènent à une plus grande réponse maximale pour la production des inositols phosphates que le DOI ou la bufotenine alors que cette hiérarchie est inversée lorsque ces composés sont étudiés sur la libération d'acide arachidonique (Berg *et al.*, 1998). De

nombreuses autres observations similaires ont été faites, pour différents RCPG et pour différentes voies de signalisation ou protéines G activées (Brink *et al.*, 2000; Gay *et al.*, 2004; Shoemaker *et al.*, 2005; Kurrasch-Orbaugh *et al.*, 2003; McLaughlin *et al.*, 2005; Hall *et al.*, 1999b; Moniri *et al.*, 2004; Krueger *et al.*, 2005).

Les ligands possèdent donc selon la voie de signalisation considérée une efficacité qui leur est propre. Ce nouveau concept d'efficacité est désigné dans la littérature sous différents noms : « agonist trafficking of receptor signals », « functional selectivity » ou encore 'biased agonism'. (Kenakin, 1995; Jarpe *et al.*, 1998; Urban *et al.*, 2007). Selon ce concept, les agonistes peuvent préférentiellement induire ou stabiliser une des conformations du récepteur favorisant ainsi l'activation d'une voie effectrice au détriment d'une autre.

### 1.3.3.2 Les réversions de l'efficacité

Récemment, de manière encore plus frappante, de nombreux ligands ont été démontrés comme possédant une efficacité opposée selon la voie de signalisation considérée. Ainsi, l'ICI118,551 et le propranolol, deux agonistes inverses pour la voie AMPc stimulée par le récepteur  $\beta_2$ adrenergique se sont révélés être des agonistes partiels pour la voie ERK1/2 (Azzi *et al.*, 2003, Baker *et al.*, 2003). De manière similaire, le proxyfan, un ligand à haute affinité pour le récepteur Histamine H3 est un agoniste partiel pour la voie cyclase alors qu'il démontre une activité agoniste inverse pour les voies MAPK et la libération d'acide arachidonique (Gbahou *et al.*, 2003). Des efficacités opposées ont aussi été observées pour des ligands des récepteurs  $\delta$ -opioïdes (Audet *et al.*, 2005), et sérotonine 5-HT<sub>2C</sub> (Werry *et al.*, 2005).

### 1.3.3.3 Sélectivité de propriétés de régulation, l'efficacité collatérale

L'activité des RCPG est régulée par divers processus (cf §1.2.1) que sont la désensibilisation (par phosphorylation ou par découplage fonctionnel), l'internalisation ou la régulation négative. D'après le dogme, ces processus s'effectuent de manière linéaire : liaison du ligand, activation de la protéine G et de la voie de signalisation en résultant, désensibilisation, internalisation et down-régulation et sont donc considérés comme le fruit d'une activité agoniste. Toutefois, certains ligands ne possédant pas d'activité intrinsèque sur la voie de signalisation dépendante des protéines G sont capables d'induire l'internalisation du récepteur. Par exemple, des antagonistes neutres des récepteurs à la cholécystokinine (CCK1R) ou des chimiokines (CCR5) sont capables d'induire l'internalisation des récepteurs (Roettger *et al.*, 1997; Simmons *et al.*, 1997). A contrario, certains agonistes ne peuvent pas produire une internalisation des récepteurs. C'est le cas par exemple de la morphine qui induit une stimulation de la voie Gi des récepteurs opioïdes mais ne provoque pas l'internalisation des récepteurs (Keith *et al.*, 1996). Ainsi, les différentes propriétés de régulation de l'activité des RCPG sont modulées avec une efficacité distincte, non linéaire. L'efficacité a ainsi été qualifiée de collatérale, en opposition à une efficacité linéaire (Kenakin, 2005).

L'ensemble des observations décrites dans les paragraphes ci-dessus, à savoir des inversions dans les ordres de puissance et de réponse maximale, des réversions de l'efficacité ou une efficacité collatérale ne peuvent pas être expliquées par un modèle à deux états, dans lequel le récepteur possède uniquement deux conformations (une conformation active et une conformation inactive). Le récepteur doit en effet pouvoir adopter plusieurs conformations, et il est intéressant de noter que les modèles ETC et CTC prédisent cette multitude de conformations, chacune étant stabilisée ou induite de façon sélective par les ligands (cf § 1.3.2 & Kenakin, 2002).

### 1.3.4 La multitude de conformations adoptées par les RCPGs:

De nombreuses études biophysiques ont mis clairement en évidence l'existence des différentes conformations des RCPGs. Ainsi, l'utilisation de préparations purifiées de récepteurs  $\beta_2$ AR liés de manière covalente à une molécule fluorescente à la Cys265 de la boucle i3 a permis de distinguer plusieurs conformations de ce récepteur. En effet, les changements spectraux du fluorophore sont différents si le récepteur est lié à un agoniste, un agoniste partiel ou un agoniste inverse, suggérant que chaque ligand puisse induire un changement spectral différent et donc une conformation du récepteur qui lui est propre (Gether *et al.*, 1995; Ghanouni *et al.*, 2001a). De plus ces différents états peuvent être associés à des fonctions biologiques différentes. En effet, la dopamine, qui est capable d'activer Gs mais ne provoque pas d'internalisation du  $\beta_2$ AR induit uniquement un changement conformationnel rapide. Par contre, la norépinéphrine et l'épinéphrine qui peuvent à la fois activer Gs et provoquer l'internalisation du récepteur induisent deux changements conformationnels : un rapide et un lent, suggérant ainsi que différents états conformationnels sont liés à des fonctions cellulaires distinctes (Swaminath *et al.*, 2004).

Le développement des techniques de transfert d'énergie par résonance a permis, en cellules vivantes, d'observer de manière directe les changements conformationnels adoptés par les RCPG en réponse à leurs ligands. En modifiant génétiquement les récepteurs  $\alpha_2$  adrénergiques de telle sorte qu'ils soient marqués avec deux fluorophores différents, des changements de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert) intramoléculaire opposés ont pu être observés avec un agoniste et un agoniste inverse (Vilardaga *et al.*, 2005; Hoffmann *et al.*, 2005). De manière similaire, les changements conformationnels du domaine Cter du récepteur  $\beta_2$ AR ont pu être analysés (Granier *et al.*, 2007).

L'utilisation de ligands fluorescents du récepteur tachykinine NK2 a aussi permis de distinguer plusieurs états d'activation du récepteur, associés à des signalisations distinctes :

une forme tronquée de la neurokinine A, qui active uniquement la réponse calcium, se lie au récepteur par une seule phase, qui est rapide, alors que la forme non tronquée démontre une liaison biphasique : une phase rapide associée à la réponse calcium et une phase plus lente associée à l'accumulation d'AMPC (Palanche *et al.*, 2001).

De manière similaire, en utilisant une nouvelle technique biophysique, la résonance de type PWR (plasmon-waveguide resonance), Salamon et al. ont démontré que différentes classes de ligands (agonistes, antagonistes et agonistes inverses) des récepteurs  $\delta$ -opioïde peuvent induire différents changements structuraux des récepteurs. (Salamon *et al.*, 2002)

Enfin, récemment, l'emploi d'anticorps reconnaissant une zone cible du récepteur, a permis de détecter différents changements conformationnels des récepteurs induits par les ligands. Ainsi, des anticorps dirigés contre le domaine Nter des récepteurs  $\mu$ opioïdes ne possèdent pas la même efficacité et la même cinétique de liaison envers les récepteurs activés par différents composés (Gupta *et al.*, 2007).

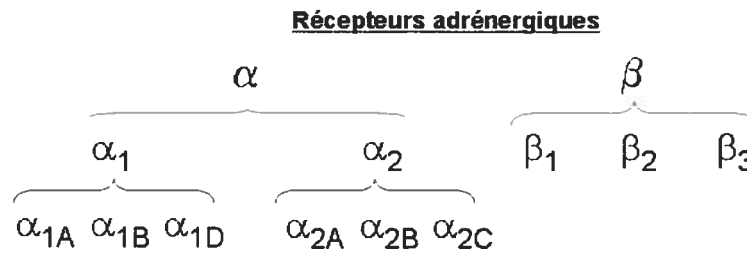
La section suivante portera sur les deux récepteurs modèles utilisés dans nos travaux, à savoir les récepteurs  $\beta_1$ AR et  $\beta_2$ AR. Ces récepteurs, et plus particulièrement le récepteur  $\beta_2$ AR a servi de modèle d'étude pour de très nombreux travaux dans les différents domaines de recherche sur les RCPGs (pharmacologie, physiologie, structure, signalisation cellulaire). Ils ont ainsi permis l'établissement de nombreux concepts de fonctionnement, qui se sont avérés généralisables à une grande majorité des RCPG ou tout au moins à la classe R, tels que la dimérisation (Angers *et al.*, 2000), la désensibilisation (Benovic *et al.*, 1987), le recrutement de la  $\beta$ arrestine (Lohse *et al.*, 1990), ou encore la notion d'agonisme inverse (Chidiac *et al.*, 1994) pour n'en citer que quelques uns. Ces récepteurs s'avèrent donc des modèles de choix, et une meilleure connaissance de leur mode de fonctionnement non seulement pourrait amener à une meilleure compréhension de l'ensemble des RCPG mais pourrait aussi permettre le développement de stratégies thérapeutiques au niveau

cardiaque, système physiologique dans lequel ces récepteurs sont grandement impliqués. D'autre part, la grande diversité de ligands disponibles ciblant ces récepteurs est un atout majeur dans le but d'une meilleure appréhension de la notion d'efficacité des ligands des RCPG.

## **1.4 Les récepteurs beta-1 et beta-2-adrénergiques en tant que modèles d'études:**

### **1.4.1 Importance physiologique / Pharmacologie**

De part leur rôle clé dans un des systèmes physiologiques majeur : le système cardiovasculaire, les récepteurs adrénergiques ont été les premiers RCPG identifiés. Cette famille des récepteurs comprend deux sous-familles : les récepteurs alpha-adrénergiques et les récepteurs beta-adrénergiques. Cette appellation provient des travaux d'Ahlquist, qui en 1948, observe que la puissance de plusieurs catécholamines (l'adrénaline, la noradrénaline et l'isoprénaline) n'est pas la même selon les effets observés au niveau de différents organes tels le coeur, les vaisseaux, l'intestin et l'utérus. Il propose ainsi l'existence de récepteurs différents qu'il appelle alpha et beta. Ces récepteurs ont par la suite été sub-divisés en 6 sous-types pour les récepteurs de type alpha et 3 sous-types pour les récepteurs de type beta (cf Fig. 15) en fonction de leur affinité pour l'adrénaline, la noradrénaline (aussi appelée norépinéphrine) et l'isoprénaline (aussi appelée isoproterenol).



**Fig. 15 : La famille des récepteurs adrénergiques : différentes sous-familles et sous-types.**

Si l'on considère les deux récepteurs modèles, pour les récepteurs  $\beta_1$ AR l'ordre d'affinité est le suivant : isoprénaline > adrénaline = noradrénaline alors que pour le  $\beta_2$ AR l'ordre d'affinité est : l'isoprénaline > adrénaline > noradrénaline

Ces deux sous-types présentent des profils d'expression différents chez l'humain (Cf Tableau II). Alors que l'on retrouve les récepteurs  $\beta_1$ AR essentiellement au niveau cardiaque et au niveau rénal, les récepteurs  $\beta_2$ AR sont prédominants au niveau vasculaire et bronchique. Au niveau du cœur les effets de l'activation des  $\beta_1$ ARs sont majeurs : il y a une augmentation de la force de contraction (effet inotrope positif) et de la fréquence cardiaque (effet chronotrope positif). L'activation des  $\beta_1$ ARs mène aussi à l'accélération de la relaxation cardiaque (Rockman *et al.*, 2002; Brodde *et al.*, 2006). Au niveau rénal, les  $\beta_1$ ARs contrôlent la sécrétion de rénine par l'appareil juxta glomérulaire (Osborn *et al.*, 1981)

Tissu	$\beta_1$ AR	$\beta_2$ AR
Cœur	80%	20%
Rein	70%	30%
Placenta	50%	50%
Poumons	30%	70%
Foie	---	100%
Leucocytes	---	100%

**Tableau II. : Expression protéique tissulaire des récepteurs  $\beta_1$ AR et  $\beta_2$ AR chez l'humain.** Pourcentage de présence par rapport à la population totale de récepteurs  $\beta_1$ AR et  $\beta_2$ AR

Malgré leur plus faible présence au niveau du cœur, les  $\beta_2$ AR sont des régulateurs importants du système cardiovasculaire, en permettant notamment la stimulation cardiaque mais aussi la libération de noradrénaline à partir des fibres sympathiques. De plus, l'activation du  $\beta_2$ AR mène à une relaxation des muscles lisses, que ce soit au niveau des vaisseaux, mais aussi des bronches, de l'intestin et du muscle utérin.

L'intérêt de l'utilisation de substances pouvant réguler ces deux sous-types de récepteur a engendré le développement d'un très grand nombre de ligands  $\beta$ adrénergiques, que ce soit des agonistes ou des antagonistes/agonistes inverses. On retrouve des agonistes dans le traitement des chocs cardiogéniques (composés sélectifs pour le  $\beta_1$ AR tels que la dobutamine), ou encore dans le traitement de l'asthme ou des maladies pulmonaires (composés sélectifs pour le  $\beta_2$ AR tels que le salbutamol, le salmeterol ou non sélectifs tels que l'isoproterenol). La plupart des composés développés sont toutefois des  $\beta$ bloqueurs, c'est-à-dire des composés décrits comme agonistes partiels, antagonistes ou agonistes inverses, qui permettent le blocage de l'action des catécholamines circulantes. Ces composés sont utilisés dans le traitement de maladies cardiaques telles que l'hypertension



(ligands sélectifs pour le  $\beta_1$ AR tels que l'atenolol mais aussi non sélectifs tels que le propranolol) ou la défaillance cardiaque (ligands sélectifs pour  $\beta_1$ AR tels que le metoprolol, le bisoprolol ou non sélectif tel que le carvedilol). On les retrouve aussi dans le traitement du glaucome ou des risques d'accouchements prématurés (ligands  $\beta_2$ AR sélectifs).

Il est intéressant de constater que dans de nombreux cas, des composés non sélectifs sont utilisés (défaillance cardiaque, hypertension). D'autre part, certains composés sont utilisés de manière paradoxale. C'est le cas par exemple des  $\beta$ bloqueurs dans le traitement de la défaillance cardiaque. En effet, lors de cette pathologie, le débit sanguin est diminué, et alors que l'on pourrait s'attendre à ce que des agonistes puissent restaurer ce débit (effet inotrope et chronotrope positif), ce sont des antagonistes qui améliorent le dysfonctionnement ventriculaire, et ce de manière dépendante de la dose et du temps. (Bristow *et al.*, 1996; Hall *et al.*, 1995).

Ainsi, nous percevons à travers ces exemples le manque de compréhension de l'efficacité thérapeutique de certains de ces composés  $\beta$ adrénergiques, pourtant administrés de façon courante.

### 1.4.2 Structure des récepteurs

Ces deux récepteurs font partie de la famille R (selon la classification GRAFS) et possèdent donc une grande homologie avec la Rhodopsine.

Le récepteur  $\beta_2$ AR fut le premier RCPG à avoir été identifié, par méthode de radioliation. Constitués respectivement de 477 et 413 acides aminés les récepteurs humains  $\beta_1$ AR et  $\beta_2$ AR présentent seulement 54% d'homologie, avec une grande divergence de

séquence pour la boucle i3 et le Cter, et une plus grande similarité pour les domaines transmembranaires (Dixon *et al.*, 1986; Frielle *et al.*, 1987).

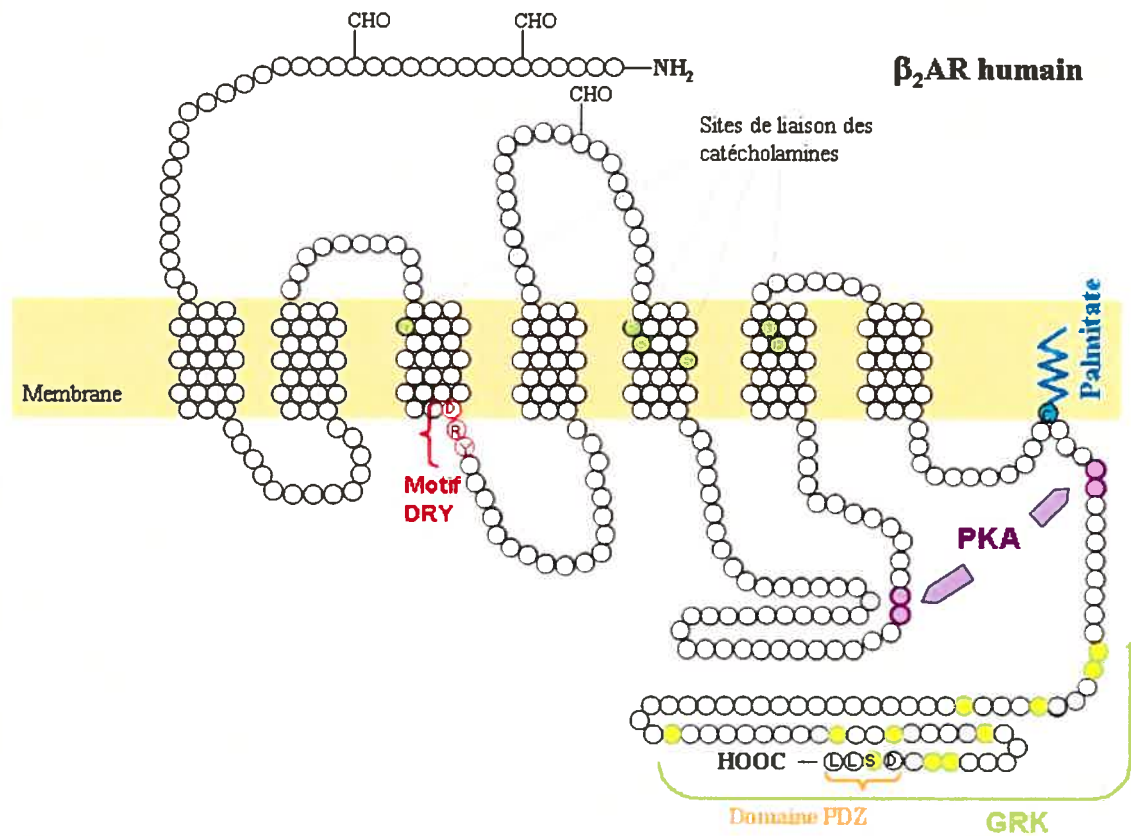
### 1.4.2.1 Domaines et résidus importants

La poche de liaison des ligands  $\beta$ adrénergiques au niveau du récepteur  $\beta_2$ AR a été amplement caractérisée : les TM3, 5 et 6 sont les principaux TM impliqués dans l'interaction ligand-récepteur. Le groupement  $\text{NH}_3^+$  des catécholamines interagit avec l'Asp113 du TM3, les groupements hydroxyles du catechol avec les Ser du TM5 (Ser203, 204 et 207) et le noyau aromatique avec le TM6 (Phe290, Asn 293). (Strader *et al.*, 1989; Wieland *et al.*, 1996; Liapakis *et al.*, 2000) (Cf Fig.16). Etant donné la forte similarité de séquence au niveau des TM entre les récepteurs humains  $\beta_1$ AR et  $\beta_2$ AR (Cf Fig. 16 et 17), et la non sélectivité d'un grand nombre de ligands  $\beta$ AR envers ces deux sous-types, on peut s'attendre à retrouver les mêmes domaines d'interaction au niveau du  $\beta_1$ AR.

L'utilisation de chimères entre les deux sous-types de récepteurs a permis de nombreuses recherches sur les domaines clé de ces récepteurs. C'est le cas par exemple de la détermination des régions à la base de la sélectivité des composés envers un sous-type ou un grand nombre de chimères a été créé. D'après les études de Frielle *et al.*, le TMIV serait responsable de la sélectivité de liaison des agonistes tels que l'adrénaline ou la noradrénaline, alors que ce sont les TMs VI et VII qui joueraient un rôle important dans la sélectivité des antagonistes (Frielle *et al.*, 1988). Toutefois, en utilisant des récepteurs chimères différents Marullo *et al.* ont démontré que la sélectivité des composés reposerait sur une multitude de sites de liaison, ces sites étant spécifiques pour un ligand donné (Marullo *et al.*, 1990). D'autre part, un peu plus récemment, ce sont différentes régions des TMII et VII qui ont été identifiés comme majeures dans cette sélectivité (Kurose *et al.*,

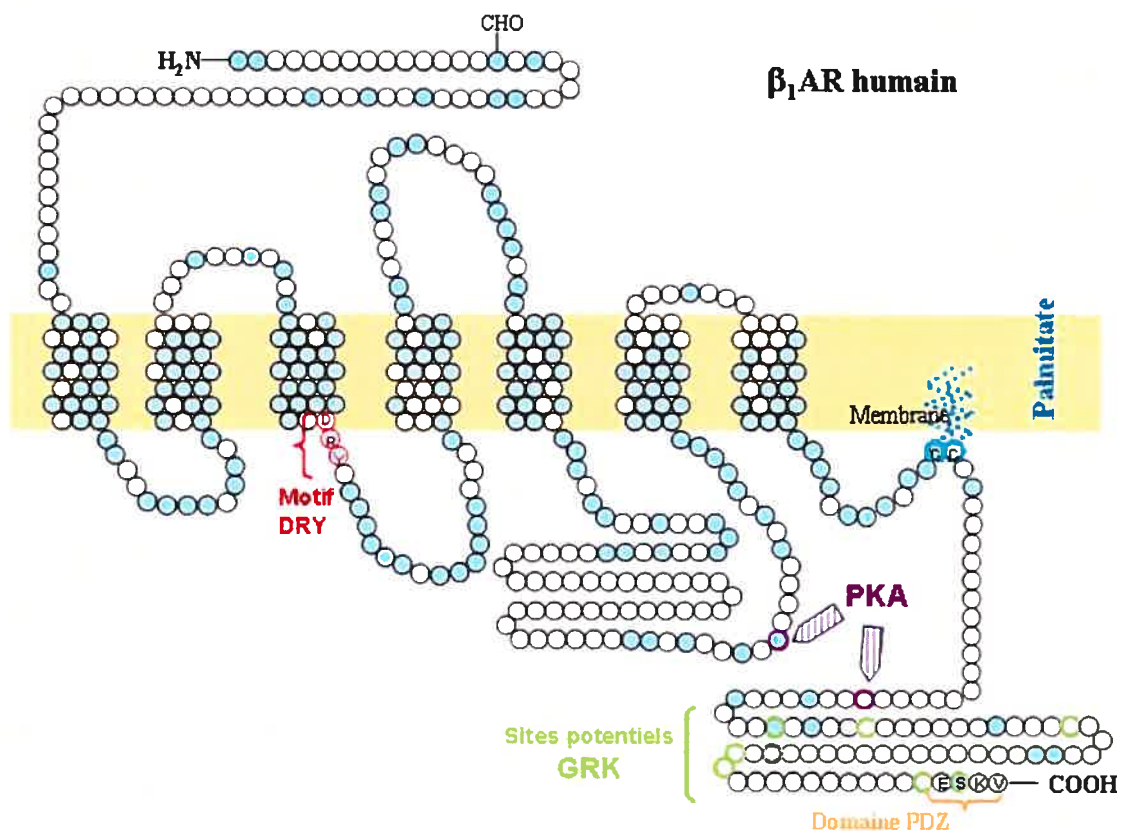
1998), et l'utilisation de mutants a confirmé l'existence de résidus clés pour la sélectivité dans ces deux TM (Isogaya *et al.*, 1999). Il apparaît donc un manque évident de consensus sur cette question de la sélectivité des composés  $\beta$ adrénergiques, qui laisse envisager, comme suggéré par Marullo *et al.* à une multitude de sites au sein des TM comme étant responsables de cette sélectivité.

En ce qui concerne le couplage du récepteur  $\beta_2$ AR à la protéine effectrice G, c'est la boucle i3 qui en serait responsable (Hausdorff *et al.*, 1990; Wong *et al.*, 1990; Okamoto *et al.*, 1991; Cheung *et al.*, 1992; Cheung *et al.*, 1991). En effet, un mutant du récepteur  $\beta_2$ AR ( $\Delta$ D267-273) présente encore une haute affinité pour l'agoniste mais n'est plus capable d'activer la voie de l'adénylate cyclase (Hausdorff *et al.*, 1990). D'autre part, l'insertion d'une partie de la boucle i3 du récepteur  $\beta_2$ AR au sein du récepteur cholinergique muscarinique M1 (M1AChR) permet à ce dernier d'activer la voie de l'adénylate cyclase (Wong *et al.*, 1990) et un peptide synthétique correspondant à la région terminale de i3 (Arg259 - Lys273) est capable d'activer Gs à des concentrations de l'ordre du nanomolaire (Okamoto *et al.*, 1991). Pour le récepteur  $\beta_1$ AR, moins de données sont présentes sur la région responsable du couplage à la protéine Gs, même si la partie Cter à proximité du TMVII semble être importante (Mason *et al.*, 1999); (Delos Santos *et al.*, 2006). L'activité constitutive des récepteurs  $\beta_1$ AR et  $\beta_2$ AR serait attribuée à la boucle i3 et au domaine Cter, très divergents entre les deux sous-types qui serait à l'origine de la différence d'activité constitutive des récepteurs (Chakir *et al.*, 2003), le  $\beta_1$ AR possédant une activité constitutive inférieure à celle du  $\beta_2$ AR (Engelhardt *et al.*, 2001). En effet, des récepteurs chimères  $\beta_1$ AR/ $\beta_2$ AR (récepteurs  $\beta_1$ AR contenant la boucle i3 et/ou le Cter du  $\beta_2$ AR) démontrent une activité constitutive bien supérieure à celle observée chez le récepteur  $\beta_1$ AR sauvage, et similaire à celle du  $\beta_2$ AR.



**Fig. 16 :** Représentation schématique de la structure du récepteur β<sub>2</sub>AR humain et indication des résidus importants.

Le domaine Cter serait aussi à l'origine de la désensibilisation. Le β<sub>1</sub>AR possède une désensibilisation moindre par rapport au β<sub>2</sub>AR (Rousseau *et al.*, 1996), et des récepteurs chimères β<sub>1</sub>AR/β<sub>2</sub>AR (récepteurs β<sub>1</sub>AR contenant une partie du Cter du β<sub>2</sub>AR) démontrent une désensibilisation supérieure par rapport à celle observée avec un β<sub>1</sub>AR sauvage (Rousseau *et al.*, 1996; Liang and Fishman, 2004). Nous allons voir dans le paragraphe suivant que ces profils distincts de désensibilisation entre les deux récepteurs peuvent être expliqués par des sites de phosphorylation distincts entre les deux récepteurs



**Fig. 17 : Représentation schématique de la structure du récepteur  $\beta_1$ AR humain et indication des résidus importants.** En bleu, acides aminés partagés avec le récepteur  $\beta_2$ AR humain. Les sites PKA, GRK et les sites de palmitoylation sont des sites potentiels.

#### 1.4.2.2 Modifications post-traductionnelles

Les récepteurs  $\beta_1$ AR et  $\beta_2$ AR subissent de nombreuses modifications post-traductionnelles (Cf Fig 16 et 17).

- **La glycosylation** : Le récepteur  $\beta_2$ AR est N-glycosylé en trois positions : aux acides aminés 6, 15 et 187, alors que le  $\beta_1$ AR est glycosylé une seule fois, en Nt en position 15. Ces glycosylations facilitent l'ancrage du récepteur à la membrane plasmique (en position 6 et 15) ainsi que son acheminement vers les voies de dégradation en réponse à l'agoniste (en position 187) (Rands *et al.*, 1990; Frielle *et al.*, 1987; Mialet-Perez *et al.*, 2004).

- **La palmitoylation** : Comme la majorité des récepteurs de la famille R, le récepteur  $\beta_2$ AR est palmitoylé au niveau de la cystéine 341, ce qui permet un ancrage du Ct à la membrane. Il y a ainsi formation entre le TMVII et la cystéine 341 d'une 4<sup>ème</sup> petite hélice  $\alpha$ , que l'on nomme aussi l'hélice VIII. Cette palmitoylation est régulée en réponse à l'agoniste (Loisel *et al.*, 1996; Loisel *et al.*, 1999). Malgré la présence de deux cystéines en position 299 et 300, aucune palmitoylation n'a été démontrée à ce jour pour le  $\beta_1$ AR.

- **La phosphorylation** : En réponse à l'agoniste, les récepteurs  $\beta_1$ AR et  $\beta_2$ AR sont phosphorylés au niveau de la boucle i3 et du domaine Cter par différents types de kinases : la PKA et les GRK de type GRK2, 5 et 6 mais aussi par PKC.

**La phosphorylation par PKA** : Les deux sous-types de récepteurs sont phosphorylés par PKA. Le récepteur  $\beta_2$ AR possède 4 sites de phosphorylation (Ser/Thr de la boucle i3 et du domaine Cter) (Cf Fig. 16), qui fait l'objet de nombreuses études, alors que le récepteur  $\beta_1$ AR n'en possède que 2 (boucle i3 et Cter) (Cf Fig.17), moins caractérisés. Cette phosphorylation entraîne une désensibilisation des récepteurs qui peut être homologue ou hétérologue (Cf §1.2.2.1). D'autre part, les récepteurs  $\beta_2$ AR phosphorylés par PKA démontrent une interaction plus faible avec la protéine Gs mais interagissent alors davantage avec Gi. Cette différence d'affinité serait à l'origine du mécanisme dénommé « switch Gs/Gi », où, les récepteurs une fois activés changent leur préférence de couplage pour un couplage préférentiel à la protéine Gi. Ce mécanisme permet alors un rétrocontrôle négatif en diminuant l'accumulation d'AMPc et participe ainsi à la désensibilisation de la

voie de signalisation. D'autre part, dans certains isolats de cellules HEK293, l'activation de la voie MAPK par le  $\beta_2$ AR a été décrite comme dépendante de la phosphorylation par PKA et de  $G_i$  mettant en évidence l'importance de ce switch pour l'activation d'une nouvelle voie de signalisation (Daaka *et al.*, 1997). Toutefois, ce mécanisme ne serait pas observé dans tous les types cellulaires et est à l'origine d'une controverse (cf § 1.2.1.3). Se basant sur la présence de ces sites de phosphorylation de PKA au niveau du récepteur  $\beta_1$ AR, Martin *et al.* ont avancé l'hypothèse d'un mécanisme de switch similaire pour ce récepteur. Cette hypothèse s'est vérifiée dans en cellule HEK293 (activation de la voie ERK1/2 dépendante de PKA et de  $G_i$ ), mais ce couplage à  $G_i$  pour les récepteurs  $\beta_1$ AR n'a été à ce jour observé qu'en système hétérologue et semble ne pas être présent dans des systèmes plus physiologiques (Martin *et al.*, 2004). Cette différence de couplage entre les deux sous-types serait même à l'origine de différences fonctionnelles majeures entre les deux récepteurs au niveau du cœur (Xiao, 2001). On peut alors supposer que la différence de couplage à  $G_i$  entre les deux récepteurs puisse provenir du nombre de site de phosphorylation par PKA. Ce profil différent de phosphorylation pourrait ainsi être à l'origine d'une affinité moindre entre le  $\beta_1$ AR et  $G_i$ , ne pouvant être observée que sous certaines conditions.

De manière intéressante, la phosphorylation par PKA du  $\beta_1$ AR pourrait aussi jouer un rôle clé dans l'internalisation des récepteurs via la voie des caveolae. En effet, deux récepteurs mutants pour les sites potentiels de phosphorylation par PKA et par GRK ( $\beta_1$ AR- PKA(-) et  $\beta_1$ AR-GRK(-)) démontrent chacun une internalisation diminuée de 50% par rapport aux récepteurs sauvages mais une fois traités par des inhibiteurs de la voie des caveolae, seuls les récepteurs  $\beta_1$ AR-GRK(-) voient leur internalisation inhibée. Ainsi, la phosphorylation par PKA permettrait aux récepteurs d'être internalisés via les caveolae alors que la phosphorylation par GRK dirigerait les récepteurs via les puits tapissés de clathrine (Rapacciuolo *et al.*, 2003).

**La phosphorylation par GRK :** Les récepteurs  $\beta$ ARs ont été les premiers RCPG décrits comme étant phosphorylés par un autre type de kinase : les GRKs (de type 2 et 5) initialement dénommées  $\beta$ ARKs ( $\beta$  adrenergic receptor kinases). Cette phosphorylation est impliquée dans la désensibilisation du récepteur (Benovic *et al.*, 1986; Freedman *et al.*, 1995) et, pour le  $\beta_2$ AR, permettrait aussi la rupture des interactions avec les protéines à domaine PDZ (Cao *et al.*, 1999). Les récepteurs  $\beta_1$ AR présentent moins de sites de phosphorylation par GRK que les récepteurs  $\beta_2$ AR (Cf Fig. 16 et 17), et ceci pourrait expliquer les différences d'affinité pour la  $\beta$ arrestine observées entre les deux sous-types, à savoir une affinité plus grande de la  $\beta$ arrestine pour le récepteur  $\beta_2$ AR que pour le récepteur  $\beta_1$ AR, impliquant par là même des profils de désensibilisation et d'internalisation distincts entre les deux récepteurs.

La phosphorylation du récepteur  $\beta_1$ AR par GRK5 a aussi été démontrée comme régulant l'association du récepteur avec la protéine PSD-95, créant ainsi une atténuation de la signalisation adénylate cyclase. En effet, la surexpression de GRK5 diminue l'association du récepteur avec PSD-95 alors que GRK2 n'influe pas sur cette interaction. D'autre part, c'est la phosphorylation par GRK5 qui semble nécessaire puisque que la surexpression d'un mutant GRK5 pour l'activité kinase n'a aucun effet sur l'interaction entre le récepteur et la protéine PDZ (Hu *et al.*, 2002)

Des phosphorylations par des tyrosines kinases ont aussi été reportées pour le récepteur  $\beta_2$ AR. Ainsi, en réponse à l'insuline le récepteur  $\beta_2$ AR peut être phosphorylé au niveau du résidu Tyr141 et des Tyr du Ct (Tyr350/354 et Tyr364) (Valiquette *et al.*, 1995), (Karoor *et al.*, 1995) le récepteur  $\beta_2$ AR pouvant servir de substrat pour le récepteur à l'insuline (Baltensperger *et al.*, 1996). La phosphorylation de la Tyr141 serait directement responsable de la potentialisation de la réponse adénylate cyclase observée après un traitement à l'insuline dans des fibroblastes. Effectivement, la mutation du résidu Tyr141 (Tyr141/Phe141) annihile à la fois la phosphorylation du récepteur et la potentialisation de



l'activité cyclase en réponse à l'insuline (Valiquette *et al.*, 1995). Toutefois, dans d'autres types cellulaires, c'est une atténuation de la réponse cyclase via internalisation des récepteurs qui est observée suite à un traitement à l'insuline. Et la phosphorylation au niveau des résidus Tyr350/354 et Tyr364 serait nécessaire à cette atténuation (Karoor *et al.*, 1995). De manière intéressante la phosphorylation au niveau du résidu Tyr350 crée un domaine SH2 qui permettrait la liaison de la protéine Grb2 et la mutation de ce résidu (Tyr350/Phe350) supprime non seulement cette liaison de Grb2 mais aussi l'internalisation des récepteurs  $\beta_2$ AR en réponse à l'insuline (Karoor *et al.*, 1998).

- **L'ubiquitination** : En réponse à l'agoniste, le récepteur  $\beta_2$ AR est ubiquitiné, et cette ubiquitination est impliquée dans la dégradation du récepteur mais n'a pas d'influence sur l'internalisation (Shenoy *et al.*, 2001). Par contre le  $\beta_1$ AR semble ne pas être ubiquitiné en réponse à l'agoniste. Et cette absence d'ubiquitination expliquerait les différences de profils d'acheminement vers les lysosomes observées entre le  $\beta_1$ AR et le  $\beta_2$ AR. En effet, en réponse à l'agoniste le récepteur  $\beta_2$ AR est ubiquitiné et colocalise avec des marqueurs des lysosomes alors que dans les mêmes conditions, aucune ubiquitination du récepteur  $\beta_1$ AR n'est observée, et celui-ci colocalise avec les marqueurs du lysosome mais dans des proportions moindres (Liang and Fishman, 2004)

### 1.4.3 Signalisation et régulation

La voie de signalisation Gs/adénylate cyclase/AMPC/PKA est la voie classique de stimulation des récepteurs adrénergiques. Elle est partagée par les trois sous-types de récepteurs  $\beta$ ARs et est à l'origine des fonctions habituellement associées aux récepteurs  $\beta$ ARs, à savoir la contractilité cardiaque. Toutefois, d'autres voies de signalisation peuvent

aussi être activées en réponse à l'agoniste, telles que la voie des MAPK qui est communément associée à l'hypertrophie cardiaque.

### 1.4.3.1 La voie de l'adénylate cyclase

Les récepteurs  $\beta_1$ AR et  $\beta_2$ AR, en réponse à l'agoniste, se couplent à la protéine Gs et activent par là même la voie de l'adénylate cyclase (Cf §1.2.1.2.1). Ainsi il y a augmentation d'AMPc qui à son tour stimule la PKA. L'activation de PKA entraîne au sein de la cellule la phosphorylation d'un grand nombre de protéines telles que les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  de type L, les protéines du réticulum sarcoplasmique (SR), les phospholamban (PLB) ou encore certains composants des myofilaments (ie : la troponine I et C), à l'origine de contraction cardiaque. Cependant le  $\beta_2$ AR est aussi capable de se coupler à la protéine Gi, et ce couplage est souvent avancé pour expliquer la différence majeure de signalisation observée entre les sous-types  $\beta_1$ AR et  $\beta_2$ AR au niveau cardiaque, à savoir un effet anti-apoptotique médiée par le récepteur  $\beta_2$ AR en opposition à un effet apoptotique médiée par le  $\beta_1$ AR (Xiao, 2001). Cette activation de Gi est attribuée à un mécanisme de « switch » Gs/Gi, décrit précédemment. Il est toutefois à noter que le  $\beta_1$ AR pourrait aussi se coupler, par un mécanisme de « switch » similaire à celui du  $\beta_2$ AR mais ce couplage à Gi n'a à ce jour été observé qu'une seule fois et ce, en système hétérologue (Martin *et al.*, 2004).

Cette voie adénylate cyclase est régulée par différents procédés. En réponse à l'agoniste, les deux sous-types de récepteurs subissent à la fois une désensibilisation hétérologue (via la phosphorylation par PKA) et une désensibilisation homologue (via l'action des GRKs de type 2 et 5 principalement) (cf §1.2.1). La  $\beta$ arrestine est ainsi recrutée préférentiellement aux récepteurs  $\beta$ ARs phosphorylés par GRK, provoquant un découplage fonctionnel et entraînant les récepteurs vers la voie de l'endocytose. Toutefois, le taux

d'endocytose des récepteurs est significativement différent entre les deux sous-types. En effet, en réponse à une stimulation courte par un agoniste, le récepteur  $\beta_1$ AR subit une légère internalisation alors que, dans le même contexte cellulaire, le  $\beta_2$ AR est rapidement et plus fortement internalisé (Suzuki *et al.*, 1992). Cette distinction entre les deux sous-types de récepteur est attribuée à leur différence d'affinité envers la  $\beta$ arrestine. En effet, le récepteur  $\beta_2$ AR possède une affinité plus grande que le  $\beta_1$ AR pour cette molécule d'échafaudage, ce qui entraîne une plus forte internalisation de celui-ci (Shiina *et al.*, 2000; Shiina *et al.*, 2001). D'autre part, en réponse à une présence prolongée de l'agoniste, l'activité des récepteurs est régulée par des processus de dégradation et de diminution de la synthèse de mRNA, c'est-à-dire par régulation négative. Celle-ci est plus significatif pour le  $\beta_2$ AR mais serait aussi présente dans une proportion moindre pour le  $\beta_1$ AR (Dunigan *et al.*, 2002).

Cette régulation de l'activité des récepteurs  $\beta$ ARs prend toute son ampleur dans des contextes pathologiques, pour lesquels les récepteurs sont stimulés de manière prolongée au ligand naturel. Ainsi, dans le cas de la défaillance cardiaque, où le taux de catécholamine dans le sang est élevé, plusieurs mécanismes de régulation sont observés. Ainsi, dans des cardiomyocytes de cœur défaillant, la concentration en GRK2 est nettement supérieure à la normale et la population de surface des récepteurs  $\beta_1$ AR est diminuée pour atteindre un niveau similaire à celle du  $\beta_2$ AR, passant ainsi d'un ratio  $\beta_1$ AR / $\beta_2$ AR de 80%/20% à un ratio de 50%/50% (Lamba and Abraham, 2000).

Un autre mécanisme supplémentaire de contrôle de l'activité du  $\beta_2$ AR fait intervenir la compartimentation des signaux via les protéines AKAPs (A-Kinase anchoring proteins). Les protéines AKAPs, en s'associant aux sous-unités régulatrices RII de PKA, compartimentent cette enzyme avec ses protéines cibles, et permettent ainsi une coordination spatiotemporelle des cascades de signalisation en rassemblant dans un même complexe activateurs et effecteurs. AKAP250, aussi connue sous le nom de gravine, ou de AKAP12, interagit avec le domaine Cter du  $\beta_2$ AR (Fan *et al.*, 2001), mais aussi avec PKA,

PDE4D (Shih *et al.*, 1999), PKC, GRK2,  $\beta$ arrestine ainsi que la clathrine (Lin *et al.*, 2000). L'agoniste induit l'activation de PKA, qui alors phosphoryle AKAP et permettrait ainsi une interaction plus forte entre AKAP250 et le récepteur (Tao *et al.*, 2003), et la formation de ce complexe protéique formé par AKAP250 serait indispensable à l'internalisation et à la resensibilisation des récepteurs  $\beta_2$ AR (Lin *et al.*, 2000). AKAP79 (encore appelée AKAP150) est aussi associée avec le récepteur  $\beta_2$ AR, et ce de manière constitutive créant ainsi un complexe contenant les protéines PKA, PKC et la protéine phosphatase PP2B. La protéine d'ancrage favoriserait alors la phosphorylation du récepteur par PKA suite à la stimulation à l'agoniste et pourrait ainsi influencer la signalisation vers la voie des ERK1/2 (Fraser *et al.*, 2000). Récemment, AKAP79 a été démontrée comme permettant la phosphorylation du récepteur  $\beta_1$ AR par PKA et dicterait le recyclage ainsi que la resensibilisation des récepteurs.

D'autre part, la distribution des récepteurs  $\beta$ AR pourrait influencer leurs propriétés fonctionnelles. Ainsi, par exemple des localisations distinctes des récepteurs  $\beta_1$ AR et  $\beta_2$ AR de microdomaines membranaires de type caveolae/lipides raft ont été proposées afin d'expliquer l'efficacité de couplage de ces récepteurs envers la voie de signalisation Gs/AC. Le  $\beta_2$ AR co-localiserait avec ses effecteurs (Gs et l'adénylate cyclase) au sein de ces microdomaines. A contrario, le récepteur  $\beta_1$ AR semble majoritairement exclu de ces microdomaines, même après activation (Steinberg, 2004). Toutefois, un tel modèle ne peut réconcilier certaines observations telles que l'augmentation de la signalisation de la voie AC lors d'une déplétion en cholestérol (Rybin *et al.*, 2000).

D'après ce que nous venons de voir, il semblerait que, bien que similaires du point de vue de leur couplage à la protéine Gs, les récepteurs  $\beta_1$ AR et  $\beta_2$ AR subissent des régulations bien distinctes. La cascade de signalisation AC/AMPC/PKA induite par le  $\beta_1$ AR se retrouverait diffuse au sein de la cellule, et serait peu régulée négativement alors que l'activité du  $\beta_2$ AR se retrouverait très localisée et hautement régulée. Cependant, on notera un certain paradoxe, à savoir que cette régulation distincte entre les deux sous-types ne se

retrouve pas au niveau du cœur défaillant : en effet, dans ce cas, c'est le récepteur  $\beta_1$ AR qui se trouve hautement régulé négativement.

### 1.4.3.2 La voie des MAPKs de type ERK1/2

Plus récemment identifiée chez les récepteurs adrénérgiques, cette voie de signalisation semble néanmoins importante physiologiquement. Ainsi, deux cascades de MAPK : p38 et ERK1/2, sont apparues comme des acteurs importants dans le contrôle de la lipolyse dans les adipocytes (Collins *et al.*, 2004). Au niveau du cœur, la voie MAPK de type MEK1-ERK1/2 aurait un rôle central dans la régulation de l'hypertrophie cardiaque et de la survie cellulaire (Bueno and Molkentin, 2002). Ainsi, par exemple, la production de souris transgéniques exprimant la protéine MEK1 active constitutivement, démontrent une hypertrophie cardiaque et de nombreuses études *in vivo* et *in vitro* semblent confirmer ce rôle (Ueyama *et al.*, 2000; Bueno *et al.*, 2000). La voie ERK1/2 aurait une fonction cardioprotectrice en empêchant l'apoptose des myocytes et serait nécessaire pour protéger le myocarde contre les dommages d'une ischémie. De manière intéressante, la création de souris KO pour ERK1 ou ERK2 a permis d'attribuer ce rôle à ERK2 (Lips *et al.*, 2004).

#### 1.4.3.2.1 Activation de la voie MAPK de type ERK1/2 par le $\beta_2$ AR.

Les déterminants moléculaires nécessaires à l'activation de la voie de type ERK1/2 par le  $\beta_2$ AR dans différents types cellulaires ont fait l'objet de nombreuses études. L'activation des ERK1/2 par ce récepteur peut être dépendante des protéines G (Gs et Gi) mais aussi indépendante, requérant alors l'intervention de protéine  $\beta$ arrestine ou de Src.

Cependant, dans la plupart des lignées cellulaires, cette voie de signalisation est sensible à la toxine pertussique (PTX), et nécessite la phosphorylation par PKA du récepteur afin de favoriser le couplage du récepteur à Gi. Toutefois, selon les lignées cellulaires, et même selon les isolats d'une même lignée, l'implication de Gi peut être très variable (Lefkowitz *et al.*, 2002). Certaines études décrivent même une insensibilité totale de la voie à la PTX (Friedman *et al.*, 2002; Schmitt and Stork, 2000). Ainsi, dans la plupart des cas, deux composantes participent de manière variable à l'activation des ERK1/2 par le  $\beta_2$ AR : une composante Gi et une composante  $\beta$ arrestine (Azzi *et al.*, 2003; Shenoy *et al.*, 2006b). La composante Gi permet, via les protéines  $\beta\gamma$ , le recrutement de Src qui, à son tour, active les RTKs. Il y a ainsi transactivation des RTKs et par là même activation des ERK1/2. En ce qui concerne la composante  $\beta$ arrestine, celle-ci est recrutée préférentiellement aux récepteurs phosphorylés par GRK. De manière intéressante, la surexpression de GRK5 et GRK6 augmente de manière significative l'activation des ERK1/2, alors que celle de GRK2 n'influe pas sur cette activation. Ainsi, les récepteur phosphorylés par GRK5 et 6 permettent la formation d'un complexe spécifique  $\beta_2$ AR/ $\beta$ arrestine/c-Src capable de stimuler les ERK1/2. Les deux composantes (protéine G et  $\beta$ arrestine) démontrent des cinétiques d'activation différentes : l'activation des ERK1/2 par Gi est rapide et transitoire alors que l'activation par la  $\beta$ arrestine est plus tardive et soutenue dans le temps (Shenoy *et al.*, 2006b).

Les récepteurs  $\beta_2$ AR peuvent aussi, dans certains types cellulaires activer les MAPKs via la cascade de signalisation Gs/AC/AMPC/PKA (Schmitt and Stork, 2000; Friedman *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2007); la PKA pouvant elle-même activer directement Rap-1 et par là même ERK1/2 (Schmitt and Stork, 2000).

Aussi, récemment, Sun Y *et al.* ont mis en évidence une activation directe de Src par le  $\beta_2$ AR en réponse à des fortes concentrations d'agonistes. Il y a ainsi stimulation de la voie MAPK de façon indépendante des protéines G. Le récepteur est en effet capable d'agir de manière similaire aux récepteurs aux cytokines qui ne possèdent pas d'activité enzymatique

mais activent de manière directe Janus Kinase (JAK), une tyrosine kinase afin de pouvoir induire une signalisation.

#### *1.4.3.2.2 Activation de la voie MAPK de type ERK1/2 par le $\beta_1$ AR*

Le  $\beta_1$ AR est aussi capable de stimuler la voie MAPK de type ERK1/2 bien qu'il soit proposé que cette activation soit moins forte que celle médiée par le récepteur  $\beta_2$ AR (Chesley *et al.*, 2000); (Sabri *et al.*, 2000; Lavoie *et al.*, 2002a). Toutefois très peu d'études ont tenté de caractériser les déterminants moléculaires nécessaires. En cellules HEK293, et COS-7, l'activation des ERK1/2 nécessiterait la protéine Gi (Martin *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2002) et un mécanisme de 'switch', similaire à celui du  $\beta_2$ AR a été proposé : le récepteur doit être phosphorylé par PKA afin de favoriser son couplage à Gi (Martin *et al.*, 2004). Toutefois, dans des systèmes plus physiologiques, le couplage des récepteurs  $\beta$ ARs à Gi est communément attribué au récepteur  $\beta_2$ AR et non au récepteur  $\beta_1$ AR. Il reste donc encore beaucoup à découvrir sur la voie ERK1/2 modulée par ce récepteur.

#### **1.4.3.3 La voie de la PI3K**

L'activation de cette voie de signalisation est essentiellement attribuée au récepteur  $\beta_2$ AR. Cependant, la majorité des études portant sur cette voie ont été réalisées dans des systèmes physiologiques et ne discriminent pas tous l'action d'un sous-type. La PI3K et ses effecteurs directs régulent principalement, via les récepteurs  $\beta$ ARs, deux mécanismes cellulaires importants que sont la croissance cellulaire et l'apoptose. Les sous-unités  $\beta\gamma$

issues de Gi sont en effet capables de stimuler la voie PI3K qui régule négativement l'apoptose. De plus, la PI3K peut aussi réguler la contractilité des cardiomyocytes, possiblement par une modulation directe ou indirecte de la phosphorylation des phospholambans, qui est dépendante de Gi (Jo *et al.*, 2002) mais aussi par inhibition de l'activité l'AC (Crackower *et al.*, 2002). Enfin, la PI3K jouerait un rôle clé dans la régulation du système adrénergique de façon générale, en étant nécessaire dans l'internalisation des récepteurs ((Naga Prasad *et al.*, 2002).

Récemment, de manière intéressante, dans des cellules cardiaques de type H9c2 la voie de signalisation menant à l'activation de la PI3K par le  $\beta_2$ AR s'est révélée dépendante d'une transactivation par les RTK, la voie de signalisation étant la suivante : Gi/ $\beta\gamma$ /Src/PDGFR/PI3K (Yano *et al.*, 2007).

#### **1.4.3.4 Les autres voies de signalisation et les protéines d'interaction des récepteurs béta-adrénergiques:**

Outre les classiques protéines G, de nombreuses autres protéines ont été identifiées comme interagissant avec les récepteurs  $\beta_1$ AR et  $\beta_2$ AR (Cf Tableau III). Nous avons vu ainsi précédemment que la  $\beta$ arrestine ainsi que Src étaient capables de se lier au récepteur  $\beta_2$ AR et d'activer la voie MAPK de type ERK1/2.

Les récepteurs  $\beta_1$ AR et  $\beta_2$ AR peuvent également, via les derniers acides aminés de leur Cter ('ESKV' pour le  $\beta_1$ AR et 'DSLL' pour le  $\beta_2$ AR) (Cf Fig. 16 et 17), recruter des protéines à domaine PDZ, qui sont spécifiques pour chaque sous-type (He *et al.*, 2006) (Cf Tableau III). Le récepteur  $\beta_2$ AR recrute ainsi la protéine NHERF (aussi dénommée EBP50). Cette interaction, qui est dépendante de la liaison à l'agoniste, a plusieurs rôles



physiologiques importants : elle permet le recyclage des récepteurs endocytosés mais aussi la régulation de l'activité de protéines telles que NHE3 et CFTR (cf §1.2.1.3.3).

Ce grand nombre d'interactions des  $\beta$ ARs avec diverses protéines (protéines d'échafaudage ou d'ancrage, protéines G, kinases, protéines à domaine PDZ, protéines à domaine SH) peut ainsi mener à des fonctionnalités et des régulations distinctes les unes des autres. Ainsi, malgré leur couplage traditionnel identique à la protéine Gs, les récepteurs  $\beta_1$ AR et  $\beta_2$ AR peuvent présenter des profils signalétiques et régulateurs distincts.

$\beta_1$ AR	$\beta_2$ AR
Gs (Gi?)	Gs Gi
PKA, PKC	PKA, PKC
GRK	GRK
$\beta_1$ AR / $\beta_2$ AR (homo/hétéro dimérisation)	$\beta_1$ AR / $\beta_2$ AR (homo/hétéro dimérisation)
$\beta$ arrestine	$\beta$ arrestine
AKAP79 (ratAKAP150)	AKAP79 (ratAKAP150)
CN-Ras-GEF <sup>S</sup>	AKAP250 (gravine)
Endophiline <sup>S</sup>	NHERF (EBP50) <sup>S</sup>
GIPC <sup>S</sup>	NSF <sup>S</sup>
MAGI-2 (ARIP-2) (S-SCAM) <sup>S</sup>	Src
PSD-95 <sup>S</sup>	
SAP97 <sup>S</sup>	
MAGI-3 <sup>S</sup>	

**Tableau III : Protéines d'interaction des récepteurs  $\beta_1$ AR et  $\beta_2$ AR.** <sup>S</sup> Interaction testée sur les deux sous-types de récepteur et déterminée comme sélective.

## 2. Objectifs de la thèse :

### Objectif n°1 :

**Etude de l'efficacité de signalisation des ligands  $\beta$ ARs :** Etablir le profil d'efficacité (efficacité maximale et puissance) de signalisation de composés sélectifs aux récepteurs  $\beta_1$ AR et  $\beta_2$ AR sur deux voies de signalisations : la voie classique d'activation de l'adénylate cyclase et la voie MAPK de type ERK1/2, afin de reconsidérer la notion d'efficacité et de sélectivité des ligands.

### Objectif n°2 :

**Etude des déterminants moléculaires et des changements conformationnels associés à l'activité biaisée des ligands :** En utilisant comme modèle le récepteur  $\beta_1$ AR, caractériser les déterminants moléculaires menant à la régulation de la voie MAPK par trois ligands aux profils d'efficacité de signalisation distincts envers la voie de l'AC et la voie ERK1/2. Analyser les changements conformationnels au sein de complexes protéiques : récepteur/sous-unités de la protéineG.

### **3. RÉSULTATS**

### 3.1 Article 1

#### **Des profils signalétiques distincts de ligands aux récepteurs $\beta_1$ et $\beta_2$ -adrénergiques envers la voie adénylate cyclase et la voie MAPK révèlent la pluridimensionnalité de l'efficacité.**

Ségolène Galandrin et Michel Bouvier. *Mol. Pharmacol.* 70 :1575-1584, 2006

Durant la dernière décennie, l'efficacité des ligands aux RCPG est apparue de plus en plus complexe. Initialement décrite comme positive ou neutre (ligands agonistes ou antagonistes), l'efficacité des ligands s'est révélée pouvoir être également négative avec la découverte de l'activité constitutive des récepteurs (ligands agonistes inverses) (cf § 1.3.1). D'autre part, certaines études ont démontré que l'efficacité d'un ligand n'est pas nécessairement identique pour toutes les voies de signalisation modulées par un même récepteur, pouvant même être duelle: positive pour une voie de signalisation et négative pour une autre, le ligand étant alors à la fois agoniste et agoniste inverse. (cf § 1.3.3.2). Pourtant, la classification des ligands des RCPG en tant qu'agonistes, antagonistes ou agonistes inverses se base généralement sur l'efficacité des composés envers une unique voie de signalisation : la voie traditionnelle activée par les récepteurs. Ainsi par exemple les ligands d'un récepteur couplé à Gq seront classés selon leur capacité à activer la voie de la PLC ou des seconds messagers ou effecteurs en aval (IP<sub>3</sub>, DAG, PKC). Pour les ligands  $\beta$  adrénergiques la classification des ligands a ainsi été établie uniquement selon leur efficacité pour les effecteurs ou les seconds messagers de la voie de l'adénylate cyclase. Pourtant, de nombreuses autres cascades de signalisation peuvent être induites par ces récepteurs dont la voie des MAPK et type ERK1/2. Ainsi, deux ligands au récepteur  $\beta_2$ -adrénergique, le propranolol et l'ICI118,551, qui sont agonistes inverses pour la voie de l'adénylate cyclase, se sont révélés posséder une activité agoniste partielle pour la voie

MAPK (Azzi M *et al* 2003). Or, l'efficacité des nombreux ligands  $\beta$  adrénergiques, qui sont pour la plupart utilisés en cliniques (cf§ 1.4.1), a été essentiellement caractérisée au niveau de la voie classique de stimulation des récepteurs  $\beta$  adrénergiques, à savoir la voie de l'adénylate cyclase ou les seconds messagers ou effecteurs en aval de cette voie.

Il est donc intéressant de repenser cette notion d'efficacité à travers d'autres voies de signalisation. Les récepteurs  $\beta$ adrénergiques nous ont alors semblé des modèles de choix. En effet, au cours des années, un grand nombre de ligands synthétiques, appartenant aux différentes classes de composés (agonistes, antagonistes, agonistes inverses) ont été développés afin de moduler ces récepteurs. Comme mentionné ci-dessus, certains de ces ligands sont pour beaucoup utilisés en clinique, dans un système majeur, le système cardiovasculaire et une efficacité duelle a déjà été observée lors d'études précédentes pour des ligands du récepteur  $\beta_2$ AR (Azzi *et al.*, 2003; Baker *et al.*, 2003). D'autre part, les récepteurs  $\beta_1$ AR et  $\beta_2$ AR partagent un grand nombre de ligands, qui sont non sélectifs pour la plupart et leur expression tissulaire est similaire (cf §1.4.1, Tableau II). Il apparaît donc intéressant de comprendre comment les ligands peuvent avoir une activité différentielle vis-à-vis de ces deux sous-types.

Nous avons ainsi testé plusieurs ligands  $\beta$  adrénergiques sur les deux sous-types de récepteurs et sur deux voies de signalisations (AC et MAPK). Huit composés ont été choisis, pouvant se lier aux deux récepteurs et ayant pour la plupart une importance thérapeutique. C'est le cas de trois d'entre eux, utilisés dans le traitement de la défaillance cardiaque mais dont l'efficacité thérapeutique est à ce jour inexpliquée par leur seule action sur la voie de l'adénylate cyclase.

La détermination de l'efficacité maximale sur les deux voies de signalisation nous a permis d'identifier des ligands arborant des profils d'efficacité distincts : agoniste ou agoniste inverse sur les deux voies de signalisation, ou bien agoniste sur une voie mais agoniste inverse sur l'autre. Nous avons ainsi pu mettre en évidence, de façon très claire le

caractère pluridimensionnel de l'efficacité des ligands aux récepteurs  $\beta$ ARs, caractère qui, au regard des autres études portant sur l'efficacité (cf §1.3.3), pourrait s'étendre aux ligands des autres GPCR.

De manière intéressante ce caractère pluridimensionnel de l'efficacité peut être mis en parallèle avec les conformations du récepteur qui peuvent elles aussi être plurielles.

D'autre part, la sélectivité des ligands  $\beta$ ARs envers les différents sous-types de récepteurs adrénergiques est classiquement basée sur l'affinité des composés. En testant l'efficacité maximale ainsi que la puissance sur deux voies de signalisation données activées par le  $\beta_1$ AR et le  $\beta_2$ AR nous avons pu démontrer que l'affinité à elle seule ne peut suffire afin de déterminer la sélectivité d'un composé envers un sous-type. En effet, un composé ayant une affinité similaire envers les deux sous-types de récepteurs ne démontre pas nécessairement le même profil signalétique (efficacité maximale et puissance) envers les voies de signalisation activées par ces deux sous-types. Un composé peut ainsi sélectionner une voie de signalisation liée à un sous-type de récepteur.

Ainsi, efficacité et sélectivité d'un ligand pour un RCPG sont deux termes qui ne peuvent pas être définis uniquement sur la base du couple ligand/récepteur mais qui doivent aussi inclure dans leur définition opérationnelle les effecteurs engagés par ce récepteur.

**Distinct Signaling Profiles of  $\beta_1$  and  $\beta_2$  Adrenergic Receptor Ligands towards Adenylyl Cyclase and Mitogen-Activated Protein Kinase Reveals the Pluridimensionality of Efficacy.**

**Ségolène Galandrin and Michel Bouvier**

Department of Biochemistry and Groupe de Recherche Universitaire sur le Médicament,  
Institute for Research in Immunology and Cancer, Université de Montréal, Montréal  
(Québec) Canada, H3C 3J7

Running title: Pluridimensional signaling efficacy of  $\beta$ -adrenergic ligands

Corresponding author: Dr. Michel Bouvier

Department of Biochemistry, Groupe de Recherche Universitaire sur le Médicament and  
Institute for Research in Immunology and Cancer, Université de Montréal,

C.P. 6128 Succursale Centre-Ville

Montréal, QC, Canada, H3C 3J7.

Tel.: 514-343-6319; [REDACTED] [REDACTED]

Text Pages: 34

Tables: 6

Figures: 5

References: 41

Abstract: 248 words

Introduction: 698 words

Discussion: 1853 words

<sup>1</sup> The abbreviations used are: GPCR, G-Protein Coupled Receptor;  $\beta_2$ AR, subtype 2 beta-adrenergic receptor; AC, adenylyl cyclase; ERK, extracellular regulated kinase;  $\beta_1$ AR, subtype 1 beta-adrenergic receptor; HRP, Horseradish peroxidase; HEK, human embryonic kidney cells; PBS, phosphate-buffered saline; MAPK, Mitogen-Activated Protein Kinase ANOVA, Analysis Of Variance; PMA, phorbol 12-myristate-13-acetate. Iso, isoproterenol; Lab, labetalol; Buc, bucindolol; Carv, carvedilol; Prop, DL-propranolol; Bis, bisoprolol; Met, ( $\pm$ ) metoprolol; At, S(-) atenolol;



**ABSTRACT:**

Drug efficacy is classically considered an intrinsic property of a ligand/receptor couple. However, recent observations suggest that efficacy may also be influenced by the signaling effectors engaged by a unique receptor. To directly and systematically test this possibility, we assessed the ability of a panel of  $\beta$ -adrenergic ligands to modulate the activity of two effector systems, the adenylyl cyclase (AC) and the mitogen-activated protein kinase (MAPK) via  $\beta_1$  and  $\beta_2$  adrenergic receptors. Although some compounds displayed similar efficacies toward the two pathways, others showed complex efficacy profiles. For example, compounds that are inverse agonists for the AC activity were found to be either agonists, neutral antagonists or inverse agonists for the MAPK pathway. Reciprocally, agonists for the AC were either agonists or neutral antagonists for MAPK. Given this complexity, we propose a Cartesian representation of the efficacies that takes into account the activities of the different effectors that can be engaged by a given receptor. In addition, compounds considered as non-selective for  $\beta_1$  and  $\beta_2$  adrenergic receptors, based on their binding affinities, showed distinct relative efficacy profiles toward AC and MAPK, adding a new dimension to the concept of ligand selectivity. Taken together, the results suggest that binding of different ligands promote distinct conformational changes leading to specific signaling outcomes. Our data therefore clearly illustrate that efficacy is a pluridimensional parameter that is not an intrinsic characteristic of a ligand/receptor couple. This should have important implications for the future design of screening assays used in drug discovery campaigns.

## INTRODUCTION:

G protein coupled receptors (GPCR) represent the largest class of protein involved in signal transduction across biological membranes. As such, they are among the main molecular targets considered for the development of therapeutic agents. Classically, drugs acting on GPCR were classified into two main categories, agonists and antagonists that respectively promote or block receptor activation. In the last ten years, however, the recognition that GPCR can exhibit constitutive activity led to the discovery of a third class of compounds that can decrease such spontaneous activity and are known as inverse agonists. In the frame work of an allosteric model whereby receptors are in equilibrium between inactive (R) and active (R\*) conformations, agonists and inverse agonists are believed to stabilize R\* and R respectively. Neutral competitive antagonists for their part presumably compete for the binding of agonists or inverse agonists but do not affect the equilibrium, thus having no intrinsic activity (for reviews see (Milligan, 2003); (Strange, 2002); (Bond, 1997)).

Interestingly, the extended and cubic ternary complex models, which were developed to formalized ligand behaviours, included terms that qualified the affinity of the activated receptor for the G protein opening the possibility that various ligands may stabilize different active conformations resulting in distinct signaling properties (see (Kenakin, 2004) for a review). Consistent with this theoretical possibility, some studies reported that the order of potency/efficacy of compounds acting through a unique receptor can be different depending of the effector system considered ((Kenakin, 1995b); (Spengler *et al.*, 1993b); (Berg *et al.*, 1998b); (Hall *et al.*, 1999c); (Kurrasch-Orbaugh *et al.*, 2003b); (Gay *et al.*, 2004b); (Moniri *et al.*, 2004b); (Krueger *et al.*, 2005b); (McLaughlin *et al.*, 2005b)). This phenomenon, often referred to as “ligand directed stimulus trafficking”, “Functional selectivity” or “biased agonism”, has been taken as evidence that more than one active receptor conformation exist (Kenakin, 2002b); (Urban *et al.*, 2006). Particularly striking in

this respect are recent studies reporting that ligands can have opposite efficacies toward two different signaling pathways. For example, ICI118,551 ((±)-1-[2,3-(dihydro-7-methyl-1H-inden-4-yl)oxy]-3-[(1-methylethyl)amino]-2-butanol) and propranolol that act as inverse agonist on the  $\beta_2$ -adrenergic receptor ( $\beta_2$ AR) toward the adenylyl cyclase (AC) signaling pathway were shown to be partial agonists when tested on the extracellular regulated kinase (ERK) activity (Azzi *et al.*, 2003b); (Baker *et al.*, 2003b). Similar dual efficacies for distinct signaling pathways were also reported for ligands acting on the H3-histamine receptor (Gbahou *et al.*, 2003b), the  $\delta$ -opioid receptor (Audet *et al.*, 2005b) and the serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor (Werry *et al.*, 2005b).

Taken together, these observations suggest that efficacy is a more complex parameter than was originally anticipated and that the effector systems may need to be included in its description. When considering two distinct signaling pathways modulated by a single receptor, multiple efficacy combinations are theoretically possible. Compounds could be agonist for the two pathways, inverse agonist for the two pathways or having opposite efficacies on each of the pathways. The present study was therefore initiated to test whether these different theoretical efficacy profiles can exist. For this purpose, the ability of various  $\beta$ -adrenergic ligands to modulate the activity of the adenylyl cyclase and ERK1/2 was assessed in cells expressing either the human  $\beta_1$  adrenergic receptor ( $\beta_1$ AR) or  $\beta_2$ AR. In the case of each receptor subtypes, ligands that activate both, inhibit both or have opposite effect on each of the two pathways were indeed identified. The wide diversity of efficacy and potency profiles revealed by our study clearly illustrates the notion of signaling pluridimensionality that complicates the classification of ligands according to unique efficacy terms. The systematic comparison of the efficacy profiles for the two closely related receptor subtypes also demonstrated that drug efficacy can only be considered in the context of the diverse signaling pathways that can be engaged by a specific receptor subtype.

In addition to shed light on the concept of drug efficacy, these results could have important clinical implications since the distinct efficacy profiles of  $\beta$ -blockers, which are widely used in the treatment of hypertension and heart failure, could underlie differences in therapeutic and side effects patterns. Additional studies linking defined physiological actions of various compounds to their efficacies toward specific effector's systems should allow to explore the potential therapeutic impact of pluridimensional signaling efficacy.

## MATERIALS AND METHODS:

**Reagents:** (-) Isoproterenol, Labetolol, DL-Propranolol, S(-) Atenolol and ( $\pm$ ) Metoprolol were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO) and ( $\pm$ ) Bisoprolol was from Tocris Cookson Inc. (Ellisville, MO). Carvedilol and Bucindolol were a generous gift from GlaxoSmithKline (Research Triangle Park, NC) and Dr. Michael Bristow (University of Colorado Health Sciences Center, CO), respectively. Mouse anti-phosphorylated ERK1/2 and rabbit anti-ERK1/2 antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Horseradish peroxidase (HRP)-anti-mouse and HRP-anti-rabbit polyclonal antibodies were from Amersham (Baie d'Urfé, QC, CA). All other reagents were of analytical grade and obtained from various suppliers.

**Stable cell lines and cell culture:** Stable cell lines expressing human- $\beta_1$ AR and human- $\beta_2$ AR were generated by transfection of pcDNA3.1-HA- $\beta_1$ AR or pcDNA3.1-HA- $\beta_2$ AR plasmids (Lavoie *et al.*, 2002b) into human embryonic kidney (HEK) 293S cells (Reeves *et al.*, 1996) using the calcium-phosphate precipitation method. Isolates that stably incorporated the plasmids were selected on the basis of their resistance to genetecin by treating cells with G418 (400 $\mu$ g/ml). Receptor level expression was deduced from binding experiments carried out on whole cells using [ $^{125}$ I]-cyanopindolol as radio-ligand. The two cell lines used expressed 7-8 pmol and 4-5 pmol of receptor per mg of protein for the  $\beta_1$ AR and  $\beta_2$ AR, respectively.

Routinely, cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 5% fetal bovine serum, 100U/mL Penicillin and Streptomycin, 2mM L-Glutamine and 400 $\mu$ g/ml G418, in a 37°C humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

**Quantification of cAMP accumulation:** Cells at 80% confluency were serum starved for 16 hours. The day of the experiment, cells were resuspended in phosphate-buffered saline (PBS)/0.1%Glucose/1mM IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine) and then treated for 30

minutes at 37°C with the indicated drugs. Compounds behaving as inverse agonists were tested in the presence of 0.3  $\mu\text{M}$  forskolin to increase the window of inhibition. Following drug treatment, cells were immediately lysed and cAMP levels measured using the CatchPoint cAMP Kit (Molecular Device, Sunnyvale, CA) according to manufacturer's recommendations. Briefly, cells lysates were incubated in 384 wells plates coated with anti-cAMP antibodies in the presence of known amounts of HRP-cAMP. cAMP from cell lysates was allowed to compete with the HRP-cAMP for 2 hours and the remaining peroxidase activity was measured following 3 washes. The cAMP generated under the different conditions was interpolated from a cAMP standard curve generated in parallel for each experiment. Triplicates were used for each condition, and all experiments were repeated at least 3 times. For the determination of the EC50, data are expressed in percentage of the maximal response reached for each compound. For the determination of the relative activities, maximal agonist responses ( $E_{\text{max}}$ ) are expressed in percentage of maximal (10 $\mu\text{M}$ ) isoproterenol-promoted stimulation. For the compounds behaving as inverse agonists, data were expressed in percentage of forskolin (0.3 $\mu\text{M}$ ) inhibition.

***Detection of phosphorylated ERK1/2:*** Cells expressing  $\beta_1\text{AR}$  or  $\beta_2\text{AR}$  were seeded in poly-D-lysine-coated six-well plates. The day after, cells were washed once with PBS and incubated with serum free media for sixteen hours. Cells at 80% confluency were then stimulated for the indicated times at 37°C. The media was then rapidly removed and cells were washed with ice-cold PBS before being lysed using 100 $\mu\text{L}$  per well of Laemmli sample buffer (62.5mM TrisHCl, 2% SDS, 10% Glycerol, 50mM Dithiothreitol, 0.1% Bromophenol Blue, pH 6.8). Whole cell lysates were sonicated, resolved by SDS-PAGE, and transferred onto nitrocellulose. The blots were blocked at room temperature for 1 hour with TBS-T buffer (50mM Tris, pH7.4, 150mM NaCl, 0.1% (v/v) Tween 20), 5% fat-free milk. Phospho-ERK1/2 was detected using mouse polyclonal anti-phospho p42/p44 ERK specific antibody (1:3000, over-night at 4°C in TBS-T, 5% fat-free milk). The immunoreactivity was revealed using a secondary HRP-conjugated anti-mouse antibody

(1:10000, 1 hour at room temperature in TBS-T, 5% fat-free milk) and the peroxidase activity detected by chemiluminescence (NEN Life Science Products). Blots were stripped and re-probed for total ERK1/2 with rabbit polyclonal anti-ERK1/2 antibody (1:25000, 1 hour at room temperature in TBS-T, 5% fat-free milk) followed by HRP-anti-rabbit antibody (1:20000, 1 hour at room temperature in TBS-T, 5% fat-free milk). Films were scanned, and band intensities were quantified using Quantity One (Bio-Rad) software. ERK1/2 phosphorylation was normalised according to the loading of proteins by expressing the data as a ratio of P-ERK1/2 over total ERK1/2.

### ***Statistical analysis***

Statistical analysis and curve fitting were done using Prism 2.01 (GraphPad, San Diego, CA). Statistical significance of the differences was assessed using one-way ANOVA (Analysis Of Variance) and post-hoc Bonferonni or Dunnett's test.

## RESULTS

The efficacy and potency profiles of eight  $\beta$ -adrenergic ligands were tested on both AC and ERK signaling pathways in cells expressing either the human  $\beta_1$ - or  $\beta_2$ -adrenergic receptors ( $\beta$ ARs). The compounds were selected based on their prevalent use in pharmacological studies and clinical settings. Their reported affinities for both  $\beta_1$  and  $\beta_2$ AR are listed in table 1. Five of the compounds bind with similar affinities to both receptors whereas three display a strong selectivity toward  $\beta_1$ AR.

### *Ligand profiles on the $\beta_1$ adrenergic receptor:*

The eight selected compounds were first tested for their ability to modulate cAMP production in HEK293S cells stably expressing the human- $\beta_1$ AR. In a first round of assays, their activity was assessed to establish whether they behave as agonists, neutral antagonists or inverse agonists (data not shown). In the case of antagonists and inverse agonists, their potency and efficacy were tested in the presence of 0.3 $\mu$ M forskolin to enhance the response window. As shown in Fig. 1, isoproterenol, labetalol, bucindolol and carvedilol behaved as agonists whereas propranolol, metoprolol, bisoprolol and atenolol were inverse agonists for the adenylyl cyclase (AC) pathway. Using maximal concentration (at least 10X the EC50 for each compound determined from dose response experiments; Fig. 1A and table 2, left column), the efficacy of each compound was determined. When considering the agonists, isoproterenol was the most efficacious compounds whereas labetalol, bucindolol and carvedilol had equivalent partial efficacy, corresponding to 33-44% of the maximal isoproterenol-stimulated response (Fig. 1B upper panel and Table 3 left column). For inverse agonists, metoprolol, bisoprolol and atenolol had similar high inverse efficacies. Propranolol for its part behaved as a partial inverse agonist leading to an inhibition of only 32% of the forskolin-stimulated AC compared to the 63-72% inhibition observed for the 3 other compounds.



The same compounds were then assessed for their ability to modulate the ERK1/2 activity in the  $\beta_1$ AR expressing cells. Because ERK1/2 activation is known to be fast and transient we first performed time-course experiments to determine the time of maximal activation for each compound. These times of activation (between 2 and 4 minutes depending on the compound) were then selected to assess relative efficacies. As shown in Fig. 2, the efficacy pattern found in the ERK1/2 assay was significantly different from that observed for AC activation. When considering the compounds that were agonists for the AC pathway, isoproterenol, bucindolol, and carvedilol also acted as agonists and partial agonists for ERK1/2; bucindolol and carvedilol showing 25-28% of isoproterenol efficacy (Fig. 2A and table 3, right column). Labetolol, however, which was as efficacious as bucindolol and carvedilol for the AC, did not significantly stimulate ERK1/2 phosphorylation (the small increase see in Fig. 2A not reaching statistical significance). For the inverse agonists in the AC assay, three compounds (metoprolol, bisoprolol and atenolol) acted as neutral antagonists (the small increases not reaching statistical significance) on the ERK1/2 pathway. Propranolol for its part, showed an opposite efficacy, stimulating ERK1/2 phosphorylation as efficiently as bucindolol and carvedilol and reaching 22% of the isoproterenol efficacy (Fig. 2A and table 3, right column).

When considering the potency of the compounds in the two signaling pathways (AC and ERK1/2), similar EC<sub>50</sub> were found for all compounds except isoproterenol (Table 2). Even propranolol that acted as inverse agonist on AC but as agonist on ERK1/2, did so with similar potency. In contrast, isoproterenol activated ERK1/2 with a potency markedly lower (450 X) than that observed for its stimulation of AC (Fig. 2B, Table 2). The possible meanings of this difference are considered in the discussion section below.

***Ligands profiles on the  $\beta_2$  adrenergic receptor:***

The  $\beta$ -adrenergic ligands were then assessed for their ability to modulate AC and ERK1/2 activity in HEK293S cells expressing the human  $\beta_2$ AR. As shown in Fig. 3, only isoproterenol and labetalol were able to increase cAMP levels. Isoproterenol behaved as agonist whereas labetalol acted as partial agonist for this pathway, possessing an efficacy of ~25% of isoproterenol. Propranolol, metoprolol, bisoprolol and atenolol all acted as inverse agonists on the cyclase response (Fig. 3 A and B, lower graph). Their efficacy to inhibit forskolin-stimulated AC was similar, ranging from 44-59% (Table 5 left column). Bucindolol and carvedilol showed no significant efficacy toward the AC pathway up to a concentration of  $10^{-5}$  M.

Significant differences in the potency of the compounds to modulate cAMP production were observed in cells expressing the  $\beta_2$ AR (Table 4 left column). Indeed, whereas the non-selective  $\beta$ -adrenergic ligands showed similar high potencies to either stimulate (isoproterenol and labetalol) or inhibit (propranolol) AC activity, the  $\beta_1$ AR selective ligands (metoprolol, bisoprolol and atenolol) showed poor potency to inhibit AC (Fig. 3A and Table 4 left column).

After determination of the time of maximal activation for each compound (1 or 2 minutes depending of the compounds), the relative efficacies and potencies of the compounds to modulate ERK1/2 activity were assessed in the  $\beta_2$ AR expressing cells. As shown in Fig. 4 and similarly to what was observed in  $\beta_1$ AR expressing cells, the efficacy pattern found in the ERK1/2 assay was significantly different from that observed for AC activation. In addition to isoproterenol and labetalol (which acted as agonists for the AC pathway), bucindolol and carvedilol, (that did not have efficacy for the AC pathway) were also able to significantly increase the ERK1/2 phosphorylation (Fig. 4A). Moreover, propranolol, which was an inverse agonist for the AC, was able to stimulate the ERK1/2 signaling pathway (Fig. 4A). Labetolol, bucindolol, carvedilol and propranolol were thus classified as partial agonists on the ERK1/2 pathway, their maximal stimulatory activity

reaching between 38% and 64% of isoproterenol efficacy (Fig. 4A; table 5, right column). Metoprolol, bisoprolol and atenolol, that were efficacious inverse agonists on the AC, did not appear to modulate ERK1/2 activity. However, the basal level of ERK1/2 phosphorylation being close to the detection limit, inverse efficacy could have gone unnoticed. Hence, the efficacies of these compounds were reassessed in the presence of Phorbol Myristate Acetate (PMA), a compound known to elevate ERK1/2 activity as a result of PKC stimulation. Under these conditions, metoprolol, bisoprolol and atenolol significantly decreased the PMA-stimulated ERK1/2 phosphorylation, thus acting as inverse agonists for this pathway (Fig. 4A Inset). This inverse agonist effect was also observed when these compounds were tested following elevation of the ERK1/2 activity by a different activator, the Epidermal Growth Factor (data not shown). The revealed inverse efficacy of metoprolol, bisoprolol and atenolol did not result from an artefact resulting from the artificially elevated ERK1/2 activity since propranolol still acted as an agonist on the PMA-stimulated ERK1/2 activity (data not shown). Moreover, PMA treatment did not reveal inverse efficacy toward the  $\beta_1$ AR-regulated ERK1/2 activity for any of the compounds (data not shown), clearly indicating the subtype selectivity of the effect observed.

As was the case for the  $\beta_1$ AR expressing cells, isoproterenol had a much lower (43X) potency to activate ERK1/2 than AC (Table 4). In contrast, labetalol and propranolol had similar potencies for the two signaling pathways. Noticeably, bucindolol and carvedilol that had no detectable efficacy toward the AC pathway activated the ERK1/2 with high potency.

## DISCUSSION

Combining the use of multiple ligands, two closely related receptor subtypes and two effectors systems, the present study, in line with other recent observations, illustrates a novel level of complexity in the definition of signaling efficacy and selectivity. When considering a single receptor, several ligands showed a complex efficacy profile resulting in some cases in the opposite regulation of the two pathways considered by the same ligand. Our results also clearly indicate the existence of a subtype-dependent efficacy profiles toward distinct signaling pathways that are not a simple reflection of the binding affinities of the ligands for each of the receptor subtype. Taken together our data forcefully support the emerging notion that signaling efficacy can no longer be defined as a function of a ligand/receptor couple but needs to include the specific effector(s) considered, thus revealing the pluridimensionality of efficacy.

One of the most striking observations of this study is that, although some ligands have similar efficacies toward ERK and AC, others displayed effectors-specific efficacies. In some cases, effector-specific efficacy profiles were revealed by different rank order of efficacies for the two pathways. For example, when considering the  $\beta_1$ AR, labetalol is an agonist as efficacious as bucindolol and carvedilol for AC whereas it is much less efficacious than these two compounds toward the ERK1/2 stimulation. In other cases, the efficacy of a given compound is completely different, depending on the pathway considered. This is particularly striking for propranolol which is an inverse agonist for AC but an agonist of the ERK1/2 pathway for both  $\beta_1$  and  $\beta_2$ AR. The effector-specific efficacy profiles for the two receptors can be easily appreciated by a Cartesian representation of the data that displays the relative efficacy of each compound toward the two signaling pathways (Fig. 5). As can be seen, 3 of the 4 possible scenarios have been observed:  $AC^{ago}$ - $ERK^{ago}$ ,  $AC^{inv}$ - $ERK^{ago}$ ,  $AC^{inv}$ - $ERK^{inv}$ . Although the case scenario  $AC^{ago}$ - $ERK^{inv}$  was not observed in the present study, such possibility cannot be excluded on theoretical grounds

and is likely to be observed for other ligands and/or other receptors. We and others have previously shown that  $\beta_2$ -adrenergic, V2-vasopressin, serotonin 5-HT<sub>2C</sub> and  $\delta$ -opioid receptors ligands can act as inverse agonists on the adenylyl cyclase pathway but as agonists for the Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK); (Baker *et al.*, 2003b); (Audet *et al.*, 2005b); (Werry *et al.*, 2005b). Similarly, Gbahou *et al.* (Gbahou *et al.*, 2003b) reported that proxyfan, a high affinity histamine H3 receptor ligand, is a partial agonist on AC and ERK1/2 but acts as an inverse agonist for the arachidonic acid release pathway. Although these studies introduced the concept of dual efficacy ligands, the study of several ligands presented here clearly illustrates the pluridimensionality of ligand efficacy. In the present study, the efficacy description relied on two signaling pathways leading to a bidimensional representation resulting in 4 possible efficacy quadrants (Fig. 5). However, more complete descriptions could take into account multiple possible signaling pathways and thus could offer a theoretical representation of efficacy in “n” dimension resulting in “2<sup>n</sup>” efficacy quadrants. In addition to define the qualitative nature of the efficacy toward various signaling pathways, such graphical representation allows to attribute quantitative terms to these efficacies by using the spatial coordinates of the point corresponding to a given ligand, thus conferring a new meaning to the term efficacy. An example of how efficacies could be reported using such a coordinate system is presented at the bottom of Fig. 5.

The distribution of the efficacy points presented in Fig. 5, do not follow the theoretical diagonal line predicted by a classical two-state model where the receptor is either active or inactive for all the effectors considered. The dispersed distribution rather supports the emerging concept that multiple discrete conformations can be active for one pathway but inactive for another and that these conformations can be differentially stabilized/induced by distinct ligands (for reviews see (Kenakin, 1995b); (Kenakin, 2003); (Kenakin, 2001)). This is in line with the concept of ligand-directed stimulus trafficking that was first introduced based on studies reporting that a given agonist can activate two

different signaling pathways with distinct order of potency while acting on a single receptor. Similar differences in the orders of potency were also observed in the present study. As an example, the rank order of potency for the  $\beta_2$ AR-modulated AC (established independently of their efficacy; ie: combining agonists and inverse agonists) was Prop  $\geq$  Iso = Lab  $\ggg$  Carv = Buc whereas it was Buc  $\geq$  Carv = Prop = Lab  $>$  Iso for ERK1/2. The case of isoproterenol is particularly interesting when considering that its potencies to stimulate the two pathways are greatly different. Whereas its potency toward ERK1/2 (EC50 = 214nM) is in line with its affinity for the receptor (K<sub>i</sub> ~450nM; see table 1) its potency to promote AC activation is much higher (EC50 = 5.0nM, see table 4). This suggests that the conformation stabilized/induced by isoproterenol favours the coupling to the AC signaling pathway so that a smaller fraction of the receptor population needs to be in this active conformation to fully activate the AC than to activate the ERK pathway. When considered in the context of the “spare receptors” concept, the isoproterenol-promoted conformation leads to a greater number of spare receptor for the AC than the ERK pathway.

Overall, our data are consistent with the emerging concept that different ligands can stabilize distinct receptor conformations (Vauquelin and Van, I, 2005) that may differ in their signaling partner preference (Kenakin, 2002b). Such behaviour can easily be formalized using either the extended or the cubic ternary complex models of G protein activation. Indeed, by including factors controlling the affinity of the receptor for its cognate G protein, these models allow different ligands to induce/stabilize distinct receptor/Gprotein affinity states (Kenakin, 2004) Given that many receptors can couple to more than one G proteins, it can easily be envisaged that the different ligand-promoted receptor conformations could yield differential signaling efficacies through distinct effector systems. There is no theoretical reason to limit this conformationally-based selection to G proteins. It could therefore be proposed that the individual conformations stabilized by each ligand could display a specific set of affinities for the various partners involved in the different behaviours of the receptor, including signaling *via* multiples effectors, receptor phosphorylation, endocytosis and desensitization. In this context, it is not surprising that

signaling efficacies are often found to be context dependant. Indeed, the different levels of expression or sub-cellular distribution of specific partners among cells or tissues would be predicted to affect the signaling profiles observed in these individual systems (Watson *et al.*, 2000).

The capacity of different ligands to promote distinct conformational rearrangements has been clearly confirmed by biophysical studies monitoring the fluorescent properties of intra-molecular probes within purified  $\beta_2$ AR (Ghanouni *et al.*, 2001b); (Swaminath *et al.*, 2005a). However, the link between the conformations stabilized by specific ligands and their efficacy pattern toward different signaling pathways remains to be established. Intuitively, compounds with the greatest chemical similarity would be expected to stabilize similar conformation, thus resulting in comparable efficacy patterns. As can be seen in table 6, this prediction appears to be born out as compounds with identical efficacy patterns present similar chemical structures.

The comparison between  $\beta_1$ AR and  $\beta_2$ AR led to the observation that in addition to their classically defined subtype-specific affinities,  $\beta$ -adrenergic ligands also display subtype-specific efficacy patterns (Fig. 5). This is particularly striking when considering labetalol. This compound binds  $\beta_1$  and  $\beta_2$ AR with similar affinities (Table 1) and has similar potencies and efficacies toward the AC pathway for the two receptor subtypes (Fig. 1 and 3, and table 3 and 5). However, it is a  $\beta_2$ AR selective ERK1/2 agonist being unable to activate this pathway in  $\beta_1$ AR expressing cells. This clearly indicates that subtype specificity can not be established only on the basis of ligand binding affinities or the relative potency determined for a single signaling pathway. To be pharmacologically exhaustive, the receptor subtype selectivity would therefore need to be determined for each effector system that can be engaged by the receptors considered.

Although the complexity of signaling efficacy and selectivity can be more easily dissected in heterologous expression systems where specific receptor expression can be controlled, efficacy profiles that differ depending of the effector systems considered have also been observed in native environments. For instance, propranolol was found to act as an inverse agonist toward the AC pathway while being an agonist on the ERK1/2 activity in canine cardiomyocytes, S49 lymphoma cells and Cos cells endogenously expressing the  $\beta$ AR (Azzi *et al.*, 2003b). Similarly, proxyfan was found to be a partial agonist when assessed in the context of H3 histamine-receptor-promoted histamine release but an inverse agonist in a GTP $\gamma$ S binding assay (Gbahou *et al.*, 2003b). These observations suggest that the pluridimensionality of signaling efficacies observed herein is not simply an artefact of over-expression in artificial systems but could be physiologically relevant. Additional studies are however needed to assess the extent to which the effector-dependent signaling efficacies will be detectable in normal and pathophysiological conditions.

It should also be noted that primary drug screenings are often carried-out using unique cell-based assays, taking advantage of robust signals detected in heterologous expression systems. The observation that different efficacies can be observed depending of the signaling outcome considered has obvious implication on the conclusions that can be drawn from such screening campaigns. On the one hand, it stresses the importance of selecting an effector pathway that is pertinent for the pathological condition considered. On the other hand, taking the pluridimensionality of efficacy into account, by testing the signaling efficacies of compounds into multiple assay systems, could allow to link specific signaling properties to given therapeutic activities or side effects, thus increasing the chances of identifying compounds with efficacy profiles that may have better therapeutic outcomes. A better description of the efficacy profiles for each member of a drug family could also help understanding why individual members of a drug class sometimes have different therapeutic indications. For example, clinical trials assessing the efficacy of  $\beta$ -blockers in the treatment of congestive heart failure revealed that carvedilol, metoprolol



and bisoprolol but not bucindolol decreased mortality and the reason for the lack of beneficial action of bucindolol remains elusive. In fact, although carvedilol and metoprolol are approved in many countries for the treatment of heart failure, the molecular basis of their beneficial effects is still poorly understood. Based on the efficacy profiles determined for two receptor subtypes and two signaling pathways, the present study did not provide a signature that could predict efficacy in heart failure. Whether or not increasing the number of signaling modalities measured for each compounds will allow such predictive signatures to emerge remains to be investigated.

One of the major conclusions of the present study is that efficacy and selectivity toward GPCRs cannot be defined based simply on a ligand/receptor couple but should also include the effector system in its operational definition. Given the increasing number of signaling possibilities that have recently surfaced for GPCRs, the pluridimensionality of efficacy will certainly become more and more evident and will be integrated in our way of thinking about drug action and classification.

**ACKNOWLEDGMENTS:**

We thank GlaxoSmithKline (Research Triangle Park, NC) and Dr Michael Bristow (University of Colorado Health Sciences Center, CO) for kindly providing carvedilol and bucindolol respectively. We are grateful to Dr. Monique Lagacé for her critical reading of the manuscript.

**REFERENCES:**

- Audet N, Paquin-Gobeil M, Landry-Paquet O, Schiller P W and Pineyro G (2005) Internalization and Src Activity Regulate the Time Course of ERK Activation by Delta Opioid Receptor Ligands. *J Biol Chem* **280**: 7808-7816.
- Azzi M, Charest P G, Angers S, Rousseau G, Kohout T, Bouvier M and Pineyro G (2003) Beta-Arrestin-Mediated Activation of MAPK by Inverse Agonists Reveals Distinct Active Conformations for G Protein-Coupled Receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 11406-11411.
- Baker JG, Hall I P and Hill S J (2003) Agonist and Inverse Agonist Actions of Beta-Blockers at the Human Beta 2-Adrenoceptor Provide Evidence for Agonist-Directed Signaling. *Mol Pharmacol* **64**: 1357-1369.
- Berg KA, Maayani S, Goldfarb J, Scaramellini C, Leff P and Clarke W P (1998) Effector Pathway-Dependent Relative Efficacy at Serotonin Type 2A and 2C Receptors: Evidence for Agonist-Directed Trafficking of Receptor Stimulus. *Mol Pharmacol* **54**: 94-104.
- Bond RA (1997) Do Recent Operational Studies Indicate That a Single State Model Is No Longer Applicable to G Protein-Coupled Receptors? *Ann N Y Acad Sci* **812**: 92-97.
- Gay EA, Urban J D, Nichols D E, Oxford G S and Mailman R B (2004) Functional Selectivity of D2 Receptor Ligands in a Chinese Hamster Ovary HD2L Cell Line: Evidence for Induction of Ligand-Specific Receptor States. *Mol Pharmacol* **66**: 97-105.
- Gbahou F, Rouleau A, Morisset S, Parmentier R, Crochet S, Lin J S, Ligneau X, Tardivel-Lacombe J, Stark H, Schunack W, Ganellin C R, Schwartz J C and Arrang J M (2003) Protean Agonism at Histamine H3 Receptors in Vitro and in Vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 11086-11091.
- Ghanouni P, Gryczynski Z, Steenhuis J J, Lee T W, Farrens D L, Lakowicz J R and Kobilka B K (2001) Functionally Different Agonists Induce Distinct Conformations in the G Protein Coupling Domain of the Beta 2 Adrenergic Receptor. *J Biol Chem* **276**: 24433-24436.
- Hall DA, Beresford I J, Browning C and Giles H (1999) Signalling by CXC-Chemokine Receptors 1 and 2 Expressed in CHO Cells: a Comparison of Calcium Mobilization, Inhibition of Adenylyl Cyclase and Stimulation of GTPgammaS Binding Induced by IL-8 and GROalpha. *Br J Pharmacol* **126**: 810-818.

- Hoffmann C, Leitz M R, Oberdorf-Maass S, Lohse M J and Klotz K N (2004) Comparative Pharmacology of Human Beta-Adrenergic Receptor Subtypes--Characterization of Stably Transfected Receptors in CHO Cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **369**: 151-159.
- Kenakin T (1995) Agonist-Receptor Efficacy. II. Agonist Trafficking of Receptor Signals. *Trends Pharmacol Sci* **16**: 232-238.
- Kenakin T (2001) Inverse, Protean, and Ligand-Selective Agonism: Matters of Receptor Conformation. *FASEB J* **15**: 598-611.
- Kenakin T (2002) Drug Efficacy at G Protein-Coupled Receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **42**: 349-379.
- Kenakin T (2003) Ligand-Selective Receptor Conformations Revisited: the Promise and the Problem. *Trends Pharmacol Sci* **24**: 346-354.
- Kenakin T (2004) Principles: Receptor Theory in Pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* **25**: 186-192.
- Krueger KM, Witte D G, Ireland-Denny L, Miller T R, Baranowski J L, Buckner S, Milicic I, Esbenshade T A and Hancock A A (2005) G Protein-Dependent Pharmacology of Histamine H3 Receptor Ligands: Evidence for Heterogeneous Active State Receptor Conformations. *J Pharmacol Exp Ther* **314**: 271-281.
- Kurrasch-Orbaugh DM, Watts V J, Barker E L and Nichols D E (2003) Serotonin 5-Hydroxytryptamine 2A Receptor-Coupled Phospholipase C and Phospholipase A2 Signaling Pathways Have Different Receptor Reserves. *J Pharmacol Exp Ther* **304**: 229-237.
- Lavoie C, Mercier J F, Salahpour A, Umapathy D, Breit A, Villeneuve L R, Zhu W Z, Xiao R P, Lakatta E G, Bouvier M and Hebert T E (2002) Beta 1/Beta 2-Adrenergic Receptor Heterodimerization Regulates Beta 2-Adrenergic Receptor Internalization and ERK Signaling Efficacy. *J Biol Chem* **277**: 35402-35410.
- McLaughlin JN, Shen L, Holinstat M, Brooks J D, Dibenedetto E and Hamm H E (2005) Functional Selectivity of G Protein Signaling by Agonist Peptides and Thrombin for the Protease-Activated Receptor-1. *J Biol Chem* **280**: 25048-25059.
- Milligan G (2003) Constitutive Activity and Inverse Agonists of G Protein-Coupled Receptors: a Current Perspective. *Mol Pharmacol* **64**: 1271-1276.

Moniri NH, Covington-Strachan D and Booth R G (2004) Ligand-Directed Functional Heterogeneity of Histamine H1 Receptors: Novel Dual-Function Ligands Selectively Activate and Block H1-Mediated Phospholipase C and Adenylyl Cyclase Signaling. *J Pharmacol Exp Ther* **311**: 274-281.

Pauwels PJ, Gommeren W, Van Lommen G, Janssen P A and Leysen J E (1988) The Receptor Binding Profile of the New Antihypertensive Agent Nebivolol and Its Stereoisomers Compared With Various Beta-Adrenergic Blockers. *Mol Pharmacol* **34**: 843-851.

Ponicke K, Heinroth-Hoffmann I and Brodde O E (2002) Differential Effects of Bucindolol and Carvedilol on Noradrenaline-Induced Hypertrophic Response in Ventricular Cardiomyocytes of Adult Rats. *J Pharmacol Exp Ther* **301**: 71-76.

Reeves PJ, Thurmond R L and Khorana H G (1996) Structure and Function in Rhodopsin: High Level Expression of a Synthetic Bovine Opsin Gene and Its Mutants in Stable Mammalian Cell Lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 11487-11492.

Spengler D, Waeber C, Pantaloni C, Holsboer F, Bockaert J, Seeburg P H and Journot L (1993) Differential Signal Transduction by Five Splice Variants of the PACAP Receptor. *Nature* **365**: 170-175.

Strange PG (2002) Mechanisms of Inverse Agonism at G-Protein-Coupled Receptors. *Trends Pharmacol Sci* **23**: 89-95.

Swaminath G, Deupi X, Lee T W, Zhu W, Thian F S, Kobilka T S and Kobilka B (2005) Probing the Beta2 Adrenoceptor Binding Site With Catechol Reveals Differences in Binding and Activation by Agonists and Partial Agonists. *J Biol Chem* **280**: 22165-22171.

Urban JD, Clarke W P, von Zastrow M, Nichols D E, Kobilka B K, Weinstein H, Javitch J A, Roth B L, Christopoulos A, Sexton P, Miller K, Spedding M and Mailman R B (2006) Functional Selectivity and Classical Concepts of Quantitative Pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther*.

Vauquelin G and Van L, I (2005) G Protein-Coupled Receptors: a Count of 1001 Conformations. *Fundam Clin Pharmacol* **19**: 45-56.

Watson C, Chen G, Irving P, Way J, Chen W J and Kenakin T (2000) The Use of Stimulus-Biased Assay Systems to Detect Agonist-Specific Receptor Active States: Implications for the Trafficking of Receptor Stimulus by Agonists. *Mol Pharmacol* **58**: 1230-1238.

Werry TD, Gregory K J, Sexton P M and Christopoulos A (2005) Characterization of Serotonin 5-HT<sub>2C</sub> Receptor Signaling to Extracellular Signal-Regulated Kinases 1 and 2. *J Neurochem* **93**: 1603-1615.

**FOOTNOTES:**

This work was supported by grants from the Canadian Institute for Health Research and from the Heart and Stroke Foundation of Canada. M. B. holds a Canada Research Chair in Signal Transduction and Molecular Pharmacology.

**LEGENDS FOR FIGURES:**

**Figure 1: Profile of the different ligands on the  $\beta_1$ AR adenylyl cyclase pathway.** cAMP accumulation experiments were performed in HEKS293 cells stably expressing  $\beta_1$ AR. **A)** EC50 of compounds were obtained using increasing concentrations of ligands in the presence (lower panel), or absence (upper panel) of 0.3  $\mu$ M forskolin. **B)** Emax of compounds were tested using maximal concentrations of ligands, determined from EC50 curves, with (lower panel) or without (upper panel) 0.3  $\mu$ M forskolin. Data represent the mean  $\pm$  S.E.M. of at least 3 experiments performed in triplicates. Iso, isoproterenol; Lab, labetalol; Buc, bucindolol; Carv, carvedilol; Prop, propranolol; Met, metoprolol; Bis, bisoprolol; At, atenolol.

**Figure 2: Profile of the different ligands on the  $\beta_1$ AR MAPK ERK1/2 pathway.**

ERK1/2 phosphorylation was assessed in HEKS293 cells stably expressing  $\beta_1$ AR. Compounds were tested at their appropriate maximal stimulation time (4 min for isoproterenol and 2 min for other compounds). **A)** Emax of compounds were obtained using maximal ligand concentration ( $10^{-4}$  M for isoproterenol and  $10^{-5}$  M for other ligands). **B)** EC50 of compounds were obtained using increasing concentrations of ligands. Data represent the mean  $\pm$  S.E.M. of at least 4 experiments. Statistical significance was determined by two-way ANOVA, followed by a Dunnett test with basal as control column. \*\*\* $p < 0.001$ .

**Figure 3: Profile of the different ligands on the  $\beta_2$ AR adenylyl cyclase pathway.**

cAMP accumulation experiments were performed in HEKS293 cells stably expressing  $\beta_2$ AR. **A)** EC50 of compounds were obtained using increasing concentrations of ligands in the presence (lower panel), or absence (upper panel) of 0.3  $\mu$ M forskolin. **B)** Emax of compounds were tested using maximal concentrations of ligands, determined from EC50



curves, with (lower panel) or without (upper panel) 0.3  $\mu$ M forskolin. Data represent the mean  $\pm$  S.E.M of at least 3 experiments performed in triplicates.

**Figure 4: Profile of the different ligands on the  $\beta_2$ AR MAPK ERK1/2 pathway.**

ERK1/2 phosphorylation was assessed in HEKS293 cells stably expressing  $\beta_2$ AR. Compounds were tested at their appropriate maximal stimulation time (1 min for isoproterenol and 2 min for other compounds). **A)** Emax of compounds were obtained by the use of a maximal ligand concentration ( $10^{-5}$  M for all compounds). Inset: Inverse efficacy of compounds was tested in the presence of 100 ng/mL PMA, 90 s. **B)** EC50 of compounds were determined using increasing concentrations of ligands. Data represent the mean  $\pm$  S.E.M. of at least 4 experiments. Statistical significance was determined by two-way ANOVA, followed by a Dunnett test with basal (A) or with PMA (A, inset) as control column. \*\*\* $p < 0.001$ .

**Figure 5:** Cartesian representation (AC pathway in abscise and MAPK ERK1/2 pathway in ordinate) of compounds efficacy profiles and their appropriate efficacy coordinates. **A)** Efficacy profile and coordinates of the compounds tested on the  $\beta_1$ AR. **B)** Efficacy profile and coordinates of the compounds tested on the  $\beta_2$ AR.  $AC^{ago}$ - $ERK^{ago}$ , compounds being agonists on the AC and on the ERK1/2;  $AC^{inv}$ - $ERK^{ago}$ , compounds being inverse agonists on the AC and agonists on the ERK1/2;  $AC^{inv}$ - $ERK^{inv}$ , compounds being inverse agonists on the AC and on the ERK1/2;  $AC^{ago}$ - $ERK^{inv}$  compounds being agonist on the AC and inverse agonists on the ERK1/2. Coordinates are obtained from tables 3 and 5.

**TABLES:****Table 1:** Compounds tested and their relative binding affinities for the two beta-adrenergic subtypes (data obtained from the literature)

Ligand	Ki, values (nM)		Reference
	$\beta_1$ AR	$\beta_2$ AR	
Isoproterenol	224	458	(1)
Labetolol	24	19	(3)
Bucindolol	1.6	1.2	(2)
Carvedilol	1.7	1.1	(1)
	0.81	0.96	(2)
	0.24	0.19	(3)
Propranolol	1.8	0.8	(1)
	4.12	0.96	(2)
	2.8	0.62	(3)
Metoprolol	47	2960	(1)
Bisoprolol	22.4	1150	(1)
Atenolol	388	8140	(1)
	396	7493	(3)

(1) (Hoffmann et al., 2004); (2)(Ponicke et al., 2002); (3) (Pauwels et al., 1988)

**Table 2:** EC50 on cAMP and on MAPK of compounds tested on  $\beta_1$ AR.

Experimental data from Fig. 1A and 2B

EC50 in nM  $\pm$  SEM

Ligand	cAMP	MAPK
Isoproterenol	4.61 $\pm$ 2.08	2147.17 $\pm$ 1162
Labetolol	5.10 $\pm$ 3.42	nd
Bucindolol	2.77 $\pm$ 1.16	14.25 $\pm$ 9.06
Carvedilol	273.19 $\pm$ 212.52	74.59 $\pm$ 39.90
Propranolol	33.31 $\pm$ 12.80	32.68 $\pm$ 19.02
Metoprolol	141.68 $\pm$ 87.71	nd
Bisoprolol	42.26 $\pm$ 18.20	nd
Atenolol	312.47 $\pm$ 170.00	nd

**Table 3:** Emax on cAMP and on MAPK of compounds tested on  $\beta_1$ AR. Experimental data from Fig. 1B and 2A.

Ligand	Emax in % maximal response $\pm$ SEM	
	cAMP	MAPK
<b>Isoproterenol</b>	100 <sup>¥</sup>	100 <sup>¥</sup>
<b>Labetolol</b>	33 $\pm$ 1 <sup>¥</sup>	6.3 $\pm$ 1.4 <sup>¥</sup>
<b>Bucindolol</b>	44 $\pm$ 4 <sup>¥</sup>	25.5 $\pm$ 5.3 <sup>¥</sup>
<b>Carvedilol</b>	35 $\pm$ 2 <sup>¥</sup>	27.8 $\pm$ 6.0 <sup>¥</sup>
<b>Propranolol</b>	-32 $\pm$ 7 <sup>§</sup>	22.0 $\pm$ 4.4 <sup>¥</sup>
<b>Metoprolol</b>	-69 $\pm$ 7 <sup>§</sup>	2.4 $\pm$ 0.4 <sup>¥</sup>
<b>Bisoprolol</b>	-72 $\pm$ 7 <sup>§</sup>	2.9 $\pm$ 1.6 <sup>¥</sup>
<b>Atenolol</b>	-63 $\pm$ 7 <sup>§</sup>	5.4 $\pm$ 1.3 <sup>¥</sup>

<sup>¥</sup> expressed in percentage of isoproterenol response, <sup>§</sup> expressed in percentage of forskolin response

**Table 4:** EC50 on cAMP and on MAPK of compounds tested on  $\beta_2$ AR. Experimental data from Fig. 3A and 4B.

EC50 in nM $\pm$ SEM		
Ligand	cAMP	MAPK
<b>Isoproterenol</b>	4.99 $\pm$ 2.08	214.21 $\pm$ 90.73
<b>Labetolol</b>	6.76 $\pm$ 3.42	11.65 $\pm$ 5.58
<b>Bucindolol</b>	> 10000	0.95 $\pm$ 0.32
<b>Carvedilol</b>	> 10000	6.88 $\pm$ 4.09
<b>Propranolol</b>	2.32 $\pm$ 0.37	8.64 $\pm$ 2.84
<b>Metoprolol</b>	294.20 $\pm$ 95.58	nd
<b>Bisoprolol</b>	305.50 $\pm$ 131.48	nd
<b>Atenolol</b>	2400.80 $\pm$ 1342.00	nd

*nd, non determined*

**Table 5:** Emax on cAMP and on MAPK of compounds tested on  $\beta_2$ AR. Experimental data from Fig. 3B and 4A.

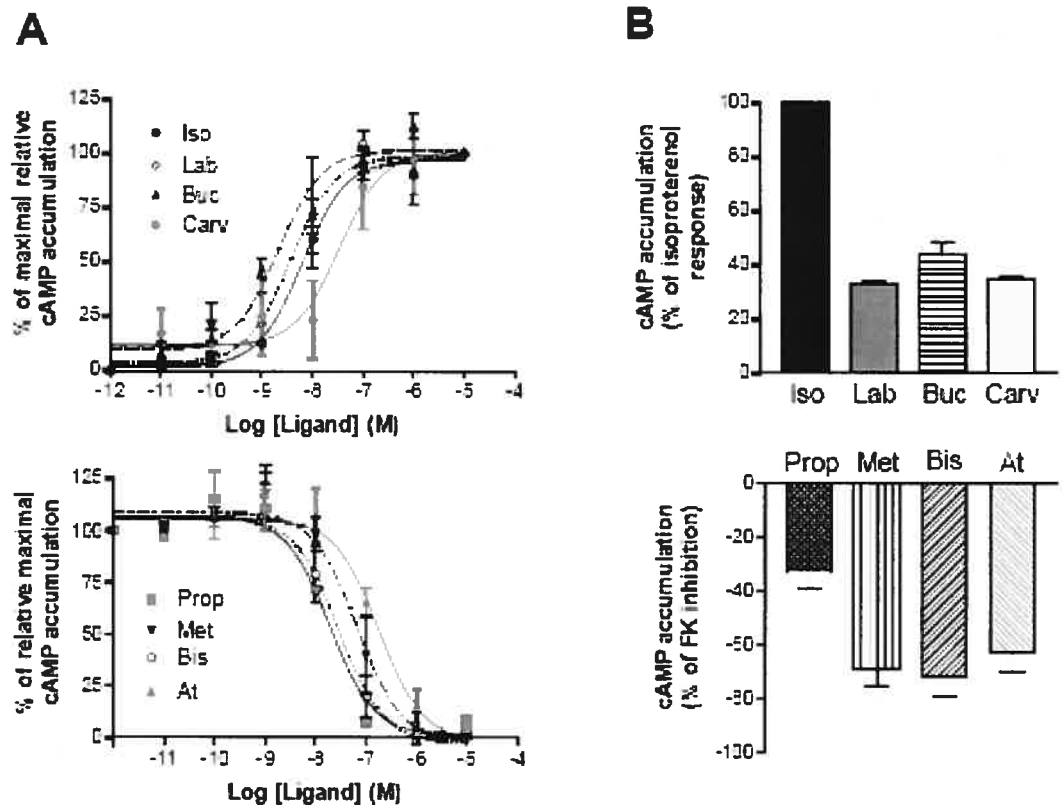
Ligand	Emax in % maximal response $\pm$ SEM	
	cAMP	MAPK
Isoproterenol	100 <sup>¥</sup>	100 <sup>¥</sup>
Labetolol	31.5 $\pm$ 1.7 <sup>¥</sup>	64.1 $\pm$ 7.3 <sup>¥</sup>
Bucindolol	-2.8 $\pm$ 1.8 <sup>§</sup>	64.8 $\pm$ 8.3 <sup>¥</sup>
Carvedilol	-6.7 $\pm$ 7.0 <sup>§</sup>	38.12 $\pm$ 6.4 <sup>¥</sup>
Propranolol	- 43.9 $\pm$ 7.6 <sup>§</sup>	40.6 $\pm$ 4.5 <sup>¥</sup>
Metoprolol	- 59.2 $\pm$ 9.0 <sup>§</sup>	- 1.8 $\pm$ 0.5 <sup>¥</sup> / - 41.2 $\pm$ 11.5 <sup>¶</sup>
Bisoprolol	-59.4 $\pm$ 12.0 <sup>§</sup>	3.0 $\pm$ 5.0 <sup>¥</sup> / - 51.6 $\pm$ 7.7 <sup>¶</sup>
Atenolol	-59.5 $\pm$ 10.8 <sup>§</sup>	-1.7 $\pm$ 0.8 <sup>¥</sup> / - 55.8 $\pm$ 9.8 <sup>¶</sup>

<sup>¥</sup> expressed in percentage of isoproterenol response, <sup>§</sup> expressed in percentage of forskolin response, <sup>¶</sup> expressed in percentage of PMA response

**Table 6:** Structures of the ligands tested and their efficacy pattern towards AC and ERK1/2 pathways on the two  $\beta$ -adrenergic subtypes. AGO= partial or full agonist, NEUT= considered as neutral antagonist, INV= inverse agonist. Iso, isoproterenol; Lab, labetalol; Buc, bucindolol; Carv, carvedilol; Prop, propranolol; Met, metoprolol; Bis, bisoprolol; At, atenolol.

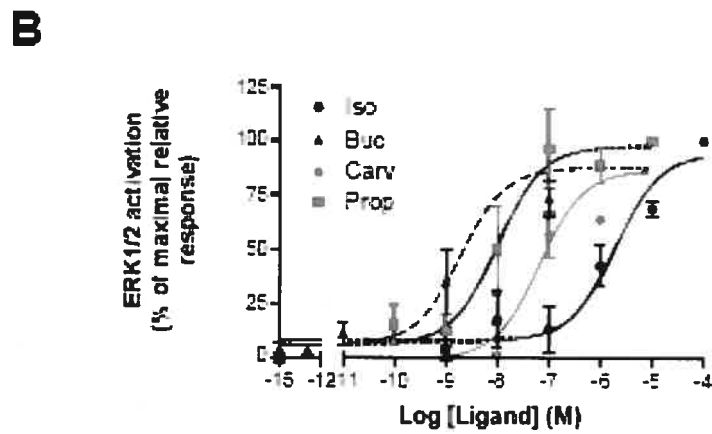
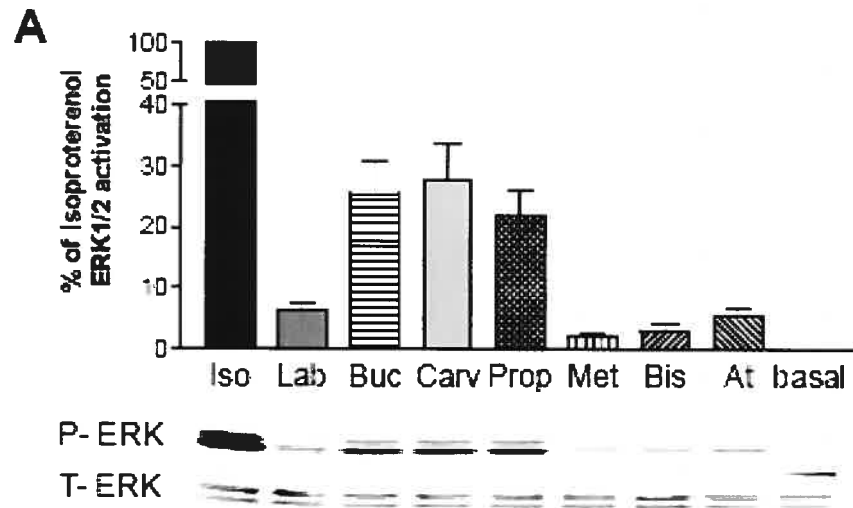
Ligand	Structure	$\beta_1$ AR		$\beta_2$ AR	
		AC	ERK1/2	AC	ERK1/2
Iso		AGO	AGO	AGO	AGO
Lab		AGO	NEUT	AGO	AGO
Buc		AGO	AGO	NEUT	AGO
Carv		AGO	AGO	NEUT	AGO
Prop		INV	AGO	INV	AGO
Met		INV	NEUT	INV	INV
Bis		INV	NEUT	INV	INV
At					

**Fig.1:**  $\beta_1$ AR / cAMP accumulation

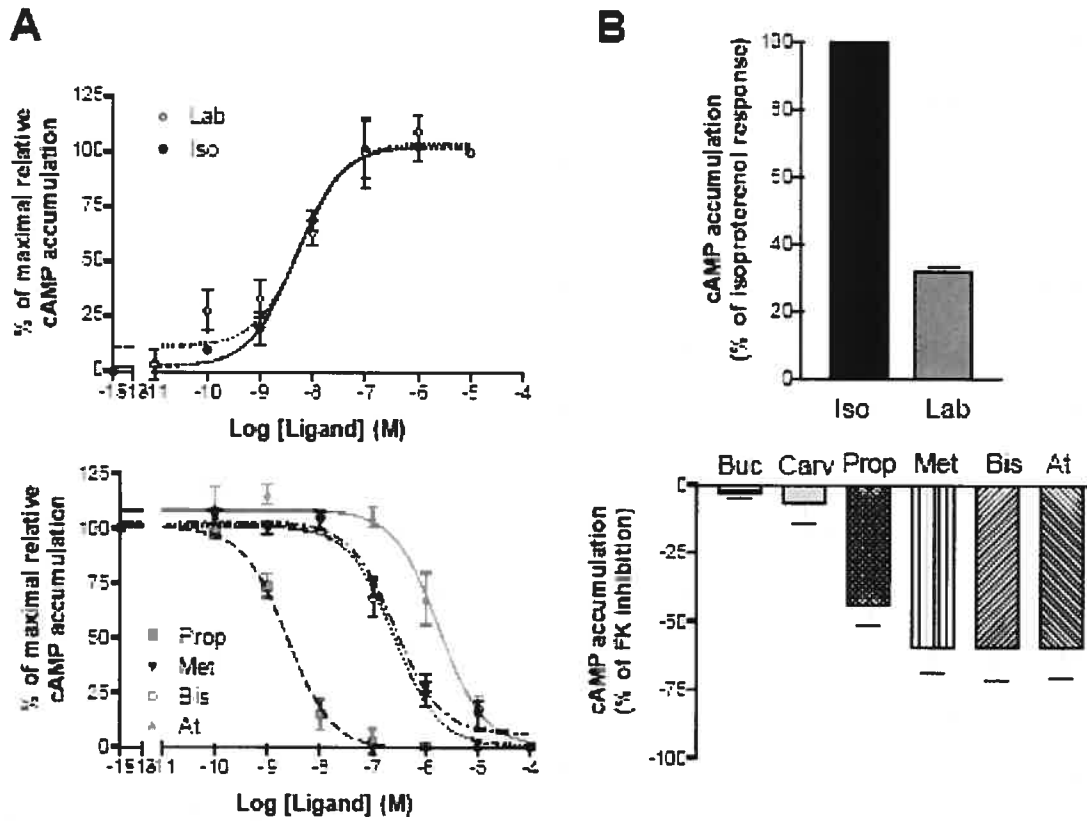




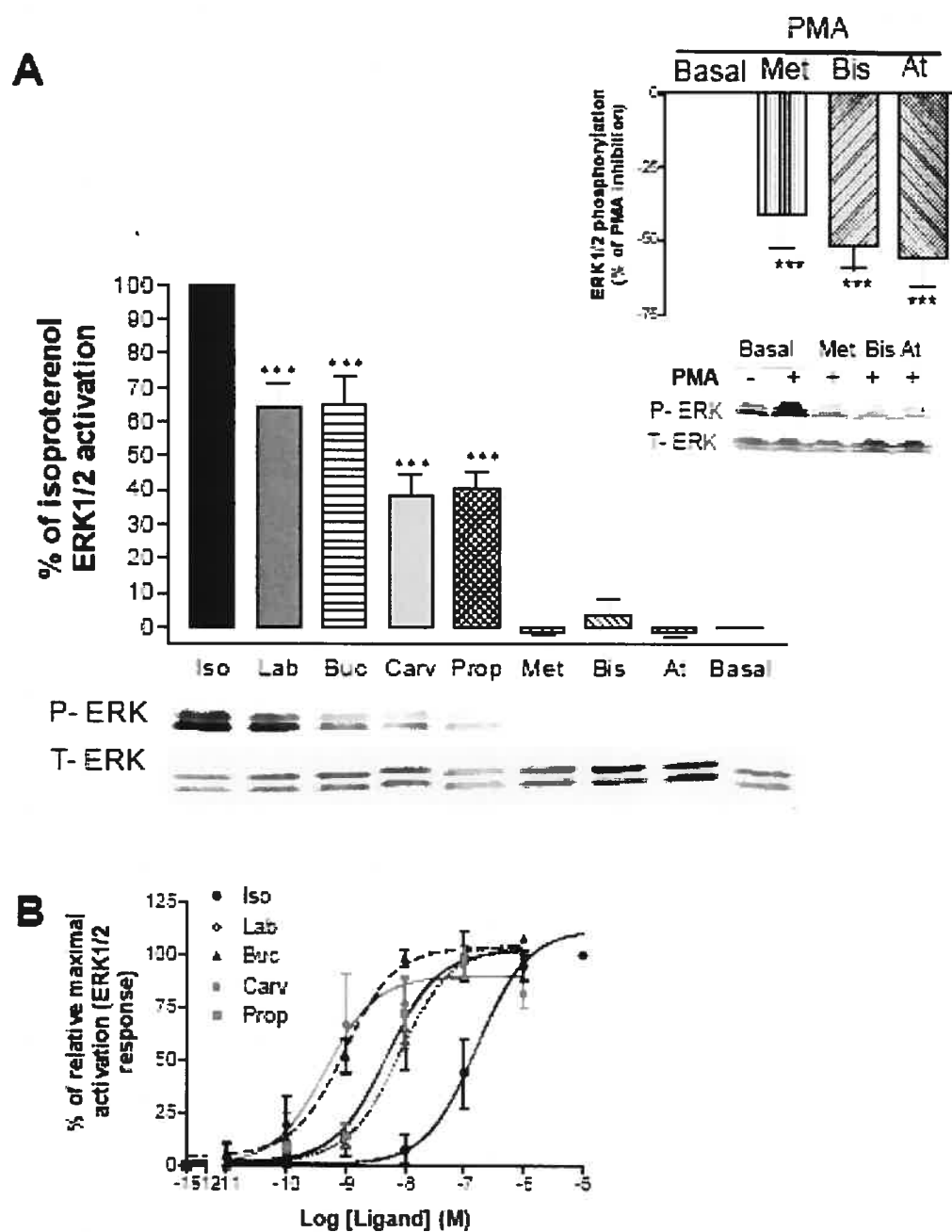
**Fig. 2:**  $\beta_1$ AR / MAPK ERK1/2

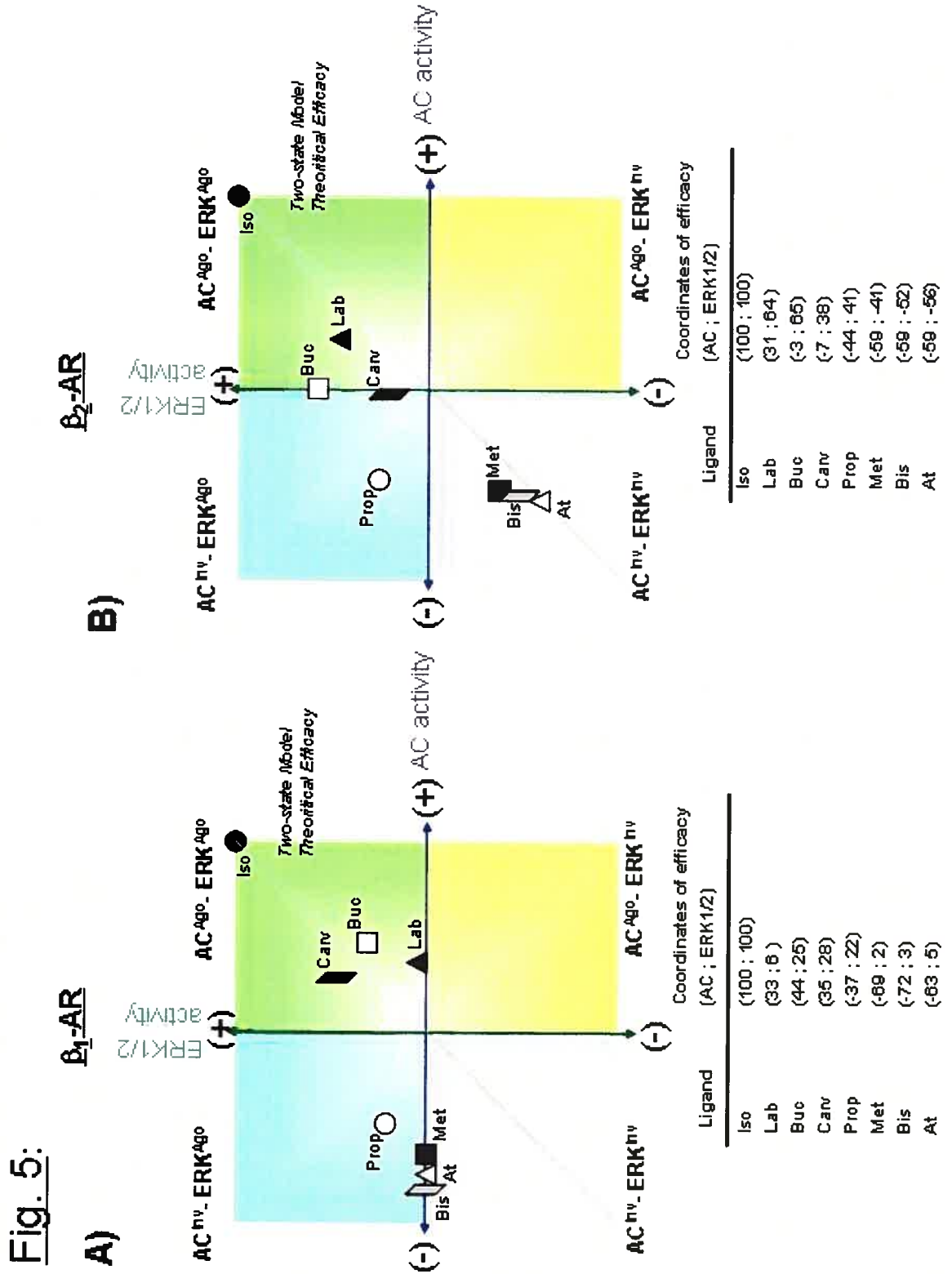


**Fig. 3:**  $\beta_2$ AR / cAMP accumulation



**Fig. 4:**  $\beta_2$ AR / MAPK







## 3.2 Article 2

### **Distinctes conformations de récepteurs et distinctes cascades de signalisation sont impliquées dans l'activation biaisée des ligands pour la voie MAPK par le récepteur $\beta_1$ -adrénergique.**

Ségolène Galandrin, Geneviève Oligny-Longpré, Céline Galés, Koji Ogawa, Hélène Bonin et Michel Bouvier.

Comme nous l'avons vu dans l'étude précédente, différents ligands des récepteurs  $\beta$ AR peuvent moduler plusieurs voies de signalisations, avec des efficacités distinctes. Ainsi, l'efficacité des ligands  $\beta$ adrénergiques doit être considérée comme pluridimensionnelle, à « n » dimensions, chaque dimension représentant une voie de signalisation donnée modulée par le récepteur. Cette pluralité de l'efficacité implique nécessairement une pluralité dans les conformations adoptées par les récepteurs  $\beta$ ARs. Ces dernières années ce sujet des conformations multiples adoptées par les RCPGs a fait l'objet d'un certain nombre d'étude (Cf Annexe I). Toutefois, peu d'informations sont présentes sur le lien entre ces différentes conformations et les déterminants moléculaires qui sont engagés selon ces conformations. C'est sur cette question que nous nous sommes penchés lors de cette étude.

Nous avons tiré bénéfice des profils signalétiques obtenus dans l'étude précédente et avons décidé de choisir trois ligands aux profils signalétiques distincts, supposés induire/stabiliser des conformations distinctes mais possédant en commun la capacité d'activer la voie des ERK1/2 modulée par le  $\beta_1$ AR bien que les effecteurs à l'origine de cette activation soient inconnus. Comme nous l'avons vu dans la section introduction §1.2.1.4, la modulation de la voie des MAPKs peut provenir d'un grand nombre de déterminants moléculaires en aval du récepteur.

Ainsi, nous avons voulu déterminer si la pluridimensionnalité de l'efficacité ainsi que la pluralité des conformations des récepteurs pouvait aussi s'appliquer aux effecteurs menant à une même voie de signalisation.

Pour ce faire, nous avons tenté dans un premier temps d'examiner les déterminants moléculaires à l'origine de la stimulation de la voie ERK1/2 par l'isoproterenol (agoniste complet sur la voie AC et sur la voie MAPK), le bucindolol (agoniste partiel sur la voie AC et sur la voie MAPK) et le propranolol (agoniste inverse sur la voie AC et agoniste partiel sur la voie MAPK). Alors que les trois composés requièrent la protéine Src pour activer la voie des MAPKs, seul l'isoproterenol requiert l'activation de la protéine Gi pour activer cette même voie.

En tirant profit de la technique de BRET entre le récepteur  $\beta$ 1AR et les sous-unités Gi et G $\gamma$ , qui permet d'analyser des changements conformationnels au sein du complexe récepteur/protéine G (Galés *et al.*, 2006), nous avons ensuite pu observer que l'isoproterenol sélectionne une conformation différente de celles sélectionnées par le bucindolol et le propranolol.

En conséquence, il y a engagement d'effecteurs distincts selon les composés lors de l'activation d'une même voie de signalisation, et ces engagements distincts ont pu être reliés à des conformations distinctes.

Lors de cette étude nous avons ainsi pu mettre en évidence un degré supplémentaire dans la pluridimensionnalité de l'efficacité des ligands aux RCPGs, à savoir la pluralité d'effecteurs engagés pour la stimulation d'une même voie de signalisation.

**Distinct Receptor Conformations and Signaling Cascades  
Involved in Ligand-Biased Activation of the Mitogen-Activated  
Protein Kinase (MAPK) by the  $\beta$ 1-Adrenergic Receptor.**

**Ségolène Galandrin, Geneviève Oligny-Longpré, Céline Galés, Hélène Bonin, Koji  
Ogawa and Michel Bouvier**

Department of Biochemistry and Groupe de Recherche Universitaire sur le Médicament,  
Institute for Research in Immunology and Cancer, Université de Montréal, Montréal  
(Québec) Canada, H3C 3J7



Running title:

Corresponding author: Dr. Michel Bouvier

Department of Biochemistry, Groupe de Recherche Universitaire sur le Médicament and  
Institute for Research in Immunology and Cancer, Université de Montréal,

C.P. 6128 Succursale Centre-Ville

Montréal, QC, Canada, H3C 3J7.

Tel.: 514-343-6319; [REDACTED]

Text Pages: 28

Tables: 0

Figures: 7

References: 51

Abstract: 220 words

Introduction: 465 words

Discussion: 1874 words

<sup>1</sup> *The abbreviations used are: AC, adenylyl cyclase; ANOVA, Analysis Of Variance;  $\beta$ ARs, beta-adrenergic receptors;  $\beta_1$ AR, subtype 1 beta-adrenergic receptor;  $\beta_2$ AR, subtype 2 beta-adrenergic receptor;; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; DTT, Dithiothreitol; ERK, extracellular regulated kinase; FBS, fetal bovine serum; GPCR, G-Protein Coupled Receptor; HEK, human embryonic kidney; HRP, Horseradish peroxidase; MAPK, Mitogen-Activated Protein Kinase, PBS, phosphate-buffered saline; SDS-PAGE, Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis.*



**ABSTRACT:**

In recent years several studies have demonstrated that different ligands can have distinct efficacy profiles towards various signaling pathways through a unique receptor. For instance,  $\beta$ 1-adrenergic compounds that are inverse agonists toward the adenylyl cyclase (AC) display agonist activity for the mitogenic-activated protein kinase (MAPK) pathway. Such phenomenon often termed functional selectivity has now been clearly established for many G protein coupled receptors when considering distinct signaling output. However, the possibility that ligands could selectively engage distinct effectors to activate a single signaling output by promoting specific receptor conformations has not been extensively examined. Here we took advantage of the fact that the AC full agonist, partial agonist and inverse agonist isoproterenol, bucindolol and propranolol all activate MAPK through the  $\beta$ 1-adrenergic receptor ( $\beta$ 1AR) to probe such conformational-biased signaling. Although the three compounds stimulated MAPK in a src-dependent manner, isoproterenol acted through both  $G_{i\alpha\beta\gamma}$  and G-protein independent pathways whereas bucindolol and propranolol promoted MAPK activation through the G protein-independent pathway only. The existence of such distinct signaling cascades linking  $\beta$ 1AR to MAPK activation was correlated with ligand-specific conformational rearrangements of receptor-G protein complexes measured by Bioluminescence Resonance Energy Transfer. Taken together, our data indicate that discrete local conformational changes can selectively promote the recruitment of distinct proximal signaling partners that can engage distinct signaling output and/or converge on the same one.

## INTRODUCTION:

G-Protein Coupled Receptors (GPCRs) represent the most prevalent class of transmembrane signaling proteins. They can modulate a large variety of signaling systems in order to assure a fine regulation of cell function in response to external stimuli. This signaling diversity is achieved in part by the capacity of one receptor to couple to diverse G-proteins and non-G protein effectors (Bockaert et al., 2004; Brady and Limbird, 2002; Hermans, 2003). Over the past decade, many studies have demonstrated that different subsets of these effector systems can be selectively modulated by distinct ligands through a unique receptor, a phenomenon often referred to as ligand-biased signaling (Galandrin et al., 2007; Kenakin, 2007). Hence, efficacy of GPCR ligands is increasingly considered as a pluridimensional parameter that should include in its definition, in addition to the ligand-receptor pair, the signaling pathways considered.

Characterizing a panel of  $\beta$ -adrenergic ligands for their efficacy profiles towards two of the  $\beta$ 1-adrenergic receptor ( $\beta$ 1AR)-stimulated signaling pathways, adenylyl cyclase pathway (AC) and the Mitogen Activated Protein Kinase Pathway (MAPK), we found that compounds displaying opposite efficacy toward AC shared common agonistic activity for MAPK. Indeed, isoproterenol, bucindolol and propranolol that are respectively full agonist, partial agonist and inverse agonists for AC were found to act as agonists for the extra-cellular regulated kinases1/2 (ERK1/2) (Galandrin and Bouvier, 2006). The inverse efficacy of propranolol compared to bucindolol and isoproterenol for  $\beta$ 1AR-stimulated AC clearly reveals the ability of the compounds to promote distinct receptor conformations. Since the three compounds activate MAPK, the data indicate that distinct receptor conformation can converge on the stimulation of a single down-stream effector system.

Multiple pathways have been shown to link GPCR to MAPK activation. Some of these involve the generation of second messengers resulting from classical G protein activation

whereas others rely on the scaffolding properties of proteins such as  $\beta$ arrestin (Luttrell, 2003; Marinissen and Gutkind, 2001; Wetzker and Bohmer, 2003). However, the correlation between the signaling cascades leading to MAPK and specific receptor conformation that can be promoted by different ligands has not been established yet. We therefore took advantage of the fact that isoproterenol- bucidolol- and propranolol-promoted receptor conformations converged on ERK1/2 stimulation to link receptor conformations to specific effector cascades. For this purpose, the pathways leading to the  $\beta$ 1AR-mediated activation of ERK1/2 were investigated for the three ligands while the conformations of the liganded receptor were assessed by bioluminescence resonance energy transfer (BRET) measurements monitoring structural rearrangements within receptor-G protein complexes. We report that isoproterenol stimulated ERK1/2 through both Gi-dependent and G protein-independent mechanisms whereas bucidolol and propranolol engaged MAPK only via the G protein-independent pathway. Interestingly, the distinct signaling pattern of isoproterenol was associated to a unique conformational signature of the receptor-G protein complex confirming that distinct ligands can select different signaling cascades by promoting discrete conformational rearrangements

## MATERIALS AND METHODS:

*Reagents:* (-) Isoproterenol, DL-Propranolol, Leu-Enkephalin and arginine-8 vasopressin (AVP) were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO) while bucindolol was a generous gift from Dr. Michael Bristow (University of Colorado Health Sciences Center, CO). Recombinant Human epidermal Growth factor (EGF) was from PeproTech Inc. (Rocky Hill, NJ). Cholera Toxin B subunit (CTX) and Pertussis Toxin (PTX) were from Sigma Aldrich (St Louis, MO). Inhibitors PP2 and PD98059 were from Calbiochem (San Diego, CA). Mouse anti-phosphorylated ERK1/2, rabbit anti-ERK1/2 and anti- $\beta$ arrestin2 (H9) antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Antibody recognizing the phosphor-(Ser/Thr) protein kinase A (PKA) substrate was purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, MA). HRP-anti-mouse and HRP-anti-rabbit polyclonal antibodies were from Amersham (Baie d'Urfé, QC, CA)). All other reagents were of analytical grade and obtained from various suppliers.

*Expression vectors:* The plasmid encoding rat ERK2-GFP (DeFea et al., 2000b) and the  $\beta$ -adrenergic receptor kinase ( $\beta$ ARK) carboxyl terminal (C)-tail conjugated to the extracellular and transmembrane domain of the CD8 protein (T8 $\beta$ ARKctail) (Crespo et al., 1995) were a generous gift from K. DeFea (University of California Riverside, La Jolla, CA) and J. S. Gutkind (National Institutes of Health, Bethesda) respectively. Plasmid encoding  $\beta$ Arrestin1 deleted in its (C)-tail from amino acid 319 to amino acid 418 ( $\beta$ -Arr  $\Delta$ 318-419) was generously provided by Jeff L. Benovic (Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA). Plasmids encoding the  $\beta$ 1 adrenergic receptor fused to its C-terminus with humanized *Renillia Luciferase* ( $\beta$ 1AR-hRLuc) or the blue variant of GFP ( $\beta$ 1AR-GFP10) were described previously (Mercier et al., 2002). The expression vectors containing human G protein subunits (*Gai1*, *Gy2* and *G $\beta$ 1*) were obtained from UMR cDNA resource center (Rolla, MO). Plasmids encoding *Gy2* fused at its N-terminus to

GFP10 (GFP10-G $\gamma$ 2) or G $\alpha$ i1 tagged with hRLuc inserted between residues L91 and K92 (G $\alpha$ i1-91hRLuc), were previously described (Gales et al., 2006).

*Stables cell lines and transfections:* HEK293S cells (Reeves et al., 1996) stably expressing the HA tagged human  $\beta$ 1AR, the human  $\delta$ -opioid receptor tagged with FLAG ( $\delta$ OR) or the myc tagged V2 vasopressin receptor (V2R) were previously described (Charest et al., 2007; Galandrin and Bouvier, 2006; Petaja-Repo et al., 2000). Cells were grown in *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) supplemented with 5%FBS, 100U/mL Penicillin and Streptomycin, 2mM L-Glutamine and 200 $\mu$ g/ml G418, in a 37°C humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. For all BRET experiments, HEK293 cells were transiently transfected with the indicated BRET partners (tagged-receptor and -G protein subunits) along with the complementary untagged G protein subunits, so to maintain the stoichiometric expression of the G $\alpha$ i1 $\beta$ 1 $\gamma$ 2 heterotrimer. For ERK phosphorylation assays, cells were transfected in 6 wells plates and harvested 48h after transfection. In all cases, transient transfections were performed using the FuGENE 6 Transfection reagent (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) according to the manufacturer's protocol. The previously described siRNAs for  $\beta$ arrestin 1 and 2 (Ahn et al., 2003) were purchased from QIAGEN and transfected at 400nm final (300nM  $\beta$ arrestin 1 siRNA and 100 nM  $\beta$ arrestin 2 siRNA) using the RNAiFect transfection Reagent (QIAGEN), according to the manufacturer's protocol.

*Quantification of cAMP accumulation:* Agonist induced cAMP accumulation was measured as previously described (Galandrin and Bouvier, 2006). Cells were grown in 60mm dishes and incubated for 16h in DMEM, with or without 300ng/mL CTX, when indicated. The day of the experiment, cells were resuspended in PBS/0.1%Glucose/1mM IBMX and treated for 20 minutes at 37°C with the indicated drugs. Propranolol was tested in the presence of 0.3  $\mu$ M forskolin to increase the window of inhibition, since it has been describe as an

inverse agonist. Following drug treatment, cells were immediately lysed and cAMP levels were measured using the Catch Point cAMP Kit (Molecular Device, Sunnyvale, CA) according to the manufacturer's recommendations. Briefly, cells lysates were incubated in 384-well plates coated with anti-cAMP antibodies in the presence of known amounts of HRP-cAMP. cAMP from cell lysates was allowed to compete with the HRP-cAMP for 2 hours and the remaining peroxidase activity was measured following 3 washes. The cAMP generated under the different conditions was interpolated from a cAMP standard curve generated in parallel for each experiment. Triplicates were used for each condition, and all experiments were repeated at least 3 times.

*Western blotting:* Cells expressing  $\beta$ 1AR,  $\delta$ OR or V2R were seeded in poly-D-lysine-coated six-well plates. The day after, cells were washed once with PBS and rendered quiescent by serum starvation for sixteen hours. Cells (~80% confluency) were then stimulated at 37°C with conditions corresponding to the maximal stimulation response obtained from time course and dose response experiments: 4 min. with 10 $\mu$ M isoproterenol, 2 min. with 10 $\mu$ M bucindolol or propranolol, 5 min. with AVP 1 $\mu$ M, 5 min. with 1 $\mu$ M Leu-Enkephalin, or 10 min. with 1ng/mL EGF. To terminate the stimulation, the media was rapidly removed and cells were placed on ice and washed with ice-cold PBS before being lysed using 100 $\mu$ l/well of Laemmli sample buffer (62.5mM TrisHCl, 2% SDS, 10% Glycerol, 50mM DTT, 0.1% Bromophenol Blue, pH 6.8). Whole cell lysates were sonicated, resolved by SDS-PAGE, and transferred to nitrocellulose. The blots were then blocked at room temperature for 1 hour with TBS-T buffer (50mM Tris, pH7.4, 150mM NaCl, 0.1% (v/v) Tween 20)/5% fat-free milk. Phospho-ERK1/2 or ERK2-GFP were detected using mouse polyclonal anti-phospho p42/p44 ERK specific antibody (1:3000, over-night at 4°C in TBS-T/5% fat-free milk). The immunoreactivity was revealed using a secondary HRP-conjugated anti-mouse antibody (1:10000, 1 hour at room temperature in TBS-T/5% fat-free milk) and the peroxidase activity detected by chemiluminescence (NEN



Life Science Products). Blots were stripped and re-probed for total ERK using rabbit polyclonal anti-ERK1/2 antibody (1:25000, 1 hour at room temperature in TBS-T, 5% fat-free milk) followed by HRP-anti-rabbit antibody (1:20000, 1 hour at room temperature in TBS-T/5% fat-free milk). Films were scanned, and band intensities were quantified using Quantity One (Bio-Rad) software. ERK1/2 or ERK2-GFP phosphorylation was normalised according to the loading of proteins by expressing the data as a ratio of P-ERK1/2 or P-ERK2GFP over total ERK1/2 or ERK2-GFP, respectively. Phosphorylation of PKA substrates was revealed using a rabbit polyclonal anti-P-SPKA antibody, detecting proteins containing a phosphor-Ser/Thr residue with arginine at the minus 3 position (1:1000, overnight at 4°C in TBS-T, 5% BSA), followed by anti-rabbit HRP conjugated IgG (1:10000, 1 hour at room temperature in TBS-T/5% fat-free milk). Detection of  $\beta$ arrestin 1 and 2 was achieved using the mouse monoclonal anti- $\beta$ arrestin2 (H9) antibody, which recognizes both  $\beta$ arrestin isoforms (1:1000, over-night at 4°C in TBS-T/0.5% fat-free milk), followed by anti-mouse HRP-conjugated IgG (1:5000, 1 hour at room temperature in TBS-T/0.5% fat-free milk).

*Bioluminescence resonance energy transfer measurement:* Rluc- and GFP10-tagged receptor or G protein constructs were transiently transfected into HEK293 cells. Forty-eight hours after transfection, cells were washed twice with PBS, detached with PBS/5 mM EDTA and resuspended in PBS/0.1% (w/v) glucose at room temperature. Cells were then distributed (50  $\mu$ g of protein per well) in a 96-well microplate (Optiplate, PerkinElmer, Lifescience) and incubated in the presence or absence of the different ligands for 1 min. BRET<sup>2</sup> between Rluc and GFP10 was measured after the addition of the Rluc substrate DeepBlueC coelenterazine (5  $\mu$ M) (PerkinElmer, Lifescience). BRET<sup>2</sup> readings were collected using a modified top-count apparatus (TopCount NXT, Packard Bioscience) that allows sequential integration of signals detected in the 370-450 nm and 500-530 nm windows, using filters with the appropriate band pass (Chroma). The BRET<sup>2</sup> signal was

calculated as the ratio of the light emitted by GFP10 (510-550 nm) over the light emitted by Rluc (460-500 nm).

***Statistical analysis***

Statistical analysis and curve fitting were done using Prism 2.01 (GraphPad, San Diego, CA). Statistical significance of the differences was assessed using one-way ANOVA and post-hoc Bonferonni test. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ .

## RESULTS:

### *Ligand profiles*

HEK293 cells stably expressing the human  $\beta$ 1AR were generated as previously described (Galandrin and Bouvier, 2006). The ability of the three selected compounds to modulate the adenylate cyclase (AC) and ERK1/2 pathways was first assessed in order to confirm their reported activity towards those two signalling pathways. As reported previously (Galandrin and Bouvier, 2006), isoproterenol is an efficacious agonist towards AC whereas bucindolol behaves as a partial agonist, reaching approximately one third of the maximal isoproterenol-promoted response (Fig. 1A). Propranolol for its part acted as an inverse agonist leading to an inhibition of the forskolin-induced cAMP accumulation, (Fig. 1B). These compounds were next evaluated in the same cells on the ERK1/2 pathway. As shown in figure 1C, the three compounds promoted ERK1/2 activation, isoproterenol being the most efficacious ligand, bucindolol and propranolol acting as equivalent partial agonists. Thus, two efficacy profiles could be distinguished. Isoproterenol and bucindolol behaved as agonist for the two signaling pathways whereas propranolol displayed an opposite efficacy profile being an inverse agonist for the AC pathway but a partial agonist in stimulating ERK1/2 phosphorylation. No response were observed for any of the three compounds in untransfected HEK293 cells confirming that the ligand-promoted AC and ERK modulation are  $\beta$ 1AR-mediated (data not shown). The distinct efficacy profiles observed for the two pathways are not an idiosyncrasy of the cell line selected since similar results were obtained in cells transiently expressing the  $\beta$ 1AR.

### *Involvement of heterotrimeric G-proteins*

To determine whether three compounds displaying distinct efficacies toward AC (full agonist: isoproterenol, partial agonist: bucindolol, inverse agonist: propranolol) can engage distinct ERK1/2 activation mechanisms, the effector systems specifically stimulated by the ligand-bound receptor for the activation of the MAPK pathway were investigated. The potential implication of G $\alpha$  proteins was first examined. To test the role of G $\alpha$ s, we subjected HEK293 cells stably expressing the human  $\beta$ 1AR to a sustained treatment with CTX, an approach that was previously described to down-regulate Gas in HEK293 cells (Charest et al., 2007; Seidel et al., 1999). The CTX-promoted knock-down of Gas was confirmed by the observed inhibition of isoproterenol-induced cAMP accumulation and PKA-substrates phosphorylation (Fig. 2, inset). ERK1/2 phosphorylation stimulated by isoproterenol, propranolol and bucindolol remained unaffected by the CTX-promoted knockdown of Gas (Fig. 2), indicating that Gas engagement is not necessary for ERK1/2 activation by any of the ligands.

Since several Gas-coupled receptors, notably the  $\beta$ 1- and  $\beta$ 2AR, were shown to promote ERK1/2 activation through a switch of coupling from G $\alpha$ s to G $\alpha$ i (Daaka et al., 1997; Martin et al., 2004), the contribution of G $\alpha$ i to the isoproterenol, bucindolol and propranolol-promoted ERK1/2 activation was evaluated. The selective inhibition of Gi/o signaling by PTX treatment partially blocked the isoproterenol-mediated ERK1/2 activation but did not affect either bucindolol- or propranolol-stimulated ERK1/2 activity. Interestingly, the inhibition of isoproterenol-stimulated ERK1/2 phosphorylation by the PTX treatment was not complete, leaving 30% of the response unaffected (Fig. 3A). This residual response did not result from an incomplete inhibition of Gi since the same PTX treatment fully blocked Leu-Enkephalin-promoted MAPK stimulation through the G $\alpha$ i coupled  $\delta$ OR (Fig. 3A, inset). These results suggest that isoproterenol relies on G $\alpha$ i protein to promote ERK1/2 activation whereas bucindolol and propranolol do not.

The  $G_{\alpha i}$  contribution to isoproterenol-but not bucindolol- or propranolol-stimulated ERK1/2 activation was confirmed by directly assessing the ability of the compounds to activate  $G_{\alpha i}$ . For that purpose, we took advantage of a BRET-based assay monitoring the interaction between  $G_{\alpha i1}$ -hRluc and GFP10-G $\gamma$ 2 fusion proteins, a BRET pair that was previously shown to reflect G-protein activation. (Gales et al., 2005; Gales et al., 2006). As shown in Figure 3B, stimulation of  $\beta$ 1AR with isoproterenol lead to a decrease in BRET between  $G_{\alpha i1}$ -hRluc and GFP10-G $\gamma$ 2, reflecting a separation between  $G_{\alpha i1}$  and  $G_{\beta\gamma}$  subunits that is characteristic of G protein activation. In contrast, no BRET signal modulation was observed when cells were stimulated with bucindolol or propranolol, suggesting that these two compounds are unable to promote  $G_{\alpha i1}$  activation.

Since  $G_{\alpha}$  and  $G_{\beta\gamma}$  protein subunits are known to engage distinct effectors to activate MAPK (Crespo et al., 1994; Neves et al., 2002), the potential role of  $G_{\beta\gamma}$  in the isoproterenol, bucindolol and propranolol-mediated ERK1/2 activation was also evaluated. For this purpose, we took advantage of the previously described  $G_{\beta\gamma}$ -scavenger consisting of the C-tail of GRK2 ( $\beta$ ARK) conjugated to the extra-cellular and trans-membrane domains of the CD8 protein that provides a membrane anchor for  $\beta$ ARK's C-tail (T8 $\beta$ ARKctail) (Crespo et al., 1995). Expression of this scavenger of  $G_{\beta\gamma}$  significantly inhibited isoproterenol-stimulated ERK1/2 activity but did not affect bucindolol or propranolol activation of ERK1/2 (Fig. 4A). Interestingly, the  $G_{\beta\gamma}$  sequestration led to a partial blockade of the isoproterenol-stimulated ERK1/2 response that was of the same magnitude as the one observed following PTX treatment. Since PTX treatment inactivates both  $G_{\alpha i}$  and  $G_{\beta\gamma}$ , the similar level of inhibition observed following PTX treatment or T8 $\beta$ ARKctail expression indicates a major contribution of the  $G_{\beta\gamma}$  subunits originating from  $G_i$  in the isoproterenol-stimulated MAPK activation. The persistence of some ERK1/2 activity following  $G_{\alpha i}/G_{\beta\gamma}$  inactivation suggests the contribution of a  $G_i$  independent component to the isoproterenol-stimulated response. As shown in Figure 4B, the maximal ERK1/2 stimulation induced by isoproterenol in the absence of PTX was reached after 4

minutes whereas bucindolol and propranolol's maximal response peaked at 2 minutes. Removal of the  $G_i$  component by PTX shifted the time course of the isoproterenol-stimulated ERK1/2 response so that it became similar to the kinetic profiles observed for bucindolol and propranolol. These data indicate that two kinetically distinct components contribute to the isoproterenol-stimulated response: a late component (peaking at 4 min) that most likely reflects the  $G_i$ -dependent response and a more rapid  $G_i$ -independent phase (peaking at two minutes) that may also be shared by bucindolol and propranolol.

### ***Involvement of the scaffolding protein $\beta$ -Arrestin:***

In addition to their role in receptor desensitization and internalization,  $\beta$ -arrestins are now known to scaffold members of the MAPK signaling cascade and to contribute to some GPCR-mediated MAPK activation (DeFea et al., 2000a; Luttrell et al., 1999; Luttrell et al., 2001; McDonald et al., 2000; Miller et al., 2000). Hence, to test their involvement in isoproterenol-, bucindolol- and propranolol-induced ERK1/2 stimulation, we used a C-tail truncated form of  $\beta$ -arrestin 1 ( $\beta$ -Arr  $\Delta$ 318-419) as a dominant negative for  $\beta$ -arrestin. Over-expression of this construct in cells stably expressing the V2 vasopressin receptor (V2R), a receptor that was described to activate ERK1/2 via  $\beta$ -arrestin, (Charest et al., 2007), significantly decreased the AVP-induced ERK1/2 stimulation (Fig. 5A, inset), confirming the dominant negative activity of  $\beta$ -Arr  $\Delta$ 318-419. However, using the same conditions, ERK1/2 response induced by isoproterenol, bucindolol and propranolol were not affected by the  $\beta$ -arrestin dominant negative mutant (Fig. 5A). The lack of involvement of  $\beta$ -arrestin in the  $\beta$ 1AR-stimulated ERK1/2 response was further confirmed by the observation that intracellular depletion of both  $\beta$ -arrestin isoforms (Fig. 5B, inset) using siRNAs did not inhibit ERK1/2 phosphorylation promoted by the three ligands. Of notice, both siRNA and dominant-negative approaches targeting  $\beta$ -arrestins led to a potentiation of

the  $\beta$ 1AR-promoted MAPK response that most likely results from an increased receptor cell surface density as a consequence of a blunted  $\beta$ arrestin-mediated endocytosis.

### ***Involvement of the Src and MEK Kinases:***

Since several studies documented the role of Src Tyrosine Kinase proteins in GPCR-mediated MAPK activation (Cao et al., 2000; Charest et al., 2007; DeFea et al., 2000a; Luttrell et al., 1999), we sought to determine whether this cytosolic kinase family was involved in  $\beta$ 1AR-mediated ERK1/2 activation induced by isoproterenol, bucindolol and propranolol. For that purpose, we assessed the effect of Src family proteins tyrosine kinase inhibition using the selective inhibitor, 4-Amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(*t*-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine (PP2). As shown in Figure 6A, such treatment almost completely blocked isoproterenol-, bucindolol- and propranolol-stimulated ERK1/2 activity, suggesting that Src plays a key role in the MAPK signaling cascades promoted by the three compounds. In the case of isoproterenol, the extensive inhibition of ERK1/2 activation upon PP2 treatment indicates that Src is involved in both  $G_i$ -dependent and -independent  $\beta$ 1AR-mediated MAPK stimulation. Similarly, the inhibition of the penultimate kinase involved in the prototypical ERK1/2 signaling cascade, MEK, completely blocked the response promoted by the three ligands (Fig. 6B), suggesting the convergence of the  $G_i$ -dependent and -independent pathways.

### ***Linking receptor conformational changes to signaling efficacy.***

The above data indicate that in addition to have different efficacy profiles toward AC and MAPK pathways, isoproterenol, bucindolol and propranolol also differ in their ability to engage  $G_i$ , the MAPK activation being partially  $G_i$  dependent for isoproterenol but  $G_i$ -

independent for bucindolol and propranolol. Such ligand-selective behavior, variously referred to as “ligand directed trafficking of receptor stimulus”, “collateral efficacy”, “ligand-biased signaling” or “functional selectivity”, is believed to originate from distinct ligand-promoted conformational reorganization of the receptor (Galandrin et al., 2007). To directly probe the link between the conformations and the functional selectivity promoted by the three ligands we took advantage of a BRET-based assay to monitor structural rearrangement within receptor/G protein complex (Gales et al., 2006). This receptor/G protein BRET-sensor was previously demonstrated to reflect ligand-induced conformational rearrangements leading to changes in the distance between the receptor carboxyl tail and either  $G\alpha$  or  $G\gamma$ . As shown in Figure 7A, stimulation of the  $\beta$ 1AR with isoproterenol increased the BRET between  $\beta$ 1AR-hRLuc and GFP10- $G\gamma$ 2 whereas bucindolol and propranolol both decreased the BRET signal between these two partners. Similar results were obtained when BRET was measured between  $G\alpha$ 1-hRLuc and  $\beta$ 1AR-GFP10 (Fig. 7B) indicating that isoproterenol promoted a conformational state of the  $\beta$ 1 receptor that is distinct from those induced by bucindolol and propranolol.



## DISCUSSION:

The three  $\beta$ AR ligands tested in the present study displayed distinct efficacy profiles toward AC and MAPK, confirming the existence of functional selectivity for  $\beta$ 1AR ligands (Galadrin and Bouvier, 2006). Indeed, whereas isoproterenol, bucindolol and propranolol behaved as full, partial and inverse agonists respectively on AC, the three compounds are agonists on MAPK. An additional level of selectivity was revealed when the signaling cascade leading to ERK1/2 activation were examined. The partial agonists bucindolol and propranolol activated ERK1/2 in a Gi-independent manner while both Gi-dependent and -independent pathways contributed to the isoproterenol-stimulated response indicating that different ligands can recruit distinct subsets of signalling effectors to activate a single pathway. This is reminiscent of few other cases where distinct effectors were selectively engaged by different ligand/receptor pairs to stimulate a common downstream signaling integrator. For example, whereas PTH1–34 was found to activate MAPK through stimulation of both Gs and  $\beta$ -arrestin, PTH7–34 and PTHrp1–36 were able to selectively engage either  $\beta$ -arrestin (PTH7–34) or the G protein (PTHrp1–36) leading in each case to the activation of ERK1/2 (Gesty-Palmer et al., 2006). Similarly, although binding of angiotensin-II (Ang-II) to its type 1 receptor (AT1R) was shown to engage both Gq and  $\beta$ -arrestin, a synthetic Ang-II analog stimulated MAPK in an exclusively  $\beta$ -arrestin-dependent manner (Wei et al., 2003). The assessment in the present study of two signaling responses (ie : AC and MAPK) allowed to further refine the level of selectivity by distinguishing two compounds that share the same Gi-independent MAPK signaling signature (bucindolol and propranolol) but have opposite efficacies (ie: agonist vs inverse agonist) when considering AC activity. These data therefore indicate that distinct receptor conformations that converge to activate one signaling cascade can diverge in their ability to regulate another pathway. This is consistent with the notion that multiple receptor conformational states with distinct signaling potentialities can be promoted by different ligands.

Although several studies have shown that ERK1/2 activation can lie downstream of AC stimulation (Grewal et al., 2000; Vossler et al., 1997), our results clearly indicate that the two pathways can be independently regulated. Indeed, even though isoproterenol and bucindolol are agonists for the two signaling systems, their ability to activate ERK1/2 was found to be independent of their positive coupling to Gs and cAMP generation, as illustrated by the lack of inhibitory effect of chronic CTX treatment. This independence of the ERK1/2 activation from the cAMP signaling arm is further substantiated by the fact that propranolol, which act as an inverse agonist for AC, stimulated the ERK1/2 activity to the same extent than the partial agonist bucindolol. Of notice, inactivation of Gs following chronic CTX treatment tended to potentiate isoproterenol-stimulated ERK1/2 phosphorylation, indicating a potential inhibitory role of cAMP on the MAPK pathway. Although, as indicated above, cAMP production and PKA stimulation can contribute to ERK1/2 activity in cell expressing B-Raf, AC and PKA activation have also been shown to inhibit ERK1/2 phosphorylation (Charest et al., 2007; Cook and McCormick, 1993; Crespo et al., 1995; Houslay and Kolch, 2000; Wu et al., 1993). Such inhibitory effect has been proposed to result from the phosphorylation and inhibition of the widely expressed c-Raf-1 (Houslay and Kolch, 2000; Mischak et al., 1996) and could account for the observed tendency of Gs inactivation to potentiate isoproterenol-stimulated ERK1/2 stimulation. In any case, the observation that propranolol act as an inverse agonist for AC but a partial agonist for ERK1/2 activities clearly demonstrate the occurrence of functional ligand selectivity at the  $\beta$ 1AR.

Functional selectivity was also revealed by the distinct cascades involved in ERK1/2 activation by the three  $\beta$ -adrenergic ligands. Indeed, inactivation of Gi by PTX treatment partially inhibited isoproterenol- but not bucindolol or propranolol-stimulated ERK1/2. Such ligand-specific sensitivity to chemical Gi knock-down suggests that only isoproterenol can induce  $\beta$ 1AR coupling to Gi. This differential involvement of Gi in the  $\beta$ 1AR-stimulated ERK1/2 cascades was further confirmed by the observation that

isoproterenol but not bucindolol or propranolol promoted Gi activation as reflected by the increase in the BRET signal detected between G $\alpha$ i1 and G $\gamma$ 2. The involvement of Gi in the isoproterenol-stimulated ERK1/2 activation has previously been proposed for the  $\beta$ 1AR in CHO cells (Martin et al., 2004). In that study, the authors suggested that the Gi contribution involved a switch of coupling from Gi to Gs that resulted from PKA-mediated phosphorylation of the receptor. Such mechanism implies that activation of Gs and cAMP production is a prerequisite to Gi coupling. The observation in the present study that CTX-mediated knock-down of Gs did not inhibit the isoproterenol-stimulated ERK1/2 activation suggest either that such PKA-mediated coupling switch is not operational in the HEK293 cells investigated in the present study or else that this mechanism is masked by opposite actions of cAMP. The possible inhibitory influence of the cAMP on the ERK1/2 activity discussed above could indeed counteract the positive action that the cAMP/PKA-promoted coupling switch could have on the ERK1/2 activity.

As is often the case for Gi-dependent activation of ERK1/2 (Bunemann et al., 2003; Crespo et al., 1994; Della Rocca et al., 1997; Gales et al., 2006; Koch et al., 1994, the isoproterenol-stimulated MAPK activation involves G $\beta\gamma$  as indicated by the inhibitory action of the G $\beta\gamma$  scavenger,  $\beta$ ARKctail. Given that chronic CTX treatment should inhibit G $\beta\gamma$  activation arising from G $\alpha$ s stimulation, the lack of CTX inhibitory effect on the isoproterenol-stimulated ERK1/2 activity suggests that G $\beta\gamma$  originating from Gi but not Gs account for the MAPK activation. Although the mechanisms underlying such specific G $\alpha$ -directed G $\beta\gamma$  signaling remains elusive, the observation is consistent with the emerging concept that G $\alpha$ i and G $\beta\gamma$  may not fully dissociate upon activation (Gales, 2005 #16; Nobles et al., 2005).

As indicated above, among the 3 ligands tested, only isoproterenol led to ERK1/2 activation through the engagement of both Gi-dependent and independent pathways. Interestingly, these two pathways as is the case for the bucindolol- and propranolol- require

the activation of Src tyrosine kinases for the ERK1/2 response, indicating a convergence of all cascades on a single integrator. Having several distinct cascades converging on the MAPK rather than a single one could have many important biological implications. For one thing, the existence of more than one pathway regulating a common cell signal generates additional intermediates that offer more control and check points to fine tune the response. Obvious consequences of such signaling convergence include changes in the intensity and spatio-temporal characteristic of the response. For instance, the greater maximal ERK1/2 response observed for isoproterenol as compared to bucindolol and propranolol could reflect the convergence of the Gi dependent and independent pathways. This hypothesis is supported by the observation that PTX-mediated inactivation of Gi blunted the isoproterenol-stimulated response to a level equivalent to that reached upon bucindolol and propranolol stimulation. Removing the Gi component also affected the kinetic of the isoproterenol-mediated response, consistently shifting the peak stimulation from 4 to 2 minutes. It follows that the time course and amplitude of the isoproterenol-stimulated response upon Gi inactivation becomes almost identical to those observed for bucindolol and propranolol indicating that the Gi-independent component engaged by the three ligands may involve a common pathway. Although the downstream consequences of the differences in MAPK activation kinetics were not investigated in the present study, different temporal patterns of ERK1/2 activation have previously been suggested to have distinct consequences on gene regulation and cell proliferation (Balmanno and Cook, 1999; Cook and McCormick, 1996; Meloche et al., 1992). Whether the relatively modest time course difference observed between the isoproterenol and the bucindolol or propranolol responses could impact qualitatively or quantitatively on the biological outcomes downstream of MAPK remains to be investigated. Multi-component kinetics of GPCR-promoted ERK1/2 activation have previously been reported for several receptors including Parathyroid hormone receptor,  $\beta$ 2-adrenergic receptor and Angiotensin II receptor (Ahn et al., 2004; Gesty-Palmer et al., 2006; Shenoy et al., 2006). In these studies, the early activation phase has been attributed to G protein-dependent pathways whereas  $\beta$ arrestins

contribution has been linked to the late phase. However, the kinetics observed for those receptors were different from the one detected herein for the  $\beta$ 1AR, the late phase peaking at much longer times than 4 minutes. Consistent with this difference, a  $\beta$ arrestin dominant negative mutant and cellular depletion of  $\beta$ arrestins by siRNAs failed to inhibit the isoproterenol-, bucindolol- and propranolol-stimulated ERK1/2 indicating that  $\beta$ arrestin is not involved in the  $\beta$ 1AR-promoted MAPK activation. This may not be surprising given the lower affinity of  $\beta$ arrestins for the  $\beta$ 1AR compared to the  $\beta$ 2AR which is known to activate ERK1/2 partly through  $\beta$ arrestin engagement (Azzi et al., 2003; Shenoy et al., 2006). The phase peaking at 4 minutes in our study was found to be Gi-dependent and most-likely corresponds to the G protein-dependent early phase observed in previous studies. Our results thus reveal the existence of an even earlier phase (peaking at 2 minutes) which is independent of both G proteins and  $\beta$ arrestin. This does not rule out the possibility that  $\beta$ 1AR could engage  $\beta$ arrestin-dependent ERK1/2 activation upon activation by different ligands. Indeed, in a recent study, Noma et al. (Noma et al., 2007) reported that the selective  $\beta$ 1AR agonist dobutamine can activate ERK1/2 in a  $\beta$ arrestin dependent manner further supporting the notion of ligand directed signaling.

Taken together our results clearly demonstrate the occurrence of functional selectivity of the  $\beta$ 1AR/ligand pairs not only towards the two signaling outputs studied (ie: AC and MAPK) but also between to distinct pathways converging on the same output (ie: MAPK). This implies that several distinct receptor conformations can be selectively promoted by the different ligand used. In line with this notion, BRET measured between the carboxyl tail of the  $\beta$ 1AR and either G $\alpha$ 11 or G $\gamma$ 2 revealed distinct conformational rearrangements of the receptor/G protein complex upon activation with the different ligands. Indeed the conformational rearrangement induced by isoproterenol could be readily distinguished from those promoted by either bucindolol or propranolol, the orientation of the BRET changes being opposite. Previous biophysical studies monitoring the fluorescent properties of intramolecular probes within purified receptors had already demonstrated that different

ligands can induce distinct conformations of the receptor (Ghanouni et al., 2001; Swaminath et al., 2005). Our findings extend such observation to living cells and start establishing correlation between specific conformational changes promoted by ligands and their ability to selectively engage distinct signaling pathways.

However, not all distinct conformational changes could be detected by the BRET biosensor used. Indeed, given that bucindolol and propranolol have opposite efficacy toward AC (being partial agonist and inverse agonist respectively), they are bound to promote distinct structural rearrangements of the receptor. Yet, this difference could not be detected, both ligands promoting a decrease in BRET between the receptor and the G protein subunits. This is not surprising when considering that BRET can only monitor the changes in distance between two specific points in the complex. Thus, the lack of difference in the ligand-promoted BRET changes only indicate that local conformational changes maybe shared by the ligands but does not allow to rule out the occurrence of different conformational rearrangement in spatially distinct domains of the receptor. The notion that subsets of discrete local conformational changes underlie the signaling profiles favoured by different ligands suggest that biosensors monitoring structural rearrangements from multiple view points should allow to precisely link specific local receptor conformations to a given signaling pathway.

**FIGURES LEGENDS:****Figure 1:**

Profile of the different ligands on the  $\beta$ 1AR adenylate cyclase and ERK1/2 pathways. cAMP accumulation experiments were performed in HEK293 cells stably expressing  $\beta$ 1AR. Emax were tested using 10 $\mu$ M of the indicated ligands, without (A) or with (B) 0,3  $\mu$ M of forskolin. Data represent the mean  $\pm$  S.E. of at least 3 experiments performed in triplicates. (C) Serum-starved HEK293 cells stably expressing  $\beta$ 1AR were stimulated at 37°C with 10 $\mu$ M of either isoproterenol (4 min), propranolol or bucindolol (2 min). Cells were then lysed in Laemmli sample buffer, subjected to SDS-PAGE and MAPK activity was detected by western blot using a phospho-specific anti-ERK1/2 antibody (p-ERK). Expression level of ERK1/2 was controlled using an antibody directed against the total kinase population (data not shown) and data expressed as a % pERK/ERK of the level observed in isoproterenol stimulated conditions. Data represent the mean  $\pm$  S.E. of at least three independent experiments.

**Figure 2:**

G $\alpha$ s is not involved in the ERK1/2 signaling cascades promoted by the three ligands. Serum-starved HEK293 cells stably expressing  $\beta$ 1AR were pretreated or not with Cholera Toxin (CTX, 300ng/mL) 16h, prior to stimulation at 37°C with 10 $\mu$ M of either isoproterenol (4 min), propranolol or bucindolol (2 min). ERK1/2 phosphorylation was detected and quantified as described in Fig.1C. Inset, Isoproterenol-induced cAMP production (top) and PKA substrates phosphorylation (bottom). Data represent the mean  $\pm$  S.E. of at least three independent experiments.

**Figure 3:**

Gi engagement is required for isoproterenol- but not bucindolol- and propranolol-stimulated ERK1/2 activity. (A) Serum-starved HEK293 cells stably expressing  $\beta$ 1AR or

the  $\delta$ opioid receptor (inset) were pretreated or not with Pertussis Toxin (PTX, 100ng/mL) 16h, prior to stimulation at 37°C with 10 $\mu$ M of either isoproterenol (4 min), propranolol or bucindolol (2 min), or Leu-Enkephalin (5 min). **(B)** BRET was measured in cells co-expressing G $\alpha$ 1-91hRluc and GFP10-G $\gamma$ 2, in the presence of untagged  $\beta$ 1AR and stimulated or not with 10  $\mu$ M of either isoproterenol (Iso), bucindolol (Buc) or propranol (Prop). Results are expressed as the difference in the BRET signal measured in the presence and the absence of the indicated ligands. Data represent the mean  $\pm$  S.E. of at least three independent experiments.

**Figure 4:**

G $\beta\gamma$  engagement is required for isoproterenol- but not bucindolol- and propranolol-stimulated ERK1/2 activity **(A)** Cells stably expressing  $\beta$ 1AR were co-transfected with eGFP-ERK2 and either CD8-GRK2Ctail (the dominant negative of G $\beta\gamma$ , +) or pcDNA3.1 (-), and serum-starved prior to activation at 37°C with 10 $\mu$ M of either isoproterenol (4min), propranolol or bucindolol (2 min). Expression of total and phosphorylated eGFP-ERK2 were detected and data expressed as a % eGFP-pERK/eGFP-ERK of the level observed in isoproterenol stimulated conditions **(B)** Serum-starved HEK293 cells stably expressing  $\beta$ 1AR were pretreated or not with Pertussis Toxin (PTX, 100ng/mL) 16h prior to stimulation at 37°C with 10 $\mu$ M of either isoproterenol, propranolol or bucindolol for the indicated time. Data represent the mean  $\pm$  S.E. of at least three independent experiments.

**Figure 5:**

$\beta$ -arrestin is not involved in the ERK1/2 signaling cascades promoted by the three ligands. **(A)** Cells stably expressing the  $\beta$ 1AR or the V2R (inset) were co-transfected with eGFP-ERK2 and either  $\beta$ -Arrestin1  $\Delta$ 318-419 (+) or pcDNA3.1 (-), and serum-starved prior to stimulation at 37°C with 10 $\mu$ M of either isoproterenol (4min), propranolol or bucindolol (2 min). **(B)** HEK 293 cells stably expressing  $\beta$ 1AR were transfected with siRNAs targeting both  $\beta$ arrestin isoforms or nonspecific siRNA (-), and serum-starved prior to stimulation at



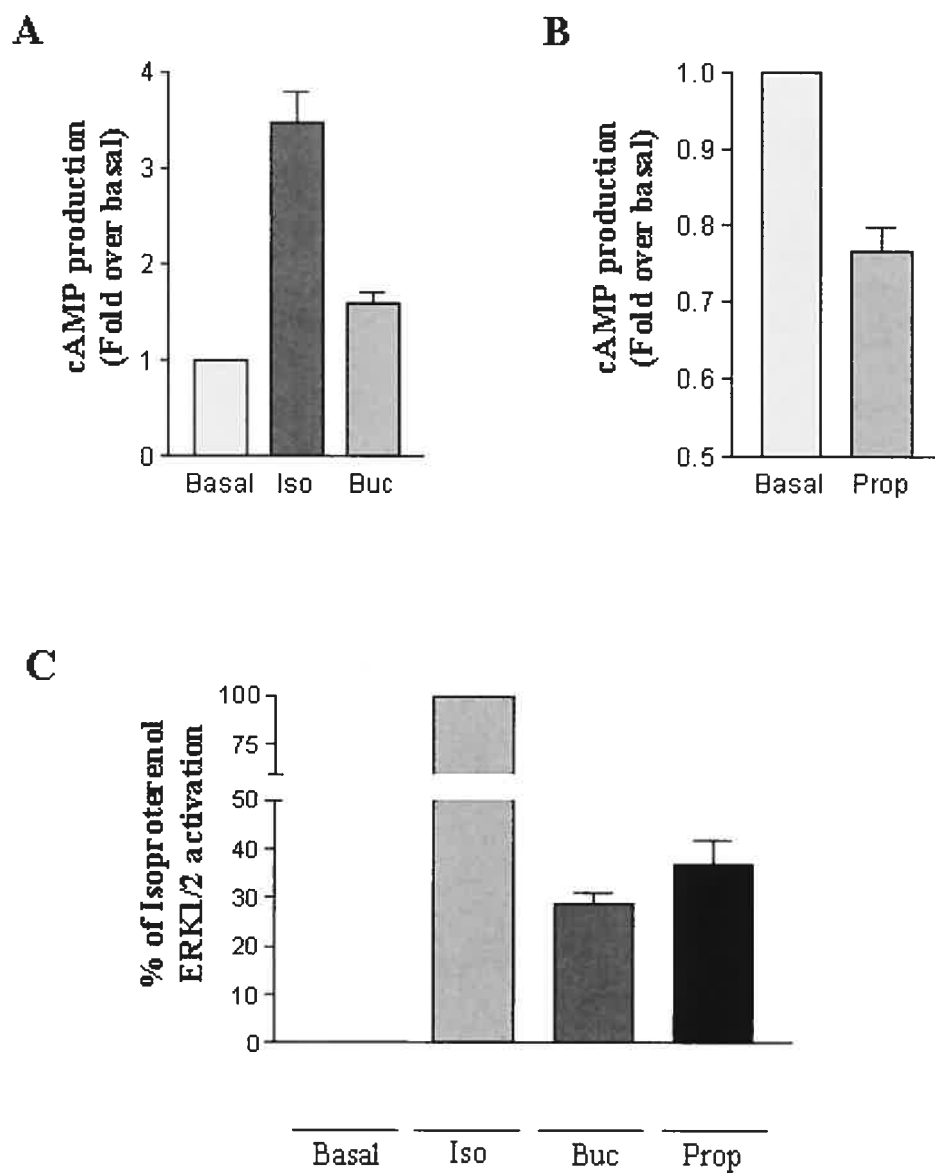
37°C with 10 $\mu$ M of either isoproterenol, propranolol or bucindolol.  $\beta$ arrestin knock-down was assessed by subjecting cell lysates to western blot using the anti- $\beta$ arrestin2 (H9) antibody recognizing both  $\beta$ arrestin isoforms (inset). Data represent the mean  $\pm$  S.E. of at least three independent experiments.

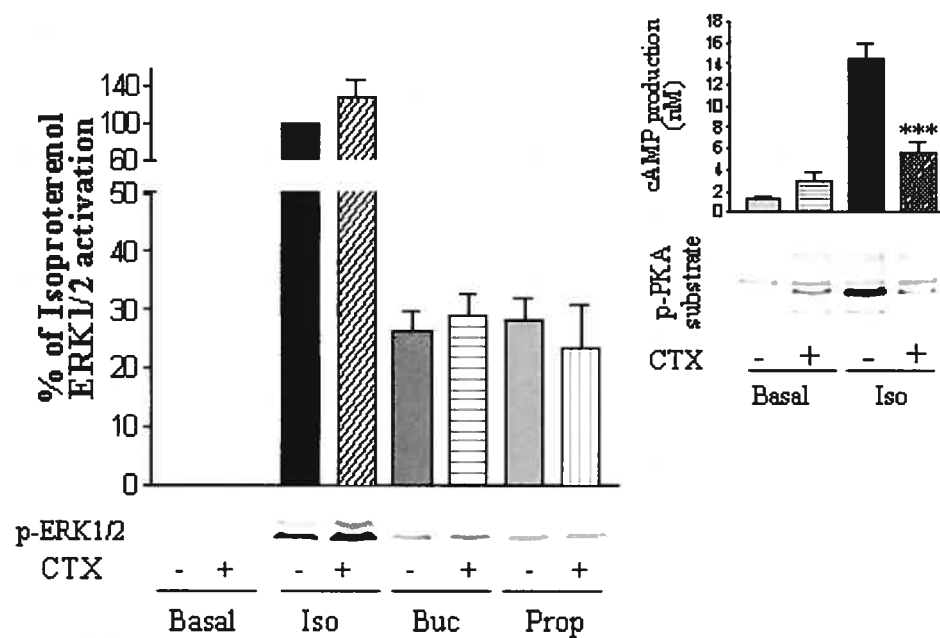
**Figure 6:**

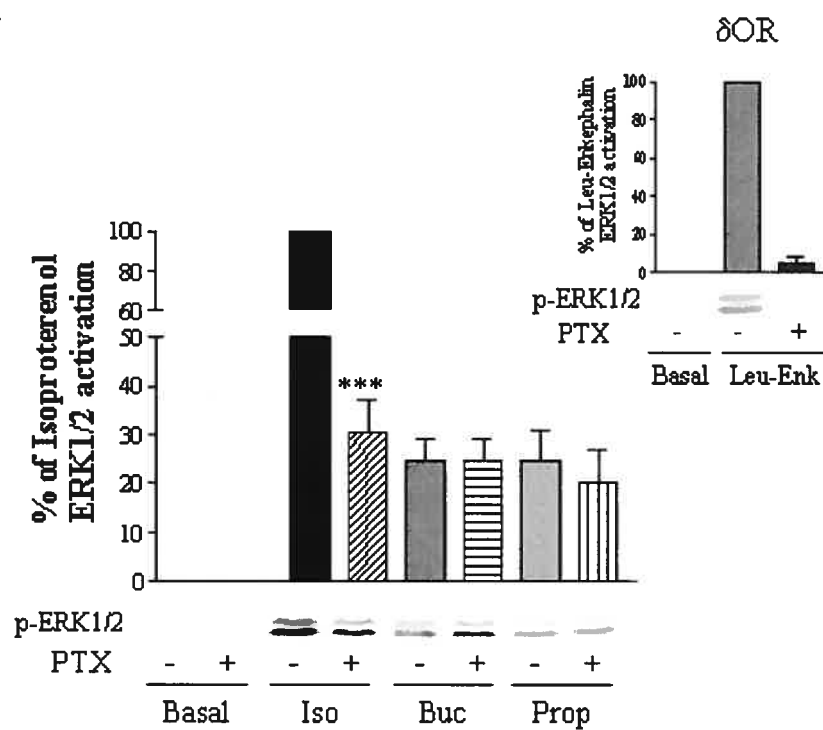
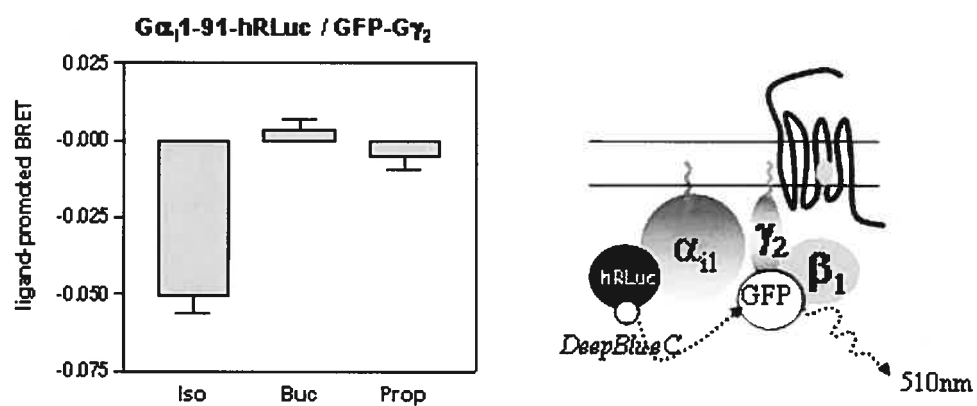
Src and MEK kinases are involved in the ERK1/2 signaling cascades promoted by the three ligands. Serum-starved HEK293 cells stably expressing the  $\beta$ 1AR were pretreated or not for 1h at 37°C with the Src inhibitor PP2 (10 $\mu$ M) (**A**), or with the MEK inhibitor PD98059 (50 $\mu$ M) (**B**) prior to stimulation with 10 $\mu$ M of either isoproterenol (4min), propranolol, or bucindolol (2 min), or EGF (insets). Data represent the mean  $\pm$  S.E. of at least three independent experiments.

**Figure 7:**

Linking receptor conformational changes to signaling efficacy. BRET was measured in cells co-expressing  $\beta$ 1AR-GFP10 with either GFP10-G $\gamma$ 2 (**A**) or G $\alpha$ i1-91hRluc (**B**), and stimulated or not with 10 $\mu$ M of either isoproterenol (Iso), bucindolol (Buc) or propranolol (Prop). Results are expressed as the difference in the BRET signal measured in the presence or absence of the indicated ligands. Data represent the mean  $\pm$  S.E. of at least three independent experiments.

Fig. 1:

**Fig. 2:**

**Fig. 3:****A****B**

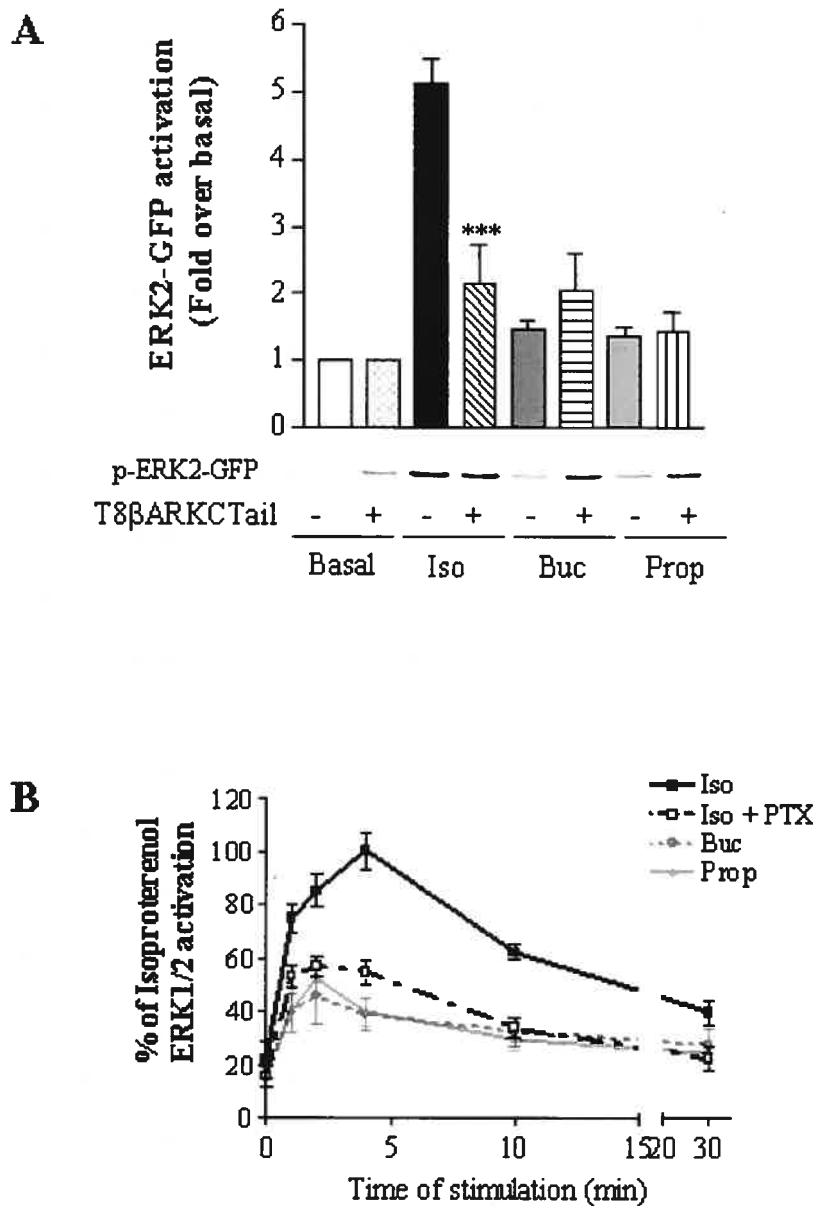
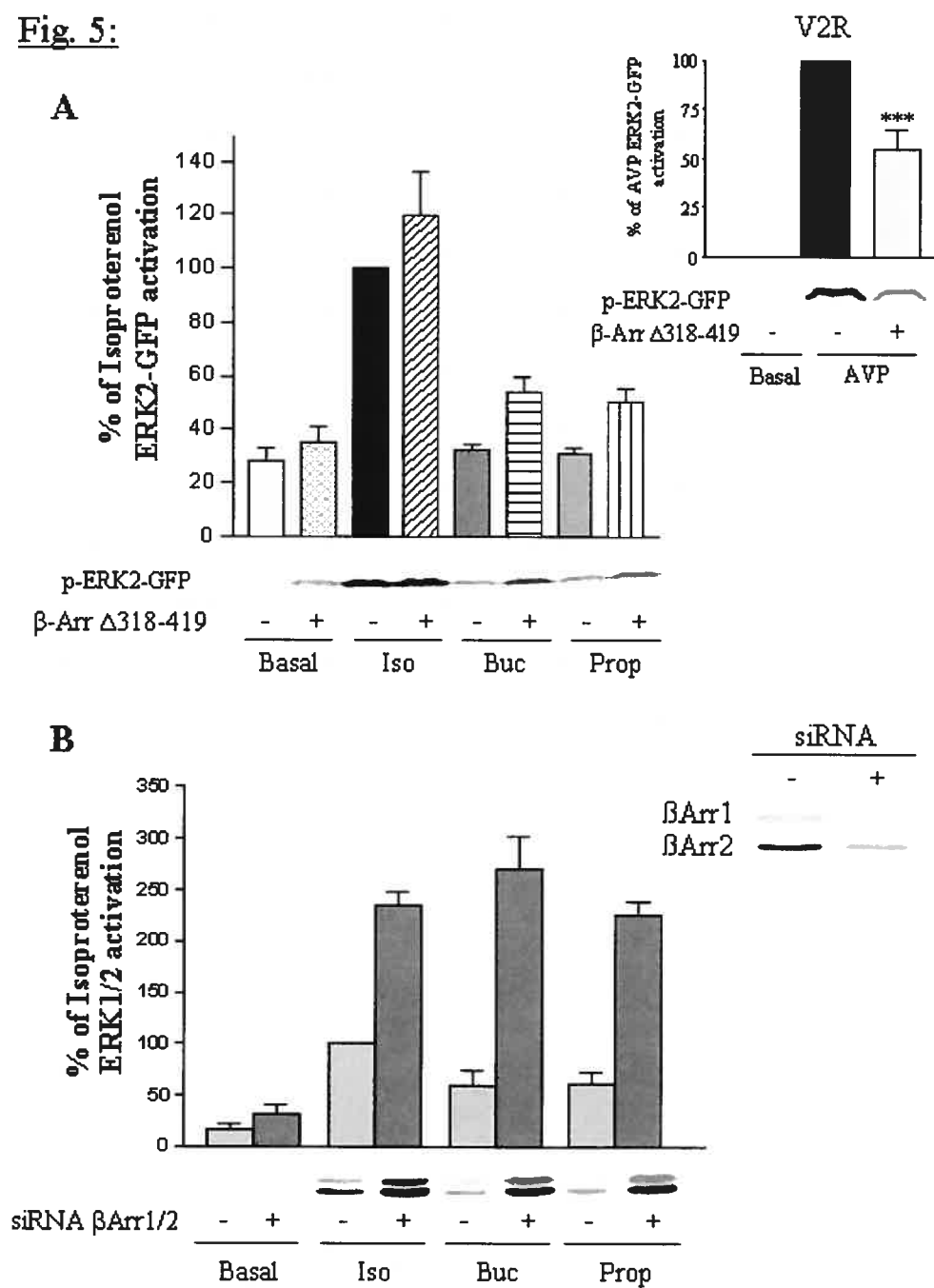
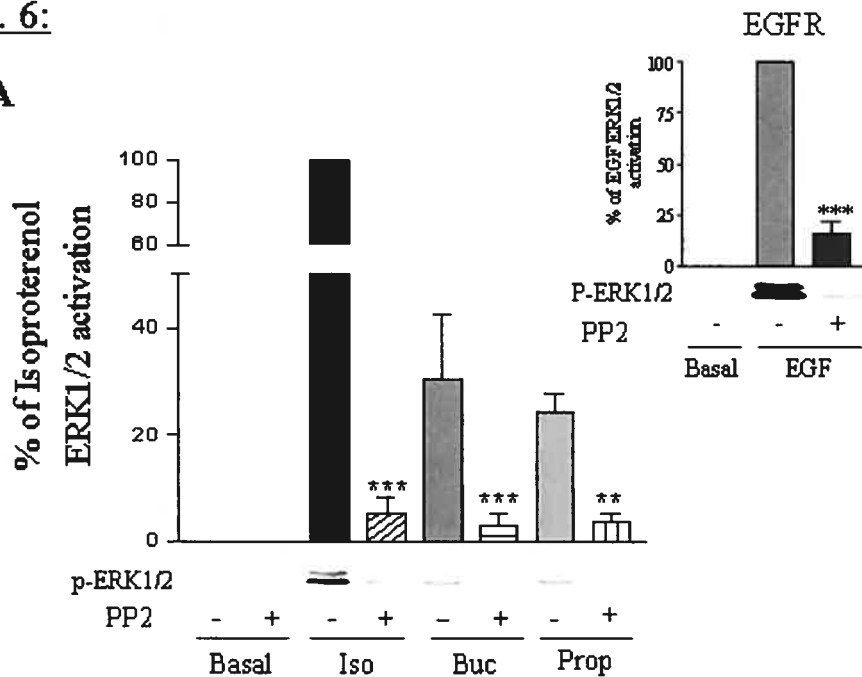
**Fig. 4:**

Fig. 5:



**Fig. 6:**

**A**



**B**

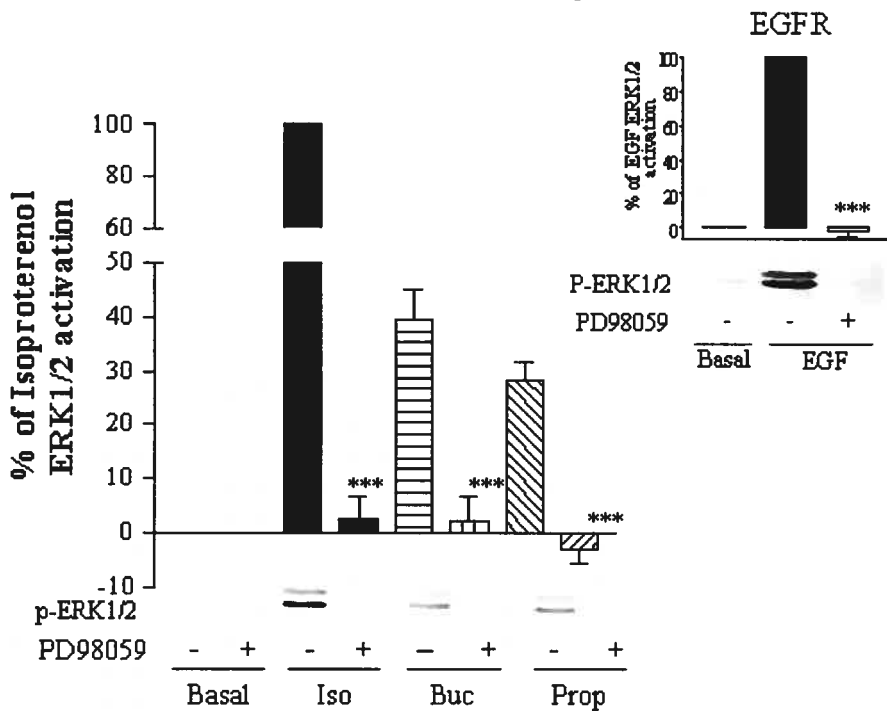
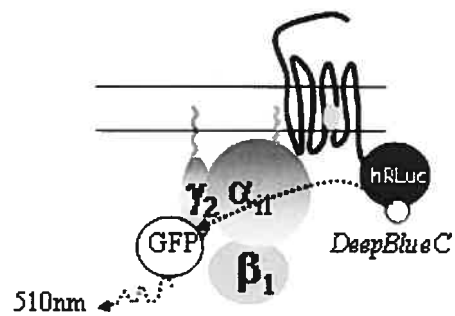
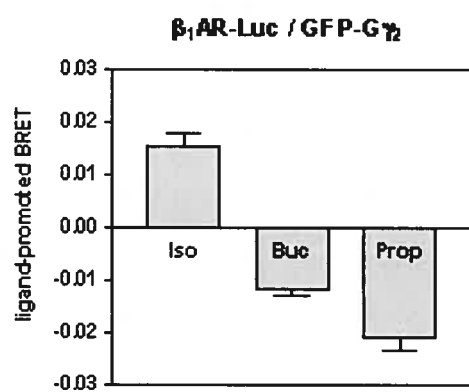
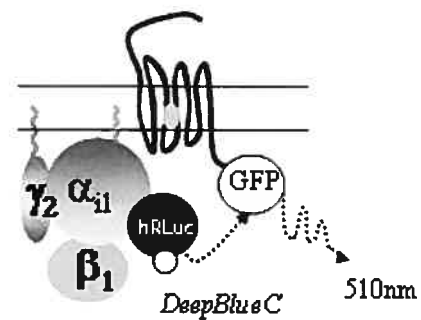
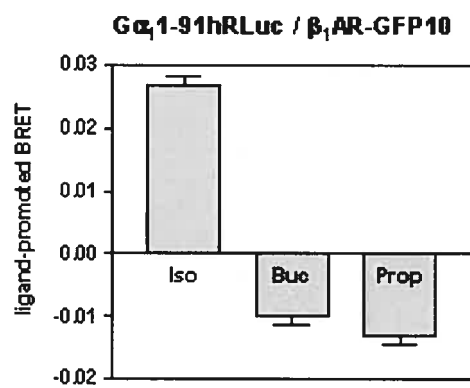


Fig. 7:

A



B





**REFERENCES:**

- Ahn S, Nelson CD, Garrison TR, Miller WE and Lefkowitz RJ (2003) Desensitization, internalization, and signaling functions of beta-arrestins demonstrated by RNA interference. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**(4):1740-1744.
- Ahn S, Shenoy SK, Wei H and Lefkowitz RJ (2004) Differential kinetic and spatial patterns of beta-arrestin and G protein-mediated ERK activation by the angiotensin II receptor. *The Journal of biological chemistry* **279**(34):35518-35525.
- Azzi M, Charest PG, Angers S, Rousseau G, Kohout T, Bouvier M and Pineyro G (2003) Beta-arrestin-mediated activation of MAPK by inverse agonists reveals distinct active conformations for G protein-coupled receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**(20):11406-11411.
- Balmain K and Cook SJ (1999) Sustained MAP kinase activation is required for the expression of cyclin D1, p21Cip1 and a subset of AP-1 proteins in CCL39 cells. *Oncogene* **18**(20):3085-3097.
- Bockaert J, Fagni L, Dumuis A and Marin P (2004) GPCR interacting proteins (GIP). *Pharmacology & therapeutics* **103**(3):203-221.
- Brady AE and Limbird LE (2002) G protein-coupled receptor interacting proteins: emerging roles in localization and signal transduction. *Cellular signalling* **14**(4):297-309.
- Bunemann M, Frank M and Lohse MJ (2003) Gi protein activation in intact cells involves subunit rearrangement rather than dissociation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**(26):16077-16082.
- Cao W, Luttrell LM, Medvedev AV, Pierce KL, Daniel KW, Dixon TM, Lefkowitz RJ and Collins S (2000) Direct binding of activated c-Src to the beta 3-adrenergic receptor is required for MAP kinase activation. *The Journal of biological chemistry* **275**(49):38131-38134.

- Charest PG, Oligny-Longpre G, Bonin H, Azzi M and Bouvier M (2007) The V2 vasopressin receptor stimulates ERK1/2 activity independently of heterotrimeric G protein signalling. *Cellular signalling* **19**(1):32-41.
- Cook SJ and McCormick F (1993) Inhibition by cAMP of Ras-dependent activation of Raf. *Science (New York, NY)* **262**(5136):1069-1072.
- Cook SJ and McCormick F (1996) Kinetic and biochemical correlation between sustained p44ERK1 (44 kDa extracellular signal-regulated kinase 1) activation and lysophosphatidic acid-stimulated DNA synthesis in Rat-1 cells. *The Biochemical journal* **320** ( Pt 1):237-245.
- Crespo P, Cachero TG, Xu N and Gutkind JS (1995) Dual effect of beta-adrenergic receptors on mitogen-activated protein kinase. Evidence for a beta gamma-dependent activation and a G alpha s-cAMP-mediated inhibition. *The Journal of biological chemistry* **270**(42):25259-25265.
- Crespo P, Xu N, Simonds WF and Gutkind JS (1994) Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein beta gamma subunits. *Nature* **369**(6479):418-420.
- Daaka Y, Luttrell LM and Lefkowitz RJ (1997) Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* **390**(6655):88-91.
- DeFea KA, Vaughn ZD, O'Bryan EM, Nishijima D, Dery O and Bunnett NW (2000a) The proliferative and antiapoptotic effects of substance P are facilitated by formation of a beta -arrestin-dependent scaffolding complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**(20):11086-11091.
- DeFea KA, Zalevsky J, Thoma MS, Dery O, Mullins RD and Bunnett NW (2000b) beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *The Journal of cell biology* **148**(6):1267-1281.

- Della Rocca GJ, van Biesen T, Daaka Y, Luttrell DK, Luttrell LM and Lefkowitz RJ (1997) Ras-dependent mitogen-activated protein kinase activation by G protein-coupled receptors. Convergence of Gi- and Gq-mediated pathways on calcium/calmodulin, Pyk2, and Src kinase. *The Journal of biological chemistry* **272**(31):19125-19132.
- Galandrin S and Bouvier M (2006) Distinct signaling profiles of beta1 and beta2 adrenergic receptor ligands toward adenylyl cyclase and mitogen-activated protein kinase reveals the pluridimensionality of efficacy. *Molecular pharmacology* **70**(5):1575-1584.
- Galandrin S, Oligny-Longpre G and Bouvier M (2007) The evasive nature of drug efficacy: implications for drug discovery. *Trends in pharmacological sciences* **28**(8):423-430.
- Gales C, Rebois RV, Hogue M, Trieu P, Breit A, Hebert TE and Bouvier M (2005) Real-time monitoring of receptor and G-protein interactions in living cells. *Nature methods* **2**(3):177-184.
- Gales C, Van Durm JJ, Schaak S, Pontier S, Percherancier Y, Audet M, Paris H and Bouvier M (2006) Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes. *Nature structural & molecular biology* **13**(9):778-786.
- Gesty-Palmer D, Chen M, Reiter E, Ahn S, Nelson CD, Wang S, Eckhardt AE, Cowan CL, Spurney RF, Luttrell LM and Lefkowitz RJ (2006) Distinct beta-arrestin- and G protein-dependent pathways for parathyroid hormone receptor-stimulated ERK1/2 activation. *The Journal of biological chemistry* **281**(16):10856-10864.
- Ghanouni P, Gryczynski Z, Steenhuis JJ, Lee TW, Farrens DL, Lakowicz JR and Kobilka BK (2001) Functionally different agonists induce distinct conformations in the G protein coupling domain of the beta 2 adrenergic receptor. *The Journal of biological chemistry* **276**(27):24433-24436.
- Grewal SS, Fass DM, Yao H, Ellig CL, Goodman RH and Stork PJ (2000) Calcium and cAMP signals differentially regulate cAMP-responsive element-binding protein

- function via a Rap1-extracellular signal-regulated kinase pathway. *The Journal of biological chemistry* **275**(44):34433-34441.
- Hermans E (2003) Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors. *Pharmacology & therapeutics* **99**(1):25-44.
- Houslay MD and Kolch W (2000) Cell-type specific integration of cross-talk between extracellular signal-regulated kinase and cAMP signaling. *Molecular pharmacology* **58**(4):659-668.
- Kenakin T (2007) Collateral efficacy in drug discovery: taking advantage of the good (allosteric) nature of 7TM receptors. *Trends in pharmacological sciences* **28**(8):407-415.
- Koch WJ, Hawes BE, Allen LF and Lefkowitz RJ (1994) Direct evidence that Gi-coupled receptor stimulation of mitogen-activated protein kinase is mediated by G beta gamma activation of p21ras. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**(26):12706-12710.
- Luttrell LM (2003) 'Location, location, location': activation and targeting of MAP kinases by G protein-coupled receptors. *Journal of molecular endocrinology* **30**(2):117-126.
- Luttrell LM, Ferguson SS, Daaka Y, Miller WE, Maudsley S, Della Rocca GJ, Lin F, Kawakatsu H, Owada K, Luttrell DK, Caron MG and Lefkowitz RJ (1999) Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science (New York, NY)* **283**(5402):655-661.
- Luttrell LM, Roudabush FL, Choy EW, Miller WE, Field ME, Pierce KL and Lefkowitz RJ (2001) Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**(5):2449-2454.
- Marinissen MJ and Gutkind JS (2001) G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends in pharmacological sciences* **22**(7):368-376.

- Martin NP, Whalen EJ, Zamah MA, Pierce KL and Lefkowitz RJ (2004) PKA-mediated phosphorylation of the beta1-adrenergic receptor promotes Gs/Gi switching. *Cellular signalling* **16**(12):1397-1403.
- McDonald PH, Chow CW, Miller WE, Laporte SA, Field ME, Lin FT, Davis RJ and Lefkowitz RJ (2000) Beta-arrestin 2: a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3. *Science (New York, NY)* **290**(5496):1574-1577.
- Meloche S, Seuwen K, Pages G and Pouyssegur J (1992) Biphasic and synergistic activation of p44mapk (ERK1) by growth factors: correlation between late phase activation and mitogenicity. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* **6**(5):845-854.
- Mercier JF, Salahpour A, Angers S, Breit A and Bouvier M (2002) Quantitative assessment of beta 1- and beta 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer. *The Journal of biological chemistry* **277**(47):44925-44931.
- Miller WE, Maudsley S, Ahn S, Khan KD, Luttrell LM and Lefkowitz RJ (2000) beta-arrestin1 interacts with the catalytic domain of the tyrosine kinase c-SRC. Role of beta-arrestin1-dependent targeting of c-SRC in receptor endocytosis. *The Journal of biological chemistry* **275**(15):11312-11319.
- Mischak H, Seitz T, Janosch P, Eulitz M, Steen H, Schellerer M, Philipp A and Kolch W (1996) Negative regulation of Raf-1 by phosphorylation of serine 621. *Molecular and cellular biology* **16**(10):5409-5418.
- Neves SR, Ram PT and Iyengar R (2002) G protein pathways. *Science (New York, NY)* **296**(5573):1636-1639.
- Nobles M, Benians A and Tinker A (2005) Heterotrimeric G proteins precouple with G protein-coupled receptors in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(51):18706-18711.
- Noma T, Lemaire A, Naga Prasad SV, Barki-Harrington L, Tilley DG, Chen J, Le Corvoisier P, Violin JD, Wei H, Lefkowitz RJ and Rockman HA (2007) Beta-

- arrestin-mediated beta1-adrenergic receptor transactivation of the EGFR confers cardioprotection. *The Journal of clinical investigation* **117**(9):2445-2458.
- Petaja-Repo UE, Hogue M, Laperriere A, Walker P and Bouvier M (2000) Export from the endoplasmic reticulum represents the limiting step in the maturation and cell surface expression of the human delta opioid receptor. *The Journal of biological chemistry* **275**(18):13727-13736.
- Reeves PJ, Thurmond RL and Khorana HG (1996) Structure and function in rhodopsin: high level expression of a synthetic bovine opsin gene and its mutants in stable mammalian cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**(21):11487-11492.
- Seidel MG, Klinger M, Freissmuth M and Holler C (1999) Activation of mitogen-activated protein kinase by the A(2A)-adenosine receptor via a rap1-dependent and via a p21(ras)-dependent pathway. *The Journal of biological chemistry* **274**(36):25833-25841.
- Shenoy SK, Drake MT, Nelson CD, Houtz DA, Xiao K, Madabushi S, Reiter E, Premont RT, Lichtarge O and Lefkowitz RJ (2006) beta-arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the beta2 adrenergic receptor. *The Journal of biological chemistry* **281**(2):1261-1273.
- Swaminath G, Deupi X, Lee TW, Zhu W, Thian FS, Kobilka TS and Kobilka B (2005) Probing the beta2 adrenoceptor binding site with catechol reveals differences in binding and activation by agonists and partial agonists. *The Journal of biological chemistry* **280**(23):22165-22171.
- Vossler MR, Yao H, York RD, Pan MG, Rim CS and Stork PJ (1997) cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-dependent pathway. *Cell* **89**(1):73-82.
- Wei H, Ahn S, Shenoy SK, Karnik SS, Hunyady L, Luttrell LM and Lefkowitz RJ (2003) Independent beta-arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *Proceedings of the*

*National Academy of Sciences of the United States of America* **100**(19):10782-10787.

Wetzker R and Bohmer FD (2003) Transactivation joins multiple tracks to the ERK/MAPK cascade. *Nature reviews* **4**(8):651-657.

Wu J, Dent P, Jelinek T, Wolfman A, Weber MJ and Sturgill TW (1993) Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3',5'-monophosphate. *Science (New York, NY)* **262**(5136):1065-1069.

## **4. DISCUSSION**



La signalisation cellulaire via les RCPGs a fait l'objet, ces dernières décennies, d'un grand nombre d'études, et est apparue de plus en plus complexe, arborant une immense diversité initialement sous estimée. Ainsi, par exemple, le récepteur a été décrit originellement comme une entité en équilibre entre un mode « on » et un mode « off » dans lequel un ligand induit une conformation active ou inactive du récepteur, activant ou inhibant la voie de signalisation dépendante des protéines G. Désormais, un nombre grandissant d'études a mis en évidence qu'il n'existe pas uniquement deux états conformationnels de ce récepteur mais une multitude de conformations.

D'autre part, la vision simple et linéaire de la signalisation via les RCPGs qui considère un ligand liant le récepteur, puis induisant l'activation d'une protéine G qui va à son tour activer une cascade de signalisation a évolué pour un modèle plus complexe, mettant en évidence la pléiotropie des récepteurs. En effet, le récepteur peut se coupler à plusieurs protéines G, de nature différente, mais aussi à d'autres protéines ayant des propriétés régulatrices ou pouvant elles aussi induire leur signalisation (cf Fig. 18).

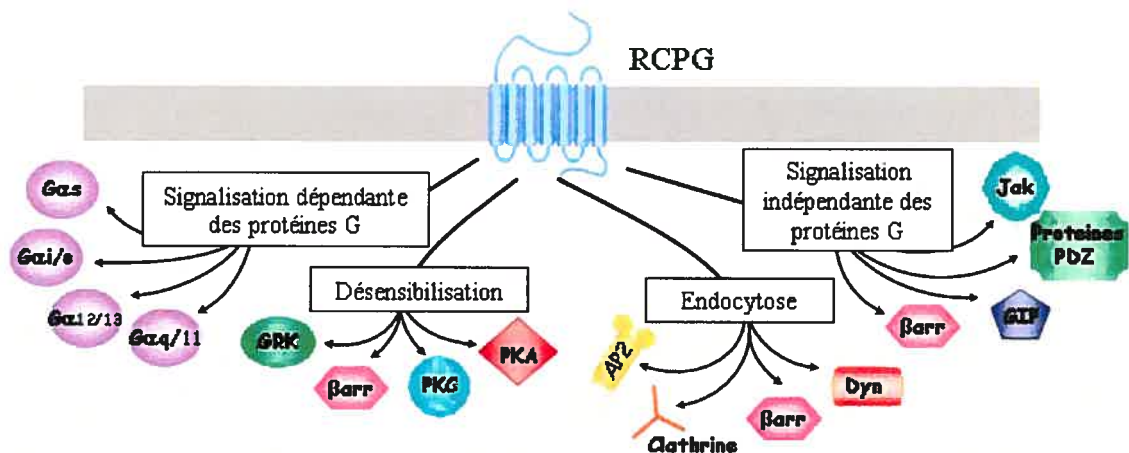


Fig. 18 : Pléiotropie de signalisation des RCPG

C'est dans ce contexte de diversité signalétique que nous avons voulu nous intéresser à l'efficacité des ligands des RCPG. Ainsi, en prenant comme modèle les récepteurs  $\beta_1$ AR et  $\beta_2$ AR, les travaux présentés dans cette thèse ont permis d'éclairer plusieurs points concernant cette notion d'efficacité pour les RCPG.

Lors de la première étude, en testant l'efficacité d'un panel de ligands  $\beta$ adrénergiques sur deux voies de signalisations activées par le  $\beta_1$ AR et le  $\beta_2$ AR nous avons pu révéler des ligands aux profils signalétiques divers pouvant être agonistes pour les deux voies de signalisation, agonistes inverses pour ces deux voies ou encore agoniste pour une voie mais agoniste inverse pour l'autre. Ainsi, l'efficacité s'est révélée comme un paramètre pluridimensionnel, qui doit tenir compte des différentes fonctionnalités du récepteur. D'autre part cette étude nous a aussi permis de repenser la notion de sélectivité d'un ligand envers un sous-type. En effet, celle-ci doit être appréciée au-delà de l'affinité du ligand pour le récepteur et doit être définie en considérant non seulement le couple ligand/récepteur mais aussi le système effecteur.

Lors de la deuxième étude, en analysant les déterminants moléculaires à l'origine de la stimulation de la voie ERK1/2 par le  $\beta_1$ AR par trois ligands à l'activité biaisée, nous avons pu révéler un caractère supplémentaire dans la complexité de l'efficacité des ligands aux RCPGs, à savoir la pluralité des effecteurs à l'origine de la stimulation d'une même cascade de signalisation, et nous avons pu relier cette pluralité avec la pluralité des conformations adoptées par le récepteur.

### **L'efficacité biaisée :**

L'efficacité des ligands aux RCPG a fait l'objet, cette dernière décennie d'un grand nombre d'études (cf §1.3.3). Les premières observations sur l'efficacité « biaisée » ont été réalisées sur des ligands présentant des efficacités distinctes envers deux voies de

signalisation, un agoniste pouvant être agoniste partiel pour une voie mais antagoniste pour une autre. Ainsi, par exemple, Jarpe et al., qui sont à l'origine de l'appellation "agoniste biaisé" ont observé que le ligand [D-Arg<sup>1</sup>,D-Phe<sup>5</sup>,D-Trp<sup>7,9</sup>,Leu<sup>11</sup>] substance P, classiquement décrit comme un antagoniste (car capable de bloquer la mobilisation de Ca<sup>2+</sup> par les neuropeptides) possède des activités agonistes. En effet, il peut activer c-JNK dans des fibroblastes de type Swiss3T3, et peut stimuler la migration et l'influx de calcium dans des neutrophiles humains (Jarpe *et al.*, 1998). Ces phénomènes peuvent cependant aisément s'expliquer par une différence de contexte cellulaire : concentration en effecteur non suffisante pour la stimulation de la voie (phénomène de récepteurs de réserve) et ne requièrent pas nécessairement la présence de conformations distinctes afin d'induire ces efficacités distinctes : une même conformation peut mener à l'activation de deux voies de signalisation, l'une pouvant subir une amplification plus forte en comparaison à l'autre. Les ligands peuvent donc posséder une activité biaisée, dépendante du contexte cellulaire dans lequel le récepteur se trouve. Lors de notre première étude, il est intéressant de noter que la majorité des ligands ont présenté une activité biaisée, c'est à dire une efficacité différente entre les deux voies de signalisation testées, à savoir la voie MAPK et la voie ERK1/2. Aussi, une des deux voies peut se trouver dans un état de "récepteur de réserve" et il devient donc nécessaire de définir le contexte cellulaire dans lequel l'efficacité des composés est testée. Toutefois, nous avons aussi observé des inversions dans les ordres d'efficacités entre différents ligands ou encore des inversions dans les ordres de puissances entre ces mêmes ligands. Ainsi, par exemple, pour le récepteur  $\beta_2$ AR l'ordre de puissance des composés envers la voie AC est le suivant : prop>iso=lab>carv=buc alors qu'il devient buc>carv=prop=lab>iso envers la voie ERK1/2. Ces observations ne peuvent être réconciliées avec un modèle à deux états. Il existe donc deux types d'activité biaisée des ligands, celle provenant du contexte cellulaire et celle, issue de conformations distinctes du récepteur.

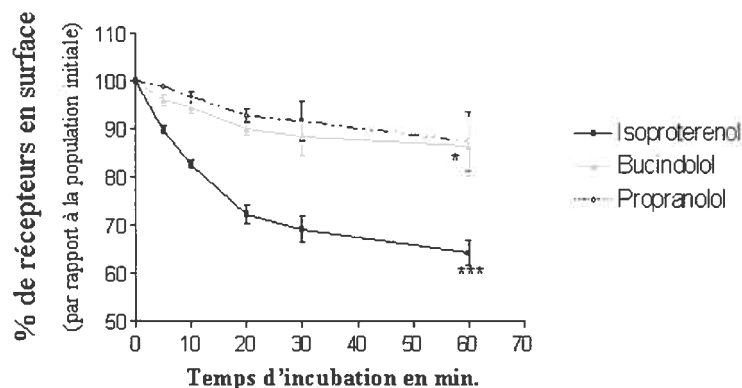
### **L'efficacité, un paramètre pluridimensionnel.**

Les nombreuses observations pharmacologiques des dix dernières années portant sur l'efficacité des ligands aux RCPG ont permis de repenser cette notion : l'efficacité n'est pas un paramètre unilatéral mais peut varier selon la fonctionnalité du récepteur considérée, pouvant même être opposée. Avec la multitude de voies de signalisations mais aussi de propriétés régulatrices des RCPG, l'efficacité d'un ligand peut désormais être considérée comme pluridimensionnelle comme mis en évidence dans notre première étude. L'utilisation d'une représentation cartésienne, où chaque axe est porteur d'une fonctionnalité du récepteur, et chaque quadrant porteur d'un profil signalétique d'efficacité, nous a permis de mettre en exergue cette pluralité de l'efficacité des ligands aux RCPG. En testant les ligands sur deux voies de signalisation modulées par les récepteurs  $\beta_1$ AR et  $\beta_2$ AR, nous avons pu révéler des ligands présentant trois profils d'efficacité distincts (sur les quatre envisageables) : composés agonistes sur la voie de l'AC et sur la voie des ERK1/2; composés agonistes inverses sur la voie de l'AMPc mais agonistes sur la voie des ERK1/2 et enfin, composés agonistes inverses sur les deux voies de signalisation. Les récepteurs doivent donc pouvoir adopter au moins trois conformations différentes afin de transmettre ces signalisations distinctes. Il apparaît toutefois simpliste de penser qu'uniquement trois profils d'efficacité différents existent mais au contraire aisément envisageable de spéculer que le test d'un plus grand nombre de composés sur les nombreuses fonctionnalités des récepteurs  $\beta$ ARs permettrait certainement l'obtention d'un plus grand nombre de profils signalétiques, reliés à des conformations différentes. En effet, comme nous avons pu le constater dans la section introduction (cf § 1.4.3), la signalisation via les récepteurs  $\beta_1$ AR et  $\beta_2$ AR est riche : ces récepteurs peuvent stimuler une grande variété d'effecteurs tels que les protéines Gs ou Gi menant à la régulation de la voie de l'AC mais aussi de la voie ERK1/2. Ils peuvent aussi interagir avec des protéines telles que la  $\beta$ arrestine, et Src (dans le cas du  $\beta_2$ AR) afin de moduler la voie ERK1/2. Le récepteur  $\beta_2$ AR peut aussi engager NHERF afin de réguler les canaux NH3E. Enfin, un très grand

nombre de processus ont été identifiés comme assurant la régulation des récepteurs  $\beta$ ARs (désensibilisation, internalisation, régulation négative), faisant intervenir une multitude de protéines d'interaction (Cf §1.4.3.4 & tableau III). Or, dans la majorité des cas, c'est en réponse à l'agoniste traditionnel du récepteur que l'étude de ces différentes fonctionnalités s'est effectuée et l'on peut ainsi s'attendre à ce que le test d'autres ligands révèlent de nouveaux profils signalétiques, reflets de la pluridimensionalité de l'efficacité mais aussi de la pluralité des conformations.

Au cours de nos travaux, nous nous sommes alors aussi intéressé à l'effet que peuvent avoir l'isoproterenol, le bucindolol et le propranolol, trois ligands  $\beta$ adrénergiques, sur une autre fonctionnalité du récepteur  $\beta_1$ AR : l'internalisation. Classiquement, l'internalisation est étroitement liée avec l'activation de la voie classique du récepteur (cf § 1.2.2.2). Ainsi, selon ce modèle, seuls l'isoproterenol et le bucindolol (respectivement agoniste et agoniste partiel sur la voie de l'AC), suite à l'activation de la voie classique de l'adénylate cyclase, pourraient d'induire l'internalisation du récepteur. Pourtant les trois composés (dont le propranolol, agoniste inverse pour la voie AC) semblent capables de mener à l'endocytose des récepteurs (cf Fig 19). Cette internalisation n'atteint que 12% environ en réponse à une incubation d'une heure au bucindolol et au propranolol mais est significative ( $p < 0,05$ ). L'internalisation est donc faible mais semble néanmoins confirmer la capacité de certains composés, décrits comme agonistes inverses pour la voie classique, à induire l'endocytose. Ainsi, par exemple, deux antagonistes du récepteur PTH, PTH(7-34) et PTH(7-84), dépourvus de propriétés activatrices peuvent cependant induire l'endocytose du récepteur (Sneddon *et al.*, 2003). Ce phénomène a récemment été dénommé « efficacité collatérale » par T. Kenakin (cf §1.3.3.3) en opposition à une efficacité linéaire pour laquelle l'occupation du récepteur mène à son activation et à l'activation de toutes les fonctionnalités : phosphorylation, désensibilisation, recrutement de la  $\beta$ arrestine, et finalement internalisation du récepteur. Dans notre cas, le propranolol possède bien une

efficacité collatérale, la stimulation de la voie classique n'étant pas un prérequis pour l'induction de l'internalisation du récepteur.



**Fig. 19 : Cinétique d'internalisation du récepteur  $\beta_1$ AR** en réponse à l'isoproterenol, au bucindolol et au propranolol. Les cellules HEK293, exprimant de manière stable le récepteur humain  $\beta_1$ AR étiqueté HA ont été incubées à 37°C, avec une concentration saturante de ligand pendant les temps indiqués. Après arrêt de la réaction à 4°C puis fixation des cellules, la population de récepteur en surface a ensuite été détectée par ELISA (pour protocole cf Terrillon and Bouvier EMBO Journal 2004). \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  d'après un *Dunnett's test*.

L'analyse de l'ensemble des composés testés dans la première étude sur ces trois fonctionnalités du récepteur (voie AC, voie ERK1/2 et internalisation) pourrait alors nous permettre de révéler jusqu'à huit profils signalétiques différents pouvant figurer dans une représentation cartésienne à trois dimensions,  $n=3$ .

De façon purement combinatoire, tester un très grand nombre de composés sur  $n$  fonctionnalités du récepteur permettrait l'observation de  $2^n$  profils signalétiques distincts

correspondant à un minimum de 2<sup>n</sup> conformations différentes du récepteur. Cependant, il est à noter que, lors de nos travaux, aucun composé n'a été trouvé comme agoniste inverse au niveau de la voie MAPK et agoniste au niveau de la voie AC. D'autre part, dans la littérature, de nombreux agonistes des RCPG ont été testés pour leur action sur la voie ERK1/2, et à ma connaissance, aucun n'a été, à ce jour trouvé comme ayant une activité agoniste inverse pour cette voie. Le test d'un plus grand nombre de composés aurait peut-être pu permettre de découvrir un ligand ayant ce profil d'efficacité mais il est aussi probable que cette observation soit le reflet d'une réalité. En effet, une des hypothèses expliquant cette observation pourrait provenir de l'intégration des signaux de signalisation au sein de la cellule. Pour certains RCPG, la stimulation de la voie des ERK1/2 résulte de plusieurs cascades de signalisation (cf 1.2.1.4) et la voie traditionnelle est souvent une des voies menant à la modulation des ERKs. Ainsi, l'activité agoniste d'un composé pour cette voie traditionnelle se répercutera sur l'activité du composé envers la voie ERK1/2, ce qui pourrait expliquer une plus grande rareté de composés activateurs de la voie traditionnelle mais inhibiteurs de la voie ERK1/2. C'est le cas pour la majorité des récepteurs couplés à Gq, dont l'activation mène à la phosphorylation des ERK1/2 via l'activation de la PLC. Toutefois, il est à noter que la voie de l'adénylate cyclase, dans certains isolats cellulaires, a un effet inhibiteur sur la voie des ERK (cf § 1.2.1.4), ce qui semble d'ailleurs être le cas au sein de l'isolat cellulaire utilisé dans nos deux études. En effet, un traitement long à la CTX (décrit comme inhibant Gs) des cellules surexprimant le récepteur  $\beta_1$ AR semble avoir un effet potentiateur sur la voie ERK1/2 (cf Article n°2, Fig.2). L'observation de composés activateurs envers la voie AC mais inhibiteurs envers la voie ERK1/2 apparaît donc pourtant envisageable, mais de manière amusante on notera que ces composés ne seront pas dénommés agonistes inverses pour la voie des ERK1/2 mais bien « agonistes » car leur activité provient d'un effet agoniste envers la protéine Gs. Nous percevons alors, au travers de cet exemple, la difficulté d'interprétation de l'efficacité mais aussi la difficulté de nomenclature des ligands lorsque les déterminants signalétiques analysés se trouvent loin en aval du récepteur, et par là même sont modulés par de multiples composantes.

**La pluralité des effecteurs menant à la modulation d'une même voie de signalisation.**

L'analyse de seconds messagers plus proximaux du récepteur permet alors une analyse plus exhaustive. C'est ce que nous avons tenté de faire lors de la deuxième étude. Nous avons analysé les déterminants moléculaires nécessaires à l'activation par le  $\beta_1$ AR de la voie des ERK1/2 par trois composés activant cette voie mais aux profils signalétiques distincts : l'isoproterenol (agoniste total pour la voie AC et la voie ERK1/2), le bucindolol (agoniste partiel pour les deux voies de signalisation) et le propranolol (agoniste inverse pour la voie de l'adénylate cyclase mais agoniste partiel pour la voie des ERK1/2). L'isoproterenol et le bucindolol, au regard de leur seule activité sur la voie MAPK et AC peuvent être décrits comme ayant une efficacité similaire (positive), pouvant provenir d'un mode « on » / « off » du récepteur : positive sur les deux voies. Pourtant, l'activation de la voie ERK1/2 par l'isoproterenol est sensible à la PTX, et donc requiert  $G_i$  alors que l'activation de cette même voie par le bucindolol est insensible à la PTX et donc indépendante de  $G_i$ . Ainsi, l'analyse d'un effecteur plus proximal tel que  $G_i$  nous a permis d'identifier des efficacités de l'isoproterenol et du bucindolol distinctes envers ces deux effecteurs : l'isoproterenol est agoniste envers  $G_i$  alors que le bucindolol est antagoniste, au même titre que le propranolol. Toutefois, une seule et même conformation pourrait être à l'origine de ces engagements différents, le bucindolol induisant/stabilisant dans une proportion moindre la même conformation que celle induite/stabilisée par l'isoproterenol. En effet, aucune inversion d'efficacité n'est observée : ordre d'efficacité envers la voie adénylate cyclase (supposée  $G_s$ ) : Iso>Buc>Prop et envers  $G_i$  Iso>Buc=Prop. Il aurait alors été intéressant de tester un nombre plus important de ligands afin de pouvoir éventuellement observer une telle inversion. En testant plusieurs composés du récepteur CB1 pour leur activité envers les différents sous-types de protéines  $G_i$ , Mukhopadhyay et Howlett ont pu observer une telle inversion d'efficacité envers des effecteurs proximaux du



récepteur. En effet, alors que le composé desacetyllevonantradol est agoniste envers  $G_{i1}$  et  $G_{i2}$ , mais agoniste inverse envers  $G_{i3}$ , un autre composé, le *R*)-methanandamide se comporte comme agoniste inverse envers les protéines  $G_{i1}$  and  $G_{i2}$ , et comme agoniste envers  $G_{i3}$  (Mukhopadhyay and Howlett, 2005). Ces résultats ne peuvent pas être réconciliés avec un modèle à deux états et doivent considérer le récepteur comme pouvant adopter plusieurs conformations.

Même si l'ensemble des résultats de notre première étude (Cf §3.1), dans le même veine qu'un certain nombre d'autres études sur l'efficacité des ligands, démontrent clairement la nécessité d'une pluralité des conformations, nous percevons aussi la nécessité de tester de nombreux composés, sur différentes voies de signalisation, ou sur différents effecteurs afin de démontrer cette pluralité. Cependant, l'analyse conformationnelle directe, par des méthodes biophysiques a permis de façon claire de démontrer ces changements conformationnels adoptés par les RCPG (cf §1.3.4) et nous avons pu, dans la seconde étude, en cellules vivantes, établir clairement le lien entre ces conformations et l'activité biaisée des composés pour la voie MAPK.

### **La multitude de conformations des RCPGs**

Les résultats présentés dans ces deux études sont donc en accord avec les modèles théoriques développés par Kenakin selon lesquels une multitude de conformations du récepteur peuvent exister (cf §1.3.2). Dans ces modèles, la multitude de conformations est directement dépendante de la diversité de ligands pouvant se lier sur le récepteur, et de la propension du récepteur, une fois lié, à interagir avec les protéines G (cf Fig 13). Il est désormais possible de considérer aussi l'interaction avec les nombreuses autres protéines décrites comme pouvant induire leur propre signalisation ou des propriétés régulatrices (cf Fig.18). Ainsi, pour les récepteurs  $\beta$ AR, nous avons vu par exemple qu'il existait une grande diversité de molécules effectrices autres que la classique protéine hétérotrimérique

Gs capables d'induire une signalisation (cf §1.2.1.3). Ainsi, par exemple, en cellules HEK293, il a été démontré que l'isoproterenol peut activer la voie des MAPK dépendante du récepteur  $\beta_2$ AR de façon dépendante des G, mais aussi de façon indépendante, via l'action de la  $\beta$ arrestine (Azzi *et al.*, 2003; Shenoy *et al.*, 2006b), alors que le propranolol active cette voie via l'action de la  $\beta$ arrestine uniquement (Azzi *et al.*, 2003). Récemment il a aussi été proposé que Src puisse mener à l'activation des ERK1/2 par l'isoproterenol. Pour le récepteur  $\beta_1$ AR, nous avons vu que la protéine  $G_i$  pouvait interagir avec le récepteur et mener à l'activation de la voie ERK1/2. D'autre part, il existe aussi une voie indépendante des protéines G qui peut aussi mener à cette activation. Il faudrait donc considérer l'affinité des récepteurs liés aux différents ligands non seulement envers Gs, mais aussi envers ces autres protéines, ie  $G_i$ , la  $\beta$ arrestine, et Src. Et cela paraît encore réducteur à la vue du grand nombre de protéines d'interaction identifiées pour ces récepteurs (cf Tableau III). Un nouveau modèle pourrait alors inclure un paramètre afin de considérer ces affinités des RCPG liés aux ligands pour ces nombreuses protéines d'interaction.

D'un point de vue structural, on imagine alors que la conformation du récepteur lié au ligand entraîne certaines contraintes structurales / microconformations locales dans les régions intracellulaires du récepteur, qui sont à l'origine de ces différences d'affinité avec les protéines cytosoliques, ce qui implique une transmission conformationnelle intracellulaire. Il y a alors induction de conformations nouvelles par les ligands. Mais on peut aussi voir une transmission conformationnelle extracellulaire, à savoir les protéines intracellulaires déjà présentes à proximité du récepteur imposent des contraintes structurales / microconformations locales, au niveau des régions extracellulaires, qui sont à l'origine de différences d'affinité des ligands pour certaines conformations. Il y a alors stabilisation de conformations pré-existantes.

Est-ce qu'il y a stabilisation par les ligands de conformations déjà existantes au sein de la cellule ou bien induction de nouvelles conformations? Il est tout à fait concevable que les deux mécanismes puissent avoir lieu.

*La pré-existence des certaines conformations, stabilisées par les ligands.*

Au sein d'une grande complexité signalétique, une certaine organisation doit exister afin que les RCPGs puissent transcrire les signaux avec rapidité et efficacité. Un modèle membranaire de mosaïque fluide (Singer and Nicolson, 1972), dans lequel le récepteur flotterait et rencontrerait de manière aléatoire les molécules de signalisation membranaires ou cytoplasmiques est difficilement envisageable. Des structures organisationnelles ou une certaine compartimentation semblent en effet nécessaires. Récemment, de nombreuses études ont mis au jour de telles structures. Elles peuvent être obtenues via l'oligomérisation des récepteurs (Terrillon and Bouvier, 2004): les récepteurs rhodopsine apparaissent par exemple arrangés à la membranaire en colonnes serrées de dimères de récepteurs (Fotiadis *et al.*, 2003). Les microdomaines lipidiques de type « raft » (radeaux lipidiques) ont aussi été décrits comme pouvant permettre la formation de complexes en créant une plate-forme d'attachement des protéines. A la surface des cellules cardiaques, on retrouverait ainsi des îlots de récepteurs  $\beta_1$ AR, qui colocalisent avec la caveoline, marqueur protéique de ces microdomaines (Ianoul *et al.*, 2005). Des protéines d'échafaudage ou d'ancrage, telles que la  $\beta$ arrestine ou AKAP permettent aussi la formation de complexes signalétiques, à l'origine d'une compartimentation de la transduction du signal. Aussi, par exemple, le récepteur  $\beta_2$ AR peut interagir dans les endosomes avec un complexe signalétique qui comprend la  $\beta$ arrestine, Src et l'EGFR et qui permet la signalisation de la voie ERK1/2 (Maudsley *et al.*, 2000; Luttrell *et al.*, 2001; Luttrell *et al.*, 1999a). Ce même récepteur peut interagir avec un autre complexe protéique, formé par les protéines AKAP de type AKAP79 et AKAP250/Gravin. AKAP79 pouvant interagir avec de façon simultanée avec

PKA, PKC et la phosphatase PP2-B. D'autre part, de plus en plus d'études mettent en évidence le pré-assemblage des RCPGs avec leurs partenaires signalétiques (Rebois and Hebert, 2003). Récemment, l'utilisation des techniques de transfert d'énergie par résonance a permis l'observation d'un précouplage entre le récepteur et certains effecteurs. Par exemple, le récepteur  $\beta_2$ AR a été décrit comme pouvant faire partie d'un signalosome comprenant le récepteur ainsi que l'ACII et les canaux potassium Kir3.1; ce signalosome étant formé très tôt, dès la biosynthèse des protéines (Lavine *et al.*, 2002; Dupre and Hebert, 2006). Les RCPGs pourraient aussi être pré-assemblés avec les classiques protéines G hétérotrimériques. En effet, différentes études de RET ont démontré qu'à l'état basal, les RCPGs sont pré-couplés de façon sélective avec leur protéine G de prédilection (Nobles *et al.*, 2005; Gales *et al.*, 2006; Ayoub *et al.*, 2007). En testant, dans notre deuxième étude l'effet de trois ligands sur l'interaction récepteur/sous-unité  $G_{i1}$  et récepteur/sous-unité  $G_{\gamma 2}$ , nous avons pu tester ces changements conformationnels au sein de ce pré-complexe. Alors que l'isoproterenol augmente le BRET ratio récepteur/ $G_{i1}$  et récepteur/ $G_{\gamma 2}$ , le bucindolol et le propranolol diminuent ces BRET ratio. Au regard de ces seuls résultats, on ne peut démontrer que le propranolol et le bucindolol induisent/stabilisent des changements structuraux différents ou identiques. Par contre, l'opposition observée dans les ratio de BRET entre l'isoproterenol et le bucindolol ou le propranolol ne peut être expliqué qu'en considérant deux changements conformationnels distincts au sein de ce pré-complexe.

En considérant le nombre de pré-complexes, ou de protéines décrites pour interagir avec le récepteur, nous percevons alors qu'il est difficilement imaginable du point de vue de l'encombrement stérique que toutes ces protéines (effectrices ou régulatrices) ou ces pré-complexes signalétiques puissent s'associer en même temps à un unique récepteur.

Différentes populations de récepteurs, correspondant à différents complexes protéiques doivent donc pouvoir exister au sein d'une même cellule. Ainsi, par exemple, si une partie des récepteurs  $\beta_1$ AR pourrait se retrouver dans les microdomaines de type raft, cette répartition ne représenterait que 15 à 20% de la population totale de récepteurs de la

cellule cardiaque. La localisation différentielle des récepteurs a été démontrée dans certains cas comme impliquant des molécules signalétiques distinctes. Ainsi, par exemple, en testant l'impact de la localisation du récepteur de l'ocytocine (OTR), Rimoldi V et al. ont observé que les protéines nécessaires à la transactivation de l'EGFR et à l'activation des ERK1/2 par le récepteur ne sont pas les mêmes lorsque le récepteur est localisé à l'intérieur ou à l'extérieur des caveolae. Cette différence de profil signalétique mène alors à une activation temporelle de la voie ERK1/2, et à des réponses cellulaires distinctes entre les deux populations. Les récepteurs situés au sein des caveolae induisent une activation transitoire des ERK et stimulent la croissance cellulaire alors que les récepteurs en dehors de ces microdomaines induisent une activation des ERK plus longue et inhibent la croissance cellulaire. Toutefois, au sein de cette étude, l'utilisation de récepteurs fusionnés avec la caveoline afin d'induire une localisation au sein des microdomaines peut aussi perturber la structure du récepteur OTR, changeant ainsi son affinité envers les différents effecteurs intracellulaires. (Rimoldi *et al.*, 2003)

Au sein de ces complexes, la conformation des récepteurs est très certainement influencée par des interactions moléculaires qui sont dépendantes des protéines présentes au sein du complexe, mais aussi de l'environnement lipidique. Il est donc probable que des conformations différentes d'un même récepteur pré-existent et co-existent au sein d'une cellule. Les récents travaux de Sun Y. et al portant sur l'activation des ERK1/2 par le  $\beta_2$ AR peuvent corroborer cette hypothèse. En effet, dans leur étude, Sun Y. et al observent une courbe dose-réponse à l'agoniste à deux phases qui est le fruit de deux mécanismes différents d'activation de la voie ERK1/2. La protéine Gs est responsable de la première phase (qui correspond à de faibles doses d'agoniste) alors que Src est nécessaire pour la deuxième phase de la réponse (qui correspond à de fortes doses d'agoniste) (Sun *et al.*, 2007). Ces observations pourraient être expliquées par l'existence de deux conformations distinctes du récepteur  $\beta_2$ AR : une conformation compatible avec un couplage à Gs et une autre pouvant lier et activer Src mais non compatible avec les protéines G. Dans cette étude, Src étant couplé de façon constitutive avec le récepteur, il est fort probable que ces

deux conformations correspondent à des complexes protéiques distincts. Toutefois, d'autres mécanismes, impliquant une seule population de récepteurs peuvent également expliquer ces observations. En effet, si la quantité de certaines molécules signalétiques de la composante Gs n'est pas suffisante, l'activation maximale possible des ERK ne pourra être atteinte, menant ainsi à un décalage de la courbe dose-réponse dépendante de Gs vers la gauche (une concentration plus faible d'isoproterenol est requise pour atteindre la stimulation maximale), alors que la courbe dose-réponse dépendante de Src ne sera pas affectée (quantité en molécules signalétiques suffisantes). De ce fait, une courbe dose-réponse à deux phases sera observée. Un autre mécanisme pourrait se baser sur la dimérisation des récepteurs. En effet, si l'on suppose l'existence des récepteurs  $\beta_2$ AR sous forme dimérique, il se peut que l'occupation d'un seul des deux sites de liaison du ligand (concentrations faibles) mène à une conformation du dimère ayant une forte affinité pour Gs, mais une faible affinité pour Src. Par contre, l'occupation des deux sites (fortes concentrations) mènera à une conformation du dimère ayant une forte affinité à la fois pour Gs et pour Src.

Lors de notre première étude, nous n'avons pas obtenu de courbe dose-réponse à l'isoproterenol biphasique (cf Article 1, Fig. 4B). Toutefois, il est possible que la technique de quantification de la phosphorylation des ERK1/2 utilisée ne soit pas assez précise pour nous permettre une telle observation. Il est aussi probable que l'isoproterenol puisse avoir la même propension à activer la voie dépendante de Gi et la voie dépendante de Src.

Il n'est donc pas exclu que l'activation des ERK1/2 par le  $\beta_1$ AR observée dans nos travaux puisse provenir de deux populations distinctes de récepteurs : une population couplée à Gi et une autre population couplée directement ou indirectement à Src.

Etant donné la variation des profils d'expression protéiques d'un tissu cellulaire à l'autre, la composition des complexes protéiques est très certainement différente. Les conformations d'un récepteur  $\beta_2$ AR exprimé au niveau du cœur pourraient être alors distinctes de celles de ce même récepteur exprimé au niveau des poumons.

### *L'induction par les ligands de nouvelles conformations.*

Il a aussi été observé que la liaison de l'agoniste entraîne des modifications structurales des récepteurs (Kobilka and Deupi, 2007). Imaginer un récepteur comme une structure figée, au sein de laquelle l'agoniste se fixe (telle une clé dans une serrure) paraît réducteur étant donné la grande plasticité structurale adoptées par les protéines. De nombreuses évidences biophysiques sur le récepteur  $\beta_2$ AR purifié et marqué avec une sonde fluorescente suggèrent plutôt que la liaison de l'agoniste et l'activation du récepteur requièrent une série d'intermédiaires conformationnels du récepteur. La transition entre ces différents états intermédiaires nécessite la rupture de certaines interactions intramoléculaires non covalentes étant à l'origine de la stabilisation de l'« état basal » du récepteur. Ainsi, la liaison de ligands structurellement différents pourrait mener à des ruptures différentes de ces interactions moléculaires, entraînant des conformations distinctes du récepteur, ces conformations pouvant mener à des propriétés signalétiques ou régulatrices distinctes ((Ghanouni *et al.*, 2001c;Ghanouni *et al.*, 2001a), (Yao *et al.*, 2006), (Swaminath *et al.*, 2004;Swaminath *et al.*, 2005b). Ces études biophysiques ont toutefois été réalisées sur un récepteur purifié, hors de son contexte protéique naturel, et de ce fait ne peuvent exclure un mécanisme double, à savoir, l'induction de nouvelles conformations mais aussi la stabilisation de conformations pré-existantes.

### **La sélectivité des ligands, au-delà de l'affinité :**

Couramment, la sélectivité d'un composé est basée sur la propension de celui-ci à se lier de façon sélective sur un récepteur. Ainsi, un composé est décrit comme sélectif pour un sous-type de récepteur si son affinité envers ce sous-type est supérieure à celle envers les autres sous-types. Un composé affin est alors supposé mettre le récepteur considéré dans un mode « on » (agoniste) ou « off » (antagoniste) pour toutes ses propriétés signalétiques ou régulatrices. Toutefois, nous avons vu par exemple, lors de la première étude que le

carvedilol, qui possède la même affinité envers le récepteur  $\beta_1$ AR et le récepteur  $\beta_2$ AR, et qui est ainsi classiquement décrit comme composé non sélectif, module différemment la voie AC et la voie ERK1/2 induites par ces récepteurs. En effet, le carvedilol se comporte comme agoniste partiel sur la voie AC stimulée par le  $\beta_1$ AR ( $EC_{50}=273\text{nM}$ ) mais est antagoniste neutre, sur cette même voie modulée par le  $\beta_2$ AR ( $EC_{50}>10000\text{nM}$ ). D'autre part, il active de façon moins puissante la voie ERK1/2 modulée par le  $\beta_1$ AR que celle modulée par le  $\beta_2$ AR (74nM versus 0.95nM). Ainsi, malgré sa définition de composé non sélectif, le carvedilol apparaît sélectionner certaines fonctionnalités du récepteur : il sélectionne la voie AC modulée par le  $\beta_1$ AR et la voie MAPK modulée par le  $\beta_2$ AR.

Ainsi, la sélectivité envers un sous-type de récepteur devrait donc être déterminée pour chaque voie de signalisation pouvant être engagée par le récepteur considéré. On parlera alors de sélectivité fonctionnelle.

Cette sélectivité peut même être encore plus complexe puisque nous avons observé dans le deuxième article que cette sélection pouvait aussi avoir lieu au niveau des mécanismes engagés pour stimuler une même voie de signalisation. Ainsi, pour le récepteur  $\beta_1$ AR, le bucindolol et le propranolol « sélectionnent » la voie dépendante de Src afin de stimuler la phosphorylation ERK1/2 alors que l'isoproterenol engage à la fois la voie dépendante de Src et la voie dépendante de Gi. Or, de nombreuses études ont démontré que les cinétiques d'activation différentes pour les voies dépendantes des protéines G et les voies indépendantes des protéines G. Ainsi par exemple, le récepteur Ghrelin est capable de stimuler la voie des ERK1/2 par trois cascades de signalisation distinctes : la première impliquant les  $\beta$ arrestines1 et 2, Src et Raf1, la deuxième implique Gq/11, PKC $\alpha\beta$  et Src et, enfin, la troisième nécessite Gi/o, la PI3K, PKC $\epsilon$  et Src. Et ces trois voies possèdent des cinétiques d'activation différentes (Camina *et al.*, 2007). De manière similaire, le groupe de Lefkowitz a observé que pour les récepteurs  $AT_{1A}R$ ,  $\beta_2$ AR et PTHR, l'activation de la voie ERK1/2 dépendante de la  $\beta$ arrestine est lente et soutenue dans le temps alors que la stimulation dépendante des protéines G est rapide et transitoire (Shenoy *et al.*, 2006b,



Gesty-Palmer *et al.*, 2006, Wei *et al.*, 2003). Et de manière intéressante, certains ligands des récepteurs AT<sub>1A</sub>R et PTH peuvent « sélectionner » une cinétique d'activation (cf §1.3.3.3). En analysant les cinétiques d'activation par l'isoproterenol et le bucindolol de la voie ERK1/2, nous avons pu constater que le maximum de stimulation n'est pas identique pour les deux composés. La stimulation dépendante de Gi est plus lente que celle dépendante de Src. (Cf article 2, Fig. 4B). En conséquence, un composé pourra sélectionner une cinétique d'activation, et par là même donc avoir une sélectivité temporelle

D'autre part, si l'on considère, au sein d'une même cellule ou dans divers tissus cellulaires, qu'il puisse exister des populations distinctes de récepteurs ayant des conformations différentes; il est concevable qu'un composé puisse sélectionner une population par rapport à une autre. On peut alors imaginer aussi une sélectivité spatiale des composés.

Ainsi, nous percevons clairement que l'efficacité d'un composé doit être considérée comme qualitative en plus d'être quantitative. En sélectionnant une propriété fonctionnelle, de manière spatio-temporelle, un ligand possède sa propre « texture » d'efficacité. Les ligands ayant cette capacité de sélection ont été dénommés « ligands biaisés ». Or, si l'on considère chaque ligand comme induisant/stabilisant une conformation unique, on peut alors percevoir ce terme comme un pléonasme.

Il apparaît évident que cette sélectivité fonctionnelle, spatiale et temporelle des composés pourrait être amplement exploitée dans le traitement de nombreuses pathologies.

Toutefois, bien que les études sur l'efficacité des ligands en système hétérologue apportent une information riche, permettant le développement de nouveaux concepts, plus de connaissances sur les liens entre cette « sélectivité fonctionnelle » observée dans ces systèmes hétérologues et la relevance physiologique de ces observations permettraient

de pouvoir tirer pleinement profit de cette capacité de sélection des ligands des RCPG. De façon intéressante, Rajagopal et al ont démontré, dans des cardiomyocytes isolés de rat, que l'effet inotrope observé suite à l'activation du récepteur  $AT_{1A}R$  par l'angiotensine II proviendrait de l'action de GRK6 et de la  $\beta$ arrestine mais serait indépendant de Gq et de PKC. De plus SII [(Sar(1), Ile(4), Ile(8)] angiotensine, un ligand à l'activité biaisée (Wei *et al.*, 2003) serait capable de sélectionner cette voie dépendante de la  $\beta$ arrestine, et par là même de sélectionner l'effet inotrope (Rajagopal *et al.*, 2006). Ces résultats permettent ainsi d'appréhender l'effet physiologique potentiel que pourraient posséder certains ligands.

En ce qui concerne les récepteurs modèles de notre étude, il a récemment été démontré pour le récepteur  $\beta_1AR$  que la  $\beta$ arrestine serait à l'origine de la transactivation de l'EGFR et de la stimulation des ERK, *in vitro* (cellules HEK293) et *in vivo* (cœur de souris) et cette transactivation mènerait à une cardioprotection (Noma *et al.*, 2007) Même si dans notre isolat cellulaire, la  $\beta$ arrestine semble ne pas être impliquée pour la stimulation de la voie ERK1/2 par nos trois composés, il serait toutefois intéressant de tester l'effet de certains composés à l'activité biaisée comme le propranolol sur cet effet cardioprotecteur.

Ainsi, l'utilisation d'un ligand sélectionnant certaines propriétés fonctionnelles pourrait aider à minimiser les effets secondaires putatifs souvent attribués aux médicaments. Ainsi, par exemple, certains agonistes  $\beta$ -adrénergiques utilisés dans le traitement de l'asthme possèdent également des propriétés stimulatrices cardiaques non désirées (Salpeter *et al.*, 2004) et inversement, la prise de  $\beta$ -bloqueurs dans les cas d'hypertension n'est pas recommandée pour des personnes souffrant de maladies respiratoires (Antonelli-Incalzi and Pedone, 2007). L'utilisation de composés plus sélectifs envers une propriété des récepteurs  $\beta ARs$  serait certainement profitable.

Cette sélectivité fonctionnelle pourrait aussi expliquer des effets thérapeutiques inattendus de certains médicaments. Le cas des  $\beta$ bloqueurs dans le traitement de la

défaillance cardiaque est en ce sens pertinent. Durant cette pathologie, une surstimulation du système adrénergique est observée, menant à des mécanismes adaptatifs (ie il a par exemple été observé une régulation négative des récepteurs  $\beta_1$ AR et un changement de couplage des récepteurs  $\beta_2$ AR de Gs à Gi). Ainsi, dans les cas de défaillance cardiaque, une diminution des fonctions contractiles (force et taux de contraction) du myocarde est observée et il est nécessaire de restaurer cette capacité de contraction. Paradoxalement, les médicaments utilisés dans le traitement de cette pathologie sont des  $\beta$ bloqueurs, c'est-à-dire des composés diminuant la contraction cardiaque induite par les catécholamines circulantes. A la vue de l'ensemble de nos travaux, de nombreuses hypothèses pourraient être avancées afin d'expliquer l'action bénéfique de ces composés. En effet, la sélectivité de ces composés envers certaines fonctionnalités des récepteurs  $\beta$ ARs bénéfiques dans le cas d'une la défaillance cardiaque est très certainement à l'origine de leur efficacité thérapeutique : un composé capable de stimuler la voie Gi (via le récepteur  $\beta_2$ AR) par rapport à la voie Gs, sera supposé avoir un effet anti-apoptotique décrit comme bénéfique sur les cellules cardiaques, notamment dans les cas de défaillance. Aussi, l'effet distinct des composés sur l'internalisation peut être intéressant afin de rétablir le niveau de récepteur  $\beta_1$ AR, connu pour être fortement diminué dans cette pathologie.

Les exemples comme ceux décrits ci-dessus foisonnent dans le domaine pharmaceutique. L'utilisation d'un composé dénué d'effets secondaires, ou dont l'activité pourrait être accrue en ciblant l'activation d'une seule voie de signalisation, ou en séparant réponse fonctionnelle et régulation du récepteur apparaît profitable. D'autre part, il est intéressant de noter que des composés ciblant les récepteurs  $\beta$ ARs, avec une efficacité et une sélectivité supposées identiques ne possèdent pas les mêmes effets secondaires ou les mêmes effets thérapeutiques. Il est certes probable que ces effets différentiels puissent provenir des propriétés pharmacocinétiques des composés (solubilité, demi-vie, voie

d'excrétion, etc.), mais il est aussi possible qu'une partie de ces effets réside dans des propriétés non initialement repérées, provenant de la « sélectivité ».

Pourtant, lors de cribles de molécules à visée thérapeutique, seule une voie de signalisation modulée par le récepteur considéré est analysée, le plus souvent la voie classique stimulée par le récepteur, ou une voie artificielle, « forcée » par un couplage avec une protéine mutante ou ubiquitaire telle la protéine G $\alpha$ 16 (Kostenis, 2001). De tels cribles masqueront alors la richesse de texture de certains ligands. Ainsi, lorsque l'on connaît l'effet thérapeutique recherché, il devient intéressant de décortiquer la voie signalétique ou la fonctionnalité à l'origine de cet effet. Un crible des composés sur cette voie cible révélera alors des composés porteurs de cet effet thérapeutique. Cependant, dans de nombreux cas, les cribles ne recherchent pas nécessairement des composés pour une pathologie donnée mais recherchent des composés « affin ». Pourtant, nous avons vu que la richesse d'un ligand ne réside pas dans son affinité (bien qu'indispensable) mais dans sa capacité à sélectionner certaines fonctionnalités. Au regard de l'ensemble de cette discussion, il apparaît clairement que l'obtention d'un profil d'efficacité d'une banque de composé pour toutes les fonctionnalités d'un récepteur donné est un véritable tonneau des Danaïdes. Certains cribles, en « multiplexing », basés sur des tests conformationnels du récepteur pourraient toutefois permettre l'obtention d'une quantité de données suffisantes afin d'avoir une information éclairée sur la « texture » d'un composé. Ainsi, l'utilisation de tests conformationnels tels que ceux utilisés lors de notre deuxième étude, à savoir les changements conformationnels monitorés par BRET au sein du complexe récepteur/sous-unités de protéines G pourraient être bénéfiques. On peut aussi imaginer la création de tests similaires au sein des autres pré-complexes (récepteur/AKAP; récepteur/adénylate cyclase; récepteur/caveoline). Ainsi, le nombre de conformations distinctes du récepteur possiblement détectable sera directement dépendant du nombre de tests effectués. De la même manière, l'utilisation de cribles en « multiplexing » pour différentes fonctionnalités des RCPG pourrait permettre de lier de manière directe certaines observations pré-cliniques

avec une fonctionnalité donnée. Ainsi, des tests tels que le recrutement de la  $\beta$ arrestine, le changement conformationnel de celle-ci, l'interaction entre la  $\beta$ arrestine et AP2, l'activation des biosenseurs EPAC, ou Src, etc. permettraient de dévoiler la richesse des composés. Toutefois, les différences de cinétiques d'activation de ces différentes fonctionnalités peuvent être un obstacle pour la création d'un crible en « multiplexing ». Un test conformationnel paraît alors plus avantageux étant donné que les changements structuraux sont observés dans les secondes suivant l'activation du récepteur, et il sera aussi possible de relier un changement structural donné avec un profil pré-clinique.

L'utilisation de programmes informatiques pertinents permettant l'interprétation de l'ensemble des données recueillies et permettant éventuellement de croiser ces données avec d'autres résultats pré-cliniques, cliniques ou épidémiologiques sera certainement la clé du succès pour l'obtention des médicaments du futur (Howe *et al.*, 2007).

## 5. CONCLUSION

L'homme a une certaine propension pour la simplicité : c'est blanc, c'est noir ; le récepteur est actif, le récepteur est inactif. Pourtant, nous avons pu percevoir au cours de cette thèse la complexité avec laquelle les RCPGs transmettent l'information au sein de la cellule. Cette complexité se retrouve à tous les niveaux de la cascade de transduction : grande diversité de stimuli pouvant activer les récepteurs (photons, ions, petits peptides, phospholipides, glycoprotéines...), grande variété de récepteurs (plus de 950 RCPGs attendus d'après le génome humain), multitude de conformations adoptées, grand nombre de voies de signalisations pouvant être induites, nombreux systèmes régulant cette signalisation intracellulaire. Et il vraisemblable que le développement de nouvelles techniques permettra l'observation d'une complexité encore plus grande.

Considérer cette complexité et l'exploiter, notamment par l'intermédiaire de ligands sélectionnant une fonctionnalité du récepteur permettra très certainement l'obtention de médicaments possédant une spécificité et une efficacité thérapeutique accrue.

## Bibliographie

Adams SR, Harootunian A T, Buechler Y J, Taylor S S and Tsien R Y (1991) Fluorescence Ratio Imaging of Cyclic AMP in Single Cells. *Nature* **349**: pp 694-697.

Adan RA and Kas M J (2003) Inverse Agonism Gains Weight. *Trends Pharmacol Sci* **24**: pp 315-321.

Ahn S, Shenoy S K, Wei H and Lefkowitz R J (2004) Differential Kinetic and Spatial Patterns of Beta-Arrestin and G Protein-Mediated ERK Activation by the Angiotensin II Receptor. *J Biol Chem* **279**: pp 35518-35525.

Anger T, Zhang W and Mende U (2004) Differential Contribution of GTPase Activation and Effector Antagonism to the Inhibitory Effect of RGS Proteins on Gq-Mediated Signaling in Vivo. *J Biol Chem* **279**: pp 3906-3915.

Angers S, Salahpour A, Joly E, Hilaiet S, Chelsky D, Dennis M and Bouvier M (2000) Detection of Beta 2-Adrenergic Receptor Dimerization in Living Cells Using Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET). *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: pp 3684-3689.

Antonelli-Incalzi R and Pedone C (2007) Respiratory Effects of Beta-Adrenergic Receptor Blockers. *Curr Med Chem* **14**: pp 1121-1128.

Ariens EJ (1954) Affinity and Intrinsic Activity in the Theory of Competitive Inhibition. I. Problems and Theory. *Arch Int Pharmacodyn Ther* **99**: pp 32-49.

Audet N, Paquin-Gobeil M, Landry-Paquet O, Schiller P W and Pineyro G (2005) Internalization and Src Activity Regulate the Time Course of ERK Activation by Delta Opioid Receptor Ligands. *J Biol Chem* **280**: pp 7808-7816.

Ayoub MA, Maurel D, Binet V, Fink M, Prezeau L, Ansanay H and Pin J P (2007) Real-Time Analysis of Agonist-Induced Activation of Protease-Activated Receptor 1/Galphai1

Protein Complex Measured by Bioluminescence Resonance Energy Transfer in Living Cells. *Mol Pharmacol* **71**: pp 1329-1340.

Azzi M, Charest P G, Angers S, Rousseau G, Kohout T, Bouvier M and Pineyro G (2003) Beta-Arrestin-Mediated Activation of MAPK by Inverse Agonists Reveals Distinct Active Conformations for G Protein-Coupled Receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: pp 11406-11411.

Baker JG, Hall I P and Hill S J (2003) Agonist and Inverse Agonist Actions of Beta-Blockers at the Human Beta 2-Adrenoceptor Provide Evidence for Agonist-Directed Signaling. *Mol Pharmacol* **64**: pp 1357-1369.

Ballesteros JA, Shi L, Javitch JA.(2001) Structural mimicry in G protein-coupled receptors: implications of the high-resolution structure of rhodopsin for structure-function analysis of rhodopsin-like receptors *Mol Pharmacol* **60**(1):1-19

Baltensperger K, Karoor V, Paul H, Ruoho A, Czech M P and Malbon C C (1996) The Beta-Adrenergic Receptor Is a Substrate for the Insulin Receptor Tyrosine Kinase. *J Biol Chem* **271**: pp 1061-1064.

Barthet G, Framery B, Gaven F, Pellissier L, Reiter E, Claeysen S, Bockaert J and Dumuis A (2007) 5-Hydroxytryptamine 4 Receptor Activation of the Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathway Depends on Src Activation but Not on G Protein or Beta-Arrestin Signaling. *Mol Biol Cell* **18**: pp 1979-1991.

Beaulieu JM, Sotnikova T D, Marion S, Lefkowitz R J, Gainetdinov R R and Caron M G (2005) An Akt/Beta-Arrestin 2/PP2A Signaling Complex Mediates Dopaminergic Neurotransmission and Behavior. *Cell* **122**: pp 261-273.

Benovic JL, Kuhn H, Weyand I, Codina J, Caron M G and Lefkowitz R J (1987) Functional Desensitization of the Isolated Beta-Adrenergic Receptor by the Beta-



Adrenergic Receptor Kinase: Potential Role of an Analog of the Retinal Protein Arrestin (48-KDa Protein). *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: pp 8879-8882.

Benovic JL, Strasser R H, Caron M G and Lefkowitz R J (1986) Beta-Adrenergic Receptor Kinase: Identification of a Novel Protein Kinase That Phosphorylates the Agonist-Occupied Form of the Receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: pp 2797-2801.

Berg KA, Maayani S, Goldfarb J, Scaramellini C, Leff P and Clarke W P (1998) Effector Pathway-Dependent Relative Efficacy at Serotonin Type 2A and 2C Receptors: Evidence for Agonist-Directed Trafficking of Receptor Stimulus. *Mol Pharmacol* **54**: pp 94-104.

Berman DM, Wilkie T M and Gilman A G (1996) GAIP and RGS4 Are GTPase-Activating Proteins for the Gi Subfamily of G Protein Alpha Subunits. *Cell* **86**: pp 445-452.

Bhatnagar A, Willins D L, Gray J A, Woods J, Benovic J L and Roth B L (2001) The Dynamin-Dependent, Arrestin-Independent Internalization of 5-Hydroxytryptamine 2A (5-HT<sub>2A</sub>) Serotonin Receptors Reveals Differential Sorting of Arrestins and 5-HT<sub>2A</sub> Receptors During Endocytosis. *J Biol Chem* **276**: pp 8269-8277.

Biscardi JS, Maa M C, Tice D A, Cox M E, Leu T H and Parsons S J (1999) C-Src-Mediated Phosphorylation of the Epidermal Growth Factor Receptor on Tyr845 and Tyr1101 Is Associated With Modulation of Receptor Function. *J Biol Chem* **274**: pp 8335-8343.

Blumer JB, Cismowski M J, Sato M and Lanier S M (2005) AGS Proteins: Receptor-Independent Activators of G-Protein Signaling. *Trends Pharmacol Sci* **26**: pp 470-476.

Bockaert J, Fagni L, Dumuis A and Marin P (2004) GPCR Interacting Proteins (GIP). *Pharmacol Ther* **103**: pp 203-221.

Bockaert J and Pin J P (1999) Molecular Tinkering of G Protein-Coupled Receptors: an Evolutionary Success. *EMBO J* **18**: pp 1723-1729.

Bond RA (1997) Do Recent Operational Studies Indicate That a Single State Model Is No Longer Applicable to G Protein-Coupled Receptors? *Ann N Y Acad Sci* **812**: pp 92-97.

Bos JL (1998) All in the Family? New Insights and Questions Regarding Interconnectivity of Ras, Rap1 and Ral. *EMBO J* **17**: pp 6776-6782.

Bouvier M, Collins S, O'Dowd B F, Campbell P T, de Blasi A, Kobilka B K, MacGregor C, Irons G P, Caron M G and Lefkowitz R J (1989) Two Distinct Pathways for CAMP-Mediated Down-Regulation of the Beta 2-Adrenergic Receptor. Phosphorylation of the Receptor and Regulation of Its mRNA Level. *J Biol Chem* **264**: pp 16786-16792.

Bradley J, Reisert J and Frings S (2005) Regulation of Cyclic Nucleotide-Gated Channels. *Curr Opin Neurobiol* **15**: pp 343-349.

Brady AE and Limbird L E (2002) G Protein-Coupled Receptor Interacting Proteins: Emerging Roles in Localization and Signal Transduction. *Cell Signal* **14**: pp 297-309.

Brink CB, Wade S M and Neubig R R (2000) Agonist-Directed Trafficking of Porcine Alpha(2A)-Adrenergic Receptor Signaling in Chinese Hamster Ovary Cells: L-Isoproterenol Selectively Activates G(s). *J Pharmacol Exp Ther* **294**: pp 539-547.

Bristow MR, Gilbert E M, Abraham W T, Adams K F, Fowler M B, Hershberger R E, Kubo S H, Narahara K A, Ingersoll H, Krueger S, Young S and Shusterman N (1996) Carvedilol Produces Dose-Related Improvements in Left Ventricular Function and Survival in Subjects With Chronic Heart Failure. MOCHA Investigators. *Circulation* **94**: pp 2807-2816.

Brodde OE, Bruck H and Leineweber K (2006) Cardiac Adrenoceptors: Physiological and Pathophysiological Relevance. *J Pharmacol Sci* **100**: pp 323-337.

Bueno OF, De Windt L J, Tymitz K M, Witt S A, Kimball T R, Klevitsky R, Hewett T E, Jones S P, Lefer D J, Peng C F, Kitsis R N and Molkenin J D (2000) The MEK1-ERK1/2

Signaling Pathway Promotes Compensated Cardiac Hypertrophy in Transgenic Mice. *EMBO J* **19**: pp 6341-6350.

Bueno OF and Molkentin J D (2002) Involvement of Extracellular Signal-Regulated Kinases 1/2 in Cardiac Hypertrophy and Cell Death. *Circ Res* **91**: pp 776-781.

Bunemann M, Frank M and Lohse M J (2003) Gi Protein Activation in Intact Cells Involves Subunit Rearrangement Rather Than Dissociation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: pp 16077-16082.

Camina JP, Lodeiro M, Ischenko O, Martini A C and Casanueva F F (2007) Stimulation by Ghrelin of P42/P44 Mitogen-Activated Protein Kinase Through the GHS-R1a Receptor: Role of G-Proteins and Beta-Arrestins. *J Cell Physiol* **213**: pp 187-200.

Cao TT, Deacon H W, Reczek D, Bretscher A and von Zastrow M (1999) A Kinase-Regulated PDZ-Domain Interaction Controls Endocytic Sorting of the Beta2-Adrenergic Receptor. *Nature* **401**: pp 286-290.

Cao W, Luttrell L M, Medvedev A V, Pierce K L, Daniel K W, Dixon T M, Lefkowitz R J and Collins S (2000) Direct Binding of Activated C-Src to the Beta 3-Adrenergic Receptor Is Required for MAP Kinase Activation. *J Biol Chem* **275**: pp 38131-38134.

Chakir K, Xiang Y, Yang D, Zhang S J, Cheng H, Kobilka B K and Xiao R P (2003) The Third Intracellular Loop and the Carboxyl Terminus of Beta2-Adrenergic Receptor Confer Spontaneous Activity of the Receptor. *Mol Pharmacol* **64**: pp 1048-1058.

Charest PG, Oligny-Longpre G, Bonin H, Azzi M and Bouvier M (2007) The V2 Vasopressin Receptor Stimulates ERK1/2 Activity Independently of Heterotrimeric G Protein Signalling. *Cell Signal* **19**: pp 32-41.

Chesley A, Lundberg M S, Asai T, Xiao R P, Ohtani S, Lakatta E G and Crow M T (2000) The Beta(2)-Adrenergic Receptor Delivers an Antiapoptotic Signal to Cardiac Myocytes

Through G(i)-Dependent Coupling to Phosphatidylinositol 3'-Kinase. *Circ Res* **87**: pp 1172-1179.

Cheung AH, Huang R R, Graziano M P and Strader C D (1991) Specific Activation of G<sub>s</sub> by Synthetic Peptides Corresponding to an Intracellular Loop of the Beta-Adrenergic Receptor. *FEBS Lett* **279**: pp 277-280.

Cheung AH, Huang R R and Strader C D (1992) Involvement of Specific Hydrophobic, but Not Hydrophilic, Amino Acids in the Third Intracellular Loop of the Beta-Adrenergic Receptor in the Activation of G<sub>s</sub>. *Mol Pharmacol* **41**: pp 1061-1065.

Chidiac P, Hebert T E, Valiquette M, Dennis M and Bouvier M (1994) Inverse Agonist Activity of Beta-Adrenergic Antagonists. *Mol Pharmacol* **45**: pp 490-499.

Chini B and Parenti M (2004) G-Protein Coupled Receptors in Lipid Rafts and Caveolae: How, When and Why Do They Go There? *J Mol Endocrinol* **32**: pp 325-338.

Cismowski MJ, Takesono A, Ma C, Lizano J S, Xie X, Fuernkranz H, Lanier S M and Duzic E (1999) Genetic Screens in Yeast to Identify Mammalian Nonreceptor Modulators of G-Protein Signaling. *Nat Biotechnol* **17**: pp 878-883.

Collins S, Cao W and Robidoux J (2004) Learning New Tricks From Old Dogs: Beta-Adrenergic Receptors Teach New Lessons on Firing Up Adipose Tissue Metabolism. *Mol Endocrinol* **18**: pp 2123-2131.

Costa T and Herz A (1989) Antagonists With Negative Intrinsic Activity at Delta Opioid Receptors Coupled to GTP-Binding Proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: pp 7321-7325.

Crackower MA, Oudit G Y, Kozieradzki I, Sarao R, Sun H, Sasaki T, Hirsch E, Suzuki A, Shioi T, Irie-Sasaki J, Sah R, Cheng H Y, Rybin V O, Lembo G, Fratta L, Oliveira-dos-Santos A J, Benovic J L, Kahn C R, Izumo S, Steinberg S F, Wymann M P, Backx P H and

- Penninger J M (2002) Regulation of Myocardial Contractility and Cell Size by Distinct PI3K-PTEN Signaling Pathways. *Cell* **110**: pp 737-749.
- Daaka Y, Luttrell L M and Lefkowitz R J (1997) Switching of the Coupling of the Beta2-Adrenergic Receptor to Different G Proteins by Protein Kinase A. *Nature* **390**: pp 88-91.
- Daub H, Weiss F U, Wallasch C and Ullrich A (1996) Role of Transactivation of the EGF Receptor in Signalling by G-Protein-Coupled Receptors. *Nature* **379**: pp 557-560.
- De Lean A, Stadel J M and Lefkowitz R J (1980) A Ternary Complex Model Explains the Agonist-Specific Binding Properties of the Adenylate Cyclase-Coupled Beta-Adrenergic Receptor. *J Biol Chem* **255**: pp 7108-7117.
- DeFea KA, Zalevsky J, Thoma M S, Dery O, Mullins R D and Bunnett N W (2000) Beta-Arrestin-Dependent Endocytosis of Proteinase-Activated Receptor 2 Is Required for Intracellular Targeting of Activated ERK1/2. *J Cell Biol* **148**: pp 1267-1281.
- Del Castillo J and Katz B (1957) Interaction at End-Plate Receptors Between Different Choline Derivatives. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **146**: pp 369-381.
- Delos Santos NM, Gardner L A, White S W and Bahouth S W (2006) Characterization of the Residues in Helix 8 of the Human Beta1-Adrenergic Receptor That Are Involved in Coupling the Receptor to G Proteins. *J Biol Chem* **281**: pp 12896-12907.
- DeWire SM, Ahn S, Lefkowitz R J and Shenoy S K (2007) Beta-Arrestins and Cell Signaling. *Annu Rev Physiol* **69**: pp 483-510.
- Dicker F, Quitterer U, Winstel R, Honold K and Lohse M J (1999) Phosphorylation-Independent Inhibition of Parathyroid Hormone Receptor Signaling by G Protein-Coupled Receptor Kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: pp 5476-5481.

Dixon RA, Kobilka B K, Strader D J, Benovic J L, Dohlman H G, Frielle T, Bolanowski M A, Bennett C D, Rands E, Diehl R E et al. (1986) Cloning of the Gene and CDNA for Mammalian Beta-Adrenergic Receptor and Homology With Rhodopsin. *Nature* **321**: pp 75-79.

Droese J, Mokros T, Hermosilla R, Schulein R, Lipp M, Hopken U E and Rehm A (2004) HCMV-Encoded Chemokine Receptor US28 Employs Multiple Routes for Internalization. *Biochem Biophys Res Commun* **322**: pp 42-49.

Dunigan CD, Hoang Q, Curran P K and Fishman P H (2002) Complexity of Ago. *Biochemistry* **41**: pp 8019-8030.

Dupre DJ and Hebert T E (2006) Biosynthesis and Trafficking of Seven Transmembrane Receptor Signalling Complexes. *Cell Signal* **18**: pp 1549-1559.

Engelhardt S, Grimmer Y, Fan G H and Lohse M J (2001) Constitutive Activity of the Human Beta(1)-Adrenergic Receptor in Beta(1)-Receptor Transgenic Mice. *Mol Pharmacol* **60**: pp 712-717.

Erikson RL. (1981) The transforming protein of avian sarcoma viruses and its homologue in normal cells. *Curr Top Microbiol Immunol.* 91:25-40

Fagni L, Ango F, Perroy J and Bockaert J (2004) Identification and Functional Roles of Metabotropic Glutamate Receptor-Interacting Proteins. *Semin Cell Dev Biol* **15**: pp 289-298.

Fan G, Shumay E, Wang H and Malbon C C (2001) The Scaffold Protein Gravin (CAMP-Dependent Protein Kinase-Anchoring Protein 250) Binds the Beta 2-Adrenergic Receptor Via the Receptor Cytoplasmic Arg-329 to Leu-413 Domain and Provides a Mobile Scaffold During Desensitization. *J Biol Chem* **276**: pp 24005-24014.

Ferguson SS (2007) Phosphorylation-Independent Attenuation of GPCR Signalling. *Trends Pharmacol Sci* **28**: pp 173-179.

Foord SM, Bonner T I, Neubig R R, Rosser E M, Pin J P, Davenport A P, Spedding M and Harmar A J (2005) International Union of Pharmacology. XLVI. G Protein-Coupled Receptor List. *Pharmacol Rev* **57**: pp 279-288.

Fotiadis D, Liang Y, Filipek S, Saperstein D A, Engel A and Palczewski K (2003) Atomic-Force Microscopy: Rhodopsin Dimers in Native Disc Membranes. *Nature* **421**: pp 127-128.

Fraser ID, Cong M, Kim J, Rollins E N, Daaka Y, Lefkowitz R J and Scott J D (2000) Assembly of an A Kinase-Anchoring Protein-Beta(2)-Adrenergic Receptor Complex Facilitates Receptor Phosphorylation and Signaling. *Curr Biol* **10**: pp 409-412.

Fredriksson R, Lagerstrom M C, Lundin L G and Schiöth H B (2003) The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogon Groups, and Fingerprints. *Mol Pharmacol* **63**: pp 1256-1272.

Freedman NJ, Liggett S B, Drachman D E, Pei G, Caron M G and Lefkowitz R J (1995) 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* **270**: pp 17953-17961.

Friedman J, Babu B and Clark R B (2002) Beta(2)-Adrenergic Receptor Lacking the Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase Consensus Sites Fully Activates Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 in Human Embryonic Kidney 293 Cells: Lack of Evidence for G(s)/G(i) Switching. *Mol Pharmacol* **62**: pp 1094-1102.

Frielle T, Collins S, Daniel K W, Caron M G, Lefkowitz R J and Kobilka B K (1987) Cloning of the CDNA for the Human Beta 1-Adrenergic Receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: pp 7920-7924.

Frielle T, Daniel K W, Caron M G and Lefkowitz R J (1988) Structural Basis of Beta-Adrenergic Receptor Subtype Specificity Studied With Chimeric Beta 1/Beta 2-Adrenergic Receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: pp 9494-9498.

Gales C, Van Durm J J, Schaak S, Pontier S, Percherancier Y, Audet M, Paris H and Bouvier M (2006a) Probing the Activation-Promoted Structural Rearrangements in Preassembled Receptor-G Protein Complexes. *Nat Struct Mol Biol* **13**: pp 778-786.

Gao BN and Gilman A G (1991) Cloning and Expression of a Widely Distributed (Type IV) Adenylyl Cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: pp 10178-10182.

Gay EA, Urban J D, Nichols D E, Oxford G S and Mailman R B (2004a) Functional Selectivity of D2 Receptor Ligands in a Chinese Hamster Ovary HD2L Cell Line: Evidence for Induction of Ligand-Specific Receptor States. *Mol Pharmacol* **66**: pp 97-105.

Gbahou F, Rouleau A, Morisset S, Parmentier R, Crochet S, Lin J S, Ligneau X, Tardivel-Lacombe J, Stark H, Schunack W, Ganellin C R, Schwartz J C and Arrang J M (2003b) Protean Agonism at Histamine H3 Receptors in Vitro and in Vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: pp 11086-11091.

Gesty-Palmer D, Chen M, Reiter E, Ahn S, Nelson C D, Wang S, Eckhardt A E, Cowan C L, Spurney R F, Luttrell L M and Lefkowitz R J (2006) Distinct Beta-Arre. *J Biol Chem* **281**: pp 10856-10864.

Gether U, Lin S and Kobilka B K (1995) Fluorescent Labeling of Purified Beta 2 Adrenergic Receptor. Evidence for Ligand-Specific Conformational Changes. *J Biol Chem* **270**: pp 28268-28275.

Ghanouni P, Gryczynski Z, Steenhuis J J, Lee T W, Farrens D L, Lakowicz J R and Kobilka B K (2001b) Functionally Different Agonists Induce Distinct Conformations in the



G Protein Coupling Domain of the Beta 2 Adrenergic Receptor. *J Biol Chem* **276**: pp 24433-24436.

Ghanouni P, Steenhuis J J, Farrens D L and Kobilka B K (2001a) Agonist-Induced Conformational Changes in the G-Protein-Coupling Domain of the Beta 2 Adrenergic Receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: pp 5997-6002.

Granier S, Kim S, Shafer A M, Ratnala V R, Fung J J, Zare R N and Kobilka B (2007) Structure and Conformational Changes in the C-Terminal Domain of the Beta2-Adrenoceptor: Insights From Fluorescence Resonance Energy Transfer Studies. *J Biol Chem* **282**: pp 13895-13905.

Gudermann T, Grosse R and Schultz G (2000) Contribution of Receptor/G Protein Signaling to Cell Growth and Transformation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **361**: pp 345-362.

Gupta A, Decaillet F M, Gomes I, Tkalych O, Heimann A S, Ferro E S and Devi L A (2007) Conformation State-Sensitive Antibodies to G-Protein-Coupled Receptors. *J Biol Chem* **282**: pp 5116-5124.

Gurevich EV and Gurevich V V (2006) Arrestins: Ubiquitous Regulators of Cellular Signaling Pathways. *Genome Biol* **7**: pp 236.

Hadcock JR and Malbon C C (1988) Regulation of Beta-Adrenergic Receptors by "Permissive" Hormones: Glucocorticoids Increase Steady-State Levels of Receptor mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: pp 8415-8419.

Hall DA, Beresford I J, Browning C and Giles H (1999c) Signalling by CXC-Chemokine Receptors 1 and 2 Expressed in CHO Cells: a Comparison of Calcium Mobilization, Inhibition of Adenylyl Cyclase and Stimulation of GTPgammaS Binding Induced by IL-8 and GROalpha. *Br J Pharmacol* **126**: pp 810-818.

Hall RA, Ostedgaard L S, Premont R T, Blitzer J T, Rahman N, Welsh M J and Lefkowitz R J (1998b) A C-Terminal Motif Found in the Beta2-Adrenergic Receptor, P2Y1 Receptor and Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Determines Binding to the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger Regulatory Factor Family of PDZ Proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95** : pp 8496-8501.

Hall RA, Premont R T, Chow C W, Blitzer J T, Pitcher J A, Claing A, Stoffel R H, Barak L S, Shenolikar S, Weinman E J, Grinstein S and Lefkowitz R J (1998a) The Beta2-Adrenergic Receptor Interacts With the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Exchanger Regulatory Factor to Control Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchange. *Nature* **392**: pp 626-630.

Hall RA, Premont R T and Lefkowitz R J (1999a) Heptahelical Receptor Signaling: Beyond the G Protein Paradigm. *J Cell Biol* **145**: pp 927-932.

Hall SA, Cigarroa C G, Marcoux L, Risser R C, Grayburn P A and Eichhorn E J (1995) Time Course of Improvement in Left Ventricular Function, Mass and Geometry in Patients With Congestive Heart Failure Treated With Beta-Adrenergic Blockade. *J Am Coll Cardiol* **25**: pp 1154-1161.

Hausdorff WP, Hnatowich M, O'Dowd B F, Caron M G and Lefkowitz R J (1990) A Mutation of the Beta 2-Adrenergic Receptor Impairs Agonist Activation of Adenylyl Cyclase Without Affecting High Affinity Agonist Binding. Distinct Molecular Determinants of the Receptor Are Involved in Physical Coupling to and Functional Activation of Gs. *J Biol Chem* **265**: pp 1388-1393.

Hausdorff WP, Pitcher J A, Luttrell D K, Linder M E, Kurose H, Parsons S J, Caron M G and Lefkowitz R J (1992) Tyrosine Phosphorylation of G Protein Alpha Subunits by Pp60c-Src. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: pp 5720-5724.

He J, Bellini M, Inuzuka H, Xu J, Xiong Y, Yang X, Castleberry A M and Hall R A (2006) Proteomic Analysis of Beta1-Adrenergic Receptor Interactions With PDZ Scaffold Proteins. *J Biol Chem* **281**: pp 2820-2827.

Hermans E (2003a) Biochemical and Pharmacological Control of the Multiplicity of Coupling at G-Protein-Coupled Receptors. *Pharmacol Ther* **99**: pp 25-44.

Herrlich A, Daub H, Knebel A, Herrlich P, Ullrich A, Schultz G and Gudermann T (1998) Ligand-Independent Activation of Platelet-Derived Growth Factor Receptor Is a Necessary Intermediate in Lysophosphatidic, Acid-Stimulated Mitogenic Activity in L Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: pp 8985-8990.

Hill SJ and Baker J G (2003) The Ups and Downs of Gs- to Gi-Protein Switching. *Br J Pharmacol* **138**: pp 1188-1189.

Hoffmann C, Gaietta G, Bunemann M, Adams S R, Oberdorff-Maass S, Behr B, Vilardaga J P, Tsien R Y, Ellisman M H and Lohse M J (2005) A FIAsh-Based FRET Approach to Determine G Protein-Coupled Receptor Activation in Living Cells. *Nat Methods* **2**: pp 171-176.

Hoffmann C, Leitz M R, Oberdorf-Maass S, Lohse M J and Klotz K N (2004) Comparative Pharmacology of Human Beta-Adrenergic Receptor Subtypes--Characterization of Stably Transfected Receptors in CHO Cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **369**: pp 151-159.

Howe TJ, Mahieu G, Marichal P, Tabruyn T and Vugts P (2007) Data Reduction and Representation in Drug Discovery. *Drug Discov Today* **12**: pp 45-53.

Hu LA, Chen W, Premont R T, Cong M and Lefkowitz R J (2002) G Protein-Coupled Receptor Kinase 5 Regulates Beta 1-Adrenergic Receptor Association With PSD-95. *J Biol Chem* **277**: pp 1607-1613.

Huang P, Steplock D, Weinman E J, Hall R A, Ding Z, Li J, Wang Y and Liu-Chen L Y (2004) Kappa Opioid Receptor Interacts With Na(+)/H(+)-Exchanger Regulatory Factor-1/Ezrin-Radixin-Moesin-Binding Phosphoprotein-50 (NHERF-1/EBP50) to Stimulate Na(+)/H(+) Exchange Independent of G(i)/G(o) Proteins. *J Biol Chem* **279**: pp 25002-25009.

Ianoul A, Grant D D, Rouleau Y, Bani-Yaghoub M, Johnston L J and Pezacki J P (2005) Imaging Nanometer Domains of Beta-Adrenergic Receptor Complexes on the Surface of Cardiac Myocytes. *Nat Chem Biol* **1**: pp 196-202.

Isogaya M, Sugimoto Y, Tanimura R, Tanaka R, Kikkawa H, Nagao T and Kurose H (1999) Binding Pockets of the Beta(1)- and Beta(2)-Adrenergic Receptors for Subtype-Selective Agonists. *Mol Pharmacol* **56**: pp 875-885.

Izzo NJ, Jr., Tulenko T N and Colucci W S (1994) Phorbol Esters and Norepinephrine Destabilize Alpha 1B-Adrenergic Receptor mRNA in Vascular Smooth Muscle Cells. *J Biol Chem* **269**: pp 1705-1710.

Jacoby E (2006) Designing Compound Libraries Targeting GPCRs. *Ernst Schering Found Symp Proc* **2**: pp 93-103.

Jarpe MB, Knall C, Mitchell F M, Buhl A M, Duzic E and Johnson G L (1998) [D-Arg1,D-Phe5,D-Trp7,9,Leu11]Substance P Acts As a Biased Agonist Toward Neuropeptide and Chemokine Receptors. *J Biol Chem* **273**: pp 3097-3104.

Jo SH, Leblais V, Wang P H, Crow M T and Xiao R P (2002) Phosphatidylinositol 3-Kinase Functionally Compartmentalizes the Concurrent G(s) Signaling During Beta2-Adrenergic Stimulation. *Circ Res* **91**: pp 46-53.

Karoor V, Baltensperger K, Paul H, Czech M P and Malbon C C (1995) Phosphorylation of Tyrosyl Residues 350/354 of the Beta-Adrenergic Receptor Is Obligatory for Counterregulatory Effects of Insulin. *J Biol Chem* **270**: pp 25305-25308.

Karoor V, Wang L, Wang H Y and Malbon C C (1998) Insulin Stimulates Sequestration of Beta-Adrenergic Receptors and Enhanced Association of Beta-Adrenergic Receptors With Grb2 Via Tyrosine 350. *J Biol Chem* **273**: pp 33035-33041.

Keith DE, Murray S R, Zaki P A, Chu P C, Lissin D V, Kang L, Evans C J and von Zastrow M (1996) Morphine Activates Opioid Receptors Without Causing Their Rapid Internalization. *J Biol Chem* **271**: pp 19021-19024.

Kenakin T (1995) Agonist-Receptor Efficacy. II. Agonist Trafficking of Receptor Signals. *Trends Pharmacol Sci* **16**: pp 232-238.

Kenakin T (2001) Inverse, Protean, and Ligand-Selective Agonism: Matters of Receptor Conformation. *FASEB J* **15**: pp 598-611.

Kenakin T (2002) Drug Efficacy at G Protein-Coupled Receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **42**: pp 349-379.

Kenakin T (2003) Ligand-Selective Receptor Conformations Revisited: the Promise and the Problem. *Trends Pharmacol Sci* **24**: pp 346-354.

Kenakin T (2004) Principles: Receptor Theory in Pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* **25**: pp 186-192.

Kenakin T (2005) New Concepts in Drug Discovery: Collateral Efficacy and Permissive Antagonism. *Nat Rev Drug Discov* **4**: pp 919-927.

Kim J, Ahn S, Ren X R, Whalen E J, Reiter E, Wei H and Lefkowitz R J (2005) Functional Antagonism of Different G Protein-Coupled Receptor Kinases for Beta-Arrestin-Mediated Angiotensin II Receptor Signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: pp 1442-1447.

Kobilka BK and Deupi X (2007) Conformational Complexity of G-Protein-Coupled Receptors. *Trends Pharmacol Sci* **28**: pp 397-406.

Kostenis E (2001) Is Galphai6 the Optimal Tool for Fishing Ligands of Orphan G-Protein-Coupled Receptors? *Trends Pharmacol Sci* **22**: pp 560-564.

Krueger KM, Witte D G, Ireland-Denny L, Miller T R, Baranowski J L, Buckner S, Milicic I, Esbenshade T A and Hancock A A (2005b) G Protein-Dependent Pharmacology of Histamine H3 Receptor Ligands: Evidence for Heterogeneous Active State Receptor Conformations. *J Pharmacol Exp Ther* **314**: pp 271-281.

Kurose H, Isogaya M, Kikkawa H and Nagao T (1998) Domains of Beta1 and Beta2 Adrenergic Receptors to Bind Subtype Selective Agonists. *Life Sci* **62**: pp 1513-1517.

Kurrasch-Orbaugh DM, Watts V J, Barker E L and Nichols D E (2003b) Serotonin 5-Hydroxytryptamine 2A Receptor-Coupled Phospholipase C and Phospholipase A2 Signaling Pathways Have Different Receptor Reserves. *J Pharmacol Exp Ther* **304**: pp 229-237.

Lamba S and Abraham W T (2000) Alterations in Adrenergic Receptor Signaling in Heart Failure. *Heart Fail Rev* **5**: pp 7-16.

Lander ES, Linton L M, Birren B, Nusbaum C, Zody M C, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov J P, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann N, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R,

Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin J C, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston R H, Wilson R K, Hillier L W, McPherson J D, Marra M A, Mardis E R, Fulton L A, Chinwalla A T, Pepin K H, Gish W R, Chissoe S L, Wendl M C, Delehaunty K D, Miner T L, Delehaunty A, Kramer J B, Cook L L, Fulton R S, Johnson D L, Minx P J, Clifton S W, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng J F, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs R A, Muzny D M, Scherer S E, Bouck J B, Sodergren E J, Worley K C, Rives C M, Gorrell J H, Metzker M L, Naylor S L, Kucherlapati R S, Nelson D L, Weinstock G M, Sakaki Y, Fujiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith D R, Doucette-Stamm L, Rubenfield M, Weinstock K, Lee H M, Dubois J, Rosenthal A, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis R W, Federspiel N A, Abola A P, Proctor M J, Myers R M, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox D R, Olson M V, Kaul R, Raymond C, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans G A, Athanasiou M, Schultz R, Roe B A, Chen F, Pan H, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt R, McCombie W R, de la B M, Dedhia N, Blocker H, Hornischer K, Nordsiek G, Agarwala R, Aravind L, Bailey J A, Bateman A, Batzoglu S, Birney E, Bork P, Brown D G, Burge C B, Cerutti L, Chen H C, Church D, Clamp M, Copley R R, Doerks T, Eddy S R, Eichler E E, Furey T S, Galagan J, Gilbert J G, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang W, Johnson L S, Jones T A, Kasif S, Kasprzyk A, Kennedy S, Kent W J, Kitts P, Koonin E V, Korf I, Kulp D, Lancet D, Lowe T M, McLysaght A, Mikkelsen T, Moran J V, Mulder N, Pollara V J, Ponting C P, Schuler G, Schultz J, Slater G, Smit A F, Stupka E, Szustakowski J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams A, Wolf Y I, Wolfe K H, Yang S P, Yeh R F, Collins F, Guyer M S, Peterson J, Felsenfeld A,

Wetterstrand K A, Patrinos A, Morgan M J, de Jong P, Catanese J J, Osoegawa K, Shizuya H, Choi S and Chen Y J (2001) Initial Sequencing and Analysis of the Human Genome. *Nature* **409**: pp 860-921.

Langley JN (1907) On the Contraction of Muscle, Chiefly in Relation to the Presence of "Receptive" Substances: Part I. *J Physiol* **36**: pp 347-384.

Laugwitz KL, Allgeier A, Offermanns S, Spicher K, Van Sande J, Dumont J E and Schultz G (1996) The Human Thyrotropin Receptor: a Heptahelical Receptor Capable of Stimulating Members of All Four G Protein Families. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: pp 116-120.

Lavine N, Ethier N, Oak J N, Pei L, Liu F, Trieu P, Rebois R V, Bouvier M, Hebert T E and Van Tol H H (2002) G Protein-Coupled Receptors Form Stable Complexes With Inwardly Rectifying Potassium Channels and Adenylyl Cyclase. *J Biol Chem* **277**: pp 46010-46019.

Lavoie C, Mercier J F, Salahpour A, Umapathy D, Breit A, Villeneuve L R, Zhu W Z, Xiao R P, Lakatta E G, Bouvier M and Hebert T E (2002b) Beta 1/Beta 2-Adrenergic Receptor Heterodimerization Regulates Beta 2-Adrenergic Receptor Internalization and ERK Signaling Efficacy. *J Biol Chem* **277**: pp 35402-35410.

Lawler O A, Miggin S M and Kinsella B T (2001) Protein Kinase A-Mediated Phosphorylation of Serine 357 of the Mouse Prostacyclin Receptor Regulates Its Coupling to G(s)-, to G(i)-, and to G(q)-Coupled Effector Signaling. *J Biol Chem* **276**: pp 33596-33607.

Lee N H, Earle-Hughes J and Fraser C M (1994) Agonist-Mediated Destabilization of M1 Muscarinic Acetylcholine Receptor mRNA. Elements Involved in mRNA Stability Are Localized in the 3'-Untranslated Region. *J Biol Chem* **269**: pp 4291-4298.



Lee SJ, Xu H, Kang L W, Amzel L M and Montell C (2003) Light Adaptation Through Phosphoinositide-Regulated Translocation of Drosophila Visual Arrestin. *Neuron* **39**: pp 121-132.

Leff P, Scaramellini C, Law C and McKechnie K (1997) A Three-State Receptor Model of Agonist Action. *Trends Pharmacol Sci* **18**: pp 355-362.

Lefkowitz RJ, Pierce K L and Luttrell L M (2002) Dancing With Different Partners: Protein Kinase a Phosphorylation of Seven Membrane-Spanning Receptors Regulates Their G Protein-Coupling Specificity. *Mol Pharmacol* **62**: pp 971-974.

Lefkowitz RJ, Rajagopal K and Whalen E J (2006) New Roles for Beta-Arrestins in Cell Signaling: Not Just for Seven-Transmembrane Receptors. *Mol Cell* **24**: pp 643-652.

Lefkowitz RJ and Shenoy S K (2005) Transduction of Receptor Signals by Beta-Arrestins. *Science* **308** : pp 512-517.

Liang W and Fishman P H (2004) Resistance of the Human Beta1-Adrenergic Receptor to Agonist-Induced Ubiquitination: a Mechanism for Impaired Receptor Degradation. *J Biol Chem* **279** : pp 46882-46889.

Liapakis G, Ballesteros J A, Papachristou S, Chan W C, Chen X and Javitch J A (2000) The Forgotten Serine. A Critical Role for Ser-2035.42 in Ligand Binding to and Activation of the Beta 2-Adrenergic Receptor. *J Biol Chem* **275**: pp 37779-37788.

Lin F, Wang H and Malbon C C (2000) Gravin-Mediated Formation of Signaling Complexes in Beta 2-Adrenergic Receptor Desensitization and Resensitization. *J Biol Chem* **275**: pp 19025-19034.

Lips DJ, Bueno O F, Wilkins B J, Purcell N H, Kaiser R A, Lorenz J N, Voisin L, Saba-El-Leil M K, Meloche S, Pouyssegur J, Pages G, De Windt L J, Doevendans P A and

Molkentin J D (2004) MEK1-ERK2 Signaling Pathway Protects Myocardium From Ischemic Injury in Vivo. *Circulation* **109**: pp 1938-1941.

Liu J, Liao Z, Camden J, Griffin K D, Garrad R C, Santiago-Perez L I, Gonzalez F A, Seye C I, Weisman G A and Erb L (2004) Src Homology 3 Binding Sites in the P2Y2 Nucleotide Receptor Interact With Src and Regulate Activities of Src, Proline-Rich Tyrosine Kinase 2, and Growth Factor Receptors. *J Biol Chem* **279**: pp 8212-8218.

Lohse MJ, Andexinger S, Pitcher J, Trukawinski S, Codina J, Faure J P, Caron M G and Lefkowitz R J (1992) Receptor-Specific Desensitization With Purified Proteins. Kinase Dependence and Receptor Specificity of Beta-Arrestin and Arrestin in the Beta 2-Adrenergic Receptor and Rhodopsin Systems. *J Biol Chem* **267**: pp 8558-8564.

Lohse MJ, Benovic J L, Codina J, Caron M G and Lefkowitz R J (1990) Beta-Arrestin: a Protein That Regulates Beta-Adrenergic Receptor Function. *Science* **248**: pp 1547-1550.

Lohse MJ, Engelhardt S, Danner S and Bohm M (1996) Mechanisms of Beta-Adrenergic Receptor Desensitization: From Molecular Biology to Heart Failure. *Basic Res Cardiol* **91 Suppl 2**: pp 29-34.

Loisel TP, Adam L, Hebert T E and Bouvier M (1996) Agonist Stimulation Increases the Turnover Rate of Beta 2AR-Bound Palmitate and Promotes Receptor Depalmitoylation. *Biochemistry* **35**: pp 15923-15932.

Loisel TP, Ansanay H, Adam L, Marullo S, Seifert R, Lagace M and Bouvier M (1999) Activation of the Beta(2)-Adrenergic Receptor-Galphi(s) Complex Leads to Rapid Depalmitoylation and Inhibition of Repalmitoylation of Both the Receptor and Galphi(s). *J Biol Chem* **274**: pp 31014-31019.

Luo X, Zeng W, Xu X, Popov S, Davignon I, Wilkie T M, Mumby S M and Muallem S (1999) Alternate Coupling of Receptors to Gs and Gi in Pancreatic and Submandibular Gland Cells. *J Biol Chem* **274**: pp 17684-17690.

Luttrell LM, Daaka Y and Lefkowitz R J (1999b) Regulation of Tyrosine Kinase Cascades by G-Protein-Coupled Receptors. *Curr Opin Cell Biol* **11**: pp 177-183.

Luttrell LM, Ferguson S S, Daaka Y, Miller W E, Maudsley S, Della Rocca G J, Lin F, Kawakatsu H, Owada K, Luttrell D K, Caron M G and Lefkowitz R J (1999a) Beta-Arrestin-Dependent Formation of Beta2 Adrenergic Receptor-Src Protein Kinase Complexes. *Science* **283**: pp 655-661.

Luttrell LM, Hawes B E, van Biesen T, Luttrell D K, Lansing T J and Lefkowitz R J (1996) Role of C-Src Tyrosine Kinase in G Protein-Coupled Recept. *J Biol Chem* **271**: pp 19443-19450.

Luttrell LM, Roudabush F L, Choy E W, Miller W E, Field M E, Pierce K L and Lefkowitz R J (2001) Activation and Targeting of Extracellular Signal-Regulated Kinases by Beta-Arrestin Scaffolds. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: pp 2449-2454.

Ma YC, Huang J, Ali S, Lowry W and Huang X Y (2000) Src Tyrosine Kinase Is a Novel Direct Effector of G Proteins. *Cell* **102**: pp 635-646.

Maeda M, Aubry L, Insall R, Gaskins C, Devreotes P N and Firtel R A (1996) Seven Helix Chemoattractant Receptors Transiently Stimulate Mitogen-Activated Protein Kinase in Dictyostelium. Role of Heterotrimeric G Proteins. *J Biol Chem* **271**: pp 3351-3354.

Malbon CC (2004) Frizzleds: New Members of the Superfamily of G-Protein-Coupled Receptors. *Front Biosci* **9**: pp 1048-1058.

Martin NP, Whalen E J, Zamah M A, Pierce K L and Lefkowitz R J (2004) PKA-Mediated Phosphorylation of the Beta1-Adrenergic Receptor Promotes Gs/Gi Switching. *Cell Signal* **16**: pp 1397-1403.

Marullo S, Emorine L J, Strosberg A D and Delavier-Klutchko C (1990) Selective Binding of Ligands to Beta 1, Beta 2 or Chimeric Beta 1/Beta 2-Adrenergic Receptors Involves Multiple Subsites. *EMBO J* **9**: pp 1471-1476.

Mason DA, Moore J D, Green S A and Liggett S B (1999) A Gain-of-Function Polymorphism in a G-Protein Coupling Domain of the Human Beta1-Adrenergic Receptor. *J Biol Chem* **274**: pp 12670-12674.

Maudsley S, Pierce K L, Zamah A M, Miller W E, Ahn S, Daaka Y, Lefkowitz R J and Luttrell L M (2000) The Beta(2)-Adrenergic Receptor Mediates Extracellular Signal-Regulated Kinase Activation Via Assembly of a Multi-Receptor Complex With the Epidermal Growth Factor Receptor. *J Biol Chem* **275**: pp 9572-9580.

McDonald PH, Chow C W, Miller W E, Laporte S A, Field M E, Lin F T, Davis R J and Lefkowitz R J (2000) Beta-Arrestin 2: a Receptor-Regulated MAPK Scaffold for the Activation of JNK3. *Science* **290**: pp 1574-1577.

McLaughlin JN, Shen L, Holinstat M, Brooks J D, Dibenedetto E and Hamm H E (2005) Functional Selectivity of G Protein Signaling by Agonist Peptides and Thrombin for the Protease-Activated Receptor-1. *J Biol Chem* **280**: pp 25048-25059.

Mialet-Perez J, Green S A, Miller W E and Liggett S B (2004) A Primate-Dominant Third Glycosylation Site of the Beta2-Adrenergic Receptor Routes Receptors to Degradation During Agonist Regulation. *J Biol Chem* **279**: pp 38603-38607.

Milano SK, Kim Y M, Stefano F P, Benovic J L and Brenner C (2006) Nonvisual Arrestin Oligomerization and Cellular Localization Are Regulated by Inositol Hexakisphosphate Binding. *J Biol Chem* **281**: pp 9812-9823.

Milligan G (2003) Constitutive Activity and Inverse Agonists of G Protein-Coupled Receptors: a Current Perspective. *Mol Pharmacol* **64**: pp 1271-1276.

Milligan G and Kostenis E (2006) Heterotrimeric G-Proteins: a Short History. *Br J Pharmacol* **147 Suppl 1**: pp S46-S55.

Moffett S, Rousseau G, Lagace M and Bouvier M (2001) The Palmitoylation State of the Beta(2)-Adrenergic Receptor Regulates the Synergistic Action of Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase and Beta-Adrenergic Receptor Kinase Involved in Its Phosphorylation and Desensitization. *J Neurochem* **76**: pp 269-279.

Moniri NH, Covington-Strachan D and Booth R G (2004) Ligand-Directed Functional Heterogeneity of Histamine H1 Receptors: Novel Dual-Function Ligands Selectively Activate and Block H1-Mediated Phospholipase C and Adenylyl Cyclase Signaling. *J Pharmacol Exp Ther* **311**: pp 274-281.

Mukhopadhyay S and Howlett A C (2005) Chemically Distinct Ligands Promote Differential CB1 Cannabinoid Receptor-Gi Protein Interactions. *Mol Pharmacol* **67**: pp 2016-2024.

Naga Prasad SV, Laporte S A, Chamberlain D, Caron M G, Barak L and Rockman H A (2002) Phosphoinositide 3-Kinase Regulates Beta2-Adrenergic Receptor Endocytosis by AP-2 Recruitment to the Receptor/Beta-Arrestin Complex. *J Cell Biol* **158**: pp 563-575.

Narayanan CS, Fujimoto J, Geras-Raaka E and Gershengorn M C (1992) Regulation by Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH) of TRH Receptor mRNA Degradation in Rat Pituitary GH3 Cells. *J Biol Chem* **267**: pp 17296-17303.

Nobles M, Benians A and Tinker A (2005) Heterotrimeric G Proteins Precouple With G Protein-Coupled Receptors in Living Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: pp 18706-18711.

Noma T, Lemaire A, Naga Prasad S V, Barki-Harrington L, Tilley D G, Chen J, Le Corvoisier P, Violin J D, Wei H, Lefkowitz R J and Rockman H A (2007) Beta-Arrestin-Mediated Beta1-Adrenergic Receptor Transactivation of the EGFR Confers Cardioprotection. *J Clin Invest* **117**: pp 2445-2458.

Northup JK, Sternweis P C, Smigel M D, Schleifer L S, Ross E M and Gilman A G (1980) Purification of the Regulatory Component of Adenylate Cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**: pp 6516-6520.

Oakley RH, Laporte S A, Holt J A, Barak L S and Caron M G (2001) Molecular Determinants Underlying the Formation of Stable Intracellular G Protein-Coupled Receptor-Beta-Arrestin Complexes After Receptor Endocytosis\*. *J Biol Chem* **276**: pp 19452-19460.

Oakley RH, Laporte S A, Holt J A, Caron M G and Barak L S (2000) Differential Affinities of Visual Arrestin, Beta Arrestin1, and Beta Arrestin2 for G Protein-Coupled Receptors Delineate Two Major Classes of Receptors. *J Biol Chem* **275**: pp 17201-17210.

Ohtsu H, Dempsey P J and Eguchi S (2006) ADAMs As Mediators of EGF Receptor Transactivation by G Protein-Coupled Receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* **291**: pp C1-10.

Okada T and Palczewski K (2001) Crystal Structure of Rhodopsin: Implications for Vision and Beyond. *Curr Opin Struct Biol* **11**: pp 420-426.

Okada T, Sugihara M, Bondar A N, Elstner M, Entel P and Buss V (2004) The Retinal Conformation and Its Environment in Rhodopsin in Light of a New 2.2 Å Crystal Structure. *J Mol Biol* **342**: pp 571-583.

Okamoto T, Murayama Y, Hayashi Y, Inagaki M, Ogata E and Nishimoto I (1991) Identification of a Gs Activator Region of the Beta 2-Adrenergic Receptor That Is Autoregulated Via Protein Kinase A-Dependent Phosphorylation. *Cell* **67**: pp 723-730.

Oldham WM and Hamm H E (2007) How Do Receptors Activate G Proteins? *Adv Protein Chem* **74**: pp 67-93.

Osborn JL, DiBona G F and Thames M D (1981) Beta-1 Receptor Mediation of Renin Secretion Elicited by Low-Frequency Renal Nerve Stimulation. *J Pharmacol Exp Ther* **216**: pp 265-269.

Ostrom RS and Insel P A (2004) The Evolving Role of Lipid Rafts and Caveolae in G Protein-Coupled Receptor Signaling: Implications for Molecular Pharmacology. *Br J Pharmacol* **143**: pp 235-245.

Palanche T, Ilien B, Zoffmann S, Reck M P, Bucher B, Edelstein S J and Galzi J L (2001) The Neurokinin A Receptor Activates Calcium and CAMP Responses Through Distinct Conformational States. *J Biol Chem* **276**: pp 34853-34861.

Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, Miyano M (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science*. 289(5480):739-45.

Pauwels PJ, Gommeren W, Van Lommen G, Janssen P A and Leysen J E (1988) The Receptor Binding Profile of the New Antihypertensive Agent Nebivolol and Its Stereoisomers Compared With Various Beta-Adrenergic Blockers. *Mol Pharmacol* **34**: pp 843-851.

Perroy J, Adam L, Qanbar R, Chenier S and Bouvier M (2003) Phosphorylation-Independent Desensitization of GABA(B) Receptor by GRK4. *EMBO J* **22**: pp 3816-3824.

Perry SJ, Baillie G S, Kohout T A, McPhee I, Magiera M M, Ang K L, Miller W E, McLean A J, Conti M, Houslay M D and Lefkowitz R J (2002) Targeting of Cyclic AMP Degradation to Beta 2-Adrenergic Receptors by Beta-Arrestins. *Science* **298**: pp 834-836.

Pierce KL, Maudsley S, Daaka Y, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. (2000) Role of endocytosis in the activation of the extracellular signal-regulated kinase cascade by sequestering and nonsequestering G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15;97(4):1489-94

Pitcher JA, Freedman N J and Lefkowitz R J (1998) G Protein-Coupled Receptor Kinases. *Annu Rev Biochem* **67**: pp 653-692.

Ponicke K, Heinroth-Hoffmann I and Brodde O E (2002) Differential Effects of Bucindolol and Carvedilol on Noradrenaline-Induced Hypertrophic Response in Ventricular Cardiomyocytes of Adult Rats. *J Pharmacol Exp Ther* **301**: pp 71-76.

Rajagopal K, Whalen E J, Violin J D, Stiber J A, Rosenberg P B, Premont R T, Coffman T M, Rockman H A and Lefkowitz R J (2006) Beta-Arrestin2-Mediated Inotropic Effects of the Angiotensin II Type 1A Receptor in Isolated Cardiac Myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: pp 16284-16289.

Rands E, Candelore M R, Cheung A H, Hill W S, Strader C D and Dixon R A (1990) Mutational Analysis of Beta-Adrenergic Receptor Glycosylation. *J Biol Chem* **265**: pp 10759-10764.

Rapacciuolo A, Suvarna S, Barki-Harrington L, Luttrell L M, Cong M, Lefkowitz R J and Rockman H A (2003) Protein Kinase A and G Protein-Coupled Receptor Kinase Phosphorylation Mediates Beta-1 Adrenergic Receptor Endocytosis Through Different Pathways. *J Biol Chem* **278**: pp 35403-35411.

Rebois RV and Hebert T E (2003) Protein Complexes Involved in Heptahelical Receptor-Mediated Signal Transduction. *Receptors Channels* **9**: pp 169-194.



Reeves PJ, Thurmond R L and Khorana H G (1996) Structure and Function in Rhodopsin: High Level Expression of a Synthetic Bovine Opsin Gene and Its Mutants in Stable Mammalian Cell Lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: pp 11487-11492.

Ren XR, Reiter E, Ahn S, Kim J, Chen W and Lefkowitz R J (2005) Different G Protein-Coupled Receptor Kinases Govern G Protein and Beta-Arrestin-Mediated Signaling of V2 Vasopressin Receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: pp 1448-1453.

Rimoldi V, Reversi A, Taverna E, Rosa P, Francolini M, Cassoni P, Parenti M and Chini B (2003) Oxytocin Receptor Elicits Different EGFR/MAPK Activation Patterns Depending on Its Localization in Caveolin-1 Enriched Domains. *Oncogene* **22**: pp 6054-6060.

Robinson PR, Cohen G B, Zhukovsky E A and Oprian D D (1992) Constitutively Active Mutants of Rhodopsin. *Neuron* **9**: pp 719-725.

Robishaw JD and Berlot C H (2004) Translating G Protein Subunit Diversity into Functional Specificity. *Curr Opin Cell Biol* **16**: pp 206-209.

Rockman HA, Koch W J and Lefkowitz R J (2002) Seven-Transmembrane-Spanning Receptors and Heart Function. *Nature* **415**: pp 206-212.

Rodbell M, Birnbaumer L, Pohl S L and Krans H M (1971a) The Glucagon-Sensitive Adenyl Cyclase System in Plasma Membranes of Rat Liver. V. An Obligatory Role of Guanylnucleotides in Glucagon Action. *J Biol Chem* **246**: pp 1877-1882.

Rodbell M, Krans H M, Pohl S L and Birnbaumer L (1971b) The Glucagon-Sensitive Adenyl Cyclase System in Plasma Membranes of Rat Liver. IV. Effects of Guanylnucleotides on Binding of <sup>125</sup>I-Glucagon. *J Biol Chem* **246**: pp 1872-1876.

Roettger BF, Ghanekar D, Rao R, Toledo C, Yingling J, Pinon D and Miller L J (1997) Antagonist-Stimulated Internalization of the G Protein-Coupled Cholecystokinin Receptor. *Mol Pharmacol* **51**: pp 357-362.

Rousseau G, Nantel F and Bouvier M (1996) Distinct Receptor Domains Determine Subtype-Specific Coupling and Desensitization Phenotypes for Human  $\beta$ . *Mol Pharmacol* **49**: pp 752-760.

Rybin VO, Xu X, Lisanti M P and Steinberg S F (2000) Differential Targeting of Beta - Adrenergic Receptor Subtypes and Adenylyl Cyclase to Cardiomyocyte Caveolae. A Mechanism to Functionally Regulate the CAMP Signaling Pathway. *J Biol Chem* **275**: pp 41447-41457.

Sabri A, Pak E, Alcott S A, Wilson B A and Steinberg S F (2000) Coupling Function of Endogenous Alpha(1)- and Beta-Adrenergic Receptors in Mouse Cardiomyocytes. *Circ Res* **86**: pp 1047-1053.

Salamon Z, Hruby V J, Tollin G and Cowell S (2002) Binding of Agonists, Antagonists and Inverse Agonists to the Human Delta-Opioid Receptor Produces Distinctly Different Conformational States Distinguishable by Plasmon-Waveguide Resonance Spectroscopy. *J Pept Res* **60**: pp 322-328.

Salpeter SR, Ormiston T M and Salpeter E E (2004) Cardiovascular Effects of Beta-Agonists in Patients With Asthma and COPD: a Meta-Analysis. *Chest* **125**: pp 2309-2321.

Samama P, Cotecchia S, Costa T and Lefkowitz R J (1993) A Mutation-Induced Activated State of the Beta 2-Adrenergic Receptor. Extending the Ternary Complex Model. *J Biol Chem* **268** : pp 4625-4636.

Samama P, Pei G, Costa T, Cotecchia S and Lefkowitz R J (1994) Negative Antagonists Promote an Inactive Conformation of the Beta 2-Adrenergic Receptor. *Mol Pharmacol* **45**: pp 390-394.

Schiöth HB and Fredriksson R (2005) The GRAFS Classification System of G-Protein Coupled Receptors in Comparative Perspective. *Gen Comp Endocrinol* **142**: pp 94-101.

Schmitt JM and Stork P J (2000) Beta 2-Adrenergic Receptor Activates Extracellular Signal-Regulated Kinases (ERKs) Via the Small G Protein Rap1 and the Serine/Threonine Kinase B-Raf. *J Biol Chem* **275**: pp 25342-25350.

Scott MG, Le Rouzic E, Perianin A, Pierotti V, Enslin H, Benichou S, Marullo S and Benmerah A (2002) Differential Nucleocytoplasmic Shuttling of Beta-Arrestins. Characterization of a Leucine-Rich Nuclear Export Signal in Beta-Arrestin2. *J Biol Chem* **277**: pp 37693-37701.

Seifert R and Wenzel-Seifert K (2002) Constitutive Activity of G-Protein-Coupled Receptors: Cause of Disease and Common Property of Wild-Type Receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **366**: pp 381-416.

Shenoy SK, Drake M T, Nelson C D, Houtz D A, Xiao K, Madabushi S, Reiter E, Premont R T, Lichtarge O and Lefkowitz R J (2006b) Beta-Arrestin-Dependent, G Protein-Independent ERK1/2 Activation by the Beta2 Adrenergic Receptor. *J Biol Chem* **281**: pp 1261-1273.

Shenoy SK, Drake M T, Nelson C D, Houtz D A, Xiao K, Madabushi S, Reiter E, Premont R T, Lichtarge O and Lefkowitz R J (2006a) Beta-Arrestin-Dependent, G Protein-Independent ERK1/2 Activation by the Beta2 Adrenergic Receptor. *J Biol Chem* **281**: pp 1261-1273.

Shenoy SK, McDonald P H, Kohout T A and Lefkowitz R J (2001) Regulation of Receptor Fate by Ubiquitination of Activated Beta 2-Adrenergic Receptor and Beta-Arrestin. *Science* **294**: pp 1307-1313.

Shih M, Lin F, Scott J D, Wang H Y and Malbon C C (1999) Dynamic Complexes of Beta2-Adrenergic Receptors With Protein Kinases and Phosphatases and the Role of Gravin. *J Biol Chem* **274**: pp 1588-1595.

Shiina T, Kawasaki A, Nagao T and Kurose H (2000) Interaction With Beta-Arrestin Determines the Difference in Internalization Behavior Between b. *J Biol Chem* **275**: pp 29082-29090.

Shiina T, Nagao T and Kurose H (2001) Low Affinity of Beta1-Adrenergic Receptor for Beta-Arrestins Explains the Resistance to Agonist-Induced Internalization. *Life Sci* **68**: pp 2251-2257.

Shoemaker JL, Ruckle M B, Mayeux P R and Prather P L (2005) Agonist-Directed Trafficking of Response by Endocannabinoids Acting at CB2 Receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **315**: pp 828-838.

Simmons G, Clapham P R, Picard L, Offord R E, Rosenkilde M M, Schwartz T W, Buser R, Wells T N and Proudfoot A E (1997) Potent Inhibition of HIV-1 Infectivity in Macrophages and Lymphocytes by a Novel CCR5 Antagonist. *Science* **276**: pp 276-279.

Simonds WF (1999) G Protein Regulation of Adenylate Cyclase. *Trends Pharmacol Sci* **20**: pp 66-73.

Singer SJ and Nicolson G L (1972) The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science* **175**: pp 720-731.

Smith FD, Langeberg L K and Scott J D (2006) The Where's and When's of Kinase Anchoring. *Trends Biochem Sci* **31**: pp 316-323.

Sneddon WB, Syme C A, Bisello A, Magyar C E, Rochdi M D, Parent J L, Weinman E J, Abou-Samra A B and Friedman P A (2003) Activation-Independent Parathyroid Hormone Receptor Internalization Is Regulated by NHERF1 (EBP50). *J Biol Chem* **278**: pp 43787-43796.

Sondek J and Siderovski D P (2001) Ggamma-Like (GGL) Domains: New Frontiers in G-Protein Signaling and Beta-Propeller Scaffolding. *Biochem Pharmacol* **61**: pp 1329-1337.

Spengler D, Waeber C, Pantaloni C, Holsboer F, Bockaert J, Seeburg P H and Journot L (1993) Differential Signal Transduction by Five Splice Variants of the PACAP Receptor. *Nature* **365**: pp 170-175.

Steinberg SF (2004) Beta(2)-Adrenergic Receptor Signaling Complexes in Cardiomyocyte Caveolae/Lipid Rafts. *J Mol Cell Cardiol* **37**: pp 407-415.

Stephenson RP (1997) A Modification of Receptor Theory. 1956. *Br J Pharmacol* **120**: pp 106-120.

Stork PJ and Schmitt J M (2002) Crosstalk Between CAMP and MAP Kinase Signaling in the Regulation of Cell Proliferation. *Trends Cell Biol* **12**: pp 258-266.

Strader CD, Candelore M R, Hill W S, Sigal I S and Dixon R A (1989) Identification of Two Serine Residues Involved in Agonist Activation of the Beta-Adrenergic Receptor. *J Biol Chem* **264**: pp 13572-13578.

Strange PG (2002) Mechanisms of Inverse Agonism at G-Protein-Coupled Receptors. *Trends Pharmacol Sci* **23**: pp 89-95.

Sun Y, Huang J, Xiang Y, Bastepe M, Juppner H, Kobilka B K, Zhang J J and Huang X Y (2007) Dosage-Dependent Switch From G Protein-Coupled to G Protein-Independent Signaling by a GPCR. *EMBO J* **26**: pp 53-64.

Suzuki T, Nguyen C T, Nantel F, Bonin H, Valiquette M, Frielle T and Bouvier M (1992) Distinct Regulation of Be. *Mol Pharmacol* **41**: pp 542-548.

Swaminath G, Deupi X, Lee T W, Zhu W, Thian F S, Kobilka T S and Kobilka B (2005) Probing the Beta2 Adrenoceptor Binding Site With Catechol Reveals Differences in Binding and Activation by Agonists and Partial Agonists. *J Biol Chem* **280**: pp 22165-22171.

- Swaminath G, Xiang Y, Lee T W, Steenhuis J, Parnot C and Kobilka B K (2004) Sequential Binding of Agonists to the Beta2 Adrenoceptor. Kinetic Evidence for Intermediate Conformational States. *J Biol Chem* **279**: pp 686-691.
- Takesono A, Cismowski M J, Ribas C, Bernard M, Chung P, Hazard S, III, Duzic E and Lanier S M (1999) Receptor-Independent Activators of Heterotrimeric G-Protein Signaling Pathways. *J Biol Chem* **274**: pp 33202-33205.
- Tao J, Wang H Y and Malbon C C (2003) Protein Kinase A Regulates AKAP250 (Gravin) Scaffold Binding to the Beta2-Adrenergic Receptor. *EMBO J* **22**: pp 6419-6429.
- Tasken K and Aandahl E M (2004) Localized Effects of CAMP Mediated by Distinct Routes of Protein Kinase A. *Physiol Rev* **84**: pp 137-167.
- Terrillon S and Bouvier M (2004) Roles of G-Protein-Coupled Receptor Dimerization. *EMBO Rep* **5**: pp 30-34.
- Tholanikunnel BG and Malbon C C (1997) A 20-Nucleotide (A + U)-Rich Element of Beta2-Adrenergic Receptor (Beta2AR) mRNA Mediates Binding to Beta2AR-Binding Protein and Is Obligatory for Agonist-Induced Destabilization of Receptor mRNA. *J Biol Chem* **272**: pp 11471-11478.
- Thomas SM and Brugge J S (1997) Cellular Functions Regulated by Src Family Kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**: pp 513-609.
- Tran TM, Friedman J, Qunaibi E, Baameur F, Moore R H and Clark R B (2004) Characterization of Agonist Stimulation of CAMP-Dependent Protein Kinase and G Protein-Coupled Receptor Kinase Phosphorylation of the Beta2-Adrenergic Receptor Using Phosphoserine-Specific Antibodies. *Mol Pharmacol* **65**: pp 196-206.
- Tsao P, Cao T and von Zastrow M (2001) Role of Endocytosis in Mediating Downregulation of G-Protein-Coupled Receptors. *Trends Pharmacol Sci* **22**: pp 91-96.

Ueyama T, Kawashima S, Sakoda T, Rikitake Y, Ishida T, Kawai M, Yamashita T, Ishido S, Hotta H and Yokoyama M (2000) Requirement of Activation of the Extracellular Signal-Regulated Kinase Cascade in Myocardial Cell Hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* **32**: pp 947-960.

Urban JD, Clarke W P, von Zastrow M, Nichols D E, Kobilka B, Weinstein H, Javitch J A, Roth B L, Christopoulos A, Sexton P M, Miller K J, Spedding M and Mailman R B (2007) Functional Selectivity and Classical Concepts of Quantitative Pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther* **320**: pp 1-13.

Valiquette M, Parent S, Loisel T P and Bouvier M (1995) Mutation of Tyrosine-141 Inhibits Insulin-Promoted Tyrosine Phosphorylation and Increased Responsiveness of the Human Beta 2-Adrenergic Receptor. *EMBO J* **14**: pp 5542-5549.

van Biesen T, Hawes B E, Luttrell D K, Krueger K M, Touhara K, Porfiri E, Sakaue M, Luttrell L M and Lefkowitz R J (1995) Receptor-Tyrosine-Ki. *Nature* **376**: pp 781-784.

Varga EV, Navratilova E, Stropova D, Jambrosic J, Roeske W R and Yamamura H I (2004) Agonist-Specific Regulation of the Delta-Opioid Receptor. *Life Sci* **76**: pp 599-612.

Vassilatis DK, Hohmann J G, Zeng H, Li F, Ranchalis J E, Mortrud M T, Brown A, Rodriguez S S, Weller J R, Wright A C, Bergmann J E and Gaitanaris G A (2003) The G Protein-Coupled Receptor Repertoires of Human and Mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: pp 4903-4908.

Vauquelin G and Van L, I (2005) G Protein-Coupled Receptors: a Count of 1001 Conformations. *Fundam Clin Pharmacol* **19**: pp 45-56.

Venter JC, Adams M D, Myers E W, Li P W, Mural R J, Sutton G G, Smith H O, Yandell M, Evans C A, Holt R A, Gocayne J D, Amanatides P, Ballew R M, Huson D H, Wortman J R, Zhang Q, Kodira C D, Zheng X H, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas P D,

Zhang J, Gabor Miklos G L, Nelson C, Broder S, Clark A G, Nadeau J, McKusick V A, Zinder N, Levine A J, Roberts R J, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannedhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di F, V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian A E, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman T J, Higgins M E, Ji R R, Ke Z, Ketchum K A, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov G V, Milshina N, Moore H M, Naik A K, Narayan V A, Neelam B, Nusskern D, Rusch D B, Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang Z, Wang A, Wang X, Wang J, Wei M, Wides R, Xiao C, Yan C, Yao A, Ye J, Zhan M, Zhang W, Zhang H, Zhao Q, Zheng L, Zhong F, Zhong W, Zhu S, Zhao S, Gilbert D, Baumhueter S, Spier G, Carter C, Cravchik A, Woodage T, Ali F, An H, Awe A, Baldwin D, Baden H, Barnstead M, Barrow I, Beeson K, Busam D, Carver A, Center A, Cheng M L, Curry L, Danaher S, Davenport L, Desilets R, Dietz S, Dodson K, Doup L, Ferriera S, Garg N, Gluecksmann A, Hart B, Haynes J, Haynes C, Heiner C, Hladun S, Hostin D, Houck J, Howland T, Ibegwam C, Johnson J, Kalush F, Kline L, Koduru S, Love A, Mann F, May D, McCawley S, McIntosh T, McMullen I, Moy M, Moy L, Murphy B, Nelson K, Pfannkoch C, Pratts E, Puri V, Qureshi H, Reardon M, Rodriguez R, Rogers Y H, Romblad D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint N N, Tse S, Vech C, Wang G, Wetter J, Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril J F, Guigo R, Campbell M J, Sjolander K V, Karlak B, Kejariwal A, Mi H, Lazareva B, Hatton T, Narechania A, Diemer K, Muruganujan A, Guo N, Sato S, Bafna V, Istrail S, Lippert R, Schwartz R, Walenz B, Yooseph S, Allen D, Basu A, Baxendale J, Blick L, Caminha M, Carnes-Stine J, Caulk P, Chiang Y H, Coyne M, Dahlke C, Mays A, Dombroski M, Donnelly M, Ely D, Esparham S, Fosler C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glodek A, Gorokhov M, Graham K, Gropman B, Harris M, Heil J, Henderson S, Hoover J, Jennings D, Jordan C, Jordan J, Kasha J, Kagan L, Kraft C, Levitsky A, Lewis M, Liu X, Lopez J, Ma D, Majoros W, McDaniel J, Murphy S, Newman



M, Nguyen T, Nguyen N and Nodell M (2001) The Sequence of the Human Genome. *Science* **291**: pp 1304-1351.

Villardaga JP, Steinmeyer R, Harms G S and Lohse M J (2005) Molecular Basis of Inverse Agonism in a G Protein-Coupled Receptor. *Nat Chem Biol* **1**: pp 25-28.

Volmat V and Pouyssegur J (2001) Spatiotemporal Regulation of the P42/P44 MAPK Pathway. *Biol Cell* **93**: pp 71-79.

Waters C, Pyne S and Pyne N J (2004) The Role of G-Protein Coupled Receptors and Associated Proteins in Receptor Tyrosine Kinase Signal Transduction. *Semin Cell Dev Biol* **15**: pp 309-323.

Watson C, Chen G, Irving P, Way J, Chen W J and Kenakin T (2000) The Use of Stimulus-Biased Assay Systems to Detect Agonist-Specific Receptor Active States: Implications for the Trafficking of Receptor Stimulus by Agonists. *Mol Pharmacol* **58**: pp 1230-1238.

Wedegaertner PB (1998) Lipid Modifications and Membrane Targeting of G Alpha. *Biol Signals Recept* **7**: pp 125-135.

Wei H, Ahn S, Shenoy S K, Karnik S S, Hunyady L, Luttrell L M and Lefkowitz R J (2003) 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* **100**: pp 10782-10787.

Weinman EJ, Hall R A, Friedman P A, Liu-Chen L Y and Shenolikar S (2006) The Association of NHERF Adaptor Proteins With g Protein-Coupled Receptors and Receptor Tyrosine Kinases. *Annu Rev Physiol* **68**: pp 491-505.

Weiss JM, Morgan P H, Lutz M W and Kenakin T P (1996) The Cubic Ternary Complex Receptor-Occupancy Model. III. Resurrecting Efficacy. *J Theor Biol* **181**: pp 381-397.

Werry TD, Gregory K J, Sexton P M and Christopoulos A (2005) Characterization of Serotonin 5-HT<sub>2C</sub> Receptor Signaling to Extracellular Signal-Regulated Kinases 1 and 2. *J Neurochem* **93**: pp 1603-1615.

Wieland K, Zuurmond H M, Krasel C, Ijzerman A P and Lohse M J (1996) Involvement of Asn-293 in Stereospecific Agonist Recognition and in Activation of the Beta 2-Adrenergic Receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: pp 9276-9281.

Wilden U, Hall S W and Kuhn H (1986) Phosphodiesterase Activation by Photoexcited Rhodopsin Is Quenched When Rhodopsin Is Phosphorylated and Binds the Intrinsic 48-KDa Protein of Rod Outer Segments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: pp 1174-1178.

Willars GB (2006) Mammalian RGS Proteins: Multifunctional Regulators of Cellular Signalling. *Semin Cell Dev Biol* **17**: pp 363-376.

Willoughby EA and Collins M K (2005) Dynamic Interaction Between the Dual Specificity Phosphatase MKP7 and the JNK3 Scaffold Protein Beta-Arrestin 2. *J Biol Chem* **280**: pp 25651-25658.

Wong SK, Parker E M and Ross E M (1990) Chimeric Muscarinic Cholinergic: Beta-Adrenergic Receptors That Activate G<sub>s</sub> in Response to Muscarinic Agonists. *J Biol Chem* **265**: pp 6219-6224.

Xiao K, McClatchy D B, Shukla A K, Zhao Y, Chen M, Shenoy S K, Yates J R, III and Lefkowitz R J (2007) Functional Specialization of Beta-Arrestin Interactions Revealed by Proteomic Analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: pp 12011-12016.

Xiao RP (2001) Beta-Adrenergic Signaling in the Heart: Dual Coupling of the Beta<sub>2</sub>-Adrenergic Receptor to G<sub>s</sub> and G<sub>i</sub> Proteins. *Sci STKE* **2001**: pp RE15.

Xie GX and Palmer P P (2007) How Regulators of G Protein Signaling Achieve Selective Regulation. *J Mol Biol* **366**: pp 349-365.

Xu X, Zeng W, Popov S, Berman D M, Davignon I, Yu K, Yowe D, Offermanns S, Muallem S and Wilkie T M (1999) RGS Proteins Determine Signaling Specificity of Gq-Coupled Receptors. *J Biol Chem* **274**: pp 3549-3556.

Yano N, Ianus V, Zhao T C, Tseng A, Padbury J F and Tseng Y T (2007) A Novel Signaling Pathway for Beta-Adrenergic Receptor-Mediated Activation of Phosphoinositide 3-Kinase in H9c2 Cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**: pp H385-H393.

Yao X, Parnot C, Deupi X, Ratnala V R, Swaminath G, Farrens D and Kobilka B (2006) Coupling Ligand Structure to Specific Conformational Switches in the Beta2-Adrenoceptor. *Nat Chem Biol* **2**: pp 417-422.

Zaccolo M, De Giorgi F, Cho C Y, Feng L, Knapp T, Negulescu P A, Taylor S S, Tsien R Y and Pozzan T (2000) A Genetically Encoded, Fluorescent Indicator for Cyclic AMP in Living Cells. *Nat Cell Biol* **2**: pp 25-29.

## **6. ANNEXE**

**« La nature évasive de l'efficacité des composés: implications pour la recherche thérapeutique. »**

**« The evasive nature of drug efficacy: implications for drug discovery.»**

Ségolène Galandrin, Geneviève Oligny-Longpré et Michel Bouvier

Trends Pharmacol Sci. 2007 Aug;28(8):423-30. Epub 2007 Jul 19.

# **The Evasive Nature of Drug Efficacy; Implications for Drug Discovery**

Sékolène Galandrin\*, Geneviève Oligny-Longpré\* and Michel Bouvier

Department of Biochemistry and Groupe de Recherche Universitaire sur le Médicament,  
Institute for Research in Immunology and Cancer, Université de Montréal, Montréal  
(Québec) Canada, H3C 3J7

\* Have contributed equally to this work

Corresponding author: Dr. Michel Bouvier

Institute for Research in Immunology and Cancer, Université de Montréal,

C.P. 6128 Succursale Centre-Ville

Montréal, QC, Canada, H3C 3J7.

Tel.: 514-343-6319; [REDACTED]

**Efficacies of drugs are generally determined by their ability to promote a quantifiable biological response. In the context of the classical receptor occupancy theory, the efficacy is considered an intrinsic property of the ligand/receptor pair and often assumed to be the same towards all the responses evoked by this pair. The recognition that a single receptor can engage different signalling pathways and that various drugs binding to this receptor may differentially influence each of these pathways led to the reassessment of the efficacy concept. Of particular notice, ligands that behave as agonists toward a given signalling pathway, can act, through the same receptor, as antagonists or even inverse agonists on a different pathway in the same cell. These observations often referred to as ligand-directed trafficking of receptor signalling, functional selectivity, biased agonism, ligand-biased efficacy, collateral or pluridimensional efficacy have important implications for the molecular definition of efficacy and the process of drug discovery.**

## **INTRODUCTION**

Since the inception of the concept of receptor to explain drug action by Clark [1, 2], pharmacologists have tried to classify biologically active compounds based on their ability to interact with and influence receptor activity. While working on the phenomenon of partial agonism, Stephenson [3] recognized that at least two distinct parameters needed to be invoked to characterize an agonist: the propensity of the compound to bind to the

receptor as well as its ability to produce a response once bound. He thus introduced the terms affinity for the binding step and efficacy for the production of a response. Although direct measurement of affinity was made possible by the advent of radio-ligand binding methodologies in the seventies [4], the efficacy term has remained somewhat elusive. One of the difficulties in obtaining meaningful quantitative assessment of efficacy resides in the fact that its measurements is indirect, being based on the assessment of down-stream functional responses such as second messenger generation, ion fluxes or even more distal events such as gene expression regulation. In addition to the tissue-dependent variability of the activity measured, which was originally recognized by Ariens [5] and can reflect differences in the number of receptor or their coupling efficiency, more recent findings suggest that the apparent efficacy of drugs also varies depending of the effector systems considered, confirming the evasive nature of efficacy.

Classically, drugs acting on GPCR were classified into two main categories, agonists and antagonists that respectively promote or block receptor activation. In the last ten years, the recognition that GPCR can exhibit constitutive activity led to the discovery of a third class of compounds that can decrease such spontaneous activity and are known as inverse agonists [6, 7]. In the framework of the classical receptor occupancy theory proposing that receptors are in equilibrium between inactive (R) and active (R\*) conformations, agonists and inverse agonists are believed to promote or stabilize R\* and R, respectively. Neutral competitive antagonists for their part presumably compete for the binding of agonists or inverse agonists but do not affect the equilibrium between receptor conformations, thus having no intrinsic activity (for reviews see [8, 9]). Because the receptor conformational

changes promoted by ligands were not directly accessible until recently, the efficacies of<sup>V</sup> drugs were generally deduced by their ability to modulate biological responses that can be measured experimentally. Thus, the classification is commonly based on the ability of ligands to modulate the G protein-dependent signalling pathway linked to the receptor under study (ex: measuring cAMP, IP<sub>3</sub>, Ca<sup>++</sup> intracellular concentrations). Classically, only one signalling pathway was assessed for a given receptor and was used to define the efficacies of all ligands acting through this receptor. However, many studies have shown that receptors are not necessarily faithful to a single signalling pathway. For instance, several receptors were found to couple simultaneously to more than one G protein subtype (For a review, [10]). Although many of the experiments demonstrating the promiscuous behavior of GPCR were carried out in heterologous expression systems where their propensity to interact with distinct G proteins could result from their over-expression, ample studies have confirmed their pleiotropic nature in native tissues. One such example is given by the thyrotropin receptor (TSH) that was found to simultaneously activate members of all four classes of G proteins (G<sub>s</sub>, G<sub>i/o</sub>, G<sub>q/11</sub>, and G<sub>12</sub>) [11] in human thyroid membranes. In addition to this multiplicity in G protein coupling, GPCR have also been shown to interact with a host of cytosolic and membranes proteins, including accessory proteins such as arrestins, PDZ-domain containing proteins that can act as scaffolds, G protein receptor kinases (GRK), tyrosines kinases, ion channels, and many others (for reviews, [12, 13]). Although most of these interactions were first appreciated in the context of G protein-mediated signalling regulation, many are now seen as genuine signalling events that in some cases can occur independently of G protein involvement [14]. As a result, GPCR



display a plethora of behaviors, including modulation of different signalling pathways, desensitization, internalization, recycling and degradation, all being able to contribute to the biological actions of ligand-bound receptors (Figure 1a).

According to the classical receptor occupancy theory of receptor activation, where receptors are in equilibrium between one active ( $R^*$ ) and one inactive ( $R$ ) receptor state, it could be predicted that, notwithstanding the peculiarities of some of the signalling pathways considered, the relative ability of a particular ligand to modulate all pathways engaged by the receptor should be similar, allowing to define an “efficacy” considered as an intrinsic property of a ligand/receptor couple. However, in the past decade, several studies challenged this prediction.

### **LIGAND-BIASED RANK ORDER OF POTENCY AND MAXIMAL RESPONSES**

Among the evidences that lead investigators to reassess the operational definition of efficacy were the observations that rank order of the relative potencies and/or maximal responses observed for a panel of ligands could be different when considering the different signalling pathways regulated by a unique receptor [15-25]. This type of data was often interpreted as an indication that distinct ligands can stabilize different active conformations of the receptor that differ in their propensities to activate the various signalling pathways. Although this is a reasonable explanation, some of these data could also be reconciled with the classical receptor occupancy theory by invoking differences in signal amplification between the pathways, leading to pathway-specific “spare receptors”. Independently of the

mechanism underlying this phenomenon, similar observations made by many investigators firmly established that the ability of a compound to modulate a given signalling pathway cannot be directly extrapolated to another signalling pathway engaged by the same receptor.

The observation in several studies that the rank order of maximal response obtained for series of ligands can be reverse depending on the signalling pathway considered for a given receptor could not be explained by difference in amplification and provided additional support to the notion that a ligand can display distinct efficacies toward different effector systems. A classical example of such phenomenon is provided by the study of Berg et al. [16] that considered the maximal responses evoked by several agonists of the serotonin 2A and 2C (5HT-2A and 2C) receptors on two signal transduction pathways independently coupled to the receptors (i.e. inositol phosphate accumulation and arachidonic acid release). For the 5HT-2C receptor, the authors found that TFMPP and quipazine preferentially activated the inositol phosphate production whereas DOI and bufotenin favoured the arachidonic acid release. These data and similar results that have been extensively reviewed [26] clearly suggest that more than one active receptor conformation can exist and be promoted or stabilized differentially by different ligands, a phenomenon often referred as ligand-directed trafficking of receptor signalling (LDTRS), functional selectivity or biased agonism [27-29] that we will thereafter call ligand-biased efficacy (Figure 1b).

## **LIGANDS DUAL EFFICACY**

Among the most spectacular evidences supporting the concept of ligand-biased efficacy is the observation that some molecules possess dual and opposite efficacies towards different pathways [30-35]. For instance, it was observed that ICI118,551 and propranolol, two inverse agonists for the  $\beta$ 2-adrenergic receptor-stimulated cAMP production, stimulate the mitogen-activated protein kinases (MAPK) ERK1/2, thus acting as agonists on that pathway [30]. Similarly, proxyfan, a high affinity histamine H3 receptor ligand, behaves as a partial agonist for both cAMP accumulation and MAPK activation but acts as an inverse agonist for the independently regulated arachidonic acid release [31]. The existence of compounds having opposite efficacies on different signalling pathways through a unique receptor strongly suggests that the receptor conformation stabilized by a given ligand can be active toward one effector system while being inactive for another. This is clearly irreconcilable with the classical receptor occupancy theory of receptor activation, predicting that a receptor is either on or off. A multi-state receptor model whereby individual ligands can stabilize or select specific conformations with different efficacy profiles toward downstream effectors more easily explains such observations. In that context, when considering two distinct signalling pathways modulated by a single receptor, multiple efficacy combinations are theoretically possible. Compounds could be agonist for the two pathways, inverse agonist for the two pathways, or have opposite efficacies on each of the pathways. This prediction was recently verified in a study assessing the ability of a panel of beta-adrenergic ligands to modulate the activity of the adenylate cyclase (AC) and the MAPK. Inverse agonists for the AC activity were found to be either agonists, neutral antagonists or inverse agonists for the MAPK pathway whereas

agonists for the AC pathway were either agonists or neutral antagonists toward MAPK.

These studies revealed that classifying compounds based on their ability to modulate a single effector system does not provide a complete description of their signalling potential. A more complete representation of the signalling potentialities of a ligand could therefore be better served by considering the diversity of activities of the different effectors engaged by a given receptor. Such representation can be achieved using a Cartesian representation in which each dimension corresponds to a signalling output (Figure 2). This empirical model offers a representation of efficacy in “n” dimension, resulting in “ $2^n$ ” efficacy quadrants corresponding to the entire signalling potential of a receptor. Hence, the efficacy of a compound could theoretically be described by the use of spatial coordinates allowing the attribution of quantitative terms for each of the activity deemed important for a particular system.

Obviously, the large number of possible signalling output makes it difficult in practice to systematically represent the efficacy of compound/receptor couples according to the ensemble of their potential activities. Pragmatically, choices concerning the most pertinent signalling events for a given system will have to be made and most descriptions will remain fragmentary. Thus, educated decisions concerning the outputs to be considered will need to be made for the characterization of a specific drug in a given context.

## **MOLECULAR BASIS OF LIGAND-BIASED SIGNALLING**

Independently of the impact that the findings described above have on the definition and representation of efficacy, they raise fundamental questions about the molecular correlates of signalling efficacy. The underlying mechanism for the pluridimensionality of efficacy has been attributed to the ability of compounds to promote unique, ligand-selective conformations of receptors that have differential propensities to engage different transduction pathways. Although direct links between specific receptor conformations and differential signalling efficacies have not been established yet, several studies have documented the ability of different ligands to promote/stabilize ligand-selective structural rearrangements. Using purified receptors covalently labelled with fluorescent probes, it was established that ligands with different signalling efficacies lead to structural rearrangements that have distinct fluorescence signature [36, 37]. More recently, monitoring intramolecular FRET changes between genetically engineered fluorescent markers within receptors allowed the detection of apparently opposite conformational changes promoted by distinct ligands [38, 39]. In these studies, the differences in conformational changes were analysed in the context of their efficacy toward a single signalling pathway and much importance was given to the difference observed between agonists, partial agonists and inverse agonists for that pathway. Monitoring changes between only two points within the receptor may not be sufficient to appreciate the subtle structural difference that may direct efficacy profiles toward various effector systems. Insertion of multiple probes within the receptor/effector complexes may provide the number of “view-points” that may be needed to detect the full spectrum of conformational changes stabilized by various ligands. The detection of distinct conformational changes promoted by different ligands by monitoring BRET between

probes inserted into different positions within the G protein  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  subunits as well as into the receptor [40, 41] leads to believe that this is a possibility worth investigating.

### **LIGAND SELECTION OF DISTINCT POTENTIAL SIGNALLING PARTNERS**

Although the detection of the precise conformational changes underlying the specific efficacy profiles of different ligands will most likely await further technological developments, ample evidence indicate that different ligands can favour the interaction of receptor with distinct proximal effectors. Ligand-selective coupling to distinct G proteins has been particularly well studied in that regard [42-52]. Interestingly, although the same signalling read-out may be turned on, activation by different ligands can select different G proteins to achieve this response. For example, in HEK293 over-expressing *Gas*, amylin was found to stimulate calcium transient response with a higher potency than rat CGRP through the calcitonin receptor whereas the contrary was found in *Gai*-enriched cells, indicating that rat CGRP favors coupling of the calcitonin receptor to *Gai* whereas amylin favors its coupling to *Gas* [50]. Ligand-selective G protein coupling was not only observed in heterologous over-expression systems. For instance, in hippocampal neurons, it was demonstrated that, although activation of cannabinoid 1 (CB1) receptor classically leads to *Gai* coupling and inhibition of cAMP production, the CB1 aminoalkylindole agonist WIN55,212 increased intracellular calcium through a *Gai*-independent process involving *Gaq/11* [48].

Agonist-biased effects are not limited to selection among G protein subtypes and examples of selection between G protein-dependent and -independent pathways have also been reported. One signalling pathway for which G protein-independent signalling has been particularly well characterized is the activation of the MAPK cascade. Although almost all G protein subtypes (Gq/11, Gi/o, Gs) can engage pathways leading to MAPK activation, additional cascades working independently of the G proteins but involving the scaffolding protein  $\beta$ arrestins have been described [53, 54]. Strikingly, some of the ligands working through receptors that can activate MAPK via both G protein-dependent and independent processes can select one or the other of these pathways. A good example of such selection is provided by the parathyroid hormone (PTH) receptor. Whereas PTH 1-34 activates MAPK through stimulation of both Gas and  $\beta$ arrestin pathways, PTH 7-34 and PTHrp 1-36 are able to selectively engage either  $\beta$ -arrestin (PTH 7-34) or G protein (PTHrp 1-36) to stimulate MAPK [55]. Similarly, although binding of angiotensin-II (Ang-II) to the angiotensin-1 (AT1) receptor engage both G $\alpha$ q and  $\beta$ arrestin to activate MAPK, the Ang-II analog [sarcosine<sup>1</sup>,Ile<sup>4</sup>,Ile<sup>8</sup>]Ang-II fails to activate G $\alpha$ q-mediated signalling and stimulates MAPK in an exclusively  $\beta$ arrestin-dependent manner [53].

### **EXTENDING THE CONCEPT OF PLURIDIMENSIONALITY OF EFFICACY**

Over the last twenty years, it has become clear that signalling efficacy through GPCRs is not static and that multiple mechanisms control the responsiveness of receptor systems as a function of both the intensity and duration of the stimuli. Among these, desensitization and internalization resulting from receptor phosphorylation have attracted considerable

attention. In recent years, increasing evidences have suggested that not all ligands with similar apparent efficacy toward a given signalling pathway display similar propensity to trigger these regulatory events, a concept that has been termed collateral efficacy [56-64].

Given that the desensitization and internalization processes have direct impact on signalling output, the ability of different compounds to initiate them should probably be included into the pluridimensional description of GPCR ligand efficacy. Classically, agonists but not antagonists were believed to induce ligand-promoted endocytosis. Clearly, the recognition that a compound can be an agonist for a signalling pathway but an antagonist or even an inverse agonist for another (see above) makes this simple vision obsolete. Antagonist-induced down-regulation of the 5HT-2A receptor was reported as early as the late 70s [65] and observed for numerous other GPCRs since then. For instance, neutral antagonists for the cognate G protein signalling pathways of the cholecystinin receptor (CCKR) [66], endothelin A receptor [67], PTH receptor [68], neuropeptide Y Y1 receptor [69] and chemokine (C-C motif) receptor 5 (CCR5) [70] were described to trigger receptor internalization. On the other hand, it was observed that NIB56297 and NIB55886, two efficacious melanocortin 4 (MC4) receptor agonists towards cAMP accumulation and calcium mobilization do not promote receptor internalization whereas the endogenous MSH peptides lead to receptor endocytosis in addition to being agonists on the two signalling pathways [71]. A recent study extended these observations to the endogenous inverse agonist agouti-related protein (AgRP) that inhibits spontaneous MC4R and MC3R signalling but induces endocytosis of the two receptors [72]. Additional examples of



ligand-biased efficacy extending beyond receptor signalling can be found in [73]. In addition to differentially influence the desensitization/resensitization patterns of a given receptor, ligands that differ in their ability to promote endocytosis may have different signalling consequences. Indeed, ligand-promoted endocytosis of several GPCRs have been shown to be either required for MAPK activation and/or to spatially direct the site of action of the activated MAPK [74]. Thus, the spatio-temporal regulation of both the responsiveness of classical plasma membrane-restricted signalling and of the intracellular activation of MAPK can be affected differently by ligands promoting distinct desensitization and endocytosis patterns.

A striking example of how ligand-biased regulation of desensitization and endocytosis could have important physiological and therapeutic repercussion is provided by the  $\mu$ -opioid receptor. Whereas morphine is an agonist towards the Gai-promoted inhibition of cAMP production and potassium channel opening, it is much less effective than other opioid agonists in promoting receptor phosphorylation,  $\beta$ -arrestin recruitment, and internalization [63]. The observation that various opioid ligands differ in their relative propensity to promote signalling and endocytosis led to the concept of “RAVE” (relative activity versus endocytosis) [75] and it was suggested that compounds with high RAVEs (ie: high apparent efficacy towards signalling but low propensity to promote endocytosis) would have greater propensity to lead to a loss of analgesic action and the development of tolerance. Although the predictive power of such a parameter remains to be firmly

established, these studies reinforce the notion that ligand-biased signalling and regulation could have dramatic implications for the development of therapeutically active compounds.

### **BIASED ALLOSTERIC MODULATION OF SIGNALLING**

In recent years, increasing attention has been given to compounds that influence receptor activity by binding to sites distinct to that of the natural ligands. These allosteric compounds can either have intrinsic agonistic activity (allosteric agonists) and/or modulate the activity of orthosteric ligands acting through the binding pocket of the natural ligand (allosteric modulators). The fact that orthosteric ligands can have distinct apparent efficacies depending on the signalling output considered thus raises the possibility that allosteric modulators may also differentially regulate the various responses evoked. For instance, binding of allosteric modulators could theoretically change the receptor's conformation in a way that favors a signalling pathway but inhibit another one, thus being simultaneously a positive and negative modulator depending of the signalling activity considered. Such theoretical possibility has been confirmed experimentally by the observation that N-{4-chloro-2-[(1,3-dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol-2-yl) methyl]phenyl}-2-hydroxybenzamide (CPPHA), an allosteric modulator of the mGluR5, potentiates the calcium mobilization induced by the orthosteric agonist 3,3'-difluorobenzaldazine (DFB) but decreases the maximal ERK1/2 activation stimulated by the same orthosteric agonist in cortical astrocytes [76].

## IMPACT OF LIGAND-BIASED SIGNALLING ON DRUG DISCOVERY

The observations summarized in the previous sections clearly demonstrate that compounds can have differential effects on the diverse signalling and regulatory repertoire of a single receptor. Thus, ligand efficacy can no longer be considered as an intrinsic property of a ligand/receptor couple, but must include the downstream effects being considered. This has obvious implications for the drug discovery process. At the conceptual level, it changes the perception of what proper target validation for drug discovery should be. Indeed, not only should the involvement of a given receptor into pathological and/or therapeutic processes be validated, but also as much information as possible about the pertinent signalling pathway(s) involved should be gained before initiating a search for a therapeutically active compound. Indeed, it is conceivable that the appropriate therapeutic action could be best reached by selectively modulating only a subset of a receptor signalling repertoire. Also, whether compounds uniformly activating (or inhibiting) the ensemble of the pertinent pathways or selectively modulating different subsets of the repertoire would be preferable, is a question that should probably be taken into consideration. Differentially activating or inhibiting specific signalling modalities could not only offer better therapeutic efficacies but also decrease the undesirable effects that could result from altering a pathway that is unrelated to the therapeutic process.

Drug discovery approaches that would consider the nature of the specific signalling output(s) to be targeted by the drug candidate dramatically contrasts with the dominant drug screening strategies currently used by pharmaceutical companies. In most cases, large

high throughput screening assays are based on a unique signalling output that is deemed universal and can be used for the largest possible number of targeted receptors. Although this approach is often successful in identifying useful biologically active ligands that can become drug leads, it limits our vision of compound efficacy to a single pathway that may or may not be related to the wanted therapeutic activity. As a result, compounds with the appropriate activity can either be missed or mislabelled with the wrong apparent efficacy for the clinically relevant pathway. It follows that the choice of the screening assays becomes a non trivial decision that should not be based only on practical considerations but should also try to link the postulated therapeutic mechanism to the screening assay mode. This presupposes considerable knowledge about the molecular basis of the pathological conditions to be treated, and about the relationships between specific signalling pathways and the ensuing physiological responses. Unfortunately, this level of knowledge is often not available at the time of initiating a screening campaign. Alternative solutions that could be considered to increase the chances of identifying compounds with the appropriate signalling efficacy are discussed below.

Given the rapid progress being made in the development of high content assay systems that permit the detection of several read-outs simultaneously [77-80], we can envisage that monitoring multiple signalling pathways into a single high throughput assay format will soon become feasible. Thus, multiplexing assays that can monitor the activities of the most relevant signalling pathways for a given receptor would offer a mean to identify a larger diversity of biologically active compounds in a single screen and to obtain a wealth of

information on their signalling activity profiles; information that could be used in later stages of the drug development by linking specific signalling activity profiles to potential therapeutic value. Despite the potential benefits of such an approach, the large computational and analysis power needed to integrate assay multiplexing into primary high throughput screening campaigns may be a limiting factor. Alternatively, the activity of hit compounds identified from generic high throughput screens based on a single signalling pathway could be at least tested for the other potentially pertinent signalling modalities in secondary screens, so to maximize the available information before they are processed further into structure function analysis and medicinal chemistry programs aimed at improving their potency and selectivity. Although this will complicate the simple linear structure-activity-relationship (SAR) analyses that are classically performed by medicinal chemists, it offers the potential for true mechanism-based drug discovery.

Since compounds must first bind to receptors and cause conformational changes to promote a response, alternative approaches based on the detection of these early events rather than downstream signalling could also be considered for high throughput primary screens. This would allow to identifying the subset of ligands that can modulate receptor conformation in an unbiased manner before assessing their signalling activities toward a panel of pathways deemed pertinent. In essence, using ligand binding assays in primary screens is based on this idea. However, the unavailability of readily usable labelled ligands for many receptors combined with the difficulties associated with the interpretation of competition binding assays, in particular for allosteric ligands, limit the general applicability of binding-based

screening. The recent development of assays that can directly monitor ligand-promoted conformational rearrangements of receptors using either purified proteins [81] or cell based systems [39] could offer interesting replacement approaches for classical binding assays. These tools would allow the detection of the conformational changes induced by most orthosteric and allosteric ligands, thus permitting a first selection of the potentially biologically active compounds before establishing their efficacy profiles in a variety of signalling assays.

Regardless of the strategies that will ultimately be chosen by the pharmaceutical industry, there is little doubt that the concept of ligand-biased signalling will sooner or later have a significant impact on the drug discovery process. Those who will find the most original solutions will certainly be the best positioned to harvest the fruits of this new paradigm.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

This work was supported by grants from the Canadian Institute for Health Research (CIHR) and the Quebec Heart and Stroke Foundation. G.O.-L. holds a studentship from the CIHR and M.B. holds a Canada Research Chair in Signal Transduction and Molecular Pharmacology. We are grateful to Dr. Monique Lagacé for her critical reading of the manuscript.

**GLOSSARY**

**Ligand-directed trafficking of receptor signalling, Functional selectivity, Biased agonism, Ligand-biased efficacy:** Those terms all refer to the ability of different ligands to induce/stabilize distinct receptor conformations that will lead to differential modulation of receptor activities (signalling, phosphorylation, internalization, etc).

**Collateral efficacy:** By opposition to linear efficacy, refers to the notion that every GPCR can engage several distinct effectors that can be independently modulated by different ligands.

**Orthosteric site:** The recognition site on a receptor to which the endogenous ligand binds.

**Allosteric site:** Any recognition site on a receptor that is distinct from the orthosteric site.

**Allosteric modulator:** Ligand that increases or decreases the efficacy and/or affinity of an orthosteric agonist or antagonist by binding to a distinct allosteric site on the receptor.

**Allosteric agonist:** Ligands that are able to directly activate a receptor by binding to a recognition domain distinct from the orthosteric site

**Inverse agonist:** Ligand that inhibit the spontaneous/constitutive activity of a receptor

**Neutral antagonist:** Ligand that block receptor response by competing with agonists or inverse agonists

**Spare receptors:** Refers to the notion that the full contingent of receptors does not need to be activated to promote the maximal response.



**Box 1****Possible Solutions to Take Advantage of Pluridimensionnal Efficacy in Drug  
Discovery**

- **Include knowledge about the signaling pathways pertinent to the therapeutic indication considered in the selection of the screening assay(s) to be performed.**
- **When possible, multiplex several assays covering a wide spectrum of the target's biological activity in the primary high throughput screening.**
- **When first screening with a generic screen targeting a single signaling pathway, include many secondary selective assays that cover the signaling repertoire of the target.**
- **In the future, develop generic conformational biosensors that would allow the identification of all compounds (orthosteric and allosteric) that can bind the receptor followed by their profiling through arrays of selective activity sorting assays.**

## REFERENCES

1. Clark, A.J. (1937) *General Pharmacology: Heffter's Handbuch d. exp. Pharmacology*. Springer
2. Clark, A.J. (1933) *The Mode Of Action Of Drugs On Cells*. Edward Arnold
3. Stephenson, R.P. (1956) A modification of receptor theory. *Br J Pharmacol Chemother* 11, 379-393
4. Lefkowitz, R.J. (2004) Historical review: a brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol Sci* 25, 413-422
5. Ariens, E.J., and De Groot, W.M. (1954) Affinity and intrinsic-activity in the theory of competitive inhibition. III. Homologous decamethonium-derivatives and succinylcholine-esters. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 99, 193-205
6. Chidiac, P., *et al.* (1994) Inverse agonist activity of beta-adrenergic antagonists. *Mol Pharmacol* 45, 490-499
7. Samama, P., *et al.* (1994) Negative antagonists promote an inactive conformation of the beta 2-adrenergic receptor. *Mol Pharmacol* 45, 390-394
8. Bond, R.A., and Ijzerman, A.P. (2006) Recent developments in constitutive receptor activity and inverse agonism, and their potential for GPCR drug discovery. *Trends Pharmacol Sci* 27, 92-96
9. Milligan, G. (2003) Constitutive activity and inverse agonists of G protein-coupled receptors: a current perspective. *Mol Pharmacol* 64, 1271-1276
10. Hermans, E. (2003) Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther* 99, 25-44
11. Laugwitz, K.L., *et al.* (1996) The human thyrotropin receptor: a heptahelical receptor capable of stimulating members of all four G protein families. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 116-120
12. Brady, A.E., and Limbird, L.E. (2002) G protein-coupled receptor interacting proteins: emerging roles in localization and signal transduction. *Cell Signal* 14, 297-309
13. Bockaert, J., *et al.* (2004) GPCR interacting proteins (GIP). *Pharmacol Ther* 103, 203-221

14. Dewire, S.M., *et al.* (2007) beta-Arrestins and Cell Signaling. *Annu Rev Physiol* 69, 483-510
15. Brink, C.B., *et al.* (2000) Agonist-directed trafficking of porcine alpha(2A)-adrenergic receptor signaling in Chinese hamster ovary cells: l-isoproterenol selectively activates G(s). *J Pharmacol Exp Ther* 294, 539-547
16. Berg, K.A., *et al.* (1998) Effector pathway-dependent relative efficacy at serotonin type 2A and 2C receptors: evidence for agonist-directed trafficking of receptor stimulus. *Mol Pharmacol* 54, 94-104
17. Spengler, D., *et al.* (1993) Differential signal transduction by five splice variants of the PACAP receptor. *Nature* 365, 170-175
18. Gay, E.A., *et al.* (2004) Functional selectivity of D2 receptor ligands in a Chinese hamster ovary hD2L cell line: evidence for induction of ligand-specific receptor states. *Mol Pharmacol* 66, 97-105
19. Shoemaker, J.L., *et al.* (2005) Agonist-directed trafficking of response by endocannabinoids acting at CB2 receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 315, 828-838
20. Kurrasch-Orbaugh, D.M., *et al.* (2003) Serotonin 5-hydroxytryptamine 2A receptor-coupled phospholipase C and phospholipase A2 signaling pathways have different receptor reserves. *J Pharmacol Exp Ther* 304, 229-237
21. McLaughlin, J.N., *et al.* (2005) Functional selectivity of G protein signaling by agonist peptides and thrombin for the protease-activated receptor-1. *J Biol Chem* 280, 25048-25059
22. Hall, D.A., *et al.* (1999) Signalling by CXC-chemokine receptors 1 and 2 expressed in CHO cells: a comparison of calcium mobilization, inhibition of adenylyl cyclase and stimulation of GTPgammaS binding induced by IL-8 and GROalpha. *Br J Pharmacol* 126, 810-818
23. Moniri, N.H., *et al.* (2004) Ligand-directed functional heterogeneity of histamine H1 receptors: novel dual-function ligands selectively activate and block H1-mediated phospholipase C and adenylyl cyclase signaling. *J Pharmacol Exp Ther* 311, 274-281

24. Krueger, K.M., *et al.* (2005) G protein-dependent pharmacology of histamine H3 receptor ligands: evidence for heterogeneous active state receptor conformations. *J Pharmacol Exp Ther* 314, 271-281
25. Eason, M.G., and Liggett, S.B. (1996) Chimeric mutagenesis of putative G-protein coupling domains of the alpha2A-adrenergic receptor. Localization of two redundant and fully competent gi coupling domains. *J Biol Chem* 271, 12826-12832
26. Kenakin, T. (2003) Ligand-selective receptor conformations revisited: the promise and the problem. *Trends Pharmacol Sci* 24, 346-354
27. Kenakin, T. (1995) Agonist-receptor efficacy. II. Agonist trafficking of receptor signals. *Trends Pharmacol Sci* 16, 232-238
28. Jarpe, M.B., *et al.* (1998) [D-Arg1,D-Phe5,D-Trp7,9,Leu11]Substance P acts as a biased agonist toward neuropeptide and chemokine receptors. *J Biol Chem* 273, 3097-3104
29. Urban, J.D., *et al.* (2007) Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther* 320, 1-13
30. Azzi, M., *et al.* (2003) Beta-arrestin-mediated activation of MAPK by inverse agonists reveals distinct active conformations for G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 11406-11411
31. Gbahou, F., *et al.* (2003) Protean agonism at histamine H3 receptors in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 11086-11091
32. Baker, J.G., *et al.* (2003) Agonist and inverse agonist actions of beta-blockers at the human beta 2-adrenoceptor provide evidence for agonist-directed signaling. *Mol Pharmacol* 64, 1357-1369
33. Audet, N., *et al.* (2005) Internalization and Src activity regulate the time course of ERK activation by delta opioid receptor ligands. *J Biol Chem* 280, 7808-7816
34. Werry, T.D., *et al.* (2005) Characterization of serotonin 5-HT2C receptor signaling to extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *J Neurochem* 93, 1603-1615
35. Galandrin, S., and Bouvier, M. (2006) Distinct signaling profiles of beta1 and beta2 adrenergic receptor ligands toward adenylyl cyclase and mitogen-activated protein kinase reveals the pluridimensionality of efficacy. *Mol Pharmacol* 70, 1575-1584

36. Gether, U., *et al.* (1995) Fluorescent labeling of purified beta 2 adrenergic receptor. Evidence for ligand-specific conformational changes. *J Biol Chem* 270, 28268-28275
37. Ghanouni, P., *et al.* (2001) Functionally different agonists induce distinct conformations in the G protein coupling domain of the beta 2 adrenergic receptor. *J Biol Chem* 276, 24433-24436
38. Vilardaga, J.P., *et al.* (2005) Molecular basis of inverse agonism in a G protein-coupled receptor. *Nat Chem Biol* 1, 25-28
39. Hoffmann, C., *et al.* (2005) A FIAsh-based FRET approach to determine G protein-coupled receptor activation in living cells. *Nat Methods* 2, 171-176
40. Gales, C., *et al.* (2005) Real-time monitoring of receptor and G-protein interactions in living cells. *Nat Methods* 2, 177-184
41. Gales, C., *et al.* (2006) Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes. *Nat Struct Mol Biol* 13, 778-786
42. Allouche, S., *et al.* (1999) Differential G-protein activation by alkaloid and peptide opioid agonists in the human neuroblastoma cell line SK-N-BE. *Biochem J* 342 ( Pt 1), 71-78
43. Mukhopadhyay, S., and Howlett, A.C. (2005) Chemically distinct ligands promote differential CB1 cannabinoid receptor-Gi protein interactions. *Mol Pharmacol* 67, 2016-2024
44. Cussac, D., *et al.* (2002) Differential activation of Gq/11 and Gi(3) proteins at 5-hydroxytryptamine(2C) receptors revealed by antibody capture assays: influence of receptor reserve and relationship to agonist-directed trafficking. *Mol Pharmacol* 62, 578-589
45. Gazi, L., *et al.* (2003) Functional coupling of the human dopamine D2 receptor with G alpha i1, G alpha i2, G alpha i3 and G alpha o G proteins: evidence for agonist regulation of G protein selectivity. *Br J Pharmacol* 138, 775-786
46. Stanasila, L., *et al.* (2000) Coupling efficacy and selectivity of the human mu-opioid receptor expressed as receptor-Galpha fusion proteins in Escherichia coli. *J Neurochem* 75, 1190-1199

47. Clark, M.J., *et al.* (2006) Comparison of the relative efficacy and potency of mu-opioid agonists to activate Galpha(i/o) proteins containing a pertussis toxin-insensitive mutation. *J Pharmacol Exp Ther* 317, 858-864
48. Lauckner, J.E., *et al.* (2005) The cannabinoid agonist WIN55,212-2 increases intracellular calcium via CB1 receptor coupling to Gq/11 G proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 19144-19149
49. Cordeaux, Y., *et al.* (2001) Agonist regulation of D(2) dopamine receptor/G protein interaction. Evidence for agonist selection of G protein subtype. *J Biol Chem* 276, 28667-28675
50. Watson, C., *et al.* (2000) The use of stimulus-biased assay systems to detect agonist-specific receptor active states: implications for the trafficking of receptor stimulus by agonists. *Mol Pharmacol* 58, 1230-1238
51. MacKinnon, A.C., *et al.* (2001) Bombesin and substance P analogues differentially regulate G-protein coupling to the bombesin receptor. Direct evidence for biased agonism. *J Biol Chem* 276, 28083-28091
52. Wenzel-Seifert, K., and Seifert, R. (2000) Molecular analysis of beta(2)-adrenoceptor coupling to G(s)-, G(i)-, and G(q)-proteins. *Mol Pharmacol* 58, 954-966
53. Wei, H., *et al.* (2003) 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* 100, 10782-10787
54. Charest, P.G., *et al.* (2007) The V2 vasopressin receptor stimulates ERK1/2 activity independently of heterotrimeric G protein signalling. *Cell Signal* 19, 32-41
55. Gesty-Palmer, D., *et al.* (2006) Distinct beta-arrestin- and G protein-dependent pathways for parathyroid hormone receptor-stimulated ERK1/2 activation. *J Biol Chem* 281, 10856-10864
56. Kenakin, T. (2005) New concepts in drug discovery: collateral efficacy and permissive antagonism. *Nat Rev Drug Discov* 4, 919-927
57. Thomas, W.G., *et al.* (2000) Agonist-induced phosphorylation of the angiotensin II (AT(1A)) receptor requires generation of a conformation that is distinct from the inositol phosphate-signaling state. *J Biol Chem* 275, 2893-2900

58. Stout, B.D., *et al.* (2002) Rapid desensitization of the serotonin(2C) receptor system: effector pathway and agonist dependence. *J Pharmacol Exp Ther* 302, 957-962
59. Blake, A.D., *et al.* (1997) Differential opioid agonist regulation of the mouse mu opioid receptor. *J Biol Chem* 272, 782-790
60. Chakrabarti, S., *et al.* (1998) Distinct differences between morphine- and [D-Ala<sup>2</sup>,N-MePhe<sup>4</sup>,Gly-ol<sup>5</sup>]-enkephalin-mu-opioid receptor complexes demonstrated by cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation. *J Neurochem* 71, 231-239
61. Kohout, T.A., *et al.* (2004) Differential desensitization, receptor phosphorylation, beta-arrestin recruitment, and ERK1/2 activation by the two endogenous ligands for the CC chemokine receptor 7. *J Biol Chem* 279, 23214-23222
62. Vigna, S.R. (2001) The N-terminal domain of substance P is required for complete homologous desensitization but not phosphorylation of the rat neurokinin-1 receptor. *Neuropeptides* 35, 24-31
63. Whistler, J.L., and von Zastrow, M. (1998) Morphine-activated opioid receptors elude desensitization by beta-arrestin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 9914-9919
64. Simmons, M.A. (2006) Functional selectivity of NK1 receptor signaling: peptide agonists can preferentially produce receptor activation or desensitization. *J Pharmacol Exp Ther* 319, 907-913
65. Gray, J.A., and Roth, B.L. (2001) Paradoxical trafficking and regulation of 5-HT(2A) receptors by agonists and antagonists. *Brain Res Bull* 56, 441-451
66. Roettger, B.F., *et al.* (1997) Antagonist-stimulated internalization of the G protein-coupled cholecystokinin receptor. *Mol Pharmacol* 51, 357-362
67. Bhowmick, N., *et al.* (1998) The endothelin subtype A receptor undergoes agonist- and antagonist-mediated internalization in the absence of signaling. *Endocrinology* 139, 3185-3192
68. Sneddon, W.B., *et al.* (2003) Activation-independent parathyroid hormone receptor internalization is regulated by NHERF1 (EBP50). *J Biol Chem* 278, 43787-43796
69. Pheng, L.H., *et al.* (2003) Agonist- and antagonist-induced sequestration/internalization of neuropeptide Y Y1 receptors in HEK293 cells. *Br J Pharmacol* 139, 695-704

70. Vila-Coro, A.J., *et al.* (1999) Characterization of RANTES- and aminooxypentane-RANTES-triggered desensitization signals reveals differences in recruitment of the G protein-coupled receptor complex. *J Immunol* 163, 3037-3044
71. Nickolls, S.A., *et al.* (2005) Functional selectivity of melanocortin 4 receptor peptide and nonpeptide agonists: evidence for ligand-specific conformational states. *J Pharmacol Exp Ther* 313, 1281-1288
72. Breit, A., *et al.* (2006) The natural inverse agonist agouti-related protein induces arrestin-mediated endocytosis of melanocortin-3 and -4 receptors. *J Biol Chem* 281, 37447-37456
73. Kenakin, T. (2002) Drug efficacy at G protein-coupled receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42, 349-379
74. Pierce, K.L., *et al.* (2001) New mechanisms in heptahelical receptor signaling to mitogen activated protein kinase cascades. *Oncogene* 20, 1532-1539
75. Whistler, J.L., *et al.* (1999) Functional dissociation of mu opioid receptor signaling and endocytosis: implications for the biology of opiate tolerance and addiction. *Neuron* 23, 737-746
76. Zhang, Y., *et al.* (2005) Allosteric potentiators of metabotropic glutamate receptor subtype 5 have differential effects on different signaling pathways in cortical astrocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 315, 1212-1219
77. Nolan, J.P., and Mandy, F. (2006) Multiplexed and microparticle-based analyses: quantitative tools for the large-scale analysis of biological systems. *Cytometry A* 69, 318-325
78. Waller, A., *et al.* (2004) Techniques: GPCR assembly, pharmacology and screening by flow cytometry. *Trends Pharmacol Sci* 25, 663-669
79. Kunkel, E.J., *et al.* (2004) Rapid structure-activity and selectivity analysis of kinase inhibitors by BioMAP analysis in complex human primary cell-based models. *Assay Drug Dev Technol* 2, 431-441
80. Kunkel, E.J., *et al.* (2004) An integrative biology approach for analysis of drug action in models of human vascular inflammation. *Faseb J* 18, 1279-1281



81. Kobilka, B.K., and Gether, U. (2002) Use of fluorescence spectroscopy to study conformational changes in the beta 2-adrenoceptor. *Methods Enzymol* 343, 170-182

**FIGURE LEGENDS**

**Figure 1.** Pleiotropic nature of GPCR signalling. **a)** Schematic representation of some of the effector pathways that are engaged by G protein-coupled receptors and the type of activity that they can regulate. Examples of such activities include modulation of G protein-dependent or independent signaling pathways, desensitization and endocytosis. **b)** Schematic representation of ligand-biased efficacy, where three different ligands can induce/stabilize different receptor conformations, each promoting distinct relative efficacies toward different effector systems.  $G\alpha s/i/o/12/13/q/11$ , heterotrimeric G protein alpha subunits of different classes; GRK, G protein receptor kinase;  $\beta$ arr, beta-arrestin; PKC, protein kinase C; PKA, cAMP dependent protein kinase; AP2, adaptor protein 2; Dyn, dynamin; Jak, Janus kinase; GIP, other GPCR interacting proteins; R, receptor; A, B and C, proteins or group of proteins implicated in a specific signalling pathway.

**Figure 2.** Pluridimensionality of ligand efficacy. Cartesian representation of compound efficacy profiles in three dimensions (x,y,z). Each axis represents a specific read-out for receptor activity. Example of how the pluridimensional activity of a given compound can be illustrated and described in the context of a cartesian representation. The compound illustrated possesses a positive efficacy for the read-out x (with a relative efficacy of 3), a positive efficacy for the read-out y (with a relative efficacy of 2) and a negative efficacy for the read-out z (with a relative efficacy of -2). The relative maximal efficacy (RE<sub>max</sub>) is determined for each read-out in relation to a full agonist (positive regulators) or a full inverse agonist (negative regulators) in this specific activity read-out. The global efficacy

of a compound can then be given by the cartesian coordinates describing its position in the pluridimensional activity space.

Fig. 1

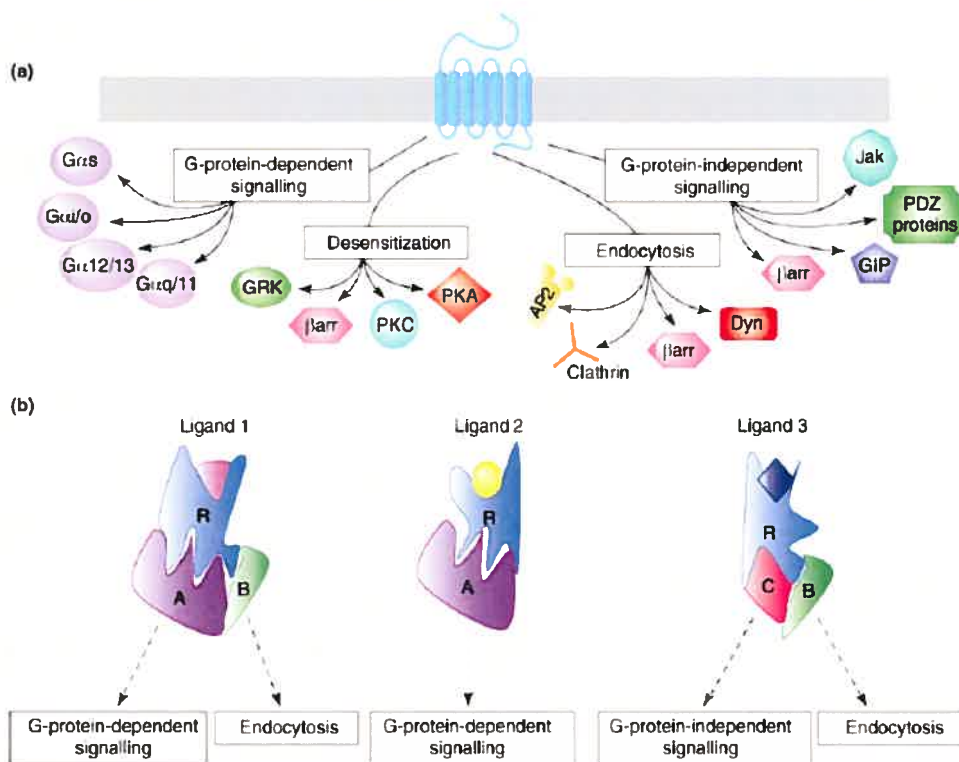


Fig. 2

